T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YARA VE YANIK NUMUNELERİNDEN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* İZOLASYONU, TANIMLANMASI VE TOKSİN ÜRETİMİNDEN SORUMLU *EXO*U GENİ YÖNÜNDEN ARAŞTIRILMASI

Mustafa Riyadh Salman ALRUBAYE

YÜKSEK LİSANS

Biyoteknoloji Anabilim Dalını

Eylül-2020
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

YÜKSEK LİSANS

Yara ve Yanık Numunelerinden *Pseudomonas aeruginosa* İzolasyonu, Tanımlanması ve Toksin Üretiminden Sorumlu *Exo*U Geni Yönünden Araştırılması

Mustafa Riyadh Salman ALRUBAYE
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman: Prof.Dr. Evren YILDIZTUGAY
İkinci Danışman: Doç.Dr. Ahmet UYSAL

2020, 84 Sayfa

Jüri
Prof.Dr. Evren YILDIZTUGAY
Doç.Dr. Gökhan ZENGİN
Doç.Dr. Ceyda ÖZFİDAN KONAKÇI

Çalışmanın amacı doğrultusunda klinik şartlarda yaralardan ve yanıklardan toplam 206 örnek alınmıştır. Bunların 139 yanık ve 67 tanesi yara numunesidir. 1 ila 70 yaş aralığındaki farklı klinik vakalardan Bağdat Eğitim Hastanesi ve tıp hastanelerinden 3 ay süreyle toplanmıştır (Ocak-Mart). Örnekler, fenotipik özelliklerine bağlı olarak *Pseudomonas aeruginosa*'nın bakteriyel izolatlarını elde etmek için çeşitli kültür ortamlarında (MacConkey agar, Kanlı agar ve Cetrimide agar) kültüre alınmıştır. 206 örnekten toplam 50 *Pseudomonas aeruginosa* izolatı elde edilmiştir. 31 izolat yanıktan ve 17 izolat yara numunelerinden izole edilmiştir. İzolatlar hem Api 20E teşhis kiti hem de bir dizi biyokimyasal teste tabi tutulmuş olup, *Pseudomonas aeruginosa* bakterileri için izolasyon veriminin daha fazla teyit edilmesini sağlamıştır. Numunelerden 12'sinin (7 yanık ve 5 yara) *Pseudomonas aeruginosa* için pozitif olduğu tespit edildi. Suşların disk difüzyon yöntemi ve otomatize sistem olan VİTEK-2 ile çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları araştırıldı. Sonuçlar, izolatların çoğunun (% 92) Amoksisiline dirençli olduğunu gösterdi. Antibiyotiklere karşı direnç oranları sırası ile Amoksisilin (% 89), Gentamisin (% 81), Siprofloksasin (% 79), Tetrasiklin (% 74), Nalidiksik asit, Norfloksasin (% 72) ve İmipenem (% 66) olarak belirlendi. 50 izolatın 12'sinin *Exo*U geni için pozitif olduğu belirlendi. *Exo*U geninin polimeraz zincir reaksiyonunun (RT-PCR) sonuçları, NCBI veritabanı ve GenBank kullanılarak değerlendirildi. Sonuçlar, izolatların (% 98-100) lokal izolatlar ve uluslararası standart izolatlar arasında eşleştiğini gösterdi. *Exo*U geninin polimeraz zincir reaksiyonunun (RT-PCR) sonuçları, *Pseudomonas aeruginosa* ile ilişkili mutasyonları saptamak için kullanıldı ve transisyon, tüm izolatlarda *Exo*U geninin 5 mutasyonunun sıklığını gösterdi. Ek olarak, üç tip mutasyon tespit edildi. Bunlar 3 çerçeve kayması mutasyonu, 4 sessiz mutasyon ve 2 uyumsuz mutasyon şeklinde dağlım gösterdi.

Anahtar Kelimeler: Antibiyotik direnci, yanık, *Exo*U geni, *Pseudomonas aeruginosa*, yara

ABSTRACT

MS THESIS

Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* from Wound and Burn Samples, Identification and Investigation of ExoU Gene Reverse Responsible for Toxin Production

Mustafa Riyadh Salman ALRUBAYE

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE

DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Advisor: Prof.Dr. Evren YILDIZTUGAY
Second Advisor: Assoc.Prof.Dr. Ahmet UYSAL

2020, 84 Pages
Jury
Prof.Dr. Evren YILDIZTUGAY
Assoc.Prof.Dr. Gökhan ZENGİN
Assoc.Prof.Dr. Ceyda ÖZFİDAN KONAKÇI

For the purpose of the study, 206 samples were taken from wound and burn under clinical conditions. 139 of these are burn and 67 are wound samples. It was collected from Baghdad Education Hospital and medical hospitals for 3 months from different clinical cases between the ages of 1 and 70 (January-March). Samples were cultured in various culture media (MacConkey agar, Bloody agar, and Cetrimide agar) to obtain bacterial isolates of *Pseudomonas aeruginosa* based on their phenotypic properties. A total of 50 *Pseudomonas aeruginosa* isolates were obtained from 206 samples. 31 isolates were isolated from burn and 17 isolates from wound samples. The isolates were subjected to both the Api 20E diagnostic kit and a series of biochemical tests provided further confirmation of the isolation efficiency for *Pseudomonas aeruginosa* bacteria. 12 of the samples (7 burn and 5 wound) were found to be positive for *Pseudomonas aeruginosa*. The susceptibility of the strains to various antibiotics was investigated by VITEK-2, a disk diffusion method and automated system. The results showed that most of the isolates (92%) were resistant to Amoxicillin. Resistance rates to antibiotics were determined as Amoxicillin (89%), Gentamycin (81%), Ciprofloxacin (79%), Tetracycline (74%), Nalidixic acid and Norfloxacin (72%) and Imipenem (66%). While 12 of 50 isolates were determined to be positive for the *Exo*U gene. The results of the polymerase chain reaction (RT-PCR) of the *Exo*U gene were evaluated using the NCBI database and GenBank. The results showed that the isolates (98-100%) matched between local isolates and international standard isolates. The results of the polymerase chain reaction (RT-PCR) of the *Exo*U gene were used to detect mutations associated with *Pseudomonas aeruginosa*, and transitions showed the frequency of 5 mutations of the *Exo*U gene in all isolates. In addition, three types of mutations were detected. These showed dispersion as 3 framework shift mutations, 4 silent mutations, and 2 incompatible mutations.

Keywords: Antibiotic resitance, burn, *Exo*U gene, *Pseudomonas aeruginosa*, wound

ÖNSÖZ

Deneyim, bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, değerli danışman hocam Sayın Prof.Dr. Evren YILDIZTUGAY'a içten teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmalarım sırasında engin deneyim ve bilgilerini benden esirgemeyen Sayın Doç.Dr. Ahmet UYSAL hocama teşekkürlerimi ederim. Ayrıca, bizlere bu imkân ve olanakları sağlayan çok değerli hocam Sayın Prof.Dr. Mustafa KÜÇÜKÖDÜK'e, tez çalışmamın hazırlanmasında ve analiz süreçlerinde her zaman yanımda olan arkadaşlarım Arş.Gör. Fatma Nur ALP, Fevzi ELBASAN, Büşra ZENGİN ile emeği geçen herkese teşekkür ederim.

Her anımda yanımda bulunan ve destekleri ile bana güç katan değerli aileme teşekkürlerimi sunarım.

Tez projemizin gerçekleştirilmesinde maddi destek sağlayan S.Ü. Bilimsel Araştırmalar Koordinatörlüğü'ne (BAP – 20201002 nolu proje) katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Mustafa ALRUBAYE
KONYA-2020

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

ÖNSÖZ ..... **vi**

İÇİNDEKİLER ..... **vii**

ŞEKİLLER ..... **ix**

ÇİZELGELER ..... **x**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **xi**

1. GİRİŞ **1**

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **5**

2.1. Bakterilerin İsimlendirilmesi ve Sınıflandırılması 5
2.2. *Pseudomonas aeruginosa*'nın Genel Özellikleri 5
2.3. *Pseudomonas aeruginosa* Genomu 6
2.4. Epidemiyoloji 7
2.5. Patogenez 8
2.6. Virülans Faktörleri 8
2.7. *P. aeruginosa*'nın Antibiyotiklere Direnci 9
2.8. *P. aeruginosa*'da *Exo*U Geni 11
2.9. Yapılan Diğer Araştırmalar 13

3. MATERYAL VE YÖNTEM **17**

3.1. Materyal 17
3.1.1. Bakteri izolatlarının toplanması ve muhafazası 17
3.1.2. Reaktiflerin, çözeltilerin ve kültür ortamlarının hazırlanması 17
3.2. Metot 22
3.2.1. Bakteri izolatlarının tanımlanması 22
3.2.1.1. Morfolojik inceleme 22
3.2.1.2. Mikroskopik muayene 22
3.2.1.3. Biyokimyasal testler 23
3.2.1.4. API 20E tanımlama sistemi 24
3.2.1.5. VITEK-2 identifikasyon sistemi 26
3.2.3. Antibiyotik duyarlılık testi 26
3.2.4. VITEK-2 kompakt sistemi kullanılarak minimal inhibitör antibiyotik konsantrasyonunun belirlenmesi 27
3.2.5. Bakterilerin genetik çalışmaları 28
3.2.5.1. Genomik DNA ekstraksiyonu 28
3.2.5.2. DNA miktarının tayini 29
3.2.5.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu 29
3.2.5.4. Reaksiyon ayarı ve termal döngü protokolü 29

3.2.5.5. Sekanslama, hizalama (alignmnet) ve filogenetik analiz 30

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA 32

4.1. *P. aeruginosa*'nın İzolasyonu ve Teşhisi 32
4.2. *P. aeruginosa* İzolatlarının Antibiyotiklere Karşı Direnci 37
4.3. VITEK 2 Sistemi ile Antibiyotiklerin Minimum İnhibitör Konsantrasyon Değerinin (MIC) Tayini 39
4.4. *Exo*U Geninin Saptanması 40
4.4.1. *P. aeruginosa* izolatlarından DNA ekstraksiyonu 40
4.4.2. Elektroforetik çalışma 41
4.4.3. qRT-PCR ile *Exo*U geninin saptanması 41
4.5. Sekans Analizi 41
4.5.1. NCBI veritabanı kullanarak *P. aeruginosa* lokal izolatlarının *Exo*U genlerinin tanımlanması 41
4.5.2. Mutasyonlu veriler için sekanslama 42
4.5.3. *P. aeruginosa*'nın *Exo*U geninin sekans benzerlik matrisi ve filogenetik ağacı 44

