ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

IRAKLI HASTALARDAN İZOLE EDİLEN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* BAKTERİLERİNDE BİYOFİLM OLUŞUMUNDAN SORUMLU TSSC1 GENİNDE TİTANYUM NANOPARÇACIĞININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Ahmed Nafea Obaid OBAID

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2022

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Ahmed Nafea Obaid OBAID tarafından hazırlanan **"Iraklı Hastadan İzole Edilen Pseudomonas Aeruginosa Bakterilerinde Biyofilm Oluşumundan Sorumlu TSSC1 Geninde Titanyum Nanoparçacığının Değerlendirilmesi"** adlı tez çalışması 01/07/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Filiz SARIKAYA PEKACAR

Eş Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Lubna Muhi RASOUL

Jüri Üyeleri :

Başkan : Doç. Dr. Müslüm KUZU
Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı
Karabük Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Filiz SARIKAYA PEKACAR
Biyoloji Anabilim Dalı
Yıldız Teknik Üniversitesi

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

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. İbrahim ÇİFTÇİ

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum "**Iraklı Hastadan İzole Edilen Pseudomonas Aeruginosa Bakterilerinde Biyofilm Oluşumundan Sorumlu TSSC1 Geninde Titanyum Nanoparçacığının Değerlendirilmesi**" 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 (01/07/2022).

Ahmed Nafea Obaid OBAID

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

IRAKLI HASTALARDAN İZOLE EDİLEN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* BAKTERİLERİNDE BİYOFİLM OLUŞUMUNDAN SORUMLU TSSC1 GENİNDE TİTANYUM NANOPARÇACIĞININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Ahmed Nafea Obaid OBAID

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Filiz SARIKAYA PEKACAR
Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Lubna Muhi RASOUL

Çalışma, 5/10/2020 ile 15/1/2021 tarihleri arasındaki farklı yaşlardaki çeşitli klinik kaynaklardan ve Ramadi Eğitim Hastaneleri ve Heet General Hospital'dan 100 numunenin toplanmasını içermiştir. Mikroskopik ve biyokimyasal testler yapıldıktan sonra *Pseudomonas aeruginosa* izolatı elde edildi. En düşük inhibitör konsantrasyonlarının değerlerini belirlemek için Vitek kompakt sistem 2 cihazları kullanıldı. PCR kullanarak TSSC1 gen ekspresyonundaki değişikliği belirlenmiştir. Analiz edilen 100 Dermatit P. aeruginosa'dan, biyofilm üzerinde VITEK sistemi ve titanyum nanopartikül kombinasyonu ile biyokimyasal test kullanılarak tanımlandı. *P. aeruginosa* arasındaki TSSC1 sıklığı, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tekniği ile genetik olarak belirlendi. Titanyum nanoparçacığının biyofilm TiO_2 NP'leri üzerindeki etkisi ölçülmektedir. Bakteriyel büyümeyi engelleyebildiği ve 500 g/mL'de maksimum 14 mm inhibisyon alanı ve 100 g/mL'de en az 11 ve 12 mm inhibisyon alanı gözlenmiştir. Ayrıca virülans genlerinin prevalansı, en yüksek TSSC1 ve ardından TCC2 insidansını gösterdi (100%). Sonuç olarak, çalışma, virülans genlerinin prevalansının en yüksek TSSC1 insidansını (%100) gösterdiğini gösterdi ve sağlam pseudomonas biyofilminin çoğu antibiyotiğe karşı direnci arttırdığını doğruladı. Iraklı hastalarda biyofilm oluşumu üzerinde titanyum nanoparçacığının pozitif biyofilm fenotipi gösterdi.

2022, 72 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: Biyofilm, *P. Aeroginosa*, TSSC1 geni, Titanyum nanoparçacıklar

ABSTRACT

Master of Science Thesis

EVALUATION OF TITANIUM NANOPARTICLE ON TSSC1 GENE RESPONSIBLE FOR BIOFILM FORMATION IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* BACTERIA ISOLATED FROM IRAQI PATIENT

Ahmed Nafea Obaid OBAID

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

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Filiz SARIKAYA PEKACAR
Co-Advisor: Asst. Prof. Dr. Lubna Muhi RASOUL

The study included the collection of 100 samples from several clinical sources of different ages and for the period between 5/10/2020 to 15/1/2021 and from Ramadi Teaching Hospitals and Heet General Hospital. After performing microscopic and biochemical tests, an isolate of *Pseudomonas aeruginosa* was obtainedVitek compact system 2 devices was used to determine the values of the lowest inhibitory concentrations. Determination the change in TSSC1 gene expression by using PCR. Out of the 100 Dermatitis *P. aeruginosa* analyzed, were identified by using combination biochemical test and VITEK system and titanium nanoparticle on biofilm. The frequency of TSSC1 among *P. aeruginosa* was genetically determined by polymerase chain reaction (PCR) technique. The effect of titanium nanoparticle on biofilm TiO_2 NPs were capable of inhibition of bacterial growth and a maximum inhibition area of 14 mm at 500 g/mL and a minimum area of inhibition of 11 and 12 mm at 100 g/mL and were observed against strong and weak biofilm-producing the isolates of *P. aeruginosa*, respectively. Also the prevalence of virulence genes showed the highest incidence of TSSC1 and TCC2 (100%). In conclusion, the study showed that the prevalence of virulence genes showed the highest incidence of TSSC1 (100%) and confirmed that the robust pseudomonas biofilm has increased resistance to most antibiotics. And showed positive biofilm Phenotype of titanium nanoparticle on biofilm formation in Iraqi patients.

2022, 72 pages

Keywords: Biofilm, *P. Aeroginosa*, TSSC1 gene, Titanium nanoparticle

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Filiz SARIKAYA PEKACAR'a teşekkür ederek başlamak istiyorum. Bana her zaman çok güvendiniz ve her zaman çok sonu belli olmayan yolculuklarda kendi projelerimi geliştirmeme ve almama izin verdiniz. Tüm teşvik, destek, fikir, yazım düzeltmeleri ve beni doğru yola iletmek için her zaman oradaydınız.
Mükemmel tavsiye ve teşvik için eş danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Lubna Muhi RASOUL. Bilim söz konusu olduğunda çok heveslisiniz ve her zaman ilginç açılar ve fikirler buluyorsunuz.
Heet Hastanesi ve Al-Ramadi Eğitim Hastanesi'ndeki tüm meslektaşlarıma ve arkadaşlara çok teşekkür ederim. Projemde bana yardımcı oldular.
Sevgim, hayatı çok daha iyi hale getiren tüm aileme gidiyor! Her adımda yanımda olan babam, annem, erkek ve kız kardeşlerim, hayatımın hem düşük hem de yüksek noktalarımı paylaştıkları ve bana her zaman gerçekten neyin önemli olduğunu hatırlattıkları için.
Son olarak, bilimsel kariyerime devam etmem için bana güven ve destek veren eşime teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

Ahmed Nafea Obaid OBAID
Çankırı, Temmuz 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**
1.1 Çalışmanın Amacı **3**
2 LİTERATÜR ÖZETİ **4**
2.1 *Pseudomonas Aeruginosa* **4**
2.2 *P. aeruginosa* Virülans Mekanizması **6**
2.2.1 Patogenez **8**
2.3 *Psödomonal* Enfeksiyonda Biyofilm Oluşumu **9**
2.3.1 Biyofilm oluşumunun adımları **12**
2.3.2 Çoklu ilaç direnci (MDR) **13**
2.3.3 *Psödomonas aeruginosa'da* MDR mekanizması **15**
2.3.4 T6SS ve TSSC1 geni **17**
2.3.5 Biyofilm enfeksiyonunu ve nanopartikülleri tedavi etmek için terapötik seçenek **19**
3 MATERYAL VE METOT **26**
3.1 Hasta Seçimi **26**
3.2 Çalışmanın Tasarımı (Çalışma Protokolü) **26**
3.2.1 Malzemeler **27**
3.2.2 Reaktifler ve kimyasallar **27**
3.2.3 Vıtek® 2 sistemi **30**
3.2.4 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) malzemeleri **31**
3.3 Yöntemler **32**
3.3.1 Sterilizasyon yöntemleri **32**

3.3.2 Hazırlık ait ağar ve kültür medya 33
3.3.3 Bakım ortamı (izolatların depolanması) 36
3.3.4 Jel elektroforez tamponları 37
3.3.5 Numune koleksiyonu 37
3.3.6 *P. aeruginosa'nın* izolasyonu ve tanımlanması 37
3.3.7 Spesifik genlerin saptanması için *P. aeruginosa'nın* genotip tanımlaması 41
3.4 İstatistiksel Analiz 46
4 BULGULAR VE TARTIŞMA 47
4.1 Bulgular 47
4.1.1 *Pseudomonas aeruginosa* bakterilerinin teşhisi 47
4.1.2 Biyokimyasal testler 47
4.1.3 Antibiyotik Gram negatif izolat duyarlılık testi 48
4.1.4 Vitek2 kompakt sistem kullanılarak antibiyotiklerin minimum inhibitör konsantrasyonunun (MIC) değerinin belirlenmesi 50
4.1.5 Biyofilm üretiminin tespiti 52
4.1.6 TiO_2 NP'lerinin *P. aeruginosa'*a karşı antimikrobiyal aktivitesi 53
4.1.7 Hedef genin *pseudomonas aeruginosa* üzerindeki etkisi 53
4.2 Tartışma 56
5 SONUÇ VE ÖNERİLER 59
5.1 Tavsiye 59
5.2 Etik Düşünceler 59
KAYNAKLAR 60
EKLER 67
ÖZGEÇMİŞ 72

SİMGELER DİZİNİ

°C	Santigrat derece
g	Gram
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
ng	Nanogram
nm	Nanometre
µL	Mikrolitre
µmol	Mikromol

KISALTMALAR DİZİNİ

DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilen diamin tetra asetat
EMB	Eozin Metilen Mavisi
MARSA	Metisiline dirençli *Staphylococcus Aureus*
MDR	Çoklu ilaç direnci
MIC	Minimum inhibitör konsantrasyonu
NP	Nanopartiküller
P. aeruginosa	*Pseudomonas aeruginosa*
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
QS	Quorum algılama sistemleri
TBE	Tris borat EDTA
Ti NP'ler	Titanyum nanopartiküller
TSI	Üçlü demir şeker
XDR	İlaca büyük ölçüde dirençli

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 *P. aeruginosa*'nin temel yapısını gösteren diyagram 5
Şekil 2.2 Bakteriyel ilaç akış pompasının üç bileşeni ve hücre zarı bileşeni 5
Şekil 2.3 *Psödomonal* virülans faktörü ve bunların salgılanması 7
Şekil 2.4 Üç quorum algılama sistemi (Yan and Wu 2019) 10
Şekil 2.5 Mikroskop altında biyofilm oluşumunun adımları 13
Şekil 2.6 *P. aeruginosa*'nin üç mekanizması için MDR 17
Şekil 2.7 T6SS oluşumundan sorumlu gen kümesi (Zoued *et al.* 2013) 18
Şekil 2.8 Biyofilm üzerindeki NP etkisinin mekanizması 23
Şekil 2.9 TiO_2'nin biyofilm üzerindeki etkisi (Jalvo *et al.* 2017) 25
Şekil 4.1 *P. aeruginosa*'daki varyans geninin yayılması 54
Şekil 4.2 *P. aeruginosa*'daki virülans geninin PCR ürün bantlarının saptanması 55
Şekil 4.3 TiO_2 tedavisinden önce ve sonra *P. aeruginosa*'daki virülans genlerinin PCR amplifikasyonu 56
Şekil 4.4 TiO_2 nanopartiküller hedef gen o ene ifadesi N *P. aeruginosa* ve TiO_2 tedavisi üzerine etkisi 56

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 MDR olan en yaygın mikroorganizma, dirençli ilaç ve tedavi sırasında MDR'nin en sık geliştiği hastalık 14
Çizelge 3.1 Ekipman ve aparatlar 27
Çizelge 3.2 Reaktifler ve kimyasallar 28
Çizelge 3.3 Çalışmada kültür ortamı kullanımı 30
Çizelge 3.4 DNA ekstraksiyonu için presto™ mini gDNA bakteri kiti 31
Çizelge 3.5 Primer sıralama listesi 32
Çizelge 3.6 Master mix açıklaması 32
Çizelge 3.7 PCR primer dizisi ve PCR ürünlerinin moleküler boyutu 44
Çizelge 3.8 Biyofilm oluşturmak 45
Çizelge 4.1 *Pseudomonas aeruginosa* bakterilerinin morfolojik ve biyokimyasal testleri 48
Çizelge 4.2 Gram negatif bakteri izolatlarının antibiyotik duyarlılık testi 49
Çizelge 4.3 Pseudomonas aeruginosa izolatları için antibiyotiklerin minimum inhibitör konsantrasyonuna direnç ve duyarlılık yüzdeleri 51
Çizelge 4.4 TiO_2 NP'lerinin biyofilm üreten *pseudomonas*'lara karşı inhibisyon bölgesi 53

1 GİRİŞ

İnsan sağlığının ve yaşam kalitesinin iyileştirilmesi, farklı hastalık türlerinden etkilenen sağlık hizmeti sağlayıcısının ana hedeflerinden biridir.

TSSC1 Geni, önemli bir tümör baskılayıcı gen bölgesi olan 11p15,5'in damgalanmış gen alanında yer alan birkaç tümör baskılayıcı alt aktarılabilir parçadan biri olarak rapor edilmiştir. Bu bölgedeki değişiklikler Beckwith-Wiedemann sendromu, Wilms tümörü, rabdomiyosarkom, adrenokortikal karsinom ve akciğer, yumurtalık ve meme kanseri ile ilişkilendirilmiştir. Bu genin genomik dizi verilerine göre düzenlenmesi, bu genin 11. kromozom yerine 2. kromozom üzerinde yaşadığını göstermektedir (GeneCards 2015).

Enfeksiyon, bakteri, virüs ve parazitleri içeren canlı dokuya mikroorganizmaların (tek tip veya çoklu tipler) istilasını tanımlamak için kullanılan bir terimdir.

Geçtiğimiz yüzyıllarda her bir patojen tipinin çeşitlilik yüzdeleri ile morbidite ve mortalitede bulaşıcı hastalıkların büyük katkısı olmuştur. Veba, çiçek hastalığı, kolera, grip gibi çok sayıda pandemi milyonlarca insanın ölümüne neden olmuş ve 47 yıl olan ortalama yaşam beklentisini azaltmıştır (erkekler ve kadınlar için sırasıyla 46 ve 48 yıl).

Bakteriyel enfeksiyon, çoğu zararsız olmasına ve insan gastrointestinal sistemi, derisi, üreme sistemi ve diğerleri içinde yaygın olarak yayılmasına rağmen, enfeksiyonun en yaygın nedenlerinden biri olarak kabul edilir.

Deri enfeksiyonları, alttaki yumuşak dokulara uzanabilen deri katmanlarının mikrobiyal istilası olarak tanımlanabilir. Enfeksiyon piyoderma kadar hafif veya nekrotizan fasiit gibi hayatı tehdit eden enfeksiyonlar olabilir. Çoğu cilt enfeksiyonu basittir, antibiyotik kullanımı gerektirmez (topikal), ancak topikal AB gerektiren impetigo ve folikülit veya türleri drenaj veya eksizyon gerektirebilir (Sukumaran and Senanayake 2016).

Şüphesiz Sir Alexander Fleming'in ilk antibiyotiği keşfetmesi (penisilin 1928'de keşfi) ve diğer keşif, bulaşıcı hastalıkların genel sağlık üzerindeki etkisini azaltmakta ve yaşam beklentisini 78,8 yıla çıkarmaktadır ve kanser, bağışıklığı baskılanmış hastalar ve yaşlılar olarak önde gelen ölüm nedenleri kronik hastalıklara aittir.

AB kullanımının artması, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Escherichia coli* (*E. coli*) ve *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) gibi çoklu ilaca dirençli ve dezenfektanlara dirençli bazı bulaşıcı hastalığın neden olduğu morbidite ve mortaliteyi artıran mikrobiyal patojenlerin ortaya çıkmasına neden olur (Liu *et al.* 2017).

P. seudomonas cilt enfeksiyonu, özellikle bağışıklığı zayıf olan hastalarda, diğer patojen tipleriyle enfeksiyondan çok daha fazla komplikasyon taşıyan ve tedavisi zor olan en yaygın cilt enfeksiyonunu temsil eder (Bassetti *et al.* 2018). Biyofilm oluşumu, mikroorganizmanın ilaca direnç geliştirmek için kullandığı mekanizmalardan biridir. Antimikrobiyal ilaca veya eradikasyon yöntemlerine karşı yüksek direnç gösteren mikroorganizmanın biyotik veya abiyotik yüzeyde toplanmasını içerir.

Tıbbi cihazlara genellikle damar içi kateterler, damar protezleri, protez kalp kapakçıkları, idrar sondaları, eklem protezleri, kalp pilleri ve kontakt lensler gibi bir enfeksiyon türü bulaşır. Biyofilmler diş çürüğü, periodontitis, kistik fibroz (KF) hastaları, doğal kapak endokarditi, kronik otitis media ve kronik yara enfeksiyonunda bulunabilir.

Titanyum dioksit (TiO_2), fotokatalitik yapısı ve kimyasal olarak kararlı, toksik olmayan, ucuz ve genellikle güvenli (GRAS) olarak kabul edilen bir madde olması nedeniyle çekici bir antimikrobiyal bileşik olarak kabul edilmiştir. Birkaç çalışma, bu metal oksidin, hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilerin geniş bir yelpazesine karşı mükemmel antifungal ve antibakteriyel özellikler gösterdiğini ortaya koymuştur.

Bir nanoparçacık veya ultra ince parçacık, genellikle çapı 1 ile 100 nm arasında olan bir madde parçacığı olarak tanımlanır. Nanopartiküller genellikle mikropartiküllerden (1-1000 μm), "ince partiküllerden" (100 ile 2500 nm arasında) ve "kaba partiküllerden"

(2500 ile 10,000 nm arasında değişen) ayrılırlar, çünkü daha küçük boyutları çok farklı fiziksel veya kimyasal özellikleri harekete geçirir. Örneğin kolloidal özellikler ve optik veya elektriksel özellikler. Nanopartiküller doğada yaygın olarak bulunur ve kimya, fizik, jeoloji ve biyoloji gibi birçok bilim dalının çalışma nesneleridir. Dökme malzemeler ile atomik veya moleküler yapılar arasındaki geçişte olduklarından, genellikle her iki ölçekte de gözlemlenmeyen fenomenler sergilerler (Vert *et al.* 2012).

1.1 Çalışmanın Amacı

Titanyum *P. Aeruginosa* bakterilerinin yayılmasını önler ve sınırlanmasına katkıda bulunur, Deri enfeksiyonunda *P. aeruginosa* insidansını belirleme, Iraklı hastalarda titanyum nanopartikülün biyofilm oluşumuna etkisini bulma ve PCR ile TSSC1 gen ekspresyonundaki değişikliği belirleme.

1. *Pseudomonas aeruginosa*'nın deri enfeksiyonundan izolasyonu ve karakterizasyonu,
2. *Pseudomonas aeruginosa* sıklığını, biyofilm oluşturma yeteneğini ve biyofilm oluşturan izolatların antibiyotik duyarlılığını değerlendirmek için çoklu ilaca dirençli ve biyofilm oluşum izolatlarının taranması,
3. Titanyum nanopartiküllerin *p. aeruginosa* 'da biyofilm oluşumundan sorumlu tssc1 geni üzerindeki etkisini incelemek,
4. Tssc1 gen ekspresyonundaki değişimi PCR ile belirleme.

2 LİTERATÜR ÖZETİ

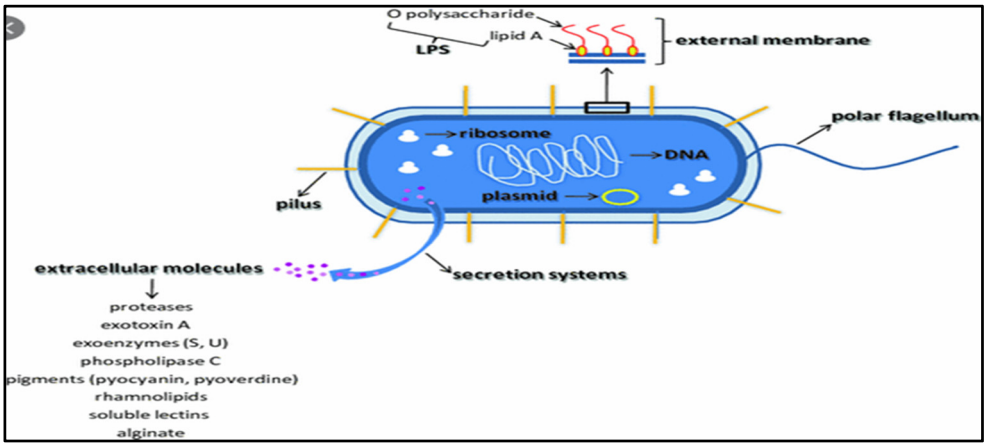
2.1 *Pseudomonas Aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa, insan vücudunun hemen hemen her yerinde enfeksiyona neden olan. Gram negatif çubuk şeklindeki özellikle bağışıklık sistemi zayıf hastalarda fırsatçı enfeksiyonlar olarak farklı mekanizmalarla yok edilen ve yanık yaraları gibi normal bariyerler veya ileri evrelerde KOAH veya kistik fibroz gibi epitel bozukluğu olan hastalarda baş gösteren bir bakteri türüdür. *P. aeruginosa* bakterileri ile enfeksiyon, diğer bakteriyel enfeksiyonlara kıyasla daha yüksek ölüm oranlarına sahiptir (Lee *et al.* 2007).

Ancak 1970 yılında anti psödomonal aktiviteye sahip antibiyotiğin kullanılmaya başlanması, immün sistemi baskılanmış hastalarda enfeksiyon oranını azaltmıştır. Buna rağmen bu tip bakteriler nötropenik ateş hastasında klebsiella pneumoniae ve escherichia coli'den sonra gram negatif bakteri olarak. Bakteriyemi nedeni olarak kabul edilmektedir (Kim *et al.* 2017).

Pseudomonas türleri normalde toprakta, suda ve bitki örtüsünde bulunur ve sağlıklı kişilerin derisinden, boğazından ve dışkısından izole edilebilir. Hastane gıdaları, lavabolar, musluklar, paspaslar ve solunum ekipmanı olarak hastanede kolonize olma eğilimindedirler ve bir hastadan diğerine fomitlerle temas veya kontamine yiyecek ve suyun yutulması yoluyla yayılırlar.

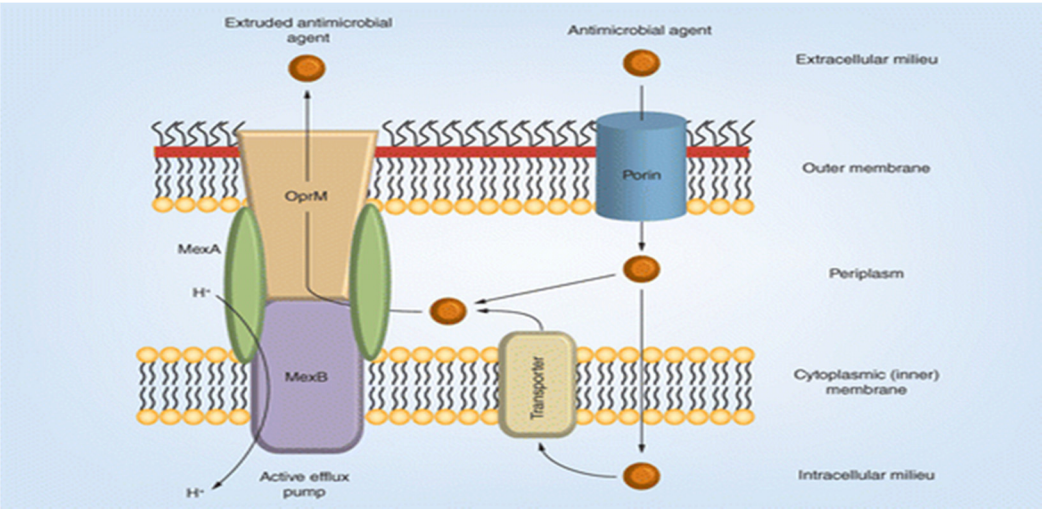
Pseudomonas aeruginosa, 0,5 ila 0,8, µm x 1,5 ila 3,0 µm boyutlarında, *Pseudomonas* cinsinin en yaygın çalışılan baharat türünü temsil eder. Şekil 2.1 *P. aeruginosa*'nın temel yapısını göstermektedir. Tek bir polar kamçı ile hareket eden diğer suşlar, ısıya dayanıklı antijenlere (H antijeni) sahip iki veya üç kamçıya sahiptir. Diğer gram negatif bakterilerde bulunan zara benzer bir sitoplazmik zar üç katmandan oluşur: simetrik dış (fosfolipitten oluşur), protein ve lipopolisakkarit) ve seçici geçirgenlikten (AB geçişini önler) ve değişim bariyerinden sorumlu asimetrik iç (peptidoglikan).



Şekil 2.1 *P. aeruginosa*'nin temel yapısını gösteren diyagram

P. aeruginosa'nin LPS'si, yan zincir ve çekirdek polisakkaritlere ek olarak heptoz, 2-keto-3-deoksioktonik asit ve hidroksi yağ asitlerinden oluşan diğer Gram-negatif çubuklar LPS'den daha az toksik olma eğilimindedir.

Besinlerin değişimi, gözenekler şekil ve işlev olarak porin adı verilen dış zardaki kanallar aracılığıyla gerçekleşir (Nakae 1976). Farklı porin aileleri, OmpA ailesinin yapısal porinleri, OmpW ailesinin küçük porinleri (8 β-yaprak) ve 18 β- ile daha büyük difüzyon porinleri vardır. Şekil 2.2 Bakteriyel ilaç akış pompasının üç bileşeni ve hücre zarı bileşenini göstermektedir.



Şekil 2.2 Bakteriyel ilaç akış pompasının üç bileşeni ve hücre zarı bileşeni

Bakteriler, fermentasyondan ziyade karbonhidratların oksidasyonundan enerji alan fermentatif olmayan bir aerobdur. Yalnızca karbon için asetat ve nitrojen için amonyum sülfat sağlayan ortamlarda iyi büyüyebilir. Aerob bakteri olmanın yanı sıra, nitratı elektron alıcısı olarak kullanarak anaerobik olarak büyüyebilir. Bu organizma, yüksek konsantrasyonlarda tuz, boya, zayıf antiseptikler, yaygın olarak kullanılan antibiyotikler ve diğer birçok maddeye karşı direnç gösterme yeteneği ile (yavaşça) veya daha yüksek veya daha düşük sıcaklıklarda hayatta kalabilmesine rağmen 25°C ila 37°C sıcaklık aralığında büyüyebilir.

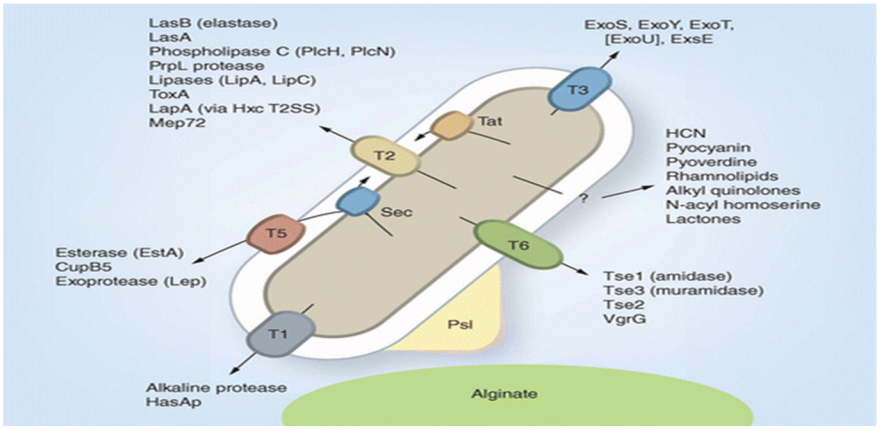
Bu özelliklerin çoğu, *Pseudomonas aeruginosa*'nın hastane kaynaklı pnömoni (HAP), kan dolaşımı, idrar yolu, yara ve yanık enfeksiyonları dahil olmak üzere hastane enfeksiyonlarının en önde gelen nedenlerinden biri olmasının nedenini açıklamaktadır (Stryjewski and Sexton 2003).

2.2 *P. aeruginosa* Virülans Mekanizması

P. aeruginosa dokuyu istila eder ve bunların birçoğunun hala gizemini koruyan varyant mekanizma ile epitelyal ve endotelyal bariyerleri kırar. Patojen, daha önce bahsedildiği gibi kistik fibroz (KF) ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH, GOLD evre III-IV) gibi kronik akciğer hastalıklarında morbidite ve mortaliteyi artıran fırsatçı bir patojen olarak kabul edilir ve antibiyotik geliştirerek direnç enfeksiyonu ve bu hastalarda biyofilm oluşturma yeteneği kronik bir enfeksiyona neden olur, *P. aeruginosa* virülans mekanizması Şekil 2.3'de gösterilmiştir.

P. aeruginosa pili, lipopolisakkarit (LPS), hücre dışı enzimler, eksotoksinler, flagellum, tip IV Pili, tip III salgılama sistemi, eksotoksin A, proteazlar, aljinat, çekirdek algılama, biyofilm oluşumu, sistemler, oksidan oluşumu gibi birçok virülans ve hastalığın erken enfeksiyon evrelerinde konakçı içinde hayatta kalmaya yardımcı olan piyosiyanin ve proteazları elastaz ve alkalin proteaz (AprA) dahil olmak üzere toksinlerin ve virülans faktörlerinin salgılanması olarak konakçı hücrede patojenin hayatta kalmasını destekleyen beş tip salgılama sistemi (TSS) faktörüne sahiptir (Rada and Leto 2013). Bu

virülansın üretimi enfeksiyonun sonraki aşamalarında azalır, bu da kronik enfeksiyondaki rollerinin tam olarak anlaşılmamasını sağlar.



Şekil 2.3 *Psödomonal* virülans faktörü ve bunların salgılanması

LPS, *P. aeruginosa*'nın dış zarının ana bileşenidir ve lipid A veya tekrarlanmayan çekirdek oligosakarit olan endotoksin (hidrofobik bileşen) ve bir distal polisakaritten (veya O-antijenden) oluşur, bu kısım aşağıdakilerin aktivasyonu ile hareket eder. konağın doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık tepkileri, ve düzensiz inflamatuar yanıtlara neden olur.

Piyosiyanin, hücresel yaşlanmaya, siliyer diskineziye neden olabilen, IL-8 ekspresyonunu artıran ve insan akciğer epitel hücrelerinde kalsiyum homeostazını bozan redoks aktif bir toksindir. Buna ek olarak pyosiyanin α1-antitripsin enzimini inaktive ederek kistik fibrozisli akciğer hastalarında zaten bulunan proteaz-antiproteaz dengesizliğini arttırır.

Tip IV pili, hücresel yapışmayı içerirken, flagellum, kemotaksi ve yapışma için olduğu kadar hareketlilik için de önemlidir (Haiko and Westerlund-Wikström 2013).

'Efektör' proteinleri hücre dışı ortama veya hedef konakçı hücrelere ihraç etmekten sorumlu olan gram-negatif bakterilerde bulunan yedi farklı TSS. T1SS, T2SS, T3SS,

T5SS ve T6SS olmak üzere 6 tanesi *P. aeruginosa'da bulunabilir*. T2SS ve T3SS'nin ana virülans faktörleri olarak kabul edildiği.

T2SS, eksotoksin A, LasA ve LasB proteazlar, tip IV proteaz, lipolitik enzimler ve fosfolipaz H üreten multiprotein salgılarından oluşur, ekzotoksin A, pilus benzeri bir aparat kullanarak lipaz, fosfolipaz, alkalin fosfataz ve proteazı salgılamak için doku üzerinde lokal olarak etki eder. hücre dışı kısım.

Arasında T3SS *P. aeruginosa* ayrıntılı ve exoto oluşumu ile, konakçı hücre membranı penetrasyon düzenleyen, 36 gen oluşan EXOS, exot, ExoU ve ExoY: xin. Bu toksinler, doğrudan kamçı-bazal-vücut ile ilgili bir sistemden, fagositozdan kaçınmayı ve konakçı dokulara zarar vermeyi kolaylaştıran konakçı hücrelerin sitozolüne iletilir.

Çekirdek algılama, bakteriyel hücreden hücreye iletişimin yayılabilir kimyasal bileşikler yoluyla gerçekleştiği başka bir virülans mekanizmasıdır. Bu sistem, otoindükleyiciyi yeterli miktarda üretmek için gereklidir ve bu molekül, gen aktivasyonu olmak üzere biyofilm oluşumu için gerekli olan büyük bir regulonun ekspresyonunu tetikleyerek hareket eder.

2.2.1 Patogenez

Pseudomonas aeruginosa'nın patojenitesi, virülans faktörü olarak işlev gören çok çeşitli ürün faktörü ile ilgilidir.

Hemen hemen tüm *P. aeruginosa* suşlarının hemolitik etkisi. L-ramnoz ve 1-β-hidroksidekenoik asit olmak üzere iki bileşenden oluşan ısıya dayanıklı hemolitik glikolipid molekülü ile ilgili birçok çalışmada tanımlanmıştır. Hemolitik glikolipidler, P aeruginosa pulmoner enfeksiyonlarına bağlı alveolar makrofajlar için toksiktir.

Bu moleküllerin diğer etkisi, fosfolipaz C'ye benzer ve *P. aeruginosa*'nın tüm klinik suşlarının yaklaşık yüzde 70'i tarafından üretilen ısıya dayanıksız protein hemolizinler tarafından Lesitin'i hidrolize etme yeteneğidir (Gellatly and Hancock 2013).

Lökositin, bazı P. aeruginosa suşları tarafından üretilen ve lökositleri parçalayarak etki eden ve lenfositlere ve çeşitli doku kültürü hücrelerine zarar verebilen termoslabil bir proteindir, ancak lökositinin rolü bilinmemektedir.

Üretilen hücre dışı polisakkaritler, kronik akciğer enfeksiyonlarının patogenezinde rol oynarlar, fagositozu engellemedeki rolleri ve antibiyotiklerin difüzyonunu bozmaları ve böylece kolonizasyon ve kalıcılığı kolaylaştırmaları konusunda önerilerde bulunulmuştur.

P. aeruginosa suşlarının yaklaşık %90'ı hücre dışı proteaz, optimum pH'ları, izoelektrik noktaları ve substrat özgüllükleri bakımından farklılık gösteren 3 farklı proteaz türü üretir. Hepsi kazeini sindirebilir, ancak sadece proteaz II elastini sindirebilir. Hayvanların derileri üzerinde yapılan deneyler, bu proteazların deriye enjekte edilmesiyle hemorajik lezyonların oluştuğunu ve 24 saat içinde nekrotik hale geldiğini göstermiştir.

Hayvan gözlerinin korneasına veya tavşan akciğerlerine proteazların enjeksiyonu, P'ye eşlik eden yıkım etkisi ile bağlantılı olan hızlı doku yıkımına neden olur. *P. aeruginosa*'nın göze veya akciğere enfeksiyonu.

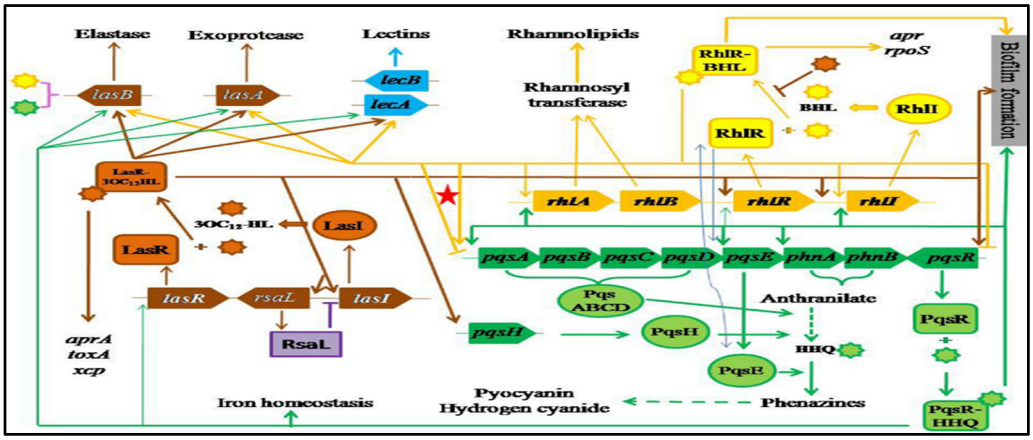
2.3 *Psödomonal* Enfeksiyonda Biyofilm Oluşumu

Pseudomonas aeruginosa enfeksiyonunu tedavi etmeyi zorlaştıran ve fırsatçı enfeksiyonlar olarak ortaya çıkma eğiliminde olan önemli özelliklerden biri, biyofilm oluşturma ve sürdürme yükümlülüğüdür.

Biyofilmler, kendi ürettiği hücre dışı biyopolimer matrisinde (örneğin, DNA, lipidler, proteinler ve polisakaritler) kolonize olan mikroorganizmaların bir araya gelmesi olarak

tanımlanır, ancak esas olarak proteinlerden oluşur ve organizmanın biyofilm yüzeyinde yaşamasını sağlar. bakteri planktonik yaşam modundan dönüşür. Bakteriyel biyofilmler esas olarak kronik enfeksiyonlarla ilişkilidir ve tekrarlayan ve devam eden patolojilerin bir işareti olabilir.

Planktonikten geçiş, esas olarak, bileşiminin büyüme koşullarına ve biyofilmin yaşına bağlı olduğu hücre dışı matrisin üretimine ve yapışmalarına, algılama sistemleri ve antibiyotikler, pigmentler ve sideroforlar gibi çevresel ipuçları üzerinde Las ve Rhl quorum tarafından üretilen hücreden hücreye sinyalleme ile geçişin başlangıçlarına bağlıdır. Biyofilmlerde yaşayan bakteriler, konakçı bağışıklık sistemine daha az duyarlı olma eğilimindedir ve antibiyotik tedavisine daha dirençlidir ve bu da yok edilmesini zorlaştırır. Şekil 2.4'te üç çekirdek algılama sistemi gösterilmektedir.



Şekil 2.4 Üç quorum algılama sistemi (Yan and Wu 2019)

P. aeruginosa biyofilm oluşumu düzenlemesi çok faktörlüdür, yüksek oranda çekirdek algılama sistemlerine (QS), iki bileşenli düzenleyici sistemler GacS/GacA ve RetS/LadS, ekzopolisakkaritler ve c-di-GMP'ye bağlıdır.

QS, birçok bakteri türü tarafından, otoindükleyiciler olarak adlandırılan küçük zarda dağılabilen moleküllerin aracılık ettiği çevresel değişikliklere hücresel adaptasyonu koordine etmek için kullanılır. Yeterli bir eşik için bu moleküllerin konsantrasyonunu

artırmak hareket özel genleri transkripsiyonel olarak. Otoindükleyici konsantrasyonu, bakteri konsantrasyonu ile orantılıdır.

*P. aeruginosa'*da bulunan, olgun ve farklılaşmış biyofilmlerin oluşumuna katkıda bulunan LasI-LasR, RhlI-RhlR ve PQS-MvfR olan üç ana çekirdek algılama sistemi.

QS sistemi *P.seudomonas aeruginos.* Üç otoindükleyici üretir. Asil homoserin laktonlar (AHL'ler), LasI AHL sentazı tarafından üretilen ve LasR transkripsiyonel aktivatör faktörü üzerinde hareket eden ilk otoindükleyicidir. İkincisi, RhlI AHL sentazı tarafından üretilen ve RhlR transkripsiyonel aktivatörü üzerinde etkili olan butiril homoserin laktondur (C4 HSL). Üçüncüsü, karmaşık çok aşamalı bir işlemle sentezlenen bir 2-heptil-3-hidroksi-4-kinolondur.

P. aeruginosa biyofilminde kullanılan ekzopolisakkaritler, biyofilm yapısının stabilizasyonundan sorumlu olan aljinat, Pel ve Psl'yi içerir, oluşumunda eksik olan mutantlar biyofilm oluşturma yeteneklerini kaybetmişlerdir.

Elektron mikroskobu altında, hücre dışı matris, hücre yüzeylerine bağlı ve geniş ağlar oluşturmak üzere gerilmiş doğrusal veya dallı uzun iplikler gibi görünür. Ekzopolisakkaritler, diğer karbonhidratların, proteinlerin, nükleik asitlerin ve lipidlerin yapışması için iskele görevi görür. Mannoz, galaktoz ve glikoz en bol bulunan karbonhidratlardır, bunu N-asetil-glukozamin, galakturonik asit, arabinoz, fukoz, ramnoz ve ksiloz takip eder. Bu ekzopolisakkaritler biyofilme özgü değildir; *P. aeruginosa'da* aljinat sentezi gibi stres tepkisine tepki olarak üretimleri artar.

KF'li hastaların akciğerlerinden izole edilen mukoid suşlar tarafından aşırı üretilen akciğerde biyofilm oluşumuna katılan aljinat, biyofilm oluşumunda yer almaz, ancak kronik enfeksiyonlarda esastır, hücreleri siprofloksasin, gentamisin gibi antibiyotiklerden koruyarak, tikarsilin ve seftazidim ve konakçı bağışıklık tepkisini baskılar. Çoğu suş tarafından üretilen Pel polisakarit, Pel ve Psl, biyofilm olgunlaşması için önemlidir. LasI–

LasR kahverengi renkli öğelerdir, RhlI-RhlR sarı renkli öğelerdir ve Pseudomonas kinolon sinyaline (PQS) dayalı QS yeşil renkli öğelerdir.

2.3.1 Biyofilm oluşumunun adımları

Farklı gen setlerinin transkripsiyonuna ihtiyaç duyan mikroorganizma hücreleri arasında, çekirdek algılama olarak bilinen özel bir sinyalleme türünü içeren çeşitli aşamalardan oluşan biyofilm oluşumu. Mikro kolonileri ayıran ve oksijenin yanı sıra besin ve atık ürünlerin taşınmasından sorumlu kanallar içerir.

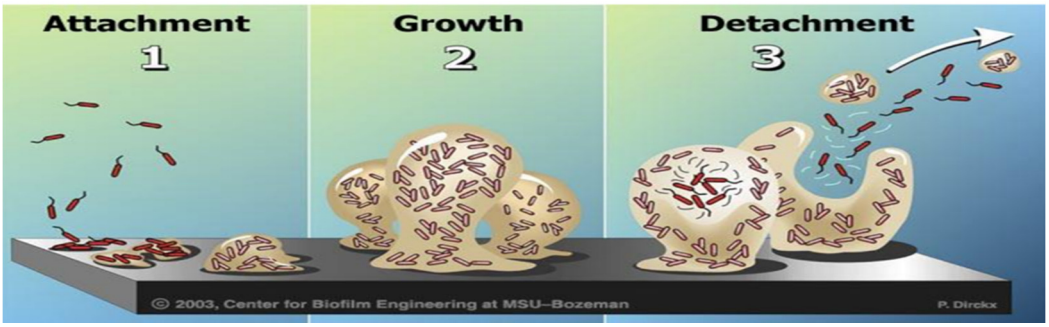
Biyofilmin stabilitesi, EPS matrisinin viskoelastik özelliklerine atfedilir. Aşamalarda meydana gelen biyofilm oluşumu şunları içeriyordu: yüzeyle ilk temas/ bağlanma, ardından mikro koloni oluşumu, biyofilm mimarisinin olgunlaşması ve oluşumu ve son olarak biyofilmin ayrılması/dağılması.

Bağlanmaya hücre dışı uzantılar aracılık eder, tip IV pili ve flagella gibi, bağlanma fiziksel kuvvetlerin etkisiyle gerçekleşebilir. Bu uzantılar, bakteri ile tutunma yüzeyi arasındaki tutunma ve etkileşime güç verir, hidrofobiklik, bakteri ve yüzey arasındaki tutarsızlık kuvvetini azaltarak bağlanmanın gücünü arttırır (Tribedi and Sil 2014).