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 46

5.1. Sonuçlar 46
5.2. Öneriler 47

6. KAYNAKLAR 48

EKLER 57

ÖZGEÇMİŞ 73

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. API20 E striplerine bakteri yüklemesi yapıldıktan sonraki görüntü (inkübasyondan önce).....**25**
Şekil 2.2. İnkübasyon sonrası API20 E stribinin *P. aeruginosa* pozitif sonucu.....**25**
Şekil 2.3. VITEK-2 kompakt sistemi.....**27**
Şekil 4.1. *Pseudomonas aeruginosa'nın* MacConkey agar üzerinde koloni görünümü **33**
Şekil 4.2. *Pseudomonas aeruginosa*'nın kanlı agar üzerindeki koloni görünümü **33**
Şekil 4.3. *Pseudomonas aeruginosa*'nın Cetrimid agar üzerindeki koloni görünümü...**34**
Şekil 4.4. Gram boyama sonucu Gram negatif *P. aeruginosa* basilleri……. **35**
Şekil 4.5. *P. aeruginosa*'nın antibiyogram test plağı.....**37**
Şekil 4.6. *P. aeruginosa* izolatlarının antibiyotiklere direnci.....**38**
Şekil 4.7. Yükleme boyası ile *P. aeruginosa*'nın genomik DNA'sının jel görünümü.. **41**
Şekil 4.8. İki grup halinde düzenlenmiş 8 *P. aeruginosa* klinik lokal izolatları için *Exo*U'nun komşu birleştirme filogenetik analizi…..... **44**
Şekil 4.9. Uluslararası izolatlarla karşılaştırıldığında 8 *P. aeruginosa* klinik lokal izolatları için *Exo*U'nun neighbor-joining filogenetik analizi…….....**45**

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. *P. aeruginosa* genom boyutları ……..……..……...**7**
Çizelge 2.2. *P. aeruginosa* virülans faktörleri ve rolleri…..……..……..……...**9**
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan besiyerleri.....**17**
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve reaktifler….....**18**
Çizelge 3.3. Kullanılan antibiyotik diskleri, konsantrasyonları ve inhibisyon zon çaplarının değerlendirilmesi……...**18**
Çizelge 3.4. *Exo*U genini belirlemek için kullanılan primerler…….....**29**
Çizelge 3.5. RT-PCR reaksiyon içeriği..... **30**
Çizelge 3.6. *Exo*U geni için Real Time PCR programı.....**30**
Çizelge 3.7. *Exo*U geni için Sanger metodunun programlanması.....**30**
Çizelge 4.1. İzolasyon kaynağına göre *P. aeruginosa* izolatlarının sayısı ve yüzde oranları **32**
Çizelge 4.2. *P. aeruginosa* suşlarının demografik dağılımı…….....**32**
Çizelge 4.3. *P. aeruginosa* tanımlaması için morfolojik ve biyokimyasal sonuçlar **36**
Çizelge 4.4. Vitek 2 kullanılarak yara ve yanıklardan izole edilen *P. aeruginosa* bakterilerine karşı kullanılan bazı antibiyotiklere direnç, orta duyarlı ve duyarlılık oranları ……..…….....**39**
Çizelge 4.5. Tespit edilen DNA konsantrasyonları (ng/µl)……..…….....**40**
Çizelge 4.6. GenBank referans alınarak, *P. aeruginosa*'da *Exo*U geni için DNA sekanslarının skoru, beklentisi ve uyumluluğu.....**42**
Çizelge 4.7. *P. aeruginosa* izolatlarının *Exo*U genlerindeki nükleotit değişimi, kodon sayısı, aminoasit değişimi ve mutasyon tipi **43**

SİMGELER VE KISALTMALAR

AMO:	Amoksisilin
AMP:	Ampisilin
CF:	Kistik fibroz
CIP:	Siprofloksasin
DNA:	Deoksiribonükleik asit
EDTA:	Etilen diamin tetra asetik acit
EF2:	Uzama faktörü 2
ExoU:	Ekzotoksin U
G:	Glisin
GEN:	Gentamisin
gyrA:	DNA giraz
H_2O:	Su
H_2O_2:	Hidrojen peroksit
IMI:	İmipenem
iPLA2:	Bağımsız fosfolipaz A2
K_2HPO_4:	Dipotasyum fosfat
K_2SO_2:	Potasyum hiposülfit
KOH:	Potasyum hidroksit
$MgCl_2$:	Magnezyum klor
$MgSO_4$:	Magnezyum sülfat
MICs:	Minimum inhibitör konsantrasyonlar
NA:	Nalidiksik asit
NCBI:	National Center for Biotechnology Information
NOR:	Norfloksasin
P. aeruginosa:	*Pseudomonas aeruginosa*
Pro:	Prolin
PCR:	Polimeraz zincir reaksiyonu
R:	Dirençli
RNA:	Ribonükleik asit
RT-PCR:	Gerçek zamanlı PCR
S:	Duyarlı
SNPs:	Tek nükleotid polimorfizmleri
T3SS:	Tip üç salgılama sistemi
TE:	Tetrasiklin
UDP-glucose:	Üridin difosfat glikoz
UV:	Ultraviyole
WHO:	Dünya Sağlık Örgütü
β-lactams:	Beta-laktamazlar

1. GİRİŞ

Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonadaceae familyasına ait olup, geniş bir yaşama skalasına sahip olan Gram negatif bir bakteridir (Silby ve ark., 2011). İnsan derisinde, yanıklar ve cilt hasarı durumunda, cilt enfeksiyonuna yol açabilen ve bakteriyel kolonizasyona en duyarlı olanlardan biridir (Azimi ve ark., 2019).

P. aeruginosa, hastane enfeksiyonları arasında yanıklarda ve pnömonide ventilasyonla ilişkili en yaygın bakteriyel enfeksiyonlara neden olan mikroorganizmaların başında gelir. Bu bakteri sağlıklı bireylerde de normal şartlarda nadiren bulunan fırsatçı bir patojen olmasına rağmen, kistik fibrozlu hastalarda ve immünsüpresyonu olan bireylerde daha yüksek oranda morbidite ve mortaliteye neden olmaktadır (Alaghehbandan ve ark., 2012; Pang ve ark., 2019). Hastalarda otitis media, folikül iltihabı (pelvis iltihabı), kornea iltihabı, yumuşak doku enfeksiyonları (yanık yaraları ve postoperatif), diyabetik ayak enfeksiyonları, idrar yolu enfeksiyonları, bakteriyemi ve kistik fibrozda pnömoni inflamasyonundan sorumludur (Liew ve ark., 2019).

P. aeruginosa çeşitli antibiyotiklere karşı direnç kazanmış bir bakteri türüdür. Bu bakteriye ait enfeksiyonların tedavisi, şu anda mevcut olan birçok antibiyotiğe direnme kabiliyeti göz önüne alındığında büyük bir zorluk haline gelmiştir (Lister ve ark., 2009; Lari ve ark., 2015). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) son zamanlarda enfeksiyonları tedavi etmek için acilen yeni antibiyotikler geliştirmek için ihtiyaç duyulan üç bakteri türünden biri olan karbapenem'e dirençli *P. aeruginosa*'yı dahil etmiştir (Tacconelli ve ark., 2018). Ek olarak, tedavi sırasında aşırı antibiyotik kullanımı, *P. aeruginosa*'nın çoklu ilaca dirençli suşlarının gelişimini hızlandırmakta, bu da bu mikroorganizmalara karşı etkisiz antimikrobiyal tedaviye neden olmaktadır (Hirsch ve ark., 2010).

P. aeruginosa (5.5-7 Mbp) genomu diğer seri bakterilere kıyasla nispeten büyüktür ve metabolizma, taşıma ve organik akışı için düzenleyici enzimlerin önemli bir bölümünü temsil eder. *P. aeruginosa*'nın gelişmiş kodlama kapasitesi, metabolik çok yönlülük ve çevresel değişikliklere uyum sağlama konusunda yüksek bir kabiliyet sağlamaktadır (Klockgether ve ark., 2011). *P. aeruginosa*'nın çeşitli ortamlarda hayatta kalma kabiliyeti genellikle büyük genom ile ilişkilendirilmiştir (Freschi ve ark., 2018). Ancak, genlerin farklı alanlara adaptasyonda yer aldığı moleküler detaylar, bu türün ayrıntılı popülasyon yapısının ne olduğu ve klinik önem taşıyan

özelliklerin kodlanmasında nasıl yer alabileceği henüz genomik düzeyde araştırılmamıştır.

Anaerobik ve pozitif oksitleyici gram negatif bakterilerden olan *Pseudomonas aeruginosa*, özellikle yoğun bakım ünitelerinde (YBÜ) nozokomiyal enfeksiyonların en önemli nedenlerinden biri olarak bilinmektedir (Neuhauser ve ark., 2003). Bu bakteri doğada pek çok yerde bulunabilmesine rağmen, YBÜ hastaları gibi zayıf bir bağışıklık sistemine sahip kişilerde fırsatçı enfeksiyonlar yapabilmektedir (Lyczak ve ark., 2000). Her yerde bulunan bir organizma olmakla birlikte, özellikle toprak, durgun su, sediment, yiyecek ve hastane gibi ortamlarda daha yoğun bir şekilde bulunmaktadır. *P. aeruginosa*'nın patogenezi, birkaç hücresel virülans ve hücre dışı faktörlerin üretiminden kaynaklanmaktadır. *P. aeruginosa*'nın en önemli hücre dışı faktörleri, her biri memeli hücrelerinde toksik etkiye sahip olan ekzotoksin S (*Exo*S), ekzotoksin U (*Exo*U), ekzoenzim A (*Exo*A), salgı proteinleri III, elastaz, alkalin proteaz ve IV proteazdır (Sadikot ve ark., 2005). Bu bakteri YBÜ'de Gram negatif bakterilerin enfeksiyonlarının yaklaşık % 13.5'ini oluşturur. YBÜ'de bu bakterilerin, birçok mekanizma tarafından birçok antibiyotiğe dirençli olmalarından dolayı kontrol edilme zorlukları vardır (Ramírez-Estrada ve ark., 2016).

Fırsatçı Gram negatif bir bakteri olan *Pseudomonas aeruginosa*, kemoterapi alan kanser hastalarında, kistik fibrosisli (KF) hastalarda, ciddi şekilde yanmış hastalarda ve immün sistemi baskılanmış veya savunmasız olan hastalarda ciddi enfeksiyonlara neden olur. Bu bakterinin yol açtığı enfeksiyon, söz konusu hastalarda yüksek morbidite ve mortalite ile ilişkilidir (Alikhani ve ark., 2017; Maroui ve ark., 2017). *P. aeruginosa*'nın farklı antibiyotik sınıflarına karşı direncini artırmak dünya çapında büyük bir endişe kaynağıdır. Yanık hastalarının bulunduğu yatakhanelerde ve yoğun bakım ünitelerinde geniş spektrumlu antibiyotiklerin aşırı kullanılmasının ardından, bakteriler üzerinde seçici bir baskı oluşturarak muhtemelen çoklu ilaca dirençli (MDR) suşların ortaya çıkmasına neden olmuştur. Günümüzde MDR *P. aeruginosa* dünyadaki hastane enfeksiyonlarının % 4-60'ından sorumludur (Safaei ve ark., 2017). *P. aeruginosa* tarafından çoklu antibiyotik sınıflarının direnci için çeşitli mekanizmalar gösterilmektedir. Ana direnç mekanizmalarından birinde; çeşitli enzimlerin üretimi, genişletilmiş spektrumlu beta-laktamazlar (ESBL'ler) ve metalo-β-laktamazlar (MBL'ler) dahil olmak üzere beta-laktamları ve karbapenemleri devre dışı bırakır (Karami ve ark., 2017).

P. aeruginosa, yüksek nemli ve basit besinlere sahip bir ortam gibi çeşitli koşullar altında büyüyebilen her yerde bulunan bir mikroorganizmadır. Antibiyotik ve dezenfektanlara karşı yüksek direncinden dolayı, bu bakteri, doktor ve hemşirelerin kıyafetleri, lavabolar, yiyecekler, bilgisayar klavyeleri, kanalizasyonlar, musluklar, içme suyu, eczane preparatları ve kontamine tıbbi ekipman dahil olmak üzere, hastanenin çeşitli alanlarında sıklıkla bulunur (Davane ve ark., 2014; de Abreu ve ark., 2014).

*Exo*S, enfeksiyonun kolonizasyonu, istilası ve yayılma aşamalarında rol oynayan majör bir sitotoksindir (Bradbury ve ark., 2010). *Exo*U, fosfolipaz aktivitesine sahip ve çeşitli ökaryotik hücreleri *in vitro* olarak öldürebilen güçlü bir sitotoksindir. Ek olarak, *Exo*U bakterilerin diğer tip III sekresyon sistemleri (TTSS) efektörlerinden daha büyük bir virülansa sahiptir (Agnello ve Wong-Beringer, 2012).

P. aeruginosa, tip III sekresyon sistemleriyle (TTSS) ilgili protein ürünlerinden en az bir veya daha fazla *Exo*S, *Exo*T, *Exo*U ve *Exo*Y genini barındırmaktadır. Bu ürünlerin *in vitro* olarak sitotoksik bir etki gösterdiği bilinmektedir. Ayrıca, klinik çalışmalarda, bu toksinlerin varlığı, *P. aeruginosa* enfeksiyonu olan hastalar arasında çeşitli çalışmalarla rapor edilmiştir (Hauser ve ark., 2002; Sato ve Frank, 2004; Kipnis ve ark., 2006). Ancak, bu TTSS ile ilişkili toksin genleri, bireysel *P. aeruginosa* suşlarının genomundaki mevcudiyeti bakımından heterojenite göstermektedir. Örneğin, *Exo*U ve *Exo*S'nin varlığı birbirini dışlamaktadır (Feltman ve ark., 2001; Berthelot ve ark., 2003). Normalde, klinik suşların % 90'ından fazlası *Exo*T ve *Exo*Y genleri içerir, ancak idrardan izole edilen izolatlar nispeten düşük bir seviyede mevcut olan *Exo*Y genine sahiptir ve bu oran yaklaşık % 70 seviyesindedir (Feltman ve ark., 2001).

Bazı *P. aeruginosa* suşları, artan virülansla ilişkili olan *Exo*U toksinini üretir. *Exo*U, fosfolipaz aktivitesi ile konakçı membrandaki lipid tabakanın bozunmasıyla konak hücrede hasara neden olur. *Exo*U yaygın olarak sitotoksisite olarak tanımlanmıştır, bu da epitel hücreleri ve nötrofiller dahil olmak üzere çok sayıda konakçı hücrenin öldürülmesiyle sonuçlanmaktadır (Pazos ve ark., 2017).

Bu çalışmada; virülan *Exo*U genotipine bağlı olarak, i) enfekte olmuş yara ve yanıklardan *P. aeruginosa* izolasyonu, ii) kimyasal testler ve VITEK 2 sistemi kullanılarak *P. aeruginosa*'nın teşhisi ve tanımlanması, iii) VITEK 2 sistemi kullanılarak *P. aeruginosa*'da antibiyotik direncinin incelenmesi, iv) gerçek zamanlı

PCR kullanarak *P. aeruginosa* izolatlarında *Exo*U geninin tespit edilmesi, v) *Exo*U genlerinin dizi analizlerinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Bakterilerin İsimlendirilmesi ve Sınıflandırılması

P. aeruginosa, *Pseudomonadaceae* familyasının bir üyesi olarak kabul edilen bir proteobakteridir. 1882'de Fransız bakteriyolog ve kimyager Carle Gessard tarafından, bandajları mavi ve yeşil olan askerlerin yaralarında keşfedilmiştir (o zamanlarda *Bacillus pyocyaneas* olarak adlandırılmıştır) (Lyczak ve ark., 2000; Moore ve Flaws, 2011), daha sonra *Pseudomonas pyocyaneas* adını almıştır ve son olarak *Pseudomonas aeruginosa* olarak isimlendirilmiştir (Lister ve ark., 2009). Bu cinsin 25'ten fazla türü, insan enfeksiyonlarına neden olur ve bunların çoğu, fırsatçı enfeksiyonlardır (Stover ve ark., 2000b). Sınıflandırmadaki ilk kullanılan yöntem morfolojik özelliklere göre olmuştur. İkinci sistem ise, DNA ve RNA arasındaki benzerliklere dayanır (Al-Qasi, 2012b). Bergey'in metodolojik bakteriyolojisine göre *P. aeruginosa*'nın bilimsel sınıflandırması aşağıdaki gibidir (Brown, 1939).

Kingdom: Bacteria
Phylum: Proteobacteria
Class: Gamma Proteobacteria
Order: Pseudomonadales
Family: Pseudomonadaceae
Genus: Pseudomonas
Species: *Pseudomonas aeruginosa*

2.2. *Pseudomonas aeruginosa*'nın Genel Özellikleri

P. aeruginosa, Gram-negatif ve her yerde bulunabilen bir bakteridir. Özellikle bağışıklık sistemi zayıf olan hastalarda hayatı tehdit eden çok çeşitli akut ve kronik enfeksiyonlara neden olabilen fırsatçı bir insan patojenidir. Kistik fibrozis (CF) hastalarında morbidite ve mortalitenin ana nedeni olduğu ve çok çeşitli antibiyotiklere kendinden dirençli iken hastaneye yatırılan hastaları etkileyen önde gelen nozokomiyal patojenlerden biri olduğu için özellikle önemlidir (Moradali ve ark., 2017).

Bu Gram-negatif yapıda, 0.5-3 μm ila 1.5-3 μm olan çubuk şekilli ve mobilizasyon için bir flagellum'a sahip bir bakteri türüdür. Gram-negatif bakterilerin

çoğundan bireysel olarak *P. aeruginosa* bir oksidaz reaksiyonu için pozitiftir. Ayrıca, laktozu fermente edemez. *P. aeruginosa* suda, bitkilerde, toprakta ve hayvanların epidermisinde bulunur. Doğada, genellikle suda yüzen bir plankton veya bir biyofilm olarak bulunur. Benzersiz olarak, *P. aeruginosa* çeşitli sıcaklık ve düşük besin varlığında gelişebilir ve hayatta kalabilir. Önceki çalışmalarda, değişen ortamlara uyum sağlama amacıyla *P. aeruginosa* saf su içinde büyüdüğü gözlemlenmiştir (Jenny ve Kingsbury, 2018). Fırsatçı bir patojen olan *P. aeruginosa*, konağını enfekte etmek için, konakçı hücrenin zayıf olması gereklidir (Pier ve Ramphal, 2005). Bu durum, hastane şartlarında tedavi amaçlı bulunan hastalarda bu tip fırsatçı patojenlerinin ne denli olumsuz sonuçlar doğuracağının kanıtı olabilmektedir. *P. aeruginosa*'nın solunum sisteminde kolonizasyonu sepsis ve ölüm ile ilişkilidir. İmmünsüprese olan veya önemli miktarda travma yaşayan herhangi bir hasta, bir enfeksiyonun kolonizasyonu için risk altındadır. Enfeksiyon sorunu yaşayan hastalar için mortalite oranı % 50'ye yakındır (Baron, 1996; Jenny ve Kingsbury, 2018).

2.3. *Pseudomonas aeruginosa* Genomu

P. aeruginosa suşları büyük genomlara sahiptir (~ 5-7 Mbp). Metabolik kapasiteleri, çok sayıda sekonder metabolit ve polimer üretme kabiliyetlerinin yanı sıra çeşitli karbon kaynakları ve elektron alıcılarını kullanma yetenekleriyle geniş bir kapasiteye sahiptir. Büyük ölçüde korunmuş olan *P. aeruginosa* genlerinin, bilinen bakteri genomlarında gözlemlenen düzenleyici genlerin ve ağların en yüksek oranda olduğu ve çeşitli tepkimelere yanıt vermek ve bunlara uyum sağlamak için kodlandıkları ileri sürülmektedir (Stover ve ark., 2000a; Mathee ve ark., 2008; Frimmersdorf ve ark., 2010). Genom hem laboratuvar suşlarında hem de klinik ve çevresel örneklerden izole edilmiş kültür suşlarında yüksek oranda korunmaktadır. Bu büyük genomun önemi, bakteriye, bakterilerin birçok farklı ortama uyum sağlamasına izin veren muazzam bir çeşitlilikte metabolik yolaklar ve fizyolojik tepkiler sağlamasıdır. Hem klinik hem de çevresel suşların çalışmaları, genomun % 90'ının suşlar arasında korunduğunu ve çoklu suşların bulunduğu habitatlarda, belirli bir fenotip nedeniyle hiçbir suşun baskın görünmediğini göstermiştir (Lee ve ark., 2006). *P. aeruginosa* genomu Çizelge 2.1'de gösterilmektedir (Mathee ve ark., 2008).