Bağlanma adımı iki aşamalı süreç olarak kategorize edilebilir: ilk tersinir bağlama ve tersinmez bağlama. Daha güçlü fiziksel veya kimyasal kesme kuvvetlerinin tolerans yeteneği ile karakterize edilen tersinmez bağlı biyofilm. İlk bağlanma, flagella ve tip IV pili aracılı motiliteler önemli faktörlerdir, flagella eksikliği olan mutantlar yüzeylerin bağlanmasına izin vermez ve tip IV pili eksikliği olan mutantlar mikro koloniler oluşturmaz (Rabin *et al.* 2015).

EPS matrisi ürettiğinde, bağlanma aşamasının geri döndürülemez olduğu anlamına gelir. Biyofilm, mikroorganizmanın toplanmasını tetikleyerek, biyofilmin ilk tabakasının oluşturulmasından sonra ince bir tabakadan "mantar" veya "kule" şeklinde bir yapıya dönüşür.

Canlı veya cansız bir yüzeye tutunduktan sonra organizma çoğalmaya başlar ve mikro kolonilerin oluşumuna yol açar. Mikro koloniler tamamlandıktan sonra, biyofilm yapısı olgunlaşmaya başlar ve hücre dışı polisakkarit üretimi ve ayrıca fiziksel direnç sağlayan ramnolipid yüzey aktif madde ile sürdürülen karakteristik bir mimari oluşturur (Vallet *et al.* 2004). Oluşum adımları aşağıda Şekil 2.5'te gösterilmiştir.



Şekil 2.5 Mikroskop altında biyofilm oluşumunun adımları

Olgunlaşma, bir glikokaliks matrisi içinde mikrokolonilerin yutulmasıyla elde edilir, atık ürünlerin ve besinlerin değişimi için sulu kanallar içeren mantar şeklindeki yapılara yol açar, biyofilmin olgunlaşması, esas olarak, otomatik indükleyici sinyalleri kullanan N-asilhomoserin lakton tarafından yapılan çekirdek algılamasına bağlıdır.

Sıyrılma enzimlerin boyunca enfeksiyonun yayılmasını organizma yardımıyla ayrılması, bir aynı olan yeni içine mikropların yüzey serbest bırakmak için yardımcı üretilen bir kolonizasyon içindir.

2.3.2 Çoklu ilaç direnci (MDR)

Geçtiğimiz yüzyıllarda enfeksiyon (esas olarak enfeksiyöz ajanların neden olduğu plak, kolera ve diğerleri salgınları) başlıca ölüm nedeniydi.

Antibiyotiğin geliştirilmesi, insanlık için hayat kurtarıcı olarak kabul edilir, ancak enfeksiyonları tedavi etmek için antimikrobiyal ilaçların sürekli kullanımı ve kullanımı, çeşitli mikroorganizma suşları arasında direncin ortaya çıkmasına neden olur.

Çoklu ilaç direnci (MDR), bir mikroorganizmanın daha önce ilaca duyarlı olmasına rağmen uygulanan antimikrobiyal ilaca karşı duyarsızlığı veya direnci olarak tanımlanmaktadır. Bu tür mikroorganizmalarda (bakteriler, mantarlar, virüsler ve parazitler gibi) MDR'nin gelişmesi, onların antimikrobiyal ilaçlarla rekabet etmelerini sağlayarak tedavinin başarısız olmasına ve enfeksiyonların yayılmasına neden olur.

Daha da kötüsü, MDR'nin gelişmesi değil (çünkü bu doğal bir fenomendir), ancak HIV hastası, DM, organ nakli, yanık hastaları ve diğerleri gibi bağışıklığı baskılanmış koşullarda büyük artış. Aşağıdaki Çizelge 2.1 WHO raporlarına göre tedavi sırasında MDR'nin geliştiği MDR, dirençli ilaç ve en yaygın hastalık olan en yaygın mikroorganizmaların bir listesini göstermektedir.

Kapsamlı ilaca dirençli (XDR), başka bir MDR türüdür; bu, mikroorganizmanın bulunan her tür antimikrobiyal ilaca dirençli olduğu anlamına gelir; bu tanım, tıbbi literatürde, her tür ilaca dirençli TB bakterisinin kısaltması olarak bulunur. TB'yi izoniazid ve rifampisin, florokinolonlar, enjekte edilebilir ikinci basamak ilaçlar (amikasin, kapreomisin veya kanamisin) olarak tedavi ettiği bulundu (Magiorakos *et al.* 2012).

Çizelge 2.1 MDR olan en yaygın mikroorganizma, dirençli ilaç ve tedavi sırasında MDR'nin en sık geliştiği hastalık

Bakterinin Adı	**Direnilen ilaç(lar)**	**Tipik hastalıklar**
Escherichia koli	Sefalosporinler ve florokinolonlar	İdrar yolu enfeksiyonları ve kan dolaşımı enfeksiyonları
Klebsiella pnömonisi	Sefalosporinler ve karbapenemler	Zatürre, kan dolaşımı ve idrar yolu enfeksiyonları
Stafilokok aureus	Metisilin	Yara ve kan dolaşımı enfeksiyonları
Aziz pnömoni	Penisilin	Pnömoni, menenjit ve otitis
Tifo olmayan *Salmonella*	Florokinolonlar	Gıda kaynaklı ishal, kan dolaşımı enfeksiyonları .
Shigella türleri	Florokinolonlar	İshal (basiller dizanteri)
Neisseria gonore	Sefalosporinler	Bel soğukluğu
Mikobakteri TB	Rifampisin, izoniazid ve florokinolonlar	Tüberküloz
Mantarların Adı		
Candida spp.	Flukonazol ve ekinokandinler	Kandidiyaz
Kriptokok neoformans	Flukonazol	Kriptokokoz
Aspergillus spp.	Azoller	Aspergilloz

Scopulariopsis spp.	Amfoterisin B, flusitozin ve azoller	Onikomikoz
Virüsün Adı		
Sitomegalovirüs (CMV)	Gansiklovir ve foskarnet	AIDS ve onkoloji hastalarında
Herpes simpleks virüsü (HSV)	Asiklovir, famsiklovir ve valasiklovir	Herpes simpleks
(HIV)	Antiretroviral ilaçlar	AIDS
Grip virüsü	Adamantan türevleri (Amantadin ve rimantadin) ve nöraminidaz inhibitörleri	Grip
Suçiçeği zoster virüsü	Asiklovir ve valasiklovir	Suçiçeği
Hepatit B virüsü (HBV)	Lamivudin	Hepatit B
Parazitin Adı		
Plasmodia spp.	Klorokin, artemisinin, ve atovakuondan	Sıtma
Leishmania spp.	Beş değerlikli antimoniyaller, miltefosin, paromomisin ve amfoterisin B	Leishmaniasis
Şistozomlar	Prazikuantel ve oksamnikin	Şistozomiyaz
Entamoeba	Metronidazol	Amoebiasis
Trikomonas vajinalis	Nitroimidazoller	Trikomoniyaz
Toksoplazma gondi	Artemisinin, atovakuon ve sülfadiazin	Toksoplazmoz

2.3.3 *Psödomonas aeruginosa'da* MDR mekanizması

P. aeruginosa son derece uyumlu bir organizmadır, çok çeşitli substratlar ve yeni ortama uyum sağlamak için özelliklerini değiştirerek elverişsiz ortamlarda hayatta kalabilir. Escherichia coli K12'de 4,64 Mbp (4279 gen), Staphylococcus aureus N315'te 2,81 Mbp (2594 gen) ve Haemophilus influenzae Rd'de 1,83 Mbp (1714 gen) ile karşılaştırıldığında 6,26 Mbp (5567 geni kodlayan) içeren büyük bir genoma sahiptir.

Hücre büyümesi ve işleyişi için enzimi eksprese etmek için yaklaşık 1500 gen gereklidir, geri kalanı esas olarak farklı çevresel koşullarda hücresel adaptasyonu desteklemek ve yeni ilaçlara direnç geliştirmek için kullanılır.

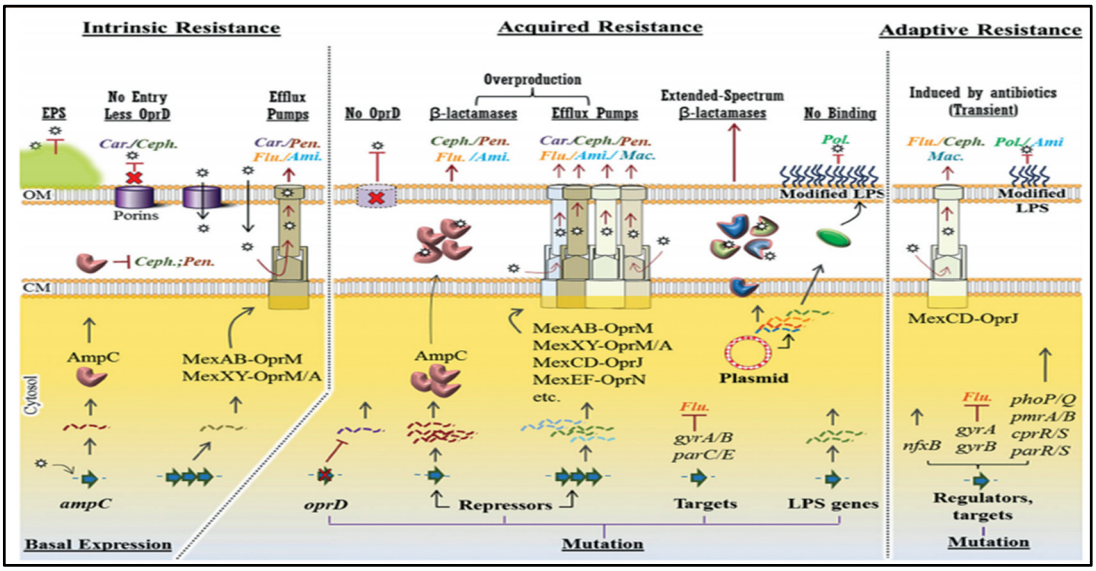
P. aeruginosa antibiyotiğe direnç, içsel, kazanılmış ve adaptif direnç mekanizmaları olarak sınıflandırılabilir. Genetik olarak konuşursak, *P. aeruginosa'ya* direnç, ya hareketli bir genetik element (yani plazmitler) kullanılarak direnç genlerinin edinilmesiyle ya da

kromozomal ekspresyonu ve/veya işlevi değiştiren mutasyonel süreçlerle gelişebilir, bu iki mekanizma yeni direnç geliştirecek ve yol açacaktır (Pang *et al.* 2019). Antimikrobiyal ajanların biyofilme nüfuzunu sınırlayan EPS matrisi. Yüklü polisakkaritler ve eDNA, birkaç çeşit antibiyotiği yakalayabilir.

Bu iki yolun yanı sıra, mikroorganizmanın antimikrobiyal ajanlara karşı doğuştan gelen yeteneğini, dış hücre zarının düşük geçirgenliğinin etkisini ve antibiyotikleri hücre dışına atmak ve β-laktemazlar olarak antibiyotik inaktive edici enzimler üretmek için akış pompalarının varlığını dikkate alan içsel dirençliliği vardır, psödomonal enfeksiyonu tedavi eden birçok drud en çok hücre duvarına nüfuz edebilir. Kinolonlar ve β-laktamlar, porin kanallarından hücre zarlarına nüfuz ederken, Aminoglikozitler ve polimiksinler, dış zardaki *P. aeruginosa* LPS ile etkileşime girerek bunları arttırır (Lambert 2002).

P. aeruginosa'nın kazanılmış direnci, direnç genlerinin yatay transferi veya mutasyonel değişiklikler ve antibiyotik hedeflerinin modifikasyonları (mutasyonla hedef bölgeyi değiştirerek), dışa akış pompalarının aşırı ekspresyonu gibi geniş bir direnç mekanizmaları repertuarını ifade etme genetik kapasitesi ile elde edilebilir. porin ekspresyonu ve ekspresyonu üzerindeki mutasyon etkisi) ve antibiyotik inaktive edici enzimlerin üretimi (DNA oksidatif onarım sisteminin inaktivasyonu, mutasyonu artıracak, β-laktamaz üretiminde artışa ve M exCD-OprJ akış pompasının aşırı ekspresyonuna neden olacaktır).

Biyofilm oluşumu adaptif mekanizmalardan biri olarak kabul edilir ve aktörler direnci arttırır, yüksek hücresel yoğunluk ve antibiyotiğin difüzyon bariyeri olarak çalışarak fiziksel olarak dışlanması ve AB geçişini sınırlandırmasıdır. Planktonikte olduğu gibi, biyofilm içindeki hücre, çevredeki ortamdaki değişimi algılama yeteneğine sahiptir (q uorum algılama) yoluyla koruyucu mekanizmalara yol açar (Riedel *et al.* 2001). Şekil 2.6'da üç mekanizma sunulmakta ve açıklanmaktadır.



Şekil 2.6 *P. aeruginosa*'nin üç mekanizması için MDR

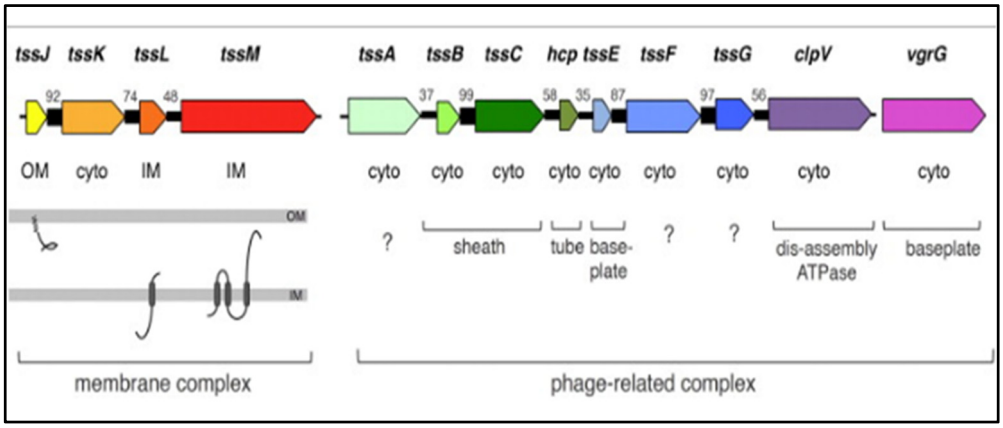
Araba = karbapenemler; Ceph = sefalosporinler; Kalem = penisilinler; Ami = aminoglikozitler; Grip = florokinolonlar; Mac = makrolidler ve Pol = polimiksinler CM = sitoplazmik zar; LPS = lipopolisakarit; OM = dış zar.

2.3.4 T6SS ve TSSC1 geni

P. seudomonas'ın besin, toksik proteinlerin atılımını alarak organizmayı çevreleyen ortamdan koruyan bir savunma mekanizması olarak kabul edilen 6 tip salgılama sistemi (SS) vardır. Tip 6 salgılama sistemi, sistem salgısını kodlayan gen kümelerinin oluşturduğu, en son keşfedilen salgı sistemlerinden biridir.

T6SS, 3 gen kategorisi tarafından düzenlenen H1 - T6SS, H2 - T6SS ve H3 - T6SS olmak üzere üç Hcp salgı adasına sahiptir, bunlardan ilki membran ilişkili proteinleri (TssL, TssM veya lipoproteinler TssJ) kodlayan genlerdir (Zoued *et al.* 2013). İkincisi, 1) kuyruklu bakteriyofaj (Hcp ve VgrG) proteininin şırıngası, 2) TssB/TssC alt birimlerinin oluşturduğu bakteriyofajın kılıfına benzeyen, kuyruklu bakteriyofaj bileşenleri ile ilgili proteinleri kodlayan genlerdir. tübüler yapılar oluşturur. 3) TssE geni kullanılarak bakteriyof yaşı taban plakasına benzeyen bileşenler. 4) ClpV kullanarak enerji sağlayan bileşenler. 5) ATPaz aktivitesine sahip membranla ilişkili protein yapısı IcmF (Chen *et*

al. 2015). Üçüncüsü, TssA, TssF, TssG ve TssK gibi tanımlanamayan işleve sahip genleri içerir.



Şekil 2.7 T6SS oluşumundan sorumlu gen kümesi (Zoued *et al.* 2013)

Araştırma, ndvB, PA14_40260-40230 ve TSSC1 dahil olmak üzere biyofilm oluşumunu etkilemeyen ancak biyofilme özgü karınca ibiyotik direnci üzerinde etkisi olan birden fazla gen buldu (Zhang *et al.* 2011).

Tobramisin ile etkileşime giren ve sekestre edilen periplazmik siklik-β-(1, 3)-glukanların sentezi için önemli olan glukoziltransferaz için kodlanan ndvB geni. PA14_40260-40230 geni (bir operonun parçası) akış pompasını kodlar, operonun silinmesi bakterinin biyofilmdeki gentamisin ve siprofloksasine direncinde bir azalma ile sonuçlanmıştır.

TSSC1 geni, tip VI sekresyonunda yer alır ve biyofilmde yüksek oranda eksprese edilir. Silinmesi, tedavide yaygın olarak kullanılan antibiyotikler olan tobramisin, gentamisin ve siprofloksasine karşı direncin azalmasına yol açar (Zhang *et al.* 2011).

Bahsedildiği gibi, TSSC1 geni biyofilmlerde bulunur ve antibiyotik direnci için önemlidir. Çalışmalar, TSSC1'in silinmesinin hem planktonik formdaki hücrede hem de biyofilm oluşumunda hücresel büyüme hızı ve mutant üzerinde hiçbir etkisi olmadığını, ancak değerlendirme sırasında ∆ TSSC1 mutantının biyofilmlerin AB direnci üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi sırasında buldu.

Çalışmalar, Δ TSSC1 mutant mikroorganizma suşunun, çalışmada kullanılan AB'ye (sırasıyla, gentamisin, tobramisin ve siprofloksasin) 2 ila 4 kat daha az direnç olduğunu ve planktonik hücrelerde TSSC1'in aşırı ekspresyonunun önerisiyle, planktonik direnç üzerinde hiçbir etkisi olmadığını bulmuştur. antibiyotik direncini artırır.

2.3.5 Biyofilm enfeksiyonunu ve nanopartikülleri tedavi etmek için terapötik seçenek

Biyofilm enfeksiyonuyla mücadele, esas olarak çeşitli öldürme mekanizmaları ile geleneksel antibiyotiklerin bir kombinasyonunu içerir. Konvansiyonel antibiyotikler bakteriyostatik veya bakterisidal olup, gerçek terapötik etkileri büyük ölçüde konsantrasyona bağlıdır. Terapötik konsantrasyon esas olarak AB'nin bakteri hücre zarına nüfuz etme ve gerekli konsantrasyona ulaşmak için birikme yeteneğine bağlıdır. Dış zar ile sitoplazmik zar arasında kalın bir peptidoglikan tabakasına sahip olan Gram-pozitif hücre duvarlarına kıyasla ince bir peptidoglikan tabakasından oluşan gram-negatif hücre duvarları.

Biyofilm enfeksiyonunda, konvansiyonel antibiyotikler, biyofilmlerin planktonik enfeksiyon formuna kıyasla antibiyotiklere 1000 kat daha fazla tolerans gösterdiği benzersiz yapı ve özellikleri nedeniyle biyofilmlere tam olarak nüfuz edemez (Donlan 2001).

Biyofilm enfeksiyonlarını tedavi etmek için mevcut stratejilerin başarısızlığı, ilaç dağıtım sistemini iyileştirmek ve kısa yarı ömür, düşük biyoyararlanım ve sistemik toksisite dahil olmak üzere geleneksel antibiyotiklerin sınırlamalarının üstesinden gelmek için stratejiler gibi yeni stratejiler geliştirme ihtiyacını yaratmaktadır.

2.3.5.1 Nanopartiküller

Nanoparçacıklar (NP), araştırmacıların önemli ölçüde dikkatini çeken tüm ilaç dağıtım sistemlerindendir, NP'ler basit moleküller değildir ve üç katmandan oluşur: a) Yüzey

katmanı çeşitli küçük moleküller, metal iyonları, yüzey aktif maddeler ve polimerler içerir. b) Çekirdekten kimyasal olarak farklı bir malzeme olan kabuk katmanları. c) Çekirdek, merkezi kısımdır. Nanopartiküllerin kullanımı bakteriyel membranlar, kutu bozulması biyofilm içine yüksek ölçüde nüfuz edebildiğini aittir artırır biyoyararlanım ve antibiyotik hedeflenen dağıtımını, farklı parçacıklar, sentetik veya doğal polimer, metal, ve lipidler gibi malzemeler dayanmak üzere tasarlanmıştır.

NP formülasyonunun etkinliği, fiziksel partikül özellikleri, ilaç yükleme, in vivo ilaç salma kinetiği, dolaşım ömrü ve taşıyıcının kendisinin içsel toksisitesi ile belirlenir. Kapsüllenmiş ilaç, arzu edilen etki ve uygulama metoduna doğal özelliklerine göre, farklı parçacıklar tasarımları, sentetik ya da doğal polimer gibi malzemeler kullanan, metaller ve lipidlerdir (Han *et al.* 2017).

NP bileşenleri arasında, metalik NP en çok çalışılan tiptir, Metal NP'ler tamamen metallerden yapılmıştır. NP Bu tür özel olduğu bilinen tercih elektrik nedeniyle lokalize yüzey için özellikleri plazmon rezonans (lspr) özellikleri. NP oluşumu iki ana sınıfa ayrılabilir: Yukarıdan aşağıya sentezler: Daha büyük molekülden başlayıp uygun NP'lere dönüştürülen yıkıcı bir yaklaşımı içerir. Aşağıdan yukarıya sentezler: Daha basit maddelerden NP oluşumunu içerir, bu nedenle çökeltme ve indirgeme teknikleri gibi oluşturma yaklaşımı olarak adlandırılır.

2.3.5.2 Karakteristik

Nanopartiküllerin temel parametreleri, şekilleri (uygun olduğunda en boy oranları dahil), boyutu ve maddenin morfolojik alt yapısıdır. Nanopartiküller, bir aerosol (havada katı veya sıvı faz), bir süspansiyon (sıvı halinde katı formda) veya bir emülsiyon (iki sıvı faz) olarak sunulur. Bu moleküller, parçacığın en dış tabakasını değiştirerek pıhtılaşma veya kümeleşmeye karşı stabilize edilebilir.

Optik özellikler dahil olmak üzere endüstriyel alanda önemli olan diğer özellikler, optik dedektör, lazer, sensör, görüntüleme, fosfor, ekran, güneş pili, fotokataliz, foto

elektrokimya ve biyotıptır. Bu özellikler boyuta, şekle, yüzey özelliklerine ve çevredeki ortam veya diğer nanoparçacıklarla etkileşime bağlıdır.