Çizelge 2.1. *P. aeruginosa* genom boyutları

Suş	**PA2192**	**C3719**	**PAO1**	**PA14**	**PACS2**
Genom Büyüklüğü(bp)	6,905,121	6,222,097	6,264,404	6,537,648	6,492,423
ORFs	6,191	5,578	5,571	5,905	5,676

2.4. Epidemiyoloji

Basit olmaları ve büyüme gereksinimindeki kolaylıklardan dolayı her yerde bulunabilen *P. aeruginosa*'ya maruz kalmayı önlemek neredeyse imkansızdır (Moore ve Flaws, 2011). Bu bakteriler toprakta ve çeşitli su solüsyonlarında, dezenfektanlarda ve sabunlarda yaygın olarak bulunur (Brooks ve ark., 2013). Ayrıca genellikle hastane ortamında, özellikle su tahliyeleri, bulaşıklar ve temizlik kovaları gibi ıslak alanlarda bulunabilirliği artmaktadır. Büyümeleri göz damlası ve merhemlerin yanı sıra bazı dezenfektan çözeltilerinde (Elraih, 2015), kontakt lens çözeltilerinde ve preparatlarında da gözlemlenmiş ve bunların anestezik maskelerde de bulunabilirliği saptanmıştır (Zhapouni ve ark., 2009). Bunlara ek olarak nozokomiyal enfeksiyonların nedeni olabilmelerinin yanı sıra dezenfektan sabun çözeltisi ve temizleyici içeren hekzakloropanda da büyüdüğü saptanmıştır (Levinson, 2017).

P. aeruginosa, metaller, plastikler, tıbbi implant materyalleri ve dokular dahil olmak üzere çeşitli yüzeylere yapışan ve yok edilmesi çok zor olan karmaşık bakteri toplulukları ile biyofilmler oluşturma eğilimindedir (An ve ark., 2003). Bu bakteri insan vücudunda özgürce yaşayan bir bakteri türü değildir, ancak sindirim sisteminin florasında az miktarda da olsa bulunur. Vücudun ıslak yüzeylerinin çeşitli yerlerinde, koltuk altında ve perine üzerinde geçici bir koloni oluşturabilirler ve boğaz ila burunda kolonize olarak bulunabilirler (Moore ve Flaws, 2011). *P. aeruginosa*, doğası ve çoklu ilaç direncine bağlı olarak dünya çapında inflamasyon yayılımının yaklaşık % 10 - 15'ini kapsamaktadır (Strateva ve Yordanov, 2009). *P. aeruginosa*'nın ıslak ortamlarda büyüme eğilimi, toprak ve sudaki doğal varlıklarının bir yansıması olabilir (Hostacka ve Majtan, 1997).

2.5. Patogenez

P. aeruginosa tehlikeli bir patojendir, çünkü çoklu virülans faktörlerini bünyesinde barındırmaktadır. Dermatit, endokardit ve idrar yolu enfeksiyonları, göz, kulak, kemik, eklemler ve özellikle solunum yolu enfeksiyonları gibi çeşitli enfeksiyon tiplerine neden olur. *Pseudomonas* enfeksiyonlarına karşı aşırı duyarlı olan kistik fibrozlu hastalar kötü prognoz ve mortalite gösterir. Diğer birçok gram negatif bakteri ile birlikte *P. aeruginosa*'nın önemli bir virülans faktörü, efektör toksinleri doğrudan bakteriden konakçı hücre sitozolüne aktaran içi boş bir moleküler iğne olan tip III salgı sistemidir. Bu karmaşık makromoleküler mekanizma, oldukça düzenli bir şekilde çalışır ve konukçu hücreyi birçok farklı şekilde değiştirebilir. Ökaryotik konak hücre yanıtlarını manipüle eden majör bir virülans belirleyicisi olan tip III sekresyon sistemi (T3SS), geniş bir patojen aralığında bulunur. Efektör toksinlerini bakterilerden konakçı sitozole direk bir şekilde veren özel bir iğne benzeri yapıdır. Bu sistem ökaryotik hücre membranlarıyla temas halinde aktive olur, sinyal iletimini engeller ve konakçı immün yanıtlarında hücre ölümü veya değişikliklerine neden olur. *P. aeruginosa*'nın T3SS'si, iç bakteri zarını, periplazmik boşluğu, peptidoglikan tabakasını, dış bakteri zarını, hücre dışı boşluğu ve konukçu hücre zarını kapsayan bir makromoleküler kompleks oluşturan çeşitli proteinlerden oluşur. *P. aeruginosa*'nın dört efektör toksini tanımlanmıştır: *Exo*S, *Exo*T, *Exo*U ve *Exo*Y.

2.6. Virülans Faktörleri

P. aeruginosa patogenezi, bu bakterilerin patogenezinde ve dokuların istilasında önemli rol oynayan çok sayıda hücresel ve hücre iskeleti faktöre bağlı bir dizi virülans faktörüne sahiptir (Çizelge 2.2) (Domingo-Calap ve ark., 2016; Al-Wrafy ve ark., 2017). Ayrıca artan antibakteriyel direnç oranlarına katkıda bulunan çoklu antibakteriyel direnç mekanizmaları sergilemektedir.

Çizelge 2.2. *P. aeruginosa* virülans faktörleri ve rolleri

Virülans Faktör	Görevi
Flagellum	Motilite, kemotaksi, başlangıç yüzey etkileşimlerine aracılık
Pilli	Hücre yüzeyine yapışma, seğirme motilitesi, biyofilm oluşumu ve konakçı bağışıklık sistemi ve antibiyotiklerden kaçınmayı sağlar.
T2SS	
Ekzotoksin A	Ökaryotik protein sentezini inhibe eder.
LasA	Stafilolizin, elastaz ve stafilolitik aktivite ile çinko metaloproteaz.
LasB	Elastaz, kolajen ve kolajen olmayan konakçı proteinleri bozumu, fiziksel engelleri barındırma, opsonize edici akciğer yüzey aktif madde proteinleri A ve D'yi bozma ve monosit kemotaksisini inhibe eder.
Tip IV Proteaz	İmmünoglobulinleri, komplemanı, A ve D yüzey aktif proteinlerini, fibrinojen, plazminojen ve antibakteriyel peptitleri bozar.
Alkaline Proteaz	Kompleman aktivasyonunu, nötrofil fagositozunu ve fibronektini inhibe eder.
Proteaz IV	Transferrin, elastin, laktoferrin, decorin ve kazeini ayırır.
Fosfolipaze H	Sürfaktan lipitlerini ve fosfolipidleri, hemolize eritrositleri yok eder.
T3SS	
***Exo*S**	Apoptoz, nekroz, konakçı bağışıklık hücrelerinin öldürülmesi, hücre iskeletinin bozunması ve DNA sentezinin inhibisyonuna yol açar.
***Exo*T**	Apoptoz, hücre bölünmesinin durdurulması, aktin hücre iskeletini değiştirir, fagositozu engeller, hücre göçünü, yapışmayı ve proliferasyonu engeller.
***Exo*U**	Nekroz ve fagositlerin yanı sıra epitel bariyerlerin ortadan kaldırılmasını sağlar.
***Exo*Y**	Aktin hücre iskeletinin bozulması ve endotel geçirgenliğinin arttırılmasına yol açar.
T5SS	Hedef ökaryotik hücreler, biyofilm oluşumu, hücresel ve antibakteriyel fonksiyonları etkileme
Lectinler (LecA ve LecB)	Konakçı hücrelere yapışma, akciğer hasarı ve biyofilm oluşumu
Sideroforlar	Demir noksan ortamlardan demir alımı
Piyosiyanin	Solunum sistemindeki siliyer disfonksiyon, konakçı hücrelere zarar veren pro-enflamatuar ve oksidatif etkiler uygular.
Quorum sensing	Biyofilm oluşumu, çeşitli virülans faktörlerinin regülasyon ekspresyonu, değişen mikrobiyal popülasyon yoğunluğuna yanıt
Lipopolisakkaritler	
Lipid A	Endotoksik şok
O-spesifik polisakkarit	Antikor üretimini sağlamaktan sorumlu
Biofilm	
Alginate	CF akciğerlerdeki ve bağışıklık savunmasındaki ortamlardan koruyucu faktör, yapısal stabilite ile biyofilmlerin korunması ve antibiyotik direnci.
Psl	Bağışıklık direnci, antibiyotik direnci, olgun biyofilmlerde yapısal iskele ve bakterilere yapısal destek vermek için eDNA-Psl liflerinin oluşumu.
Pel	Biyofilm oluşumu, antibiyotik direnci ve adezinler için birincil yapı iskelesi.
eDNA	Antibiyotik direnci

2.7. *P. aeruginosa*'nın Antibiyotiklere Direnci

P. aeruginosa, Gram-negatif enfeksiyonların tanınmasında bir ayraç olarak görev alan en önemli ve en yaygın olarak kabul edilen patojenlerden biridir. Bu

organizmanın göz önünde bulundurulması önemlidir, çünkü özellikle bağışıklığı düşük olan konaklarda ciddi hastane kaynaklı enfeksiyonlara neden olur ve genellikle antibiyotiğe dirençlilik, tedavi sürecini karmaşıklaştırır ve yüksek mortalite oranı ile ilişkilendirilmiştir (Kanj ve Sexton, 2019). *P. aeruginosa*, yaşadığı çevreye kolayca uyum sağlar ve ayrıca ciddi bir enfeksiyona neden olmak için bir insan konağa ihtiyaç duyar ve istila edebilir (Yayan ve ark., 2015). Büyük genomlarında (> 6 Mb) kodlanan düzenleyici genlerin büyük bir kısmının (>% 8) sağladığı çok yönlülük ve uyarlanabilirlik, virülans belirleyicilerinin dikkat çekici içeriklerinden ve antimikrobiyal tedavilerin aktivitesinden kaçınmak için olağanüstü kapasitesi, *P. aeruginosa*'yı korkulan bakteriyel patojenlerden biri yapmaktadır. Özellikle kronik enfeksiyonlarda yaygın olan mutasyon varyantlarının ortaya çıkması, *P. aeruginosa*'da uyarlanabilirliği ve antimikrobiyal direnç gelişimini daha da artırmıştır (Cabot ve ark., 2016).