NP, nanotüpler ve Nano çubuklardaki iletkenliği, karbon nanotüpleri, Nano çubukların fotoiletkenliğini, nano kompozitlerin elektriksel iletkenliğini içeren elektriksel özelliklere sahiptir. Manyetik özellikler, diğer kimyasal türlerle etkileşime girerek, yani nanoparçacıkları kapatarak modifikasyonla ilgilidir (Guo *et al.* 2013). NP özelliklerinden bazıları ve bunların tıbbi açıdan etkilerini nasıl etkilediği tartışılacaktır.

2.3.5.3 Parçacıkların boyutu ve yüzey alanı

Parçacık boyutu ve yüzey, NP'nin önemli bir özelliğidir; boyuttaki azalma, NP yüzeyini daha reaktif hale getirir ve sistemin nasıl tepki verdiğini, malzemeleri nasıl dağıttığını ve ortadan kaldırdığını belirler. NP'lerin in vitro sitotoksisitesi, çeşitli hücre tiplerinde kullanılan NP'nin boyutuna, kültür koşullarına ve maruz kalma sürelerine göre farklıdır; bu, esas olarak partikül boyutuna bağlı biyolojik sistemlere girme yeteneği ile ilgili olabilir, hücrelere giriş, çeşitli makromoleküllerin yapısını değiştirebilir ve biyolojik fonksiyonlara müdahale edebilir (Lovrić *et al.* 2005).

Farmakolojik davranışlar, 50 nm'den küçük bir NP'nin tüm dokulara hızla transfer olduğu ve dokular üzerinde potansiyel bir toksik etkiye neden olduğu, 50 nm'den büyük bir NP'nin retiküloendotelyal sistem tarafından alındığı boyut tarafından büyük ölçüde belirlenir.

2.3.5.4 Parçacık şekli

Farklı şekil NP bulunabilir, Şekil NP bağlı toksisite titanyum karbon nano, silika, allotropies, nikel, altın ve nano malzeme içeren onbinlerce şekil bildirilmiştir.

Bu tür toksisite, endositoz veya fagositoz sırasında membran sarma süreçleri üzerinde etkilidir, küresel nanoparçacıkların (daha az toksik moleküller) endositozunun çubuk

şeklindeki nanoparçacıklara kıyasla çok daha kolay ve hızlı olduğu fark edilmiştir (Lee *et al.* 2007).

2.3.5.5 Yüzey yükünün etkisi

Biyolojik sistemlerle etkileşimler için yüzey yükü önemlidir. Yüklü yüzey nanopartiküllerin seçici adsorpsiyon, koloidal davranış, plazma protein bağlanması, kan-beyin bariyeri bütünlüğü ve NP çeşitli yönleri olan trans membran geçirgenliğini düzenler (Georgieva *et al.* 2011).

Pozitif yüklü bir NP, plazma proteinleri tarafından opsonizasyonun arttırılmasıyla, negatif yüklü ve nötr nanopartiküllere kıyasla daha yüksek hücresel alıma sahiptir. Pozitif yüklü NP, hemoliz ve trombosit agregasyonunu indükleme yetenekleri nedeniyle ciddi derecede toksiktir. 50-500 nm boyutundaki negatif yüklü NP'ler, dermal uygulamadan sonra cilde nüfuz eder, aynı boyutta pozitif yüklü kullanılmasına izin verilmez.

2.3.5.6 Bileşim ve kristal yapının etkisi

NP toksisitesindeki büyük pay, NP'nin bileşimi ve kristal yapısının toksisiteyi etkilediği nanoparçacık kimyalarıyla ilgilidir, örneğin Nano gümüş ve Nano bakır test edilen tüm organizmalarda toksisiteye neden olurken, aynı boyutlardaki TiO_2 aynı toksisiteye neden olmadı (Griffitt *et al.* 2008).

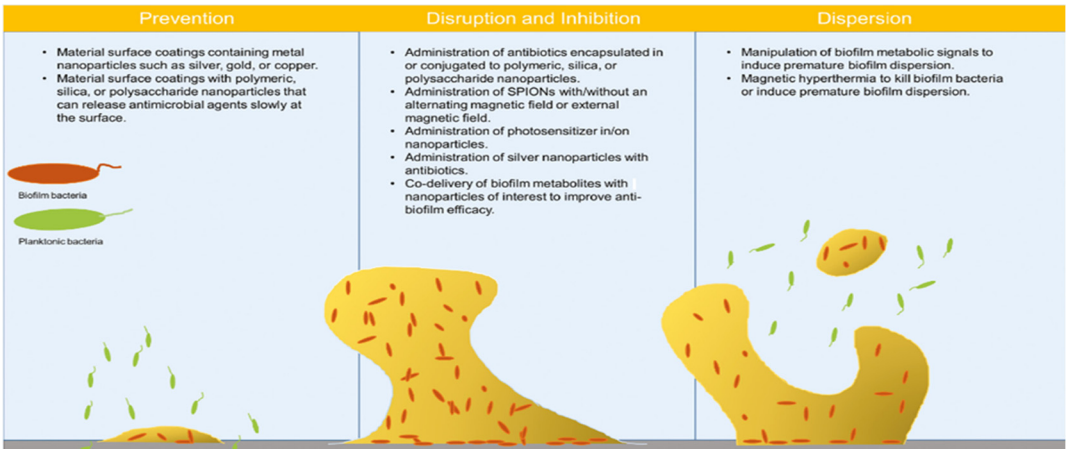
Nanopartiküller, su veya diğer dispersiyon ortamı ile etkileşimden sonra değiştirilebilir, su ile etkileşime girerse toplu bir katı ZnS parçasının yapısına daha yakın hale gelen ZnS nanopartikülleri.

2.3.5.7 NP ve biyofilm istilası

Bir çok polimer molekülünün taşıyıcı oluşan biyofilm hücre dışı polimer matrisi ücretleri farklı türde diğer moleküllerin tutulduğu bir filtre gibi hareket ederek, NP'ler ve biyofilm

arasındaki etkileşim üç aşamalı bir sürece sahiptir: (1) NP'lerin biyofilme transferi; (2) yüzeye tutturma; ve (3) biyofilmlerde migrasyon.

NP yüzeye eklendiğinde, matris negatif yüklü olduğundan ve elektrostatik kuvvetler yoluyla pozitif yüklü metal iyonları ve organik bileşiklerle etkileşime girebildiğinden, NP'ler ve EPM arasında elektrostatik özellikleri tarafından belirlenen bir etkileşim meydana gelir (Esparza-Soto and Westerhoff 2014). Şekil 2.8 biyofilm üzerindeki NP etkisinin mekanizmasını göstermektedir (Han *et al.* 2017).



Şekil 2.8 Biyofilm üzerindeki NP etkisinin mekanizması

Daha sonra NP'ler biyofilme nüfuz eder ve difüzyon nedeniyle hareket düşünülür, difüzyon hızı gözeneklerinin matris içindeki boyutuna, su kanallarının varlığına, NP'lerin ve EPM'nin yüküne, ortamın hidrofobikliğine, içindeki kimyasal gradyan'a bağlıdır.

Metalik oksit biyofilmi 3 mekanizma ile rekabet edebilir: (1) elektrostatik etkileşim nedeniyle hücre duvarında mekanik hasar, (2) oksidatif stres ve (3) protein fonksiyonlarında ve hücresel yapılarda bozulma. NP oluşumunda kullanılan her metal türünün kendi mekanizması vardır, bu çalışmada titanyum nanoparçacık ve biyofilm enfeksiyonunu tedavi etme etkisine odaklanılacaktır.

2.3.5.8 Titanyum nanoparçacıklar

Oda sıcaklığında Lactobacillus sp kültür filtratı kullanılarak hücre dışı üretilen küresel titanyum (Ti) NP'ler (~40–60 nm). Endüstriyel açıdan kullanılan daha hafif bir ağırlığa ve korozyona karşı daha yüksek dirence sahiptir, ayrıca kanser kemoterapisinde ve gen aktarımında gelecek vaat eden bir role sahiptir.

TiO_2, yüksek kırılma indeksi, ışığı absorplama, serbest toksisite, stabilite ve daha az maliyetli üretim gibi birçok özelliği ile doğal olarak bulunur. Kristallerin üç kristal fazı bulunur: rutilin termodinamik olarak daha kararlı olduğu anataz, rutil ve brokit. Anataz, fotovoltaik hücrelerde ve foto katalizör aktivitesinde uygulamaya sahiptir.

TiO_2 NP'ler bakterilere, virüslere karşı etkili olarak kabul edilir, TiO_2 NP'ler hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilere karşı antibakteriyel özellikler gösterir, bu nedenle yara pansumanlarında kullanılır. TiO_2, toksik olmayan ve biyouyumlu özelliklerinden dolayı biyolojik algılama, kontrast ajanlar, hedeflenen ilaç taşıyıcı ajanlar, karınca kırışıklığı ve antimikrobiyal ve karınca parazit ajanlarda uygulama alanına sahiptir.

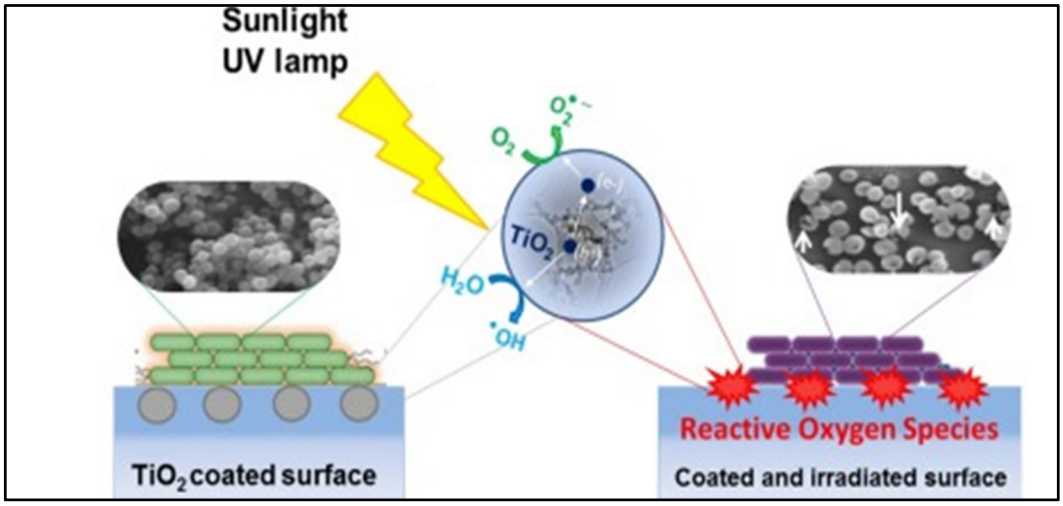
Morfolojik özellikler küresel, oval şekilli, 66-77 nm boyutunda bireysel NP'lerdir. XRD, titanyum dioksit NP'lerinin anatazının kristalografik düzlemini gösterir; bu, NP'lerin yapısının baskın olarak anataz kristalli titanyum dioksite karşılık geldiğini gösterir.

TiO_2 NP hücre duvarı zarı üzerinde bakteri ve inhibe biyofilm yapışmasını azaltmak olanağı, TiO2'nin biyofilm üzerindeki etkisi Şekil 2.9'da gösterilmektedir, yıkım nesil ROS ile esas olarak ortaya çıkar ve lipid oksidasyonunu göstermektedir ki inhibe ba cterial büyüme (Shkodenko *et al.* 2020).

TiO_2, oksidatif ve hidroliz özelliklerine sahiptir, foto katalizör aktivite promotörleri, suyu elektrolitik olarak hidrojen ve oksijene bölerek üretilir. Bu nanopartiküller molekülü ultraviyole (UV) ışığı maruz, bunlar (Arora *et al.* 2015). Fotokatalizin temel prensibi,

yarıiletkenin bant aralığına eşit veya daha yüksek enerjiye sahip bir fotonun absorpsiyonu üzerine bir elektron-boşluk çifti oluşturmaktır.

TiO_2 uygun ve ideal bir fotokatalizördür çünkü ucuzdur, kimyasal olarak oldukça kararlıdır ve fotojenere edilmiş delikler yüksek oranda oksitleyicidir. Anataz formunun en yüksek foto aktiviteyi gösterdiği üç kristal formda (anataz, rutil ve brookite) bulunan TiO_2.



Şekil 2.9 TiO_2'nin biyofilm üzerindeki etkisi (Jalvo *et al.* 2017)

3 MATERYAL VE METOT

Ramadi Eğitim Hastanesi ve Heet General Hospital'da deneysel ve uygulamalı çalışmalar yapılmıştır (Ek 2).

3.1 Hasta Seçimi

Al-Ramadi Eğitim Hastanesi ve Heet Genel Hastanesi'nden dermatit (yara ve yanık) ile enfekte hastalardan 100 numune alındı.

Örnekler steril vektör ortamı kullanılarak aktarıldı ve izolasyona kadar 4°C'de saklandı Hastanede yatan veya tedavi gören hastalara bilgi verildi.

Çalışmaya onam veren hastalardan imzalı onamlarını gösteren belgeler alındı.

Hastane Etik Kurul onay formları uygulandı ve çalışma onayı alındı.

Çalışma sırasında Covid-19 salgını nedeniyle çeşitli kısıtlılıklar ve zorluklar yaşansa da gerekli önlemler alınarak ve ardından hasta seçiminde farklı hususlar dikkate alınarak çalışmaya devam edilmiş, hastaların hastalığı etkileyen başka bir hastalığı olmadığı göz önünde bulundurulmuştur. Çalışma, teşhiste yardım ve doktor Yöneticiden onay istendi.

Örneklerin yaş ve cinsiyete göre dağılımı göz önünde bulundurularak ekte olduğu gibi tablo şeklinde dağıtılmıştır. Ayrıntılı bilgiler Ek 1'de gösterilmiştir

3.2 Çalışmanın Tasarımı (Çalışma Protokolü)

Bu çalışma*, pseudomonas aeruginosa* bakterilerinin fonotipik ve genotipik özelliklerini analiz ederek şunlara odaklanmıştır: Cilt enfeksiyonunda *P. aeruginosa'nın* belirlenmesi, Iraklı hastalarda titanyum nanopartikülün biyofilm oluşumuna etkisi ve PCR ile TSSC1 gen ifadesindeki değişikliğin belirlenmesi şeklindedir.

3.2.1 Malzemeler

Çizelge 3.1 çalışmada kullanılan ekipman ve aparatları göstermektedir.

Çizelge 3.1 Ekipman ve aparatlar

Ekipman ve Aparat	Şirket	Ülke
Otoklav	MELAG	Almanya
Santrifüj PLC Serisi	Gemmy Sanayi A.Ş.	Tayvan
Soğutmalı Mikro-santrifüj	Hermle	Almanya
Dondurucu	Selam havalı	Çin
Gaz Brülörü	Yerel olarak sağlanan	Yerel olarak sağlanan
Jel Elektroforez Aparatı	Cleaver Bilimsel Ltd.	Birleşik Krallık
Kuluçka makinesi	HATIRLATMA	Almanya
Mikropipetler (farklı boyutta)	Ependorf	Almanya
Mikroskop	Geneks	Hindistan
Mikrodalga	Gosonik	Çin
PCR Termal Döngüleyici	BioRad	ABD
Buzdolabı	Uyum	Lübnan
Hassas Elektronik Terazi	Kesin	İsviçre
Termometre	TDR	Romanya
Vorteks Karıştırıcı	FISHER-HAMILTON	İNGİLİZCE
VITEK2 Sistem cihazı	STUART	Fransa
McF	Bio Merieux	Fransa
Su banyosu	Bio Merieux	Almanya
Su Damıtıcı	İNSAN	Almanya
Konik Şişeler	GFL	Almanya
Kapak slipleri Cam	Almanya	Çin
Tek Kullanımlık Petri Tabakları	MMK	Ürdün
Forseps	AFCO	Almanya
Cam Slaytlar	Almanya	Almanya
Vidalı Kapaklı Cam Tüp	Beromed	Almanya
Döngü	Almanya	Ürdün
Mikro tüpler (Eppendorf)	AFCO	Ürdün
Düz Tüpler	AFCO	Ürdün
İdrar Numune kabı	AFCO	Ürdün

3.2.2 Reaktifler ve kimyasallar

3.2.2.1 Reaktifler

Oksidaz reaktifleri: 0.1 gram tetra-p-para-fenilendiamin hidroklorürü 10 mL saf suda eriterek ve bakterilerin oksidaz enzimini kırpma yeteneğini ortaya çıkarmak için koyu renkli bir ampulde istifleyerek hazır hale getirilmiştir.

Katalaz reaktifleri: 3 g H_2O_2'nin 100 mL saf suda eritilmesi ve ardından bakterilerin katalaz enzimini kırpma yeteneğini ortaya çıkarmak için karanlık bir pakette saklanmasıyla hazır hale getirilmiştir.

Metil kırmızı reaktifler: 0,1 g metil kırmızısı 300 mL %99 etanol içinde çözülmüş ve hacim distile su ile 500 mL'ye tamamlanmıştır. Karbonhidratların tam fermantasyonundan kaynaklanan ortamın asitliğini tespit etmek için kullanılmıştır.

Fogg-proskauer reaktifleri (barrett reaktifi)

1 adet solventten hazırlandı:

5 g alfa-naftol, 100 mL %99 etanol içinde çözündürüldü ve daha sonra ışıktan uzakta karanlık bir kapta saklandı.

40 gram KOH, 100 mL damıtılmış su içinde çözülmüştür. Asetil-metilkarbinol üretimini tespit etmek için kullanıldı.

Kovac reaktifleri: 10 g P-Dimetil benzaldehitin (DAMB) 150 mL amil alkol içinde çözülmesi ve ardından bu karışıma yavaş yavaş 50 ml konsantre hidroklorik asit eklenmesiyle hazırlanmıştır. Bu solüsyonu koyu renkli bir şişede saklandı ve kullanmadan önce hafifçe sallandı. İndol üretim gösteriminde kullanılmıştır.

3.2.2.2 Kimyasallar

Çalışmada kullanılan tüm kimyasallar Çizelge 3.2'de listelenmiştir.

Çizelge 3.2 Reaktifler ve kimyasallar

Kimyasallar	**Şirket / ülke**
Alfa-Naftol	BDH – İngiltere
Amonyum klorür (NH_4Cl)	Merck Darmstadt - Almanya
Kalsiyum klorür ($CaCl_2$)	Merck Darmstadt - Almanya

Di-potasyum di-hidrojen fosfat (K_2HPO_4)	Merck - Darmstadt - Almanya
Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4. $2H_2O$)	Merck - Darmstadt - Almanya
Etanol (%99 ve %70 C_2H_5OH)	Floca Chemicals - İsviçre
Jelatin	BDH – İngiltere
Glikoz	MERRC - ALMANYA
Gliserin	BDH – İngiltere
Kovacs reaktifi	Floca Chemicals - İsviçre
Magnezyum sülfat ($MgSO_4$)	Merck - Darmstadt - Almanya
Metil kırmızısı	BDH – İngiltere
Hidrojen peroksit (H_2O_2)	Floca Chemicals - İsviçre
Potasyum hidroksit (KOH)	BDH – İngiltere
Sodyum klorür (NaCl)	Merck Darmstadt - Almanya
Sodyum hidrojen fosfat (NaH_2PO_4, $2H_2O$)	Merck Darmstadt - Almanya
Toplam protein grubu	Pio Lapu – Fransa
Trikloroasetik asit (TCA)	BDH – İngiltere
Ürik asit kiti	Pio Lapu – Fransa
5, 5-Ditiopis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB)	Fluca -İsviçre
Etilendiamin disodyum tetraasetik asit (EDTA Na_2)	Fluca -İsviçre
Glutatyon standardı (GSH)	Fluca -İsviçre
Metanol	BDH – İngiltere
Hidroklorik asit (HCl)	BDH – İngiltere
Tiyobarbutik asit (TPA)	Sigma – Almanya
Soduım hidroksit	BDH – İngiltere
Ksantin	BDH – İngiltere
Hipoksantin	BDH – İngiltere
2,4 – Dinitrofenilhidrazin	Fluca -İsviçre
Guanidin	BDH - İngiltere
Etil asetat	BDH - İngiltere
Sülfürik asit H_2SO_4	BDH – İngiltere
Sistein	Fluca -İsviçre
L – fukoz	BDH- İngiltere
Amonyum Sülfat	BDH - İngiltere
Bis Akrilamid	Fluca Chemicals - İsviçre
Amonyum Persülfat	BDH - İngiltere
N,N,N-,N-Tetrmetilendiamin (TEMED)	HİMEDYA - Hindistan
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	BDH- İngiltere
Buzul asetik asit	kimyasal balıkçı
Asetik asit	kimyasal balıkçı
Kumasi Brilliant Blue (AM - 250)	BDH- İngiltere
Folin – reaktif	Fluca Chemicals - İsviçre
Sodyum karbonat	BDH- İngiltere
Bakır sülfat pentahidrat	BDH- İngiltere
Tres Parçası	BDH- İngiltere
Sığır serum albümini (BSA)	Sigma - Aldrich Kimya
Glisin	BDH- İngiltere
2-Merkaptoetanol	kimyasal balıkçı
Sodyum asetat	BDH- İngiltere
V İzole protein merdiveni	Geneaid - ABD

3.2.2.3 Kültürel medya

Bu çalışmada kullanılan kültür ortamı Çizelge 3.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.3 Çalışmada kültür ortamı kullanımı

Numara.	Medya	Şirket / ülke
1	Kanlı agar tabanı, beyin kalp infüzyon agarı, MaCconkey agar, kalp beyin infüzyon suyu	Merhaba Medya - Hindistan
2	Besin Agar, Besin suyu	Oksiod - Birleşik Krallık
3	Üre bazlı agar, simon sitrat agar, üçlü şekerli demir agar, MR - VP broth, soya triptikaz suyu, soya triptikaz agar, mannitol agar	Devco - İngiltere.

3.2.3 Vıtek® 2 sistemi

VITEK Sistemi, gram negatif bakterileri VITEK2 GN Kiti (Biomérieux/Fransa) ile tanımlamak için kullanılan yakın zamanda otomatikleştirilmiş bir cihazdır.

3.2.3.1 Vıtek® 2 sisteminin prensibi

Vitek2, büyümeye dayalı teknolojiyi kullanan otomatik bir mikrobiyoloji sistemidir. Bu formatlar, klinik mikrobiyoloji çalışma odasında ek olarak emilir ve gelişmiş hacimli laboratuvarlar için artırılmış mekanizasyon ve hacim yükseklikleri sunar. Antimikrobiyal güvenlik açığı testi için otomatik pipetleme ve inceltme seçeneği de sunarlar. Reaktif kartpostalları, tümü ayrı bir test substratını kapsayabilen (64 kuyu) içerir. Substratlar, asitleştirme, alkalinizasyon, enzim hidrolizi ve inhibitör materyallerin katılımında gelişme gibi çeşitli metabolik olayları tutar. Kartpostalın yan taraflarındaki optik olarak net bir film akımı, organizma-alt tabaka karışımları ile etkileşimi durduran kapalı bir kabı korurken uygun eşit oksijen yayınına izin verir. Her kartın aşılama için önceden tanıtılmış bir iletim tüpü kullanımı vardır. Kartlar, oluşturulma türü, lot miktarı, bitiş tarihi bilgilerini içeren barkodlara ve kart sisteme önceden veya doldurulduktan sonra örnekle ilişkilendirilebilecek tek tanımlayıcıya sahiptir.

3.2.3.2 Süspansiyon hazırlama

Yeterli sayıda saf kültür kolonisini aktarmak ve mikroorganizmayı 12 x 75 mm şeffaf plastikte 3,0 mL steril salin (%0,45 ila %0,50 NaCl, pH 4,5 ila 7,0) içinde süspanse etmek için steril bir çubuk kullanıldı. Bulanıklık buna göre ayarlandı ve DensiChekTM adı verilen bir bulanıklık ölçer kullanılarak ölçüldü. McFar landTurbidityRange (0,48-0,56) ile belirlenen bulanıklıkların süspansiyonudur.

3.2.4 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) malzemeleri

3.2.4.1 DNA ekstraksiyonu için Presto™ mini gDNA bakteri kiti

Presto TM Mini gDNA Bakteriler Seti (Geneaid Biotech Ltd. / Tayvan) Çizelge 3.4'te listelenmektedir.

Çizelge 3.4 DNA ekstraksiyonu için presto™ mini gDNA bakteri kiti

Bileşen	**GBB004**	**GBB100**	**GBB101**	**GBB300**	**GBB301**
Gram+ Tampon	2 mL	30 mL	30 mL	75 mL	75 mL
GT Tamponu	1,5 mL	30 mL	30 mL	75 mL	75 mL
GB Tamponu	2 mL	40 mL	40 mL	75 mL	75 mL
W1 Tamponu	2 mL	45 mL	45 mL	130 mL	130 mL
Yıkama Tamponu1	1 mL	25 mL	25 mL	50 mL	50 mL
(Etanol ekleyin)	4 mL	100 mL	100 mL	200 mL	200 mL
Lizozim2	8 mg	110 mg	NA	250 mg	NA
Proteinaz K3(ddH_2O ekleyin)	1 mg 0,1 mL	11 mg x 2 1,1 mL	11 mg x 2 (1,1 mL)	65 mg (6,5 mL)	65 mg (6,5 mL)
Elüsyon Tamponu	1 mL	30 mL	30 mL	75 mL	75 mL
GD Sütunları	4	100	100	300	300
2 mL Toplama Tüpleri	8	200	200	600	600

Toplam etanol, Yıkanmış Tampon'a ilave edildi ve ardından birkaç saniye çalkalanarak karıştırıldı. Şişenin üstünde kutusunu kontrol edildi. Etanolün kaybolmasını önlemek için şişenin yakınında sıkıca tutun, Lizozim, uzun süreler boyunca -20ºC'de saklandı ve ddH2O, Proteinaz K'ya ilave edildi, ardından Proteinaz K'nin tamamen erimesini sağlamak için girdaplanmıştır. Şişedeki kutuyu kontrol edildi. Tamamen eridiğinde,

kombinasyonu bastırmak için yetersiz saniye santrifüjlendi. Uzun süreler için ddH2O ve Proteinaz K karışımı 4ºC'de saklandı. Ortam CO_2'si olarak yalnız yeni ddH2O'nun kullanımı, hızla asitlenmeye neden olabilir.

3.2.4.2 Primerler

Entegre DNA (Sentebiolab Biyoteknoloji Şirketi /Türkiye tarafından sağlanan oligonükleotid primerleri) suşları tanımlamak için *S. aeruginosa* gen primerleri kullanıldı. Dizilere sahip üç primer Çizelge 3.5'te listelenmiştir.

Çizelge 3.5 Primer sıralama listesi

Gen		Ön ve arka sıra (astar 3 / -5 /)	PCR ürün boyutu (bp)	Referans
TSSC1	F	CTCCAACGACGCGATCAAGT	150	(Zhang *et al.* 2011)
	r	TCGGTGTTGTTGACCAGGTA		

3.2.4.3 PCR master mix karışım

Bu çalışmada kullanılan Ana karışım Çizelge 3.6'te açıklanmıştır.

Çizelge 3.6 Master mix açıklaması

Malzeme	**Tanım**	**Şirket**	**Ülke**
PCR Yeşil Ana Karışım	2X TaqDNA polimeraz bir reaksiyon tamponu (pH 8,5), 400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 µM dCTP,400 µM dTTP ve 3 mM $MgCl_2$	Promega	Amerika Birleşik Devletleri

3.3 Yöntemler

3.3.1 Sterilizasyon yöntemleri

Ortam, tamponlar ve solüsyonlar otoklavda (121°C) ve basınçta (15 psi) 15 dakika sterilize edildi.

3.3.2 Hazırlık ait ağar ve kültür medya

Aşağıda yazılı olarak hazırlanan bu çalışmada kullanılan çok sayıda agar türü ve kültür ortamı:

3.3.2.1 MacConkey ortalama ağarı

MacConkey agar ortamı, çoğu Gram-negatif bakterinin ilk izolasyonu için kullanıldı ve ardından laktoz fermentleri ile n-laktoz fermentleri olmayanlar arasında ayrım yapıldı.

3.3.2.2 Besin agar ortamı

- Dehidrate besiyerini uygun hacimde distile su içinde, yani 23 g dehidrate nütrient agarda (üretici talimatına göre) 1000 mL distile suda eritildi.
- Sık sık çalkalayarak ısıtın ve tozu tamamen çözmek için 1 dakika kaynatıldı
- Besiyeri otoklavlanarak sterilize edildi (15 dakika boyunca 121°C).
- Besiyerini tüplere (yani besleyici agar eğimleri yapmak için 3 mL, besleyici agar dipleri yapmak için 5 mL) veya plakalara dağıtın. Agar ortamını katılaşmaya bıraktı.

3.3.2.3 Besin suyu

- 1 L damıtılmış suya 13 g besin suyu tozu (CM0001B) ekleyin.
- Karıştırın ve tamamen çözün.
- Son kaplara (örn. konik erlen) dökünüz.
- 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edin.

3.3.2.4 Kanlı agar ortamı

Kanlı agar, 40 g kanlı agar bazının 1000 mL distile suda çözülmesiyle hazırlanmıştır. 121°C'de 15 dakika otoklavlandı ve daha sonra (%5) taze koyun kanı ile desteklenerek

50°C'de soğutuldu. Bu ortam, bakteri izolatlarının kültürlenmesi ve bakterilerin kan hücrelerini hidrolize etme kabiliyetinin belirlenmesi için kullanıldı.

3.3.2.5 Mueller - hinton agar

Müller Hinton agar ortamında duyarlılık test etmek için kullanıldı, antibiyotikler, damıtılmış suyun 1 litresi ortamın 38 g süspansiyon halinde tutulur ve iyice karıştırın. Tamamen sık ajitasyon ve 1 dakika kaynatın ile Isı bileşenleri çözmek. 15 Boyunca 121°C'de otoklav dakika.

3.3.2.6 %5 Gliserol ile beyin kalp infüzyon broth

Bu ortam, otoklavlamadan önce 95 mL BHI et suyuna 5 mL gliserol eklenerek hazırlandı. Bakterileri korumak için kullanılmıştır.

3.3.2.7 Peptonlu su

Bu besiyeri, 8 g peptonun 1000 mL distile su içinde çözülmesiyle hazırlandı, ardından test tüplerine dağıtıldı ve sterilize edildi. Bakterilerin amino asit triptofanı indole hidrolize etme yeteneğini göstermek için kullanıldı.

3.3.2.8 MR - VP ortalaması

MR - VP ortamı hazırlandı ve glikozun kısmi ve tam hidrolizini saptamak için kullanıldı.

3.3.2.9 Mannitol tuzlu agar ortamı

1000 mL damıtılmış su içinde 111,025 g MRS ortamını süspanse edildi. Ortamı tamamen çözmek için kaynatıldı. 121°C'de 15-20 dakika otoklavlandı

3.3.2.10 Soya fasulyesi triptik agar ortamı

Bu besiyeri, üreticiye göre 40 g soya fasulyesinin 1000 mL damıtılmış su içinde çözülmesiyle hazırlanmıştır. Bakteriyel izolatların büyümesini arttırmak için bu ortam, ortam 121°C'de 15 dakika sterilize edildikten sonra %5 taze kan ilave edilerek modifiye edildi ve daha sonra 50°C'ye soğutuldu. Bu ortam, bakteri izolatlarının kültürlenmesi için bir zenginleştirme ortamı olarak kullanıldı.

3.3.2.11 Triptik soya suyu

Üreticiye göre triptik soya suyu ortamı hazırlandı.

- g Triptik soya suyu (TSB) tozunu tartın ve 100 mL distile suda çözüldü.
- Karıştırmak için şişeyi manyetik karıştırıcıya yerleştirildi.
- Her bir 13 x100 mm cam spiral tüpe (veya ihtiyacınıza göre başka bir uygun kaba) besiyerinden 10 mL bölündü.
- Alikottan sonra tüm tüpleri 121°C'de 15 dakika otoklava yerleştirildi.

3.3.2.12 Üre agar ortamı

Bu ortam, 100 mL steril üre agar bazına 15 mL üre çözeltisi (filtreleme yoluyla steril) eklenerek 121°C'de 15 dakika buharlaştırılarak ve ardından 50°C'de soğutularak hazırlanmıştır. pH 7,1'e ayarlandı ve daha sonra ortam steril test tüplerine dağıtıldı ve ardından eğik bir biçimde katılaşmasına izin verildi. Bu ortam, bakterilerin üreaz enzimi üretme yeteneğini test etmek için kullanılır.

3.3.2.13 Simmons sitrat

Simmons' sitrat ortamı şu amaçlarla kullanıldı:

- Bakterilerin sitratı tek karbon kaynağı olarak kullanma yeteneğini belirlendi.

- Deiyonize suda yukarıdaki tuzları çözüldü
- pH'ı 6,9'a ayarlandı.
- Agar ve Bromothymol blue eklendi.
- Agar eriyene kadar karıştırarak hafifçe ısıtıldı.

3.3.2.14 KH_2PO_4 çözeltisinin hazırlanması

Altı gram Na_2HP0_4, 3g KH_2P0_4, 0,5g NaCl, ardından 1 gram NH_4Cl; %2 agar içeren 950 ml distilasyon suyunda çözüldü, sonra otoklavlandı. Soğutma işleminden sonra, 1 M $MgSO_4$ 2 mL,% 20 glikoz ve 10 mL daha sonra $CaCl_2$, 0,1 M (Süzme ile ayrı olarak sterilize edilmiş) ilave edildi ve daha sonra hacim 1000 mL'ye tamamlanmıştır. Bu ortam, demir taşıyıcıları tespit etmek için kullanılan ve daha sonra da hücre-dışı üretimi.

3.3.2.15 Eozin metilen mavisi (EMB) agar

Kültür ortamı, üreticinin laktoz fermentasyon bakterilerinin, özellikle Escherichia coli'nin teşhisine yönelik talimatlarına göre hazırlanmıştır.

35,96 g/ 1000 mL distile suda süspanse edin, Süspansiyon homojen olana kadar karıştırın. Tamamen ortam çözünmesi için kaynamaya kadar ısıtıldı. 15 lbs basınçta (121°C) 15 dakika otoklavlayarak sterilize edildi.

3.3.3 Bakım ortamı (izolatların depolanması)

Bu ortam, bir bazal ortam olarak beyin kalp infüzyon çorbasından oluşuyordu. İle 20 % gliserol. Bu besiyeri, bakteri izolatlarını uzun süreli depolama için -20ºC'de derin dondurucuda muhafaza etmek için kullanılmıştır.

3.3.4 Jel elektroforez tamponları

3.3.4.1 Tris borat EDTA tamponu (TBE 10X)

Bu tampon 108g Tris baz, 55g borik asit, 40 mL 0,5 M EDTA'nın 800 mL DW içinde çözülmesiyle hazırlandı, pH 7,8'e ayarlandı ve hacim 1000 mL'ye tamamlandı otoklavlandı ve 4°C'de eriyene kadar saklandı. elektroforezde kullanılır.

3.3.4.2 Tris borat EDTA tamponu (TBE 1X)

Bu solüsyon 100 mL stok TBE 10X karıştırılarak hazırlanmış ve hacim DW ile 1000 mL'ye tamamlanarak elektroforezde kullanılana kadar 4 °C'de saklanmıştır.

3.3.5 Numune koleksiyonu

Al-RAMADI eğitim hastanesine ve Heet hastanesine başvuran farklı cilt enfeksiyonu ve yanığı olan hastalardan toplam 100 cilt sürüntü örneği toplandı ve bu çalışmaya Ekim 2020'den Ocak 2021'e kadar Farklı yaşlardaki hastalardan, her iki cinsiyette (erkekler ve kadınlar). Numuneler daha sonra aerobical kültür ortamı (besleyici agar daha sonra ortam, MacConkey, kan) inoküle edildi 24-48 saat boyunca 37°C'de inkübe ly eden.

3.3.6 *P. aeruginosa'nın* izolasyonu ve tanımlanması

Benson's microbiological applications tarafından önerilen tanı prosedürlerine göre, 30 yılı aşkın bir süredir mikrobiyoloji laboratuvar kılavuzlarının altın standardı olmuştur, çalışma altındaki hastalarla ilişkili *P. aeruginosa* izolasyonu ve tanımlaması yapılmıştır. Numuneler aseptik koşullar altında toplandı ve 24 saat 37ºC'de inkübe edilen MacConkey agarda sürme işlemine tabi tutuldu.

3.3.6.1 Koloni morfolojisi

Kan, MacConkey ve Nutrient agar üzerinde her bir birincil kültürden bir koloni alındı, daha sonra şekline (koloni şekli, boyutu, rengi ve sınırları, ardından dokusu) bağlı olarak tanımlandı, Gram boyama ile boyandıktan sonra ışık mikroskobu ile incelendi.

3.3.6.2 Biyokimyasal test

Katalaz testi

Bir organizma kolonisi steril bir tahta çubukla temiz, kuru bir cam lamın yüzeyine aktarıldı ve ardından 1 damla %3 H_2O_2 eklendi. Gaz kabarcıklarının oluşumu olumlu bir sonucu gösterdi.

Oksidaz testi

Bir parça filtre kağıdı, steril evcil hayvan binicilerine yerleştirildi ve birkaç damla taze hazırlanmış oksidaz reaktifi ile nemlendirildi, ardından test edilecek koloninin küçük bir kısmı tahta bir çubukla alındı ve filtre kağıdına ovuldu. 10 saniye içinde maviye veya koyu mora renk değişimi, pozitif bir sonucu gösterir.

İndol testi

Organizmayı ve triptofanaz ile triptofan demineralizasyonunn indol üretme kabiliyetini tanımlamak için kullanıldı. Et suyunun üzerinde kırmızı bir halka oluşması pozitif reaksiyonu, sarı halka ise negatif reaksiyonu gösterir.

Metil kırmızısı testi

Glukoz pepton broth'unda (MR - VP broth) büyüme sırasında bazı bakteriler tarafından glukoz fermantasyonu sırasında yeterli asit üretimini tespit etmek için kullanıldı. Rengi turuncuya çevirmek olumlu bir tepki verir.

Voges-proskauer testi

VP testi spesifik üretildi aseton (asetil-metil-karbinol) tespit etmek için kullanıldı, bakteriler, sırasında, büyümenin pepton glukoz suyu (MR - VP suyu) ve pozitif sonuç kırmızıya ortamın renk değişikliği oldu.

Simon'ın sitrat testi

Sitrat test karbon kaynağı olarak sitrat kullanımı bakterinin yeteneğini belirlemek için kullanılmıştır. Pozitif sonuç yeşilden maviye medyanın renginde bir değişiklik oldu.

UR kolaylığı Testi

Üre şekilde, karbon dioksit, ardından amonyak, ve daha sonra su amidlerin karbon-azot bağı kırdı bir enzim oldu. Üre taban agar, bundan sonra, 500°C'ye soğutuldu ve bir üre Alt tabaka buna ilave edildi ve steril tüplere boşaltılır, otoklav ile sterilize edildi; daha sonra bunlar 370 santigrat derece arasındaki bir sıcaklıkta (24-48) saat inkübe edildi, bakteriyel kültür ile aşılandı. Üre bozuldu amonyak açığa orta pH'si edilir. pH bu değişiklik temel bir ortamda pembe döndü pH indikatörü ile tespit edildi. Pembe ortalama pozitif üreaz testi belirtir. Geliştirmek için daha koyu pembe başarısızlığı olumsuz tepkiydi.

Üçlü demir şeker testi (TSI)

Amaç, bağırsak bakterilerini karbonhidrat fermantasyonu ve hidrojen sülfür üretimine göre ayırt etmektir.

Motilite testi

Kinetik ortam içeren tüpler, bir aşı iğnesi ile ortasından bir kez bıçaklandı ve ardından 35°C'de 24-48 saat inkübe edildi. Hareketli bakteri aşılama hattından yayılır.

Kan pıhtılaşma testi

Pseudomonas aeruginosa'nın patojenik ve patojenik olmayan suşlarını ayırt etmenin önemli bir yoluydu. Test, tüp döşenerek ve plazmada pıhtı oluşumu gözlemlenerek okundu.

Mannitol fermantasyon testi

(Mannitol tuzlu agar) bakteri kolonileri ile aşılandı, 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Ortamın değişmeden rengi (7 dakika 15,000 g'da santrifüjü soğutularak) bakteriyel suyu santrifüjlenir negatif result. Then ise bakteriler laktoz fermantasyonu, olumlu sonuç amaçlanmış ise açık sarı bir pembe renk değişikliği için her test. Elde edilen yüzer kısım, aşağıdaki prosedürler için elde edilir.

3.3.6.3 Vitek 2 kompakt sistem kullanılarak minimal inhibitör antibiyotik konsantrasyonunun araştırılması

Tüm adımlar üreticinin talimatlarına göre yapıldı (Biomerieux, Fransa).

1. Yeterli sayıda saf kültür kolonisi, steril sürüntü veya aplikatör çubuğu kullanılarak aktarıldı ve mikroorganizmayı 12 x 75 mm'lik bir boyutta 3,0 mL steril salin (sulu %0,45 ila %0,50 NaCl, pH 4,5 ila 7,0) içinde süspanse edin. Şeffaf plastik (polistiren) test tüpü.
2. Bulanıklık, McFarland Bulanıklık Aralığı (0,48 - 0,56) ile buna göre ayarlandı ve DensiChekTM adı verilen bir bulanıklık ölçer kullanılarak ölçüldü.

3. Identification kart entegre bir vakum aygıtı kullanılarak mikroorganizma süspansiyonları ile aşılanmıştır. mikroorganizma süspansiyonu içeren bir test tüpüne, özel bir raf (kaset) içine yerleştirilmiştir ve karşılık gelen süspansiyon tüp içine transfer tüpü sokulurken kimlik kartı komşu yuvaya yerleştirildi.
4. Uygulanan vakum uygulandı ve istasyona hava yeniden verildikten sonra, organizma süspansiyonu transfer tüpünden tüm test kuyularını dolduran mikro kanallara zorlandı.
5. Aşılanmış kartlar, karusel inkübatörüne yüklenmeden önce transfer tüpünü kesen ve kartı kapatan bir mekanizma ile geçirilmiştir. Döner kuluçka makinesi 30 karta kadar barındırabilir. Tüm kart türleri on-line olarak 35,5 + 1,0ºC'de inkübe edildi.
6. Her kart her 15 dakikada bir döner inkübatörden çıkarıldı, reaksiyon okumaları için optik sisteme taşındı ve ardından bir sonraki okuma zamanına kadar inkübatöre geri döndü. Veriler, tüm inkübasyon süresi boyunca 15 dakikalık aralıklarla toplandı.
7. Sonraki adımların tümü cihazlar tarafından gerçekleştirildi, cihaz inkübasyon sıcaklığını, kartların optik okumasını kontrol eder ve analiz için test verilerini sürekli olarak izler ve bilgisayara aktarır. Test döngüsü tamamlandığında, sistem kartları otomatik olarak bir atık konteynerine attı.

3.3.7 Spesifik genlerin saptanması için *P. aeruginosa'nın* genotip tanımlaması

3.3.7.1 Genomik DNA ekstraksiyonu ve saflaştırma yöntemi

Bakteriyel genomik DNA, üreticinin protokollerine göre bir favor prep genomic DNA ekstraksiyon küçük kiti (Favorgen, Tayvan) kullanılarak ekstre edildi. DNA, PCR reaksiyonu için kullanılana kadar -20°C'de saklandı.

Numune Hazırlama

- Bakteri hücreleri transfer edilmiştir (kadar ila 1 x 109), bir gece boyunca kültür, 1,5 mL mikro santrifüj tüpüne (besleyici et suyu).

- 1 dakika boyunca 14,000 xg'de santrifüjleyin, ardından süpernatant atıldı.
- 180 µL GT Tamponu eklendi, ardından hücre peletini vorteksle yeniden süspanse edildi.
- 20 µL Proteinaz K eklendi (ddH2O'nun eklendiğinden emin oluyoruz).
- 60ºC'de en az 10 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon sırasında tüpü her 3 dakikada bir ters çevirdik. Adım 2 Lysis ile devam edildi.