P. aeruginosa genetik olarak olağanüstü antibiyotik direnç mekanizmaları ile donatılmıştır (Cabot ve ark., 2016). *P. aeruginosa* indüklenebilir bir AmpC sefalosporinaz taşır ve üretimi sadece düşük bazal seviyededir. Bu da onu antipseudomonal penisiline duyarlı hale getirir. Ancak, üretimi önemli ölçüde arttığında, *P. aeruginosa* tüm β-laktamlara karşı direnç geliştirir, yani *P. aeruginosa*'nın indüklenebilir bir AmpC β-laktamazı vardır ve bu enzimi indükleyen ve hidrolize olan β-laktamlara doğal olarak dirençlidir (Livermore, 2002; Mouly, 2018). Ayrıca, *P. aeruginosa* çok sayıda geniş dış zar gözeneklerinin varlığından dolayı oluşan bir porin (OprF) ürettiği için, çoğu antibiyotikler çoğunlukla hücrenin geçirimsizliğine atfedilen psödomonal hücreden çıkarılır (Benz ve Hancock, 1981; Mouly, 2018). Ancak, bu geçirimsizlik aracılı direnç aslında β-laktamları, kloramfenikol, florokinolonlar, makrolidler, novobiocin, sülfonamidler, tetrasiklin ve trimetoprimin yanı sıra çeşitli boyaları ve deterjanları gideren bir pompa sistemi olan MexA B-OprM tarafından yürütülmektedir (Poole, 2001).

İlaçların hedef bölgesinin, kromozomal DNA mutasyonu yoluyla modifiye edilmesi, *P. aeruginosa* tarafından direnç kazanmanın başka bir yoludur. Kinolon hedef enzimleri DNA girazı ve topoizomeraz IV kodlayan genlerdeki QRDR'deki modifikasyonlar, kinolon grubu antibiyotiklere karşı direnç sağlar (Jalal ve Wretlind, 1998; Mouly, 2018).

OprD kaybı, tip II topoizomerazlarda değişiklikler, AmpC aşırı üretimi, akış pompaları, kromozomal DNA'da mutasyon ve elde edilen çok sayıda gen *P.*

aeruginosa direncinden sorumludur. Ancak, hedef genlerdeki, DNA girazı (gyrA) ve topoizomeraz IV'ü (parC) kodlayan genlerdeki mutasyonlar, florokinolon direncini kazanmanın ana mekanizmalarıdır (Firouzi ve ark., 2016). Yakın zamanda gerçekleşmiş olan birçok çalışmada, her direnç mekanizmasının yaygınlığı ve her bir antibiyotik sınıfına katkısı ayrıntılı olarak açıklanmıştır (Lister ve ark., 2009; Strateva ve Yordanov, 2009; Sun ve ark., 2014; Potron ve ark., 2015).

2.8. *P. aeruginosa*'da *Exo*U Geni

*Exo*U ilk olarak 1997'de, akciğeri iltihaplı olan hayvan modellerinde ciddi akut akciğer hasarı ve sepsise neden olan sitotoksik *P. aeruginosa* suşunda tanımlanmıştır (Finck-Barbançon ve ark., 1997). Bu çalışmada, *Exo*U geninin (*Exo*U) 2064-bp açık okuma çerçevesi klonlanmış ve kodladığı tahmin edilen 687 aminoasit proteini karakterize edilmiştir. *Exo*U'nun durdurma kodonu olan TGA, 137 aminoasitten oluşan *Exo*U salgılanması için *Spc*U şaperonunu kodlayan *Spc*U'nun ATG başlangıç kodonu ile çakışır. *Exo*U aynı zamanda *P. aeruginosa*'nın tip III salgı aparatı yoluyla doğrudan hedeflenen ökaryotik hücrelerin sitosolüne enjekte ettiği tip III salgılı toksinlerden biri olarak karakterize edilir. Daha sonra klinik çalışmalarla, *Exo*U'ya sahip *P. aeruginosa* izolatlarının bakteriyemi, sepsis ve yüksek mortaliteye neden olduğu ortaya konmuştur (Roy-Burman ve ark., 2001). Genetik analizler ayrıca *Exo*U geninin sitotoksik *P. aeruginosa* izolatlarının kromozomal genomunda ek bir gen kümesi olarak bulunduğunu göstermiştir (Finck-Barbançon ve ark., 1998; Sawa ve ark., 2016).

Virülan *P. aeruginosa*, *Exo*U salgılayan sekresyonları izole ederek kültürlenmiş epitel hücrelerinde ve makrofajlarda sitotoksisite gösterir (Finck-Barbançon ve ark., 1997; Kurahashi ve ark., 1999). *Exo*U çeşitli hayvan modellerinde, akut akciğer hasarı için önemli bir virülans faktörü olarak karakterize edilmiştir (Finck-Barbançon ve ark., 1997; Sawa ve ark., 2016). *P. aeruginosa* izolatlarının çeşitli fenotipleri arasındaki *Exo*U pozitiflik, klinik ortamlarda olumsuz sonuçlar için risk faktörü göstergesidir (Roy-Burman ve ark., 2001). Sawa ve ark. (2014) yaptıkları çalışmalarda klinik analizler sonucu bakterinin antimikrobiyal özellikleri ile *Exo*U-pozitif bir genotip arasında bir korelasyon olduğunu bildirilmiştir. 1997'de *Exo*U bölgesinin keşfinden sonra sitotoksinin neden olduğu akut hücre ölümü mekanizmaları ilk zamanlarda belirsizliğini korumuştur. Ancak, 2003 yılında, aktif

*Exo*U'nun patatin-benzeri fosfolipaz (PLP) yapısı ve enzimatik aktivitesi yapılan çalışmalarla açığa çıkarılmıştır (Tamura ve ark., 2004). Hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalar, *Exo*U'nun fosfolipaz A2 ve lizofosfolipaz aktivitelerinin bilinmeyen ökaryotik hücre faktörleri tarafından aktive edildiğini göstermiştir (Tamura ve ark., 2004). *Exo*U'nun PLP alanı, serin (Ser142) ve aspartik asit (Asp344) rezidülerinden oluşan bir katalitik ikili içerir. Bu katalitik ikili yapısı, her ikisi de bir PLP-alan proteinleri ailesine ait olan memeli sitosolik fosfolipaz A2 (cPLA2) ve Ca^{+2}-bağımsız fosfolipaz A2'ye (iPLA2) benzerdir. *Exo*U'nun PLP aktivitesi, hücrenin lipid zarlarını yok etmek için hareket eden bir hücre ölüm faktörü olarak karakterize edilmiştir (Sato ve Frank, 2004; Sawa ve ark., 2016).

Tip III salgılama sisteminin bir özelliği olarak; içerdiği her toksinin enzimatik etkilerinin, toksinlerin hedeflenen ökaryotik hücrenin sitoplazmasına taşınmasından sonra ökaryotik hücre faktörleri tarafından aktive edilmesidir. Örneğin, *P. aeruginosa* tip III salgısı toksin *Exo*S'nin ADP-ribosil transferaz aktivitesi 14-3-3 protein ailesinin bir üyesi olan bir faktör tarafından aktive edilirken, *Exo*Y'nin adenilat siklaz aktivitesi, ökaryotik hücrelerden türetilen bilinmeyen bir faktör tarafından aktive edilir. Benzer şekilde *Exo*U'nun PLA2 etkisi, ökaryotik hücrelerin sitozol ekstraktında bulunan bir aktivatörün varlığını gerektirir. 2006 yılında *Exo*U'nun süperoksit dismutaz (SOD1) tarafından aktive edildiği de bildirilmiştir (Sato ve ark., 2006). Aynı yıllar içerisinde, diğer araştırmalarda, lizin 178 ve SOD1'in karboksil-terminal aminoasitlerinin 679-683'ün aktivasyon işlemi sırasında ubikitinlendiğini bildirmiştir. Benzer bir çalışmada, SOD1'in ubikitin donörü olarak davrandığını ve *Exo*U'nun karboksil terminal alanının ubikutinin PLP aktivasyonunun mekanizması olduğunu ortaya koymuştur (Schmalzer ve ark., 2010). *Exo*U'nun karboksil terminali DUF885 adı verilen korunmuş bir gen bölgesi içerir ve bu bölgeye sahip olmayan mutant proteinler aktive edilemez (Anderson ve ark., 2011). Kristalize cPLA2 kullanılarak yapılan üç boyutlu yapısal analiz, PLP'nin enzimatik merkezinde serin ve asparagin kalıntılarının birbirine çok yakın yerleştirildiğini ve üç boyutlu yapıda katalitik bir ikili oluşturduğunu ortaya çıkarmıştır. Ancak, *Exo*U'nun aktif olmayan formunun yapısal analizi, PLP için katalitik ikili oluşturan Ser142 ve Asp344'ün, aktifleştirilmemiş *Exo*U'nun öngörülen üç boyutlu yapısında birbirinden daha da ayrıldığını ortaya çıkarmıştır (Halavaty ve ark., 2012). Bu nedenle, karboksil terminalinin ubikitinasyonunun, dyad yapısının aktif bir formunu üretmek için Ser142 ve Asp344'ü birbirine yakınlaştırdığını varsaymışlardır (Sawa ve ark., 2016).

2.9. Yapılan Diğer Araştırmalar

Pseudomonas aeruginosa, özellikle yanık, cerrahi yaralar, kanser veya kistik fibrozlu hastalarda hastane kaynaklı enfeksiyonlara neden olan yaygın bir şekilde görünen Gram-negatif fırsatçı bir insan patojenidir (Williams ve ark., 2010). *P. aeruginosa*, tip III salgılama sistemi (T3SS) gibi çeşitli virülans faktörlerinin (Huber ve ark., 2016) ekspresyonunu düzenleyerek akut ve kronik enfeksiyonlara neden olur (Anantharajah ve ark., 2016). Bunların arasında, demir alımı (Reinhart ve Oglesby-Sherrouse, 2016), biyofilm oluşumu (Rybtke ve ark., 2015) ve piosiyanin, ramnolipidler vb. gibi quarum algılama sistemine (QS) bağımlı virülans faktörlerini barındırır (Moradali ve ark., 2017).

Kingsley ve Verghese (2013)'nın yaptıkları çalışmada, *Pseudomonas aeruginosa* klinik izolatı ile üretilen, OXA-4 olarak adlandırılan genişletilmiş bir β-laktamaz spektrumunu tanımlamışlardır. ESBL üretimini belirlemek için çift disk sinerji testi ile çalışma yapılmıştır. *P. aeruginosa* izolatı, CVA ve hipertansiyon tanısı konan 84 yaşındaki erkek hastadan elde edilmiştir. OXA-4 bölgesini kodlayan genlerin bölgelerine özgü primerler ile PCR ve ESBL üreten OXA bölge laktamazlarını tespit etmişlerdir. Sekanslama yardımı ile OXA β-laktamaz, OXA-4 geni olarak tanımlamışlardır.

Genişletilmiş spektrumlu β-laktamazların (GSBL'ler) ortaya çıkması, dünya çapında artan bir klinik endişe olarak bildirilmektedir. Amirkamali ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada, İran'daki iki ayrı ilden izole edilen GSBL üreten *P. aeruginosa*'daki blaOXA, blaPER-1, blaVEB-1 ve blaGES-1 genlerinin dağılımını belirlemeyi amaçlamışlardır. Sonuç olarak ise, *P. aeruginosa* izolatları arasında blaOXA-1, blaOXA-4, blaGES-1 ve blaVEB-1 genlerinin varlığını tespit etmişlerdir. Hastaları etkin bir şekilde tedavi etmek ve bu dirençli organizmaların daha fazla dağılımını önlemek için uygun enfeksiyon kontrol stratejilerine olan ihtiyacı bildirmişlerdir.

Zarei ve ark. (2018)'nın yaptıkları çalışmanın amacı, İran'ın batısındaki Hamadan'daki ICU hastanelerinde çevresel kaynaklardan, hastaneye yatırılan hastalardan ve hamamböceği yüzeylerinden izole edilen *P. aeruginosa* arasındaki antibiyotik duyarlılık, virülans faktörleri ve klonal ilişkiyi araştırmıştır. Mayıs-Eylül 2017 tarihleri arasında sırasıyla klinik, çevresel ve hamamböceği kaynaklarından toplam 237, 286 ve 156 bakteri izolatı toplanmıştır. Antimikrobiyal duyarlılık, disk

difüzyon yöntemi kullanılarak belirlemişlerdir. Virülans faktörleri, *Exo*A, S ve U genlerini PCR ile tespit etmişlerdir. *P. aeruginosa* izolatlarının genetik bağı, Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) -PCR ile analiz etmişlerdir. Sonuç olarak, çevresel izolatların klinik izolatlardan daha fazla *Exo*A ve *Exo*S genini içerdiği tespit edilmiştir. *P. aeruginosa* izolatları arasında genetik çeşitlilik belirlenmiş olup, 14 farklı ERIC parmak izi bildirilmiştir. Araştırmacılar, hastanelerde *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının potansiyel kaynaklarını belirleme ve kontrol etmenin önemini vurgulamışlardır.

Mohammed ve ark. (2012)'nın yaptıkları çalışmada, *P. aeruginosa*'nın karbapenem ve bazı antibiyotiklere karşı direncindeki önemli bir metalo-laktamaz ve genişletilmiş spektrum β-laktamların rolünü netleştirmek için deney düzeneği tasarlamışlardır. Çalışmada Nisan-Ağustos 2011 dönemindeki Bağdat kentinde bulunan bazı hastane ve laboratuvarlardan toplanan 305 farklı klinik örnekten elde edilen 75 *P. aeruginosa* izolatı kullanılmıştır. İzolatlar geleneksel biyokimyasal testlerle belirlenmiş ve sonra VITEK2 kompakt sistemi ile doğrulanmıştır. Disk difüzyon yöntemiyle antibiyotik duyarlılığı ile VITEK2 ve MIC değerlendirici test kullanılarak minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) testi uygulanmıştır. Metallo-β-laktamaz (MBL) üretimi başlangıçta fenotipik yöntemlerle tespit edilmiş ve doğrulamışlardır. IMP, VIM, SPM-1 (metalo-β-laktamazlar için), SHV ve TEM (GSBL'ler için) ile kodlanmış bla-genlerin varlığı, geleneksel PCR tekniği ile çalışılmışdır. Tüm *P. aeruginosa* izolatları, seçici ortam olarak 4 mg/L Meropenem (MMAC) ile desteklenmiş bir MacConkey agar üzerinde kültürlenerek karbapenem direnç yetenekleri açısından test edilmiştir. Çalışılan 75 izolattan sadece 16 (% 21.3) *P. aeruginosa* izolatı MMAC üzerinde büyüyebilmiş ve karbapenem dirençli olarak kabul edilmiştir. Sonuçlar, izolatların büyük çoğunluğunun β-laktam antibiyotiklere (sefoksitin, seftazidime, seftriakson, sefepim, piperasilin ve aztreonam) dirençli olduğunu, karbapenemlere (imipenem, meropenem) karşı % 8'lik düşük direnç seviyesi tespit edildiğini göstermiştir. Ayrıca, tüm *P. aeruginosa* izolatları, aminoglikozitlere (gentamisin, amikasin) ve siprofloksasine karşı orta ila düşük direnç seviyesi göstermiştir. Tüm izolatların polimiksin B'ye (% 100) duyarlı olduğunu da bildirmişlerdir.

Azimi ve ark. (2016), Kuzeybatı İran'da *P. aeruginosa* izolatları arasında *Exo* genlerinin ve biyofilm üretiminin varlığı ile ilgili çalışma yapmışlardır. İzolatlara karşı en etkili antibiyotiklerin kolistin ve polimiksin olduğu tespit edilmiştir.

İzolatların % 55'i *Exo*Y, izolatların % 52'si *Exo*U ve % 26.3'ü *Exo*S ve % 5'i *Exo*T genlerini taşıdıklarını bildirmişlerdir.

Sana'a (2013), yara ve yanık örneklerinden elde edilen *Pseudomonas aeruginosa'*nın moleküler tespiti için ayrı ayrı iki polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) analizi yapmıştır. İki gen *P. aeruginosa* için spesifik belirteçler, yani ekzotoksin A geni ve dış membran lipoprotein (oprI) geni olarak hedeflenmiştir. Her bir *P. aeruginosa* ve diğer *Pseudomonas* türleri için yedi izolat bu çalışmada kullanılmış ve bakteriyel süspansiyon DNA şablonu olarak kullanılmıştır. Sonuçlar, tüm *P. aeruginosa* izolatlarının, genişletilmiş boyutta (196 bp) oprI geni için pozitif PCR ürünü verdiğini gösterirken, sadece 4 izolat, genişletilmiş boyutta (396 bp) *Exo*A genini barındırdığını göstermiştir. *Pseudomonas sp.* için PCR ürünü sonuçları; yedi izolatın hiçbirinin *Exo*A geni için pozitif olmadığını ve *opr*I geni için sadece 4'ünün pozitif olmadığını rapor etmişlerdir. Bu araştırma ile *P. aeruginosa*'nın *Exo*A ve *opr*I genlerini kullanarak yara ve yanık örneklerinden moleküler saptamanın PCR analiziyle hızlı bir şekilde gerçekleştirilebileceğini ileri sürmüşlerdir.

Horna ve ark. (2019) yaptıkları çalışmada, *P. aeruginosa* klinik izolatlarında *Exo*U+ / *Exo*S+ genotipinin varlığını belirlemeyi amaçlamışlardır. *Exo*S, *Exo*T, *Exo*U ve *Exo*Y varlığı PCR ile 189 *P. aeruginosa*'da belirlenmiş ve *Exo*U'nun varlığı / yokluğu, kaynak enfeksiyonu, klonal ilişkiler, biyofilm oluşumu, motilite ve antimikrobiyal duyarlılığa göre analiz etmişlerdir. *Gyr*A, *par*C, *opr*D, efflux pump regülatörleri ve β-laktamaz genleri de PCR / sekanslama ile analiz edilerek belirlemişlerdir. *Exo*S, *Exo*T ve *Exo*Y genleri izolatların % 100'ünde bulunduğunu bildirmişlerdir. Ancak β-laktamazların varlığı, *gyr*A ve *par*C'deki mutasyonlar ve akıntı pompaları ve OprD'deki ilgili modifikasyonlar, *Exo*U + izolatları ile anlamlı bir şekilde ilişkili olmadığını tespit etmişlerdir. 25 izolatlık bir alt kümenin MLST analizi, *Exo*U +/*Exo*S + genotipini gösteren 8 farklı sekans tipini göstermiştir.

Pseudomonas aeruginosa'nın virüs suşları genellikle, fosfolipaz aktivitesi ile konakçı hücrelerin hücre zarlarını hızla tahrip eden bir kazanılmış sitotoksik protein olan ekzoenzim U (*Exo*U) ile ilişkilidir. *Exo*U genine sahip olan suşlar göz enfeksiyonlarında baskındır ve antibiyotiklere daha dirençlidir. Bu nedenle, bu suşlar için tedavi seçeneklerini anlamak esastır. Subedi ve ark. (2018), florokinolon ve beta-laktamlar için direnç ile ilişkili direnç profilleri ve genleri araştırmışlardır. Anterior göz enfeksiyonları, mikrobiyal keratit (MK) ve kistik fibroz (AK) hastalarının akciğerlerinden toplam 22 *P. aeruginosa* suşunu kullanmışlardır. Bütün genom

dizilimine dayanarak, *Exo*U geninin yaygınlığının, mikrobiyal keratit izolatlarında % 61.5 iken, kistik fibrozis izolatlarının hiçbirinin bu gene sahip olmadığını ortaya çıkarmışlardır. Genel olarak, *Exo*U içeren izolatlarda daha yüksek antibiyotik direnci saptamışlardır. *Exo*U suşlarının biri hariç tümünün florokinolonlara dirençli, % 100'ünün beta-laktamlara dirençli olduğunu rapor etmişlerdir. % 75'inin florokinolon direnci ile ilişkili olan kinolon direncini belirleyen bölgelerde (T81I *gyr*A ve / veya S87L *par*C) mutasyonların varlığını saptamışlardır. AmpC geninin ekspresyonu, sekiz *Exo*U suşunun hepsinde dokuz kat artmış ve *amp*R, PAO1'e kıyasla yedi *Exo*U suşunda indükleyici yönde düzenlenmiştir. MexR geninin ekspresyonun, *Exo*U suşlarının % 75'inde 1.4 ila 3.6 kat daha düşük olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada, virülans özellikleri ile patojenik *P. aeruginosa*'da antibiyotik direnci arasındaki ilişkiyi vurgulamışlardır.

Yousefi-Avarvand ve ark. (2015), *P. aeruginosa*'nın klinik izolatları arasında *tox*A, *Exo*U ve *Exo*S genlerinin sıklıklarını belirlemişlerdir. Bu çalışmada, Eylül 2011 - Şubat 2012 arasında, farklı klinik örneklerden 156 *P. aeruginosa* izolatını elde etmişlerdir. CLSI kurallarına göre disk difüzyon yöntemiyle bireysel izolatlarda 10 antibiyotiğe duyarlılık testi yapılmıştır. Ekstre edilen DNA, *tox*A, *Exo*U ve *Exo*S genlerinin varlığını belirlemek için PCR tekniği çalışılmıştır. Genel olarak, *tox*A, *Exo*U ve *Exo*S genlerinin sıklığının sırasıyla % 90.4, % 66.7 ve % 65.4 olduğunu bildirmişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bakteri izolatlarının toplanması ve muhafazası

Bağdat'taki çeşitli şehir hastanelerinin yanık bölümü ünitelerinden bir tıp uzmanının denetiminde Ocak-Haziran (2019) ayları arasında, hastaneye başvuran 67 yanık ve 139 yara enfeksiyonu taşıyan hastadan toplam 206 adet swab örneği alınmıştır. İzolasyonu yapılan 50 *P. aeruginosa* suşu çalışma yapılana kadar aşağıda belirtilen şekilde saklanmıştır:

- **Kısa süreli koruma:** *P. aeruginosa* izolatları tüpte yatık vaziyette olan nutrient agarlı besiyerine ekilerek 12 °C 87 saat tutulmuştur. Ardından örnekler 4 °C saklanmıştır (Harly ve Prescott, 2002).
- **Uzun süreli koruma:** % 15 gliserol içeren brain heart infüzyon besiyerine alınan suşlar -20 °C'de saklanmıştır (Vandepitte ve ark., 2003).

3.1.2. Reaktiflerin, çözeltilerin ve kültür ortamlarının hazırlanması

Deney suşlarının izolasyonları ve kültürlerinin hazırlanmasında kullanılan besi ortamları Çizelge 3.1'de; reaktifler ve kimyasallar ise Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan besiyerleri

Besiyeri	**Temin Edilen Firma**
Blood agar base	Oxoid (İngiltere)
Brain-Heart infusion agar	Oxoid (İngiltere)
Brain-Heart infusion broth	Oxoid (İngiltere)
Kligler-Iron agar	Oxoid (İngiltere)
MacConkey agar	Oxoid (İngiltere)
Methyl red-Voges-Proskauer broth	Oxoid (İngiltere)
Muller-Hinton agar	Oxoid (İngiltere)
Nutrient agar	Oxoid (İngiltere)
Pseudomonas agar base	Oxoid (İngiltere)
Cetrimide Agar	Oxoid (İngiltere)
King A medium	Oxoid (İngiltere)
King B medium	Oxoid (İngiltere)
Peptonlu su	Oxoid (İngiltere)
Urea agar	Oxoid (İngiltere)
Gelatin medium	Oxoid (İngiltere)

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve reaktifler

Malzeme	Temin Edilen Firma
Absolute etanol	Bioneer (Korea)
Agarose	Bio Basic INC (Canada)
Kristal violet boyası 1%	Promega (USA)
Etanol %70	BDH (England)
Ethidium bromide	Bio Basic INC (Canada)
Gliserol	BDH (England)
Gram boyama kiti	Institute of sera and vaccines (Iraq)
İnsan kanı	Blood Bank at Medical City Hospital / Baghdad – Iraq
Kovacs ayracı	Institute of sera and vaccines (Iraq)
DNA Ladder (100-2000 bp)	(Korea) Bioneer
6XDNA yükleme boyası	Geneaid (Thailand)
Metil kırmızısı	Fluka (Switzerland)
N,N,N′,N′-Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride	Difco (England)
Sedir yağı	BDH (England)
Tries borate EDTA buffer 10X(TBE)	Bio Basic INC (Canada)
Agar-Agar	Bio life (Italy)
Hidrojen peroksit (H_2O_2)	BDH (England)

Antibiyotik duyarlılık çalışmalarında kullanılan antibiyotik diskler Bioanalyse (Türkiye) firmasından temin edilmiştir. Disk içerikleri Çizelge 3.3'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Kullanılan antibiyotik diskleri, konsantrasyonları ve inhibisyon zon çaplarının değerlendirilmesi

Antibiyotik Diskleri	Kısaltması	Disk İçeriği (µg)	Zon Çapı (mm)		
			R (Dirençli)	I (Orta duyarlı)	S Duyarlı
Amoksisilin	AMC	20	≤18		≥19
İmipenem	IPM	10	≤16	17-21	≥22
Nalidiksik asid	NA	30	≤13	14-18	≥19
Gentamisin	CN	10	≤13	14-16	≥17
Tetrasiklin	TE	30	≤14	15-18	≥19
Siprofloksasin	CIP	5	≤21	22-24	≥25
Ampisilin	AM	10	≤13		≥14
Norfloksasin	NOR	10	≤18	19-21	≥22

Katalaz reaktifi

Koyu renkli bir şişede % 3'lük hidrojen peroksit, bakteri izolatlarının katalaz üretme yeteneğini tespit etmek için kullanıldı (Tadesse, 2006).

Oksidaz reaktifi

Oksidaz üretebilen bakterileri tespit etmek için reaktif; 0.1 g N, N, N ′, N′-Tetrametil-p-fenilendiamin dihidroklorür'ün 10 ml damıtılmış su içinde çözülmesi ile hazırlandı. Karanlık bir yerde ve koyu renkli bir şişede muhafaza edildi (Brown ve Smith, 2014).

Serum fizyolojik

Bu çözelti, 0.9 g NaCl'nin 100 ml damıtılmış su içerisinde çözdürülmesi ile hazırlandı ve daha sonra 121 °C'de 15 dakika boyunca otoklav ile steril edildi. Daha sonra 4 °C'de muhafaza edildi. Suşların inokulumlarının hazırlanmasında kullanıldı (Brown ve Smith, 2014).

Gram boyama seti

Gram boyama çözeltisi, bakteri hücrelerinin mikroskobik incelemesinde kullanmak üzere ticari olarak (Syrbio / Suriye) satın alındı.

Kristal viole

10 ml damıtılmış su içinde 0.1 ml Kristal viyole çözeltisinden ilave edildi ve enjektör filtreleri ile steril edildi. Çözelti, bakteriyel izolatlarla biyofilm oluşumunu tespit etmek için kullanılana kadar 4 ° C'lik bir sıcaklıkta tutuldu (Christensen ve ark., 1982).

Tris borat EDTA tamponu (1X) TBE

10X TBE konsantrasyondaki tampon, Bio Basic INC (Kanada) firmasından temin edildi. 100 ml TBE (10X) Tris borat EDTA tamponu alınarak 900 mL damıtılmış su ilave edildi ve 1X'e seyreltildi. Kullanılana kadar 4 °C'de buzdolabında saklandı (Firouzi ve ark., 2016).

Kanlı agar

Kanlı agar firmanın talimatlarına göre hazırlandı. Bu besiyeri, otoklavda 121 °C'de 15 dk steril edildi ve 45-50 °C'ye soğutulduktan sonra % 5 defibrine steril insan kanı ilave edildi ve karıştırılarak plaklara döküldü ve soğumaya bırakıldı (Forbes ve ark., 1988).

MacConkey agar

Himedia Şirketi tarafından belirtildiği şekilde hazırlandı. Otoklavda 121 °C'de 15 dk steril edildi ve 45-50 °C'ye soğutulduktan sonra plaklara döküldü. Laktoz fermantasyon testinin yanı sıra Gram-negatif bakterilerin teşhisinde kullanıldı.

Nutrient Broth

Şirket tarafından belirtilen talimatlara (Oxoid) göre hazırlandı. Otoklavda 121 °C'de 15 dk steril edildi ve 45-50 °C'ye soğutulduktan sonra plaklara döküldü. İzolatların geliştirilmesi ve korunması amacıyla kullanılmıştır.

Mueller- Hinton agar

Bakterilerin antibiyotiklere duyarlılığının araştırılmasında kullanıldı. Otoklavda 121 °C'de 15 dk steril edildi ve 45-50 ° C'ye soğutulduktan sonra plaklara kalınlığı 4 mm olacak şekilde döküldü.

Setrimid agar

45.3 g Setrimid agar tartıldı ve 1000 ml distile suda eritildi. 10 ml gliserol ilave edildi ve daha sonra otoklavda 121 °C'de 15 dk steril edildi ve 45-50 °C'ye soğutulduktan sonra 15 mg Nalidiksik asit iyice karıştırıldı ve sonra steril kaplara döküldü ve sertleşmeye bırakıldı. *Pseudomonas aeruginosa*'nın izolasyonu ve tanısı için kullanıldı.

Brain Heart infüzyon broth

Üretici firmanın talimatlarına göre hazırlandı ve otoklavda 121 °C'de 15 dk steril edildi. *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarını aktive etmek ve bakterileri birkaç hafta boyunca korumak için kullanıldı.

***Pseudomonas* agar**

48.4 g Pseudomonas agarın 1000 ml damıtılmış su içinde eritilmesi ve ardından Otoklavda 121 °C'de 15 dk steril edildi ve 45-50 ° C'ye soğutulduktan sonra Ek CN çözeltisi ilave edildi. Bu çözelti 0.2 g Setrimid ve 0.15 g Nalidiksat sodyum ($C_{12}H_{13}N_2NaO_4$) karıştırılarak elde edildi ve 5 ml distile su içerisinde çözündürüldü ve daha sonra 0.45 μm filtre ile steril edildi. Daha sonra, ortam homojenize etmek için karıştırıldı ve steril petri kaplarına döküldü (Forbes ve ark., 2002).

Voges - Proskauer reaktifi

İki solüsyondan oluşur: (Forbes ve ark., 2002).

A- Solüsyon 1: 100 ml absolüt etil alkol içinde 5 g naftol-α karıştırılarak hazırlandı.

B- Solüsyon 2: KOH solüsyonu (potasyum hidroksit) 40 g bu maddenin 90 ml distile suda çözünmesi ile elde edildi. Glikoz fermantasyonunu ve asetoin üretimini tespit etmek için kullanıldı.

Üre agar

2.4 g baz üre agarının 95 ml damıtılmış su içinde çözülmesi suretiyle hazırlandı. Sonra otoklavda 121 °C'de 15 dk steril edildi ve 45 ° C'ye soğumaya bırakıldı. 5 ml % 40'lık steril üre çözeltisi ilave edildi ve tüpler belli bir açıda yatık bir şekilde katılaşmaya bırakıldı. Daha sonra 4 °C'de korundu. Bu besiyeri üreaz üretimini incelemek için kullanıldı (Forbes ve ark., 2007).

King A medyumu

1000 g damıtılmış suda 20 g Pepton, 10 ml Gliserol, 1.4 g $MgCl_2$, 10 g K_2SO_2 ve 15 g Agar-agar çözülerek Starr (1981)'da tarif edildiği gibi hazırlandı. Daha sonra ortamın pH'sı 7.2'ye ayarlandı, 1 dakika kaynatıldı ve otoklav ile steril edildi. Ardından 45 °C'ye soğutuldu, steril Petri kaplarına döküldü ve katılaşmaya bırakıldı ve deneysel çalışmada kullanılana kadar 4^{o}C'de tutuldu.