Lizis

Numuneye 200 µL GB Tampon eklendi ve 10 saniye vorteks ile karıştırıldı. Incubated en az (10-15 70°C'de) dakika numune lizat temizlendi. İnkübasyon sırasında, tüp, her 3 dakikada bir tersine çevrilmiş olarak, bu süre. Gerekli elüsyon tamponunu (örnek başına 200 µL) 70ºC'ye kadar önceden ısıtıldı (adım 5 DNA Elüsyonu için).

DNA Bağlanması

Bir mutlak etanol 200 mL numune lizat ilave edildi ve şiddetli bir şekilde çalkalanarak hemen karıştırıldı. 2 mL'lik bir Toplama Tüpüne bir GD Sütunu yerleştirildi. Karışım (herhangi bir çözünmeyen çökelti dahil) GD Sütununa aktarıldı ve ardından 2 dakika 14,000 x g'de santrifüjlendi. Akış içeren 2 mL toplama tüpü atıldı ve ardından GD Sütununu yeni bir 2 mL Toplama Tüpüne yerleştirildi.

Yıkama

Bir W1 Tampon 400 µL GD sütun eklenmiştir. Ardından (30 saniye boyunca 14,000xg) Santrifüjlendi, ardından akışı attı. GD Sütunu (2 mL) toplama Tüpüne geri yerleştirildi. Daha sonra (600 µL) Yıkama Tamponu (etanol eklendiğinden emin oluyoruz) GD Sütununa eklendi. Santrifüjlendi (30 saniye için 14,000 x g) ardından akışı atıldı. 2 mL toplama Tüpüne geri yerleştirildiği GD Sütunu. Ve sütun matrisini kurutmak için tekrar 3 dakika (14,000 xg)'de santrifüjlendi.

Elüsyon

Kurutulmuş GD Sütunu, temizlenmiş (1,5 mL) bir mikro santrifüj tüpüne aktarıldı. 100 µL önceden ısıtılmış elüsyon tamponu1 eklendi, TE Tamponu sütun matrisinin merkezine yerleştirildi. Elüsyon tamponunun tamamen emilmesini sağlamak için en az (3 dakika) bekletin. Ardından saflaştırılmış DNA'yı ayrıştırmak için (30 saniye boyunca 14,000 xg) santrifüjlendi. Elüsyon tamponunun (10 mL Tris-HCl, 25ºC'de pH 8,5) GD Sütun matrisinin merkezine eklendiğinden ve tamamen emildiğinden emin olund.

3.3.7.2 Agaroz jel ile DNA ürünlerinin analizi

Her bir *P. aeruginosa* (CTX, TEM ve OXA) gen fragmanının amplikonu jel elektroforezi ile analiz edildi. Agaroz jeli %1,0 konsantrasyonda hazırlandı ve etidyum bromür ile boyandı. Daha sonra her amplikondan 8 µL seçilen kuyucuğa yüklendi. *P. aeruginosa* amplikonunun doğru boyutunu saptamak için jelin ilk kuyucuğuna bir DNA markörü yüklendi. PCR ürünleri, 45 dakika boyunca 81 voltta elektroforeze tabi tutuldu ve jel, UV aydınlatıcı altında görselleştirildi.

3.3.7.3 *P. aeruginosa* geninin amplifikasyonu

Primerlerin hazırlanması

Tris-Borate-EDTA tamponu (TBE)

109 g Tris baz, 55,54 g borik asit ve 20 mL EDTA (0,5 M) (pH = 8,0) uygun miktarda DW ile çözülerek Tris-borat 10x tampon çözeltisi hazırlandı ve ardından pH 7,8'e ayarlandı. Ve DW kullanarak 1 litreye kadar hacim. Çözelti, 15 dakika süreyle 121°C'de 15 psi'de otoklavlanarak sterilize edildi ve oda sıcaklığında saklandı.

Terabaytın 0,5 katı

Tris-borte 0,5x tampon çözeltisi, 1900 mL DW içinde 100 mL 10x TBE karıştırılarak hazırlandı.

Çizelge 3.7 PCR primer dizisi ve PCR ürünlerinin moleküler boyutu

Gen		Ön ve arka sıra (astar 3 / -5 /)	PCR ürün boyutu (bp)	Referans
TSSC1	F	CTCCAACGACGCGATCAAGT	150	(Zhang *et al.* 2011)
	r	TCGGTGTTGTTGACCAGGTA		

F = ileri sıra, R = geri sıra

Protokol

- Yüzde bir agaroz jeli, 1 g agarozun 100 mL 1x TBE içinde çözelti berraklaşana kadar kaynatılmasıyla hazırlandı. Çözeltinin 55°C'ye soğumasına izin verildi ve ardından jele etidyum bromür (0,5 µg/mL) çözeltisi ilave edildi. Agaroz çözeltisi, bir jel yapmak için kapalı bir plakaya döküldü.
- Kristalizasyondan sonra (Oda sıcaklığında yaklaşık 30 dakika), tarak ve bant çıkarılmıştır. Jel, 0,5x TBE tamponu ile doldurulmuş bir jel odasına yerleştirildi. Jel cepleri tamamen bir yalıtkan ile kapatıldı.
- Tüm PCR karışımı (25 µL) jel ceplerine damlatıldı. Ek olarak, hacim karşılaştırması için 5 µL DNA uzunluk standardı uygulandı.
- Daha sonra 100 eV'de 45 dakika elektroforez yapıldı.
- Elektroforez işlemi tamamlandığında, jel, bir UV uygulandı transilüminatör .Ve Gen Flaş jel dokümantasyon sistemi. Gözlenen aralıkları belgelemek için bir jel dokümantasyon sistemi kullanıldı.

3.3.7.4 Biyofilm üretiminin tespiti

Kültürlenmiş bakterinin gecelik kültürü, 1, 100 ve 200 oranında eklenen %1 glikoz ile Soy Tryptex (TSB) broth içinde seyreltildi. L bakteri kültürü, düz tabanlı 96 oyuklu polistiren mikrotitre tabakalarına (Hindistan) aşılandı,. Kültürler daha sonra aspire edildi ve kuyucuklar, pH 7,2 olan fosfat tamponlu tuzlu su ile üç kez yıkandı. Paneller daha

sonra gece boyunca havada kurutuldu ve %0,1 kristal menekşe ile lekelendi. Kuyucukların optik yoğunluğu, otomatik bir mikro-ELISA okuyucu kullanılarak 570 nm'de ölçüldü. Biyofilm olmayan bir ürün için\ 0,120 optik yoğunluk, hafif bir biyofilm ürünü için 0,120 -0,240 ve sağlam biyofilm üreticilerini karakterize etmek için [0,240] seçildi. Negatif (boş) kontrol olarak steril bir TSB kullanıldı. Arka plan absorpsiyonunu telafi etmek için, vakum OD okuma değeri test değerlerinden çıkarılmıştır. Biyofilmlerin yoğunluğu şu şekilde kategorize edilmiştir (Mathur *et al.* 2006). Biyofilm oluşturmak için Çizelge 3.8 seçimi.

Çizelge 3.8 Biyofilm oluşturmak

Organizma	**Organizasyonel gelişim değerleri**		
	(> 0,3 - 20) +++ (%)	(0,110-0,220) ++ (%)	(< 0,110) - (%)
(Pseudomonas aeruginosa)	21 (71,22)	3 (12,22)	3 (32,32)

3.3.7.5 Antimikrobiyal duyarlılık testi

Pseudomonas aeruginosa izolatları altı antibiyotik diskinde Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılarak antibiyotik duyarlılık testine tabi tutuldu. Test edilen antibiyotikler siprofloksasin (CIP, 5 mg), amikasin (AK, 30 mg), seftriakson (CRO, 30 mg) idi, levofloksasin (LEV, 10 mg), imipenem (IPM, 10 mg) ve sefepim (FEP, 30 mg (mg) tabletler (Oxoid, İngiltere).

3.3.7.6 Titanyum nanopartiküllerin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi

İnce difüzyon yöntemiyle, TiO_2 NP'ler, güçlü ve zayıf biyofilm üreten *P. aeruginosa'ya* karşı ince difüzyon yöntemiyle antimikrobiyal aktivite açısından test edildi. Saf *P. aeruginosa* kültürleri, steril Luria-Bertani et suyunda kültürlendi ve 37°C'de 16-18 saat inkübe edildi. 16-18 saat sonra, yukarıdaki aşılanmış kültürün optik yoğunluğunun 600 nm'de yaklaşık 0,135 olduğu kontrol edildi. Bir jel deliği kullanılarak Muller-Hinton agar plakaları üzerinde 6 mm çapında kuyucuklar yapılmıştır. Her suş üniform olarak tarandı.

3.4 İstatistiksel Analiz

Elde edilen istatistikler, kötü standart uygunsuzluk olarak konuşuldu ve kapasitelerin doğruluğunu ve şefkatini doğrulamak için istatistiksel olarak incelendi. Sosyal Bilimler İstatistik Paketi'ne (SPSS) form 17 kullanım t-testi ile yeni fraksiyon aracılığıyla pratik aritmetik analiz protokolü. Kapasitelerin olasılığı (P) dikkatli bir şekilde önemliydi (<0,05'te) (Narrator, etal, 2000).

4 BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Bulgular

4.1.1 *Pseudomonas aeruginosa* bakterilerinin teşhisi

Mannitol tuzlu agar: *P. aeruginosa'yı* ayırt etmek için bakteri kolonileri etiketlenmiştir. Bu argüman, *Pseudomonas aeruginosa'nın* %7,5 sodyum klorür içerdiğini, bu da birçok mikroorganizmanın büyümesini engellerken, bakteriler üzerinde büyür ve içinde bulunan mannitol şekerini fermente eder, bu da *Pseudomonas aeruginosa* fenol kırmızısı reaktifine neden olan asidin üretimine yol açar (Narang *et al.* 2003).

4.1.2 Biyokimyasal testler

Pseudomonas aeruginosa bakterilerinin izolatları üzerinde biyokimyasal testler yapılırken, hidrojen peroksiti parçalama ve onu su ve oksijen gazına dönüştürme yetenekleri sayesinde hepsinin katalaz üreticisi olduğu, burada pozitif sonucun gaz kabarcıklarının ortaya çıkması ile karakterize edildiği bulundu (H_2O_2), *Pseudomonas aeruginosa* bakterilerinin morfolojik ve biyokimyasal testleri Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

İzolatlar plazmada pıhtılaşma üretimi için test edildiğinde, bu *Pseudomonas aeruginosa*'dır, her ikisi de pozitif sonuç vermiştir, bu da bu izolatların bakteriye ait olduğunu gösterir (Lolans *et al.* 2004). *Pseudomonas aeruginosa*'yı ve ardından bakteriyel biyouyumluluğu kabul eder.

Pseudomonas aeruginosa 42°C'de yetiştirilir. Suşların çoğu kanlı agarda β-Hemoliz gösterir ve floresan yeşili renkli Cetrimide agarda yetiştirilir. IMViC testinin üzüm benzeri koku sonuçları ile tüm izolatlar indol için negatif iken, Cimon sitrat, oksidaz ve katalaz için pozitiftir.

Çizelge 4.1 *Pseudomonas aeruginosa* bakterilerinin morfolojik ve biyokimyasal testleri

No.	Test	Sonuç
1	Gram boyama	-
2	Hücresel görünüm	Hücreler gruplar halinde küreseldir
3	Büyüyen koşullar	Aerobik
4	kanlı ağar	B-Hemoliz
5	MacConkey ağarı	Laktozsuz fermente edilmiş
6	setrimid ağarı	+floresan yeşil renk, yüksek koloniler ve üzüm benzeri koku ile büyüme
7	Katalaz testi	+
8	Oksidaz testi	+
9	Sitrat	+
10	Koagülaz	-
11	Hareketlilik	Hareketli
12	İndol	_-
13	42C'de Büyüme	+
14	4C'de Büyüme	-
15	Kligler Demir ağarı	K\K(taban\taban)

(+): pozitif sonuç, (-): negatif sonuç

4.1.3 Antibiyotik Gram negatif izolat duyarlılık testi

Pseudomonas aeruginosa, bakteri izolatları test edildi ve ardından azitromisin, klindamisin, eritromisin dahil gentamisin, ofloksasin, tobramisin, doksisiklin, nitilmisin, trimetoprim - sülfametoksazol, kloramfenikol, ve Amikasin sülfametoksazol. bunlara karşı *Pseudomonas aeruginosa* duyarlılığını belirlemek için test edilmiştir. Çizelge 4.2'de sonuçlar gösterilmektedir. Elde edilen verilerden, test edilen mikroorganizmaların yüzde 66'sının ofloksasin grubundaki florokinolonlara dirençli olduğu açıktır. Bakteri duvarının antibiyotiğe geçirgenliğini azaltarak bakteriler antibiyotik ofloksasine direnç gösterebilirler. (Kumar *et al.* 2017) gösterdiği gibi, bakteri hücresine nüfuz etmesine izin vermeyin. Azitromisin ve eritromisin grubundan gelen makrolid, bir esteraz olarak işlev gören iki antagonistten biri olduğundan, bakterilerin bunlara karşı direnci bu iki işleme bağlanabilir.

Tablodan, bakterilerin Ofloksasin grubunun Florokinolonlarına %66 dirençli olduğu açıktır. Ofloksasin antibiyotiğe geri döner ve bakteriler, bakteri duvarının antibiyotiğe geçirgenliğini azaltarak onunla savaşabilir. (Ranjini *et al. 2017)*, bakteri hücresine girmesini engellediğini gösterdi. Azitromisin ve eritromisin grubundan makrolid, esteraz

görevi gören iki antagoniste aittir ve bakterinin bunlara karşı direnci bu iki mekanizma ile açıklanabilir.

Çizelge 4.2 Gram negatif bakteri izolatlarının antibiyotik duyarlılık testi

No	**İzolasyon numarası**	**Antibiyotik**											
		TOB	**AZM**	**OFX**	**TMB**	**C**	**DO**	**E**	**NITL**	**SMX**	**GEN**	**CLEAN**	**AK**
1	**2**	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
2	**3**	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
3	**12**	S	R	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S
4	**14C**	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
5	**20A**	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R
6	**20b**	R	R	R	R	S	R	R	I	R	R	R	R
7	**20C**	R	R	R	R	S	R	R	I	R	R	R	R
8	**21A**	R	R	R	R	S	R	R	I	R	R	R	R
9	**21b**	R	R	R	I	S	R	R	I	R	R	R	R
R. Per.%		**66,6**	**77,7**	**66,6**	**66,6**	**0**	**66,6**	**77,7**	**11,1**	**100**	**66,6**	**66,6**	**66,6**
Orta (I), Direnç (R), Hassas (S)													

Çalışmamızda Amikasine direnç (%66,6) bunun nedenidir, çünkü bu antibiyotik sınıfına bakteriyel direnç, genetik olarak eksprese edilen belirli enzimlerin, N-asetil-transferazların, adenil-transferazların ve fosfor-transferazların varlığından kaynaklanıyor olabilir. Bu enzimler, spesifik aminoglikozit değiştirici Enzim (AME'ler) türleri olarak tanımlanmıştır (Aghazadeh *et al.*2014). Bu tür enzimlerin kodlanmış genleri, taşınabilir plazmidal veya kromozomal kodlama olabilir (214). TOB, TS, CEN, CLIN sırasıyla %66,6 idi. *P. aeruginosa* izolatlarının aşağıdakilere dirençli olduğu gözlenirken: gentamisin %85-60 arasındadır (Mahesh *et al.*2012).

Elde edilen sonuçlar, azitromisine *P. aeruginosa* direnci gibi görünüyor, eritromisine (%77,7) vardı AZM, antibiyotik aktivitesinin merkezi dogmasını yeniden gözden geçirmek için benzersiz bir model sunuyor ancak AZM'nin hem patojen hem de konakçı üzerindeki etkileri hakkında daha fazla bilgi edinmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır (De Francesco *et al*.2014). Eritromisin ve azitromisin gibi makrolidler, 50S ribozomal alt birimine bağlanarak translasyonu bloke eden yaygın olarak kullanılan antibiyotiklerdir (Morita *et al.* 2013).

Başka bir çalışmada (Meng *et al.* 2020) Pseudomonas izolatlarının trimetoprim-sülfametoksazole (%69,8) en yüksek dirençli olduğu görülürken, trimetoprim-sülfametoksazol %66,6 idi, bu bizim mevcut çalışmamızla aynı fikirdeydi ancak antibiyotikte (kloramfenikol) vardı (%45,3) ve bu oran kloramfenikolün *aeruginosa*'ya duyarlı olduğunu gösteren çalışmamızı reddetmektedir.(%100). Bakterilerin Sülfametoksazole karşı dayanıklı olduğu (%100). Direnişin nedeni budur

Antibiyotiklerin, dış zarın geçirgenliğini değiştirme yeteneği ve akış pompalarına sahip olması, β-laktamaz enzimleri üretmesi ve biyofilm oluşturması ve direnç genleri taşıyan direnç plazmitleri gibi birçok mekanizması vardır (Hong *et al*.2019).

4.1.4 Vitek2 kompakt sistem kullanılarak antibiyotiklerin minimum inhibitör konsantrasyonunun (MIC) değerinin belirlenmesi

Ticarcillin, Ticarcillin/Clavulanic Acid, Piperasilin, Piperasilin/Tazobaktam, Ceftazidime, Cefepime, Imipenem, Meropenem, Amikacin, Gentamicin, Tobramycin, Siprofloxacin, Colistin gibi on üç antibiyotiğin minimum inhibitör konsantrasyonlarını belirlemek için Vitek kompakt sistem 2'yi kullanma. AST test kartını benimseyerek (Pincus 2006)ve üreticinin BioMérieux talimatlarına göre. Sonuçlar, anti-Ticarsilin 17 izolatlarının en düşük inhibitör konsantrasyonu değerinin dirençli (%42,5), 2 izolatın orta derecede dirençli (%5) ve 21 (%52,5) duyarlı olduğunu göstermiştir. Anti-Ticarcillin/klavulanik asit ile ilgili olarak, sonuçlar 17 izolatın dirençli (%42,5) ve 23'ünün (%57,5) duyarlı olduğunu gösterdi ve hiçbir orta dirençli izolat göstermedi.

Anti-piperasiline gelince, sonuçlar 20 izolat (%50) dirençli, 20 (%50). Duyarlı gösterdi ve hiçbir orta dirençli izolat göstermedi.

Anti- Piperasilin/Tazobaktam sonuçları 18 izolat (%45) dirençli, 22 (%55) duyarlı ve orta dirençli izolat göstermedi.

Anti-seftazidim sonuçları 9 izolatta (%22,5) dirençli, 10 izolatta orta derecede dirençli (%25) ve 21 (%52,5) duyarlılığa işaret etti.

Sefepim antikoruna karşı direnç, sonuçlar 13 izolat (%32,5) dirençli, 10 (%25) orta derecede dirençli ve 17 (%42,5) duyarlı olduğunu gösterdi.

İmipenem sonuçları 6 izolatın (%15) dirençli, 2 izolatın orta derecede dirençli (%5) ve 32 (%80) duyarlı olduğunu gösterdi. Meropenem antagonistine gelince, sonuçlar 7 izolatın (%17,5) dirençli 3 izolatın orta derecede dirençli (%7,5) ve 30 (%75) duyarlı olduğunu gösterdi. Anti-Amikasin sonuçları 10 izolatta (%25) direnç gösterirken,6 izolat orta derecede dirençli (%15) ve 24 (%60) duyarlılık gösterdi. Gentamisin 10 izolat (%25) dirençli, 8 izolat orta derecede dirençli (%20) ve 22 (%55) duyarlılık gösterdi.

Anti-Siprofloksasin sonucu 9 (%22,5) dirençli, 9 izolat orta derecede dirençli (%22,5) ve 22 (%55) duyarlı iken, anti-Colistin sonucu 19 (47,5) dirençli ve 21 (52,5) olarak bulundu. duyarlı, kolistin için orta dirençli hiçbir izolat ortaya çıkmadı.

Son olarak, Tobramisin antikorunun sonuçları 21 izolatta (%52,5) en dirençli ve 10 izolatta (%25) duyarlı iken 9 (%22,5) orta derecede dirençli ve duyarlı idi Çizelge 4.3

Çizelge 4.3 Pseudomonas aeruginosa izolatları için antibiyotiklerin minimum inhibitör konsantrasyonuna direnç ve duyarlılık yüzdeleri

Antimikrobiyal	**MIC µg/mL**	**Duyarlılık**	**Direnç**	**Orta Düzey**
Tikarsilin	32	21 (52,5%)	17 (42,5%)	2 (5%)
Tikarsilin/klavulanik asit	16	23 (57,5)	17 (42,5%)	0
Piperasilin	8	20 (50%)	20 (50%)	0
Piperasilin/Tazobaktam	<= 4	22 (55%)	18 (45%)	0
Seftazidim	2	21 (52,5)	9 (22,5%)	10 (25%)
Sefapim	<=1	17 (42,5%)	13 (32,5%)	10 (25%)
İmipenem	2	32 (80%)	6 (15%)	2 (5%)
Meropenem	1	30 (75%)	7 (17,5%)	3 (7,5%)
Amikasin	<= 2	24 (60%)	10 (25%)	6 (15%)
Antibiyotik	<=1	22 (55%)	10 (25%)	8 (20%)
Tobramisin	<=	10 (25%)	21 (52,5)	9 (22,5%)
Siprofloksasin	<= 0,25	22 (55%)	9 (22,5%)	9 (22,5%)
Kolistin	<=0,5	21 (52,5)	19 (47,5%)	0

Çalışmamızın sonuçlarını diğer çalışmalarla karşılaştırarak (Khan and Faiz 2016), Suudi Arabistan Krallığı'ndaki Pseudomonas aeruginosa izolatlarının anti-Ticarsilin'e karşı direncinin %22,3'e yakın olduğunu bulmuştur. Çalışmada 17 (%42,5) olan bu durum, sistemik bakterilerin genellikle deriden izole edilen suşlara göre antimikrobiyal tedaviye daha dirençli olması, hastanın immünolojik yanıtı veya diğer ilaçlara müdahale etmesi nedeniyle numunelerdeki farklılıklardan kaynaklanabilir. (Al-Saray *et al.* 2022), *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının %56,5 oranında Piperacillin ile eşit karşılaşma gösterdiğini bildirmiştir. Başka bir çalışma, *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının %20'sinin Piperacillin'e dirençli olduğunu ortaya koydu. (Devi *et al*. 2012) ve bizim sonuçlarımıza bu kadar yakın, sırasıyla hem direnç hem de Hassas'ın 20'si (%50) idi. Irak'ta, (Hassan *et al.* 2012) tarafından yürütülen bir araştırma, bakterilerin Amikasine karşı direncinin %13,9 olduğunu bildirdi. Bizim sonuçlarımızda ise bakterilerin Amikasine direnci %25 olarak bulunmuştur. Başka bir çalışmada siprofloksasin direnç oranı %75 ve araştırmacı Meropenem için direnç oranı ve imipenem her ikisi için %70. Bu çalışma, Meropenem ve Imipenem bakterilerinin direncinin 7 (%17,5) ve 6 (%15) olduğunu belirlerken araştırmacının belirttiği (Dhar and McKinney 2007) anti-Tobramisine direnci %79,6 olarak belirlemiştir. Araştırmacılar ise (Khan and Faiz 2016) 136 bakteri izolatı üzerinde yaptıkları çalışmada, Ticarcillin'e karşı direnç oranının %54,4 ve Ticarcillin/Clavulanic Acid'e %61,8 oranında direnç gösterdiğini bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda ise kolistin (%47,5) bulunmuş ve bu çalışmaya (Mohanty *et al.*2013), kloistine dirençli bulanlar (%53,3) bulunmuştur

4.1.5 Biyofilm üretiminin tespiti

(*Pseudomonas aeruginosa*) izolatları standart bir TCP testine tabi tutuldu ve test edilen 22 izolat, art arda 18 ve 24 saat inkübasyondan sonra TSB ortamında pozitif biyofilm Fenotipi gösterdi. Renk pastası bakteriler için optik yoğunluk (OD), 570 nm dalga boyunda otomatik bir mikro elastik Elisa Okuyucu (Model 680, Bio-Rad) kullanılarak belirlendi.

4.1.6 TiO_2 NP'lerinin *P. aeruginosa*'a karşı antimikrobiyal aktivitesi

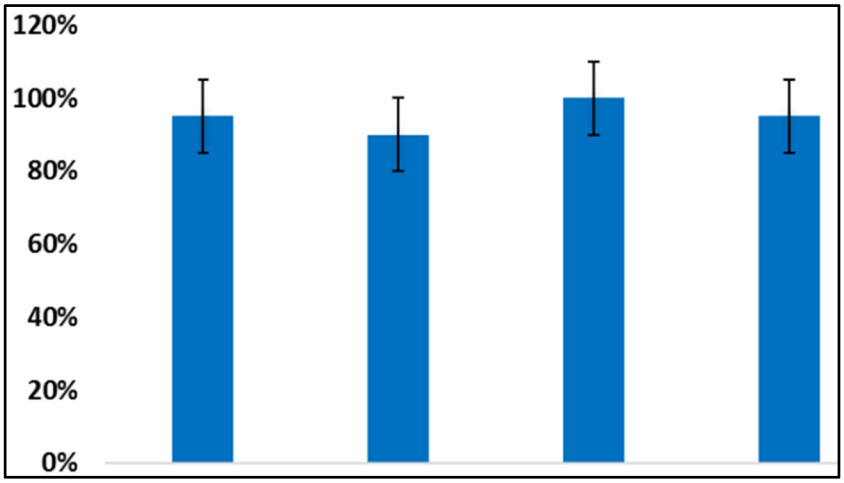
TiO_2 NP'lerin biyofilm üreten *Pseudomanasa* karşı antimikrobiyal aktivitesi ince difüzyon yöntemi kullanılarak araştırıldı. Her bir kuyunun etrafındaki inhibisyon zonlarının çapının (mm olarak) ortalama dört tekrarı TiO_2 NPs çözeltisi ile temsil edilir. Tüm konsantrasyonlarda, TiO_2 NP'lerin bakteriyel büyümeyi ve maksimum inhibisyon bölgesini inhibe edebildiği bulunmuştur. 500 g/mL'de 16 ve 17 mm ve güçlü ve zayıf biyofilm üretimine karşı 100 g/mL'de minimum 12 ve 14 mm inhibisyon bölgesi gözlendi. *Pseudomonas aeruginosa* sırasıyla izole eder. Benzer şekilde, TiO_2 NP'ler, bakteri üremesini ve 500 g/mL'de maksimum 14 mm'lik bir inhibisyon alanı ve 100 g/mL'de 11 ve 12 mm'lik bir minimum inhibisyon alanı inhibisyonu yeteneğine sahipti ve güçlü ve zayıf biyofilm üretimine karşı gözlemlendi. MRSA izolatları sırasıyladır.

Çizelge 4.4 TiO_2 NP'lerinin biyofilm üreten *pseudomonas*'lara karşı inhibisyon bölgesi

Çalışma no.	***Pseudomonas aeruginosa* yalıtılmış**	**Biyofilm şekillendirme yeteneği**	**TiO_2 NP'leri**		
			100 (Mg/ mL)	200 (Mg/ mL)	500 (Mg/ mL)
1	*P.A1*	Kuvvetli	10	12,5	13
2	*P.A5*	Zayıf	11	12	13

4.1.7 Hedef genin *pseudomonas aeruginosa* üzerindeki etkisi

Virülans genlerine prevalansı TSSC1 (% 100), TCC3 (% 95) ve sonra da TCC4 (% 90), en yüksek rastlanma göstermiştir. Şekil 4.1 *P. aeruginosa*'daki varyans geninin yayılmasını göstermektedir.



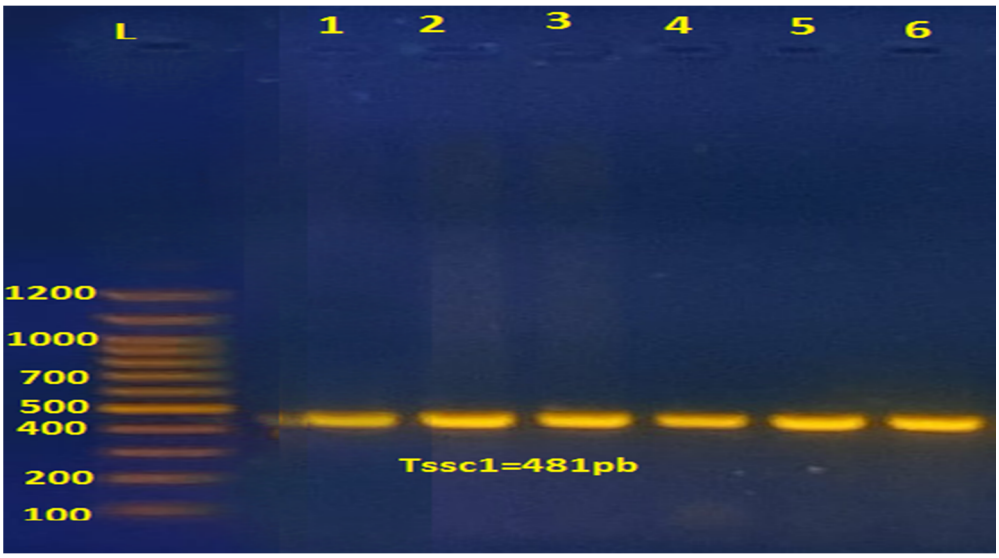
Şekil 4.1 *P. aeruginosa*'daki varyans geninin yayılması

Genel olarak, bir antibakteriyel olarak nanoparçacıkların mekanizması, metal iyonunun çözünmesi ve ardından ROS oluşumu ile ilgili iki faktörle ilgilidir. TiO_2 nanoparçacıklarının asıl mekanizması Ti2+'ın sıvı bir ortama salınması ve ardından bakteri yüzeyi tarafından emilir veya proteinler veya nükleik asitler gibi hücrenin aktif bileşenleri ile etkileşime girdiği hücreye girerek enzimatik aktiviteyi engeller. Hücrenin ve hücre-fizyolojik yolakların kaybı (Verma and Garg 2001). Daha yakın zamanlarda, TiO_2 nanoparçacıkları, *Vibrio cholerae*'ye karşı önemli antibakteriyel aktivite göstermiştir, bu da membranların depolarizasyonuna ve hem DNA hem de proteinin bozulmasına yol açmıştır (Ranjini *et al.* 2017). TiO_2 nanopartikülleri, *P. aeruginosa*, *E. coli, P. aureus, Proteus* ve *Acinetobacter* gibi birçok patojene karşı antibakteriyel bir karışım olarak antibiyotiklerle birlikte kullanılmıştır. Antibiyotik direnç seviyesinde bir azalmaya yol açar. Ayrıca, TiO_2 nanoparçacıkları hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilerin çoklu ilaç direncine karşı antibakteriyel olarak kullanılmıştır (Dunyach-Remy *et al.* 2016).

Bu çalışmada, *P. aeruginosa'da* bakteri kolonizasyonu ve enfeksiyonu indüklemede önemli olan virülans genlerine karşı aktif bir ajan olarak TiO_2 nanopartikülleri kullandık. Sonuç olarak, TiO_2, zararlı gen ekspresyonunu etkilemede önemli aktivite gösterdi. Bu sonuçlar, TiO_2'nin TSSC1 tetikleyicisi üzerindeki etkisini ve *P. aeruginosa'daki* TSSC1 baskılayıcı ve porin geni gibi çeşitli transkripsiyon düzenleyiciler üzerindeki etkisini gösteren önceki çalışma ile uyumluydu, bu da biyofilm oluşumu ve biyosiyanin üretimi

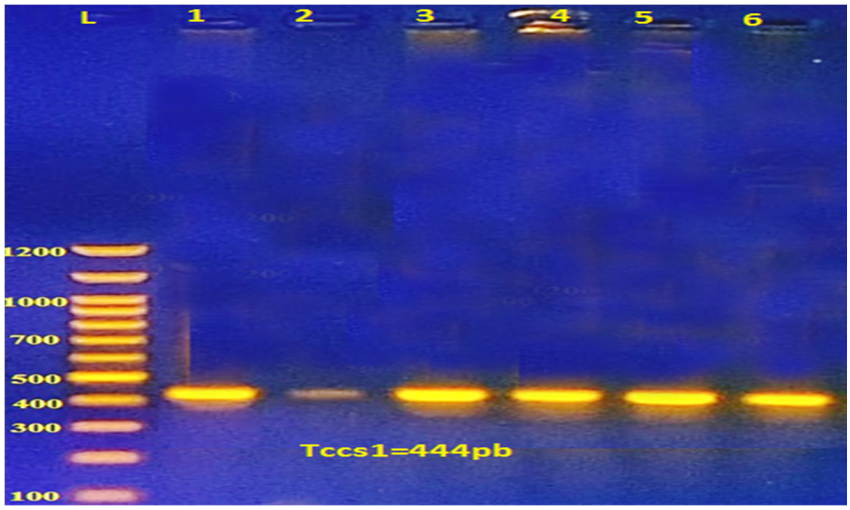
üzerinde bir etki ile sonuçlandı. TSSC1 ekran indisli ve TiO_2 işlemi olmaksızın TiO_2 tedavisidir.

Şekil 4.2 TiO2 ile tedaviden önce *P. aeruginosa*'daki virülans geninin PCR ürün bantlarının saptanmasını göstermektedir Şerit L merdivendir, şerit (1-5) pozitiftir, şerit (6) negatif kontroldür. Amplifikasyon fragmanları, %2 agaroz jel üzerinde ve (1) saat boyunca 75 hacimde elektroforez ile ayrıldı, U.V ışığı altında fotoğraflandı.

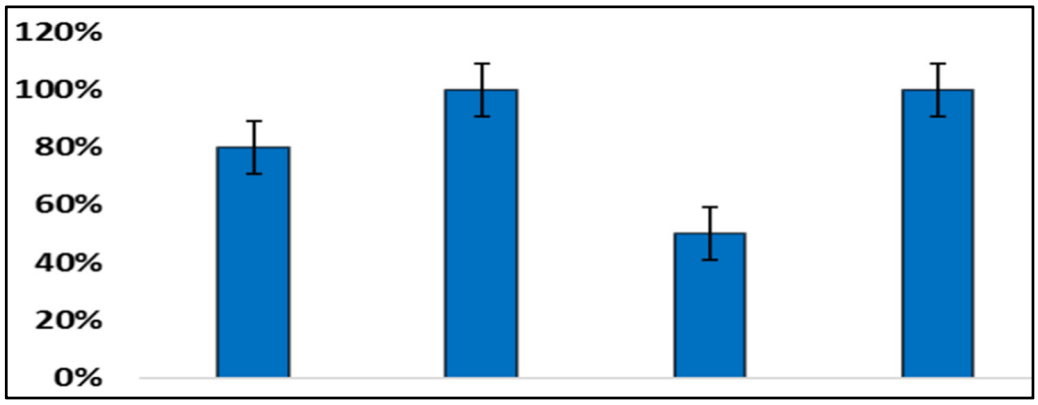


Şekil 4.2 *P. aeruginosa*'daki virülans geninin PCR ürün bantlarının saptanması

Şekil 4.3 TiO_2 tedavisinden önce ve sonra *P. aeruginosa*'daki virülans genlerinin PCR amplifikasyonunu göstermektedir. Gen amplifikasyonu, beklenen değerin 481 bp'lik bir beklenen amplifikasyonunu gösterir. tssc2 Gen amplifikasyonu, 444 bp'lik beklenen değeri gösterir. DNA Merdiveni: Moleküler Ağırlık: 100-10.000 bps. Şekil 4.4 TiO_2 nanopartiküller hedef gen o ene ifadesi N *P. aeruginosa* ve TiO_2 tedavisi üzerine etkisini göstermektedir.



Şekil 4.3 TiO_2 tedavisinden önce ve sonra *P. aeruginosa*'daki virülans genlerinin PCR amplifikasyonu



Şekil 4.4 TiO_2 nanopartiküller hedef gen o ene ifadesi N *P. aeruginosa* ve TiO_2 tedavisi üzerine etkisi

4.2 Tartışma

Pseudomonas aeruginosa, antibiyotik yüzleşmesine ve diğer bağlantılı enfeksiyonlara verilen biyofilmleri üretme yönündeki yeteneğini kullanmıştır (Kwon *et al.* 2008).Bu çalışmada, *pseudomonas'*ın %73,3'ünün biyofilm üretebildiği tespit edildi. Göreceli olarak 14,7, 52,7 ve ardından 56,6'dan daha büyük olmuştur (Mathur *et al.* 2006). Mevcut çalışmada, *P.aeroginosa*'daki biyofilmleri tanımlamak için TCP tekniği kullanıldı. Öngörülebilir araştırma laboratuvarı prosedürü için elde edilebilecek en kolay ve en ucuz yöntem bu olmuştur (Ruzicka *et al.* 2010). Antibiyotik direnci tasarımlarındaki

tutarlılıkları biyofilm ayırarak, ardından biyofilmler arasında antibiyotik çatışması yaratarak ilişkilendirildi (Cha *et al.* 2011) Biyofilmlerin, mevcut çalışmanın sonuçlarını destekleyen biyofilm yapıdaki hücrelerden daha fazla cinayete dirençli olduğu öne sürülmüştür (Cha *et al.* 2011) Biyofilmlerdeki daptomisin ve ardından tigesiklinin aktivitelerinin, diğer konservatif antibiyotik kullanan kişilere (klindamisin, vankomisin, gentamisin ve linezolid) göre daha sağlıklı olduğu sunulmuştur. Öte yandan, çalışma da vankomisin, ampisilin/sülfbaktam, rifampisin ardından linezolid antibiyotikler biyofilmlerin aksine gelişmiş aktiviteler sundu. *P.aeruginosa* ayrılarının vankomisin, teikoplanin ve linezolid'e karşı savunmasız olduğu tespit edildi, ancak çalışmada, yalnız vankomisine karşı deneyimsel olarak tam duyarlılık, ardından teikoplanin ve linezolid ile karşı karşıya kaldık. TiO_2'nin klinik alana dönüşmesi mümkün olan gerçek bir iyiliğe sahiptir. TiO_2 NP'lerinin çeşitli ayrıklara karşı antibakteriyel etkisi, *Pseudomonas aeruginosa* (Huang *et al.* 2008), *Pseudomonas spp* (Jiang *et al.* 2009), *Escherichia coli* (Chang *et al.* 2009), *K. pneumoniae* (Lee *et al.* 2007)'de olduğu gibi iyi belgelenmiştir. TiO_2 nanoparçacıklarının konsantrasyon artırıldığında, bölgenin boyutunda bir artışa yol açtığından bahsedilmiştir.

Bu çalışmada 100 ve 200 lg/mL'de inhibisyon bölgesinde önemli bir değişiklik olmazken, 500 lg/ml'de hacimde artış olmuştur. (Ansari *et al.* 2009), TiO_2 NP'lerinin artırılmış bir dikkati kullanılarak, bölge boyutunda sürekli bir artışın görülmediği belirtilmiştir Önceki araştırmacılar, H_2O_2 salınımının TiO_2-NP'lerin antibakteriyel etkisi için olası cihazlardan benzersiz olabileceğini öne sürmüşlerdir (Yamamoto *et al.* 2004).

TiO_2 ve diğer metal oksitlerin insanlara karşı toksisitesi, ileri düzeydeki dikkatlerde deneyimseldir, ancak TiO_2'nin daha düşük dikkatleri insan hücreleri için toksik olmamıştır. İyi dağılmış bir agar tekniğinde açıklanamayan Ti insidansı, açıkça TiO_2 NP'lerin antibakteriyel etkisini gösterir. Öte yandan, TiO_2 NP'ler, farklı mikroorganizmaların gelişiminin düzenlenmesinde ek gerçek olmuştur. (Gelover *et al.* 2006) TiO_2 NP'lerinin, çeşitli NP'ler arasında fotokatalitik antimikrobiyal etki için tipik olarak kasıtlı olduğu belirlenmiştir. (Roy *et al.* 2010) yaptıkları çalışmada, TiO_2 NP'lerinin antibakteriyel etki göstermede başarısız olduklarını, ancak antibiyotiklerle birleştiğinde mikroorganizmaların gelişimini kısıtlama konusunda yetenekli olduklarını

belirtmişlerdir. Fakat burada, TiO_2 NP'leri bir miktar karışımdan yoksun bırakılarak, *P.aeroginosa*'nın gelişimini ayırarak 500 lg/mL'de maksimum 14 mm'ye kadar ve 100 lg/mL'de minimum 11 ve 12 mm'lik bir parçaya karşı sağlam ve zayıf *P.aeroginosa* ayırmaktadır. Nanomalzemelerin biyolojik moleküllerle iletişimini bağlayan isteğe bağlı olası cihazları ayırır (Chang *et al.* 2009). Mikroorganizmaların negatif bir yük ilettiği, metalik oksitlerin ise mikrop ve korunan yüzey arasında "elektromanyetik" bir manyetizma oluşturarak pozitif bir yük ilettiği kabul edildi, daha sonra etkileşim gerçekleştiğinde mikropun okside olduğuna ve derhal öldüğü anlaşıldı (Chang *et al.* 2009). Böylece nanopartiküllerin antimikrobiyal etkisi, TiO_2 NP'lerin mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal ajan olarak sayısız kullanım olanağına sahip olduğunu ortaya koymuştur. Patojenik bakterilerin antimikrobiyal ajanlarla karşı karşıya gelmesi yeni yıllarda ortaya çıkmış ve ana sağlık sorunu haline gelmiştir. Bu çalışma, klinisyenler ve diğer sağlık uzmanları için *P. aeroginosa* bulaşmalarının etkisinde antibiyotik ve nanopartikülleri seçmeleri için değerli bir rehber olacaktır.

Ancak TiO2NP'ler ve TiO_2 NP'ler, 500 lg/mL'de maksimum 13 mm (güçlü), 11 mm (zayıf) ve 12 mm (hem güçlü hem de zayıf) inhibisyon bölgesi ile gelişmeyi, buna karşılık, biyofilm oluşturan *P.aeroginosa*'ya karşı ayırır. Çalışma, sağlam *pseudomonas* biyofilminin en büyük antibiyotiklerle yüzleşmeyi artırdığını doğruladı. Dolayısıyla psödomonasların aracılık ettiği hastalık özelliklerinin daha sağlıklı bir sempatik olması için esas vardır. Örneğin, mobil ve diğer tıbbi planların dışını kaplayan metal nanopartiküllerin büyümesi, mikroorganizma kolonizasyonunu, ardından cihazla ilişkili enfeksiyonları, ventilatörle ilişkili pnömoniyi, merkezi cilt enfeksiyonlarını ve kateterle ilişkili idrar yolu bulaşmalarını azaltmak için başka gelirler sağlayacaktır.

5 SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, çalışma, virülans genlerinin prevalansının en yüksek TSSC1 insidansını (%100) gösterdiğini sunmuş ve sağlam *Pseudomonas* biyofilminin çoğu antibiyotiğe karşı direnci arttırdığını doğrulamıştır. Iraklı hastalarda biyofilm oluşumu üzerinde titanyum nanoparçacığının pozitif biyofilm Fenotipi gösterdi.

5.1 Tavsiye

- Iraklı hastaların profilini diğerlerine kıyasla belirlemek için cilt enfeksiyonu hastalarıyla ilgili *P.aeroginosa* ve diğer bakterilerin tespiti oluşturulmalıdır.
- Popülasyonun daha iyi anlaşılması için daha büyük örneklem büyüklüğüne sahip ileri çalışmalar yapılmalıdır.

5.2 Etik Düşünceler

Tüm izolatlar rutin örnekleme sırasında toplandı. Hastalar projenin tarafsızlığı konusunda bilgiliydiler ve numune almam için bana izin verdiler. Hastanın verileri anonimliğin altında tutuldu. Irak Sağlık Bakanlığı/ Anbar Sağlık Müdürlüğü/ Ramadi Eğitim Hastanesi ve Heet Genel Hastanesi tarafından bir etik grup tarafından onay Ek 2'de belgelenmiştir.

KAYNAKLAR

Aghazadeh, M., Hojabri, Z., Mahdian, R., Nahaei, M. R., Rahmati, M., Hojabri, T., & Pajand, O. 2014. Role of efflux pumps: MexAB-OprM and MexXY (-OprA), AmpC cephalosporinase and OprD porin in non-metallo-β-lactamase producing Pseudomonas aeruginosa isolated from cystic fibrosis and burn patients. Infection, Genetics and Evolution, 24: 187-192.