King B medyumu

1000 g damıtılmış suda 20 g pepton, 10 ml gliserol, 1.5 g K_2HPO_4, 1.5 g $MgSO_4.7H_2O$ ve 15 g agar-agar çözülerek Starr (1981)'de tarif edildiği gibi hazırlandı. Daha sonra ortamın pH'ı 7.2'ye ayarlandı, 1 dakika kaynatıldı ve otoklav ile steril edildi. Ardından 45 °C'ye soğutuldu, steril petri kaplarına döküldü ve katılaşmaya bırakıldı ve deneysel çalışmada kullanılana kadar 4^{o}C'de tutuldu.

İndol testi ortamı

20 g pepton ve 5 g NaCl distile su içinde çözülerek hazırlandı ve daha sonra hacim distile su ile 1 litreye tamamlandı ve otoklav ile steril edildi. Daha sonra tüplere dağıtıldı ve 4°C'de tutuldu (Forbes ve ark., 2002). Ortam *P. aeruginosa*'nın triptofanı indol haline dönüştürme yeteneğini belirlemek için kullanıldı.

API 20E sistemi

Sistem 20 kimyasal test içeren bu kit BioMérieux şirketinden tedarik edildi ve *Enterobacteriaceae, P. aeruginosa* ailesini ve *Vibrio* ailesini teşhis etmek için kullanıldı.

VITEK 2 (BioMérieux, ABD)

Bu cihaz, ön biyokimyasal testlerle doğrulanan *P. aeruginosa* izolatlarını ve teşhis etmek için kullanıldı.

3.2. Metot

3.2.1. Bakteri izolatlarının tanımlanması

Swab örneklerinden kültürel yöntemlerle elde edilen izolatların tür tayinleri çeşitli yöntemler kullanılarak yapıldı.

3.2.1.1. Morfolojik inceleme

Daha önce hazırlanan Kanlı agar, MacConkey agar ve Setrimide agar besiyerlerinde koloni morfolojisi, şekil ve renk, boyut ve aroma dahil *P. aeruginosa* kolonilerinin fenotiplerini incelemek için kullanıldı (Murray ve ark., 2007).

3.2.1.2. Mikroskopik muayene

Gram boyama yöntemi numunelerde *P. aeruginosa*'nın tanımlanması için kullanılmıştır. Serum fizyolojik temiz bir lam üzerine alındı ve tek bir izole bakteri kolonisi ile karıştırıldı. Daha sonra, yayma hava ile kurutuldu ve bunsen beki ateşinde hızla geçirilmesiyle sabitlendi. Ardından kurutulmuş bakteriyel preparata Gram boya seti ile muamele edildi. İşlem sonrasında boyanmış lam üzerine sedir yağı damlatıldı ve x100 büyütme altında incelendi (Murray ve ark., 2007).

3.2.1.3. Biyokimyasal testler

Aşağıda belirtilen bazı biyokimyasal testler *P. aeruginosa*'nın tanımlanması için kullanılmıştır.

Katalaz testi

Katalaz reaktifi (% 3 H_2O_2), lam üzerine birkaç damla ilave edildi. Steril plastik öze ile tek bir bakteri kolonisi alındı ve reaktif ile iyice karıştırıldı. Pozitif sonuç, katalaz aktivitesini gösteren oksijen kabarcıklarının görünmesi ile anlaşıldı (Collee ve ark., 1996).

Oksidaz testi

Birkaç damla oksidaz reaktifi filtre kağıdına emdirildi ve steril tahta çubuk kullanılarak saf tek bir bakteri kolonisi alınarak filtre kağıdı üzerinde iyice karıştırıldı. 10-30 saniye içinde mor renk ortaya çıktığında test pozitif kabul edilir ve bu durum bakterilerin oksidaz üretim enzimi yeteneğine sahip olduğunu gösterir (Harly ve Prescott, 2002).

Hareket (Motilite) testi

Daha önce hazırlanan yarı katı hareketlilik test ortamı tüplerine, saf izole edilmiş bakteri kolonisinden iğne öze yardımı ile alınarak besiyerinin merkezine doğru batırıldı ve 37 °C'de 24 saat süreyle inkübe edildi. Bakteriler hareketli ise, batırma çizgisinden uzağa yayılırlar (Collee ve ark., 1996).

IMVIC testi

Collee ve ark. (1996) tarafından tarif edildiği gibi yapıldı:

A. İndol testi

Peptonlu suya, gecelik üretilmiş taze bakteri kültürü aşılandı ve 37 °C'de (24-48) saat süreyle inkübe edildi. Sonra 0.5 ml kovacs reaktifi, doğrudan kültür tüpüne ilave edildi ve 37 °C'de 24 saat süreyle inkübe edildi. Kültür triptofanaz üretiyorsa

yani triptofan parçalanmışsa; indol halkası broth kültürünün üzerinde halka şeklinde görünür.

B. Metil Kırmızısı ve Voges-Proskauer testi

Bakteriyel koloni bir MR-VP ortamında büyütüldü ve 37 °C'de 24 saat inkübe edildi, daha sonra 3-4 damla kırmızımsı reaktif eklendi ve hafifçe çalkalandı, pozitif test iki dakika içinde rengin kırmızıya dönmesi ile anlaşıldı. Glikozun fermente edilmesi ile asidik ürünlerin ortaya çıkma yeteneği araştırıldı (Jean, 2000). Pozitif sonuç parlak kırmızı renk, negatif sonuç sarı renktir. Metil kırmızısı negatif olan suşlar genellikle VP pozitiftir.

C. Sitrat kullanım testi (Simmons'ın sitrat agar)

Simmons'ın sitrat agar tüpleri, çizgi yöntemi ile izole koloni ile aşılandı ve 37 °C'de 24 saat süreyle inkübe edildi. Bakterilerin karbon ve enerji kaynağı olarak sitratı kullanma yeteneğinin araştırıldığı bu testte; pozitif sonuç rengin yeşilden maviye değişmesi ile ortaya konur (Jean, 2000).

42 ° C'de üreme yeteneği

Nutrient agarı plakaları, izole edilmiş bakteriler ile ekim yapıldı ve 42 °C'de 18-24 saat süreyle inkübe edildi. Bu sıcaklıkta suşların büyümesi pozitif sonuç olarak bildirilir (Collee ve ark., 1996).

3.2.1.4. API 20E tanımlama sistemi

API 20E, 20 biyokimyasal teste bağlı olarak *Enterobacteriaceae* ve diğer kolay üreyen, gram-negatif basillerin tanımlanması için standart bir sistemdir (Atlas ve ark., 1995).

1- İnkübasyon sırasında inokülasyon tepsisine dağıtılan musluk suyu (5ml) uygulanarak nemli atmosfer sağlandı.

2- API kullanılarak izolat kolonisinden bakteri süspansiyonu hazırlamak için bulanıklık 0.5 McFarland bulanıklık standardına ($1.5X10^8$ CFU/ml) ayarlandı.

3- Süspansiyon medyumu mikropipet kullanılarak bakteri ile aşılandı ve üreticinin talimatlarına göre CIT, VP ve GEL mikro tüplerin bölümü doldurulurken

ADH, LDC, ODC, H_2S ve URE mikro tüpleri bölümü tamamen steril mineral yağ ile dolduruldu (Şekil 2.1).

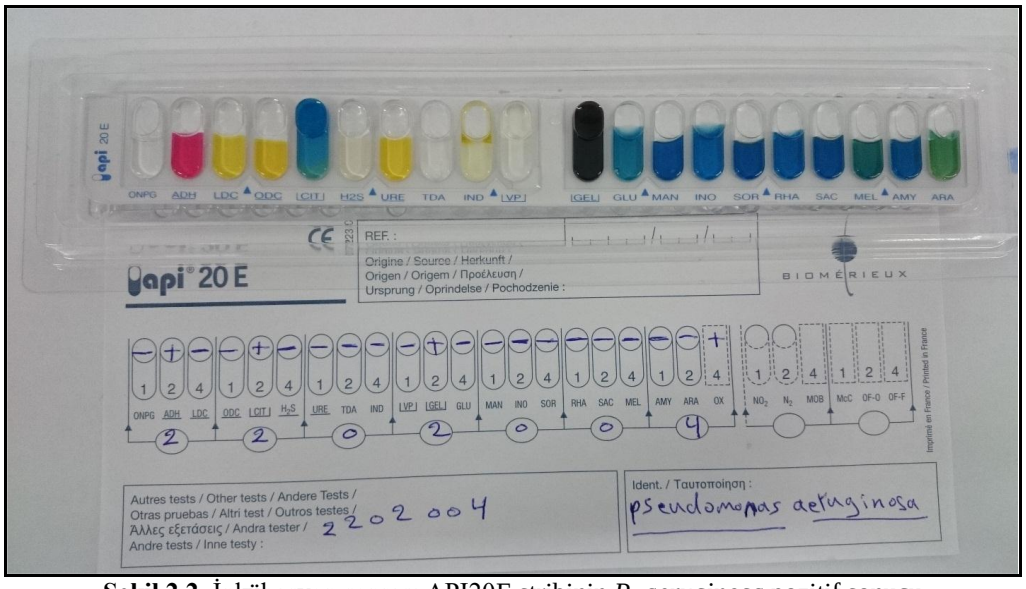


Şekil 2.1. API20 E striplerine bakteri yüklemesi yapıldıktan sonraki görüntü (inkübasyondan önce)

4- Aşılamadan sonra plastik kapak tepsiye konuldu ve 37 °C'de 18 ila 24 saat inkübe edildi.

5- Reaktif gerektirmeyen tüm reaksiyonlar önce olmuştur. Ancak aşağıdaki reaktifler; TDA, IND, VP mikro tüplerine eklendi. TDA mikro tüpüne bir damla % 3.4 demir klorür, IND mikro tüpüne bir damla Kovoc's reaktifi ve VP mikro tüpüne bir damla Voges-Proskauer reaktifi ilave edildi.

6- İzole edilen bakterilerin sonucu, analitik profil indeksi kullanılarak belirlendi (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. İnkübasyon sonrası API20E stribinin *P. aeruginosa* pozitif sonucu

3.2.1.5. VITEK-2 identifikasyon sistemi

Geleneksel yöntemlerle *P. aeruginosa* olarak tanımlanan izolatların, teşhislerinin doğrulanması VITEK-2 sistemi ile yapıldı (Nakasone ve ark., 2007). VITEK 2, bakteri tanımlaması yapan tam otomatik bir sistemdir (Joyanes