Al-Saray, D., Al-Asady, F. M., & Tuhair, T. 2022. Role of Antibodies against SARS-COV-2 in the Detection of Corona Virus, its Transmissibility and Immunological Status Determination among Different Population in Babylon Province. Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences, 10(A): 644-649.

Ansari, M. A., Khan, H. M., Khan, A. A., Sultan, A. and Azam, A. 2012. Synthesis and characterization of the antibacterial potential of ZnO nanoparticles against extended-spectrum β-lactamases-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolated from a tertiary care hospital of North India. Applied microbiology and biotechnology, 94: 467-477.

Arora, B., Murar, M. and Dhumale, V., 2015. Antimicrobial potential of TiO2 nanoparticles against MDR Pseudomonas aeruginosa. Journal of Experimental Nanoscience, 10: 819-827.

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

Cha, J. O., Park, Y. K., Lee, Y. S., & Chung, G. T. 2011. In vitro biofilm formation and bactericidal activities of methicillin-resistant Staphylococcus aureus clones prevalent in Korea. Diagnostic microbiology and infectious disease, 70(1): 112-118.

Chang, C. W., Luo, L., Chou, C. K., Lo, C. F., Lin, C. Y., Hung, C. S., & Diau, E. W. G. 2009. Femtosecond transient absorption of zinc porphyrins with oligo (phenylethylnyl) linkers in solution and on TiO_2 films. The Journal of Physical Chemistry C, 113(27): 11524-11531.

Chen, L., Zou, Y., She, P. and Wu, Y., 2015. Composition, function and regulation of T6SS in Pseudomonas aeruginosa. Microbiological research, 172: 19-25.

De Francesco, V., Hassan, C., Ridola, L., Giorgio, F., Ierardi, E., & Zullo, A. 2014. Sequential, concomitant and hybrid first-line therapies for Helicobacter pylori eradication: a prospective randomized study. Journal of medical microbiology, 63(5): 748-752.

Devi, J. S., Bhimba, B. V., & Ratnam, K. 2012. In vitro anticancer activity of silver nanoparticles synthesized using the extract of Gelidiella sp. Int J Pharm Pharm Sci, 4(4): 710-715.

Dhar, N., & McKinney, J. D. 2007. Microbial phenotypic heterogeneity and antibiotic tolerance. Current opinion in microbiology, 10(1): 30-38.

Donlan, R.M., 2001. Biofilms and device-associated infections. Emerging infectious diseases, 7: 277-9.

Dunyach-Remy, C., Ngba Essebe, C., Sotto, A. and Lavigne, J. P. 2016. Staphylococcus aureus toxins and diabetic foot ulcers: role in pathogenesis and interest in diagnosis. Toxins, 8: 201-9.

Esparza-Soto, M. and Westerhoff, P., 2003. Biosorption of humic and fulvic acids to live activated sludge biomass. Water research, 37: 2301-2310.

Gellatly, S. L. and Hancock, R. E. 2013. Pseudomonas aeruginosa: new insights into pathogenesis and host defenses. Pathogens and disease, 67: 159-173.

Gelover, S., Gómez, L. A., Reyes, K. and Leal, M. T. 2006. A practical demonstration of water disinfection using TiO2 films and sunlight. Water research, 40: 3274-3280.

Georgieva, J. V., Kalicharan, D., Couraud, P. O., Romero, I. A., Weksler, B., Hoekstra, D. and Zuhorn, I. S. 2011. Surface characteristics of nanoparticles determine their intracellular fate in and processing by human blood–brain barrier endothelial cells in vitro. Molecular Therapy, 19: 318-325.

Griffitt, R. J., Luo, J., Gao, J., Bonzongo, J. C. and Barber, D. S. 2008. Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal, 27: 1972-1978.

Guo, D., Xie, G. and Luo, J. 2013. Mechanical properties of nanoparticles: basics and applications. Journal of physics D: applied physics, 47: e013001.

Haiko, J. and Westerlund-Wikström, B. 2013. The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence. Biology, 2: 1242-1267.

Han, C., Romero, N., Fischer, S., Dookran, J., Berger, A. and Doiron, A. L. 2017. Recent developments in the use of nanoparticles for treatment of biofilms. Nanotechnology Reviews 6: 383-404.

Hassan, K. I., Rafik, S. A., & Mussum, K. 2012. Molecular identification of Pseudomonas aeruginosa isolated from Hospitals in Kurdistan region. Journal of Advanced Medical Research, 2(3): 90-98.

Hong, J. S., Song, W., Park, H. M., Oh, J. Y., Chae, J. C., Shin, S., & Jeong, S. H. 2019. Clonal spread of extended-spectrum cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae between companion animals and humans in South Korea. Frontiers in microbiology, 10: 1371.

Huang, Z., Zheng, X., Yan, D., Yin, G., Liao, X., Kang, Y. and Hao, B. 2008. Toxicological effect of ZnO nanoparticles based on bacteria. Langmuir, 24: 4140-4144.

Jalvo, B., Faraldos, M., Bahamonde, A. and Rosal, R. 2017. Antimicrobial and antibiofilm efficacy of self-cleaning surfaces functionalized by TiO2 photocatalytic nanoparticles against Staphylococcus aureus and Pseudomonas putida. Journal of hazardous materials, 340: 160-170.

Jiang, W., Mashayekhi, H. and Xing, B. 2009. Bacterial toxicity comparison between nano-and micro-scaled oxide particles. Environmental pollution, 157: 1619-1625.

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: 23-28.

Kim, H. S., Park, B. K., Koo Kim, S., Han, S. B., Lee, J. W., Lee, D. G. and Kang, J. H. 2017. Clinical characteristics and outcomes of Pseudomonas aeruginosa bacteremia in febrile neutropenic children and adolescents with the impact of antibiotic resistance: a retrospective study. BMC infectious diseases, 17: 1-10.

Kumar, S., Lekshmi, M., Parvathi, A., Nayak, B. B., & Varela, M. F. 2017. Antibiotic resistance in seafood borne pathogens. Food borne pathogens and antibiotic resistance, 397-415.

Kwon, A. S., Park, G. C., Ryu, S. Y., Lim, D. H., Lim, D. Y., Choi, C. H. and Lim, Y. 2008. Higher biofilm formation in multidrug-resistant clinical isolates of Staphylococcus aureus. International journal of antimicrobial agents, 32: 68-72.

Lambert, P. A., 2002. Mechanisms of antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa. Journal of the royal society of medicine, 95: 22-8.

Lee, M. K., Lim, S. J. and Kim, C. K. 2007. Preparation, characterization and in vitro cytotoxicity of paclitaxel-loaded sterically stabilized solid lipid nanoparticles. Biomaterials, 28: 2137-2146.

Liu, Q., Meng, X., Li, Y., Zhao, C. N., Tang, G. Y. and Li, H. B. 2017. Antibacterial and antifungal activities of spices. International journal of molecular sciences, 18: 1283-8.

Lolans, K., Queenan, A. M., Bush, K., Sahud, A., & Quinn, J. P. 2005. First nosocomial outbreak of Pseudomonas aeruginosa producing an integron-borne metallo-β-lactamase (VIM-2) in the United States. Antimicrobial agents and chemotherapy, 49(8): 3538-3540.

Lovrić, J., Bazzi, H. S., Cuie, Y., Fortin, G. R., Winnik, F. M. and Maysinger, D. 2005. Differences in subcellular distribution and toxicity of green and red emitting CdTe quantum dots. Journal of Molecular Medicine, 83: 377-385.

Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. T., Carmeli, Y., Falagas, M. T., Giske, C. T., Harbarth, S., Hindler, J. T., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B. and Paterson, D. T. 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: 268-281.

Mahesh, A. R., Kumar, H., Ranganath, M. K., & Devkar, R. A. 2012. Detail study on Boerhaavia diffusa plant for its medicinal importance-A Review. Res J Pharm Sci, 1(1): 28-36.

Mathur, T., Singhal, S., Khan, S., Upadhyay, D. J., Fatma, T. and Rattan, A. 2006. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods. Indian journal of medical microbiology, 24: 25-29.

Meng, L., Hua, F., & Bian, Z. 2020. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): emerging and future challenges for dental and oral medicine. Journal of dental research, 99(5): 481-487.

Mohanty, J., Barooah, N., Dhamodharan, V., Harikrishna, S., Pradeepkumar, P. I., & Bhasikuttan, A. C. 2013. Thioflavin T as an efficient inducer and selective

fluorescent sensor for the human telomeric G-quadruplex DNA. Journal of the American Chemical Society, 135(1): 367-376.

Morita, Y., Tomida, J., & Kawamura, Y. 2014. Responses of Pseudomonas aeruginosa to antimicrobials. Frontiers in microbiology, 4: 422.

Nakae, T. 1976. Identification of the outer membrane protein of E. coli that produces transmembrane channels in reconstituted vesicle membranes. Biochemical and biophysical research communications, 71: 877-884.

Narang, U., Mainwaring, L., Spath, G. and Barefoot, J. 2003. In-vitro analysis for microbial barrier properties of 2-octyl cyanoacrylate-derived wound treatment films. Journal of cutaneous medicine and surgery, 7: 13-19.

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: 177-192.

Pincus, D. H. 2006. Microbial identification using the bioMérieux Vitek® 2 system. Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods. Bethesda, MD: Parenteral Drug Association, 1-32.

Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E. and Sintim, H. O. 2015. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. Future medicinal chemistry, 7: 493-512.

Rada, B. and Leto, T. L. 2013. Pyocyanin effects on respiratory epithelium: relevance in Pseudomonas aeruginosa airway infections. Trends in microbiology, 21: 73-81.

Ranjini, D. S., Parthiban, S., Kumar, G. P. and Mani, T. T. 2017. Development of Levofloxacin loaded nano-niosomes as nanoscale drug delivery for effective treatment of tuberculosis. World J. Pharm. Pharm. Sci, 6: 1819-1828.

Riedel, K., Hentzer, M., Geisenberger, O., Huber, B., Steidle, A., Wu, H. and Eberl, L. 2001. N-acylhomoserine-lactone-mediated communication between Pseudomonas aeruginosa and Burkholderia cepacia in mixed biofilms. Microbiology, 147: 3249-3262.

Roy, A. S., Parveen, A., Koppalkar, A. R. and Prasad, M. A. 2010. Effect of nano-titanium dioxide with different antibiotics against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology, 1: 37-41.

Ruzicka, F., Holaav, V., Tejkalova, R., Horvat, R., Heroldova, M. and Woznicova, V. 2010. Biofilm discovery and clinical significance of Staphylococcus epidermidis isolates. Folia Microbiol, 49: 596—600.

Shkodenko, L., Kassirov, I. and Koshel, E., 2020. Metal Oxide Nanoparticles Against Bacterial Biofilms: Perspectives and Limitations. Microorganisms, 8: 1545-1550.

Stryjewski, M. E. and Sexton, D. J. 2003. Pseudomonas aeruginosa infections in specific types of patients and clinical settings. In Severe infections caused by Pseudomonas aeruginosa, pp. 1-15, Boston.

Sukumaran, V., & Senanayake, S. 2016. Bacterial skin and soft tissue infections. Australian prescriber, 39(5): 159.

Tribedi, P. and Sil, A. K. 2014. Cell surface hydrophobicity: a key component in the degradation of polyethylene succinate by P seudomonas sp. AKS 2. Journal of applied microbiology, 116: 295-303.

Vallet, I., Diggle, S. P., Stacey, R. E., Cámara, M., Ventre, I., Lory, S., Lazdunski, A., Williams, P. and Filloux, A. 2004. Biofilm formation in Pseudomonas aeruginosa: fimbrial cup gene clusters are controlled by the transcriptional regulator MvaT. Journal of bacteriology, 186: 2880-2890.

Verma, R. K. and Garg, S. 2001. Drug delivery technologies and future directions. Pharmaceutical Technology, 25: 1-14.

Vert, M., Doi, Y., Hellwich, K. H., Hess, M., Hodge, P., Kubisa, P. and Schué, F. 2012. Terminology for biorelated polymers and applications. Pure and Applied Chemistry, 84: 377-410.

Yamamoto, T., Yamashita, F., Tanaka, I., Matsubara, E., & Muramatsu, A. 2004. Electronic states of sulfur doped TiO2 by first principles calculations. Materials transactions, 45(7): 1987-1990.

Yan, S. and Wu, G. 2019. Can biofilm be reversed through quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa?. Frontiers in microbiology, 10: 1582-7.

Zhang, L., Hinz, A. J., Nadeau, J. P. and Mah, T. F. 2011. Pseudomonas aeruginosa TSSC1 links type VI secretion and biofilm-specific antibiotic resistance. Journal of bacteriology, 193: 5510-5513.

Zoued, A., Durand, E., Bebeacua, C., Brunet, Y.R., Douzi, B., Cambillau, C., Cascales, E. and Journet, L. 2013. TssK is a trimeric cytoplasmic protein interacting with

components of both phage-like and membrane anchoring complexes of the type VI secretion system. Journal of Biological Chemistry, 288: 27031-27041.

EKLER

EK 1. Hastaların yaş ve cinsiyet bilgileri ve numune tipi

EK 2. Etik Kurul Onay Belgesi

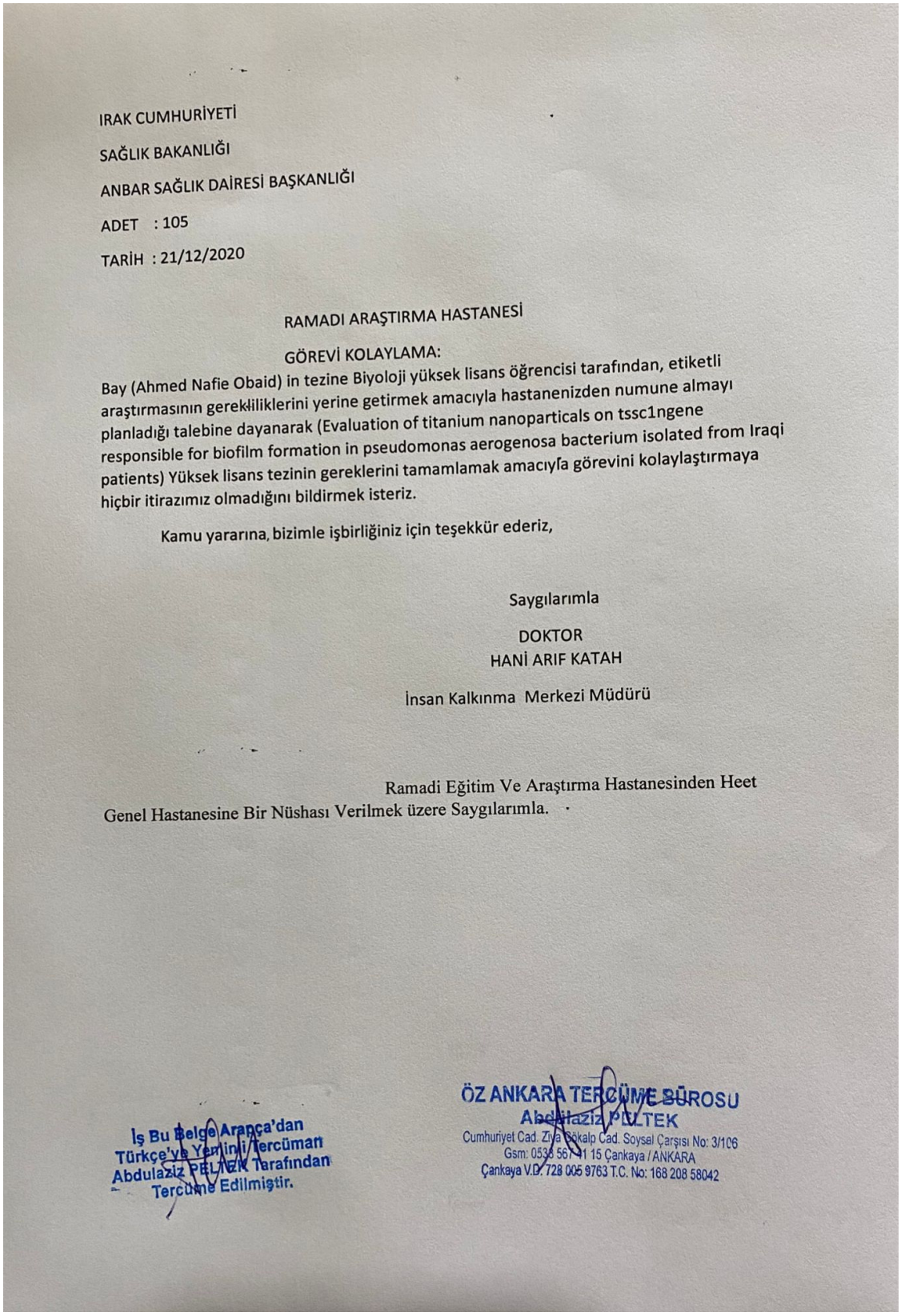
EK 1. Hastaların yaş ve cinsiyet bilgileri ve numune tipi

Hasta	Yaş	Cinsiyet	Örneklem
1	75	Erkek	Yara Enfeksiyonu
2	43	Erkek	Yara Enfeksiyonu
3	19	Erkek	Yara Enfeksiyonu
4	65	Erkek	Yara Enfeksiyonu
5	43	Erkek	Yara Enfeksiyonu
6	44	Erkek	Yara Enfeksiyonu
7	25	Erkek	Yara Enfeksiyonu
8	71	Erkek	Yara Enfeksiyonu
9	65	Erkek	Yara Enfeksiyonu
10	48	Erkek	Yara Enfeksiyonu
11	49	Erkek	Yara Enfeksiyonu
12	33	Erkek	Yara Enfeksiyonu
13	46	Erkek	Yara Enfeksiyonu
14	73	Erkek	Yara Enfeksiyonu
15	69	Erkek	Yara Enfeksiyonu
16	31	Erkek	Yara Enfeksiyonu
17	28	Erkek	Yara Enfeksiyonu
18	74	Erkek	Yara Enfeksiyonu
19	20	Erkek	Yara Enfeksiyonu
20	60	Erkek	Yara Enfeksiyonu
21	40	Erkek	Yara Enfeksiyonu
22	54	Erkek	Yara Enfeksiyonu
23	74	Erkek	Yara Enfeksiyonu
24	32	Erkek	Yara Enfeksiyonu
25	28	Erkek	Yara Enfeksiyonu
26	75	Erkek	Yara Enfeksiyonu
27	63	Erkek	Yara Enfeksiyonu
28	18	Erkek	Yara Enfeksiyonu
29	21	Erkek	Yara Enfeksiyonu
30	45	Erkek	Yara Enfeksiyonu
31	36	Erkek	Yara Enfeksiyonu
32	38	Erkek	Yara Enfeksiyonu
33	48	Erkek	Yara Enfeksiyonu
34	45	Erkek	Yara Enfeksiyonu
35	74	Erkek	Yara Enfeksiyonu

36	39	Erkek	Yara Enfeksiyonu
37	42	Erkek	Yara Enfeksiyonu
38	48	Erkek	Yara Enfeksiyonu
39	38	Erkek	Yara Enfeksiyonu
40	43	Erkek	Yanık Enfeksiyonu
41	77	Erkek	Yanık Enfeksiyonu
42	26	Erkek	Yanık Enfeksiyonu
43	35	Erkek	Yanık Enfeksiyonu
44	74	Erkek	Yanık Enfeksiyonu
45	35	Erkek	Yanık Enfeksiyonu
46	19	Erkek	Yanık Enfeksiyonu
47	41	Erkek	Yanık Enfeksiyonu
48	81	Erkek	Yanık Enfeksiyonu
49	28	Erkek	Yanık Enfeksiyonu
50	75	Erkek	Yanık Enfeksiyonu
51	42	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
52	48	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
53	38	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
54	43	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
55	77	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
56	26	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
57	35	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
58	74	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
59	35	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
60	19	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
61	41	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
62	81	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
63	28	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
64	75	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
65	45	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
66	45	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
67	45	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
68	78	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
69	36	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
70	44	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
71	64	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
72	63	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
73	85	Dişi	Yanık Enfeksiyonu

74	25	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
75	45	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
76	29	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
77	23	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
78	74	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
79	76	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
80	25	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
81	61	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
82	64	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
83	45	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
84	75	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
85	54	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
86	47	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
87	43	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
88	41	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
89	49	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
90	55	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
91	38	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
92	44	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
93	19	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
94	25	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
95	21	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
96	22	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
97	32	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
98	63	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
99	34	Dişi	Yanık Enfeksiyonu
100	57	Dişi	Yanık Enfeksiyonu

EK 2. Etik Kurul Onay Belgesi



IRAK CUMHURİYETİ

SAĞLIK BAKANLIĞI

ANBAR SAĞLIK DAİRESİ BAŞKANLIĞI

ADET : 105

TARİH : 21/12/2020

RAMADI ARAŞTIRMA HASTANESİ

GÖREVİ KOLAYLAMA:

Bay (Ahmed Nafie Obaid) in tezine Biyoloji yüksek lisans öğrencisi tarafından, etiketli araştırmasının gerekliliklerini yerine getirmek amacıyla hastanenizden numune almayı planladığı talebine dayanarak (Evaluation of titanium nanoparticals on tssc1ngene responsible for biofilm formation in pseudomonas aerogenosa bacterium isolated from Iraqi patients) Yüksek lisans tezinin gereklerini tamamlamak amacıyla görevini kolaylaştırmaya hiçbir itirazımız olmadığını bildirmek isteriz.

Kamu yararına, bizimle işbirliğiniz için teşekkür ederiz,

Saygılarımla

DOKTOR
HANİ ARIF KATAH

İnsan Kalkınma Merkezi Müdürü

Ramadi Eğitim Ve Araştırma Hastanesinden Heet Genel Hastanesine Bir Nüshası Verilmek üzere Saygılarımla.

İş Bu Belge Arapça'dan Türkçe'ye Yeminli Tercüman Abdulaziz PELTEK Tarafından Tercüme Edilmiştir.

ÖZ ANKARA TERCÜME BÜROSU
Abdülaziz PELTEK
Cumhuriyet Cad. Ziya Gökalp Cad. Soysal Çarşısı No: 3/106
Gsm: 0533 561 11 15 Çankaya / ANKARA
Çankaya V.D. 728 005 9763 T.C. No: 168 208 58042

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Ahmed Nafea Obaid OBAID

Eğitim

Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2019-Halen
Lisans	Anbar Üniversitesi Bilim Koleji Biyoloji Bölümü	1995-2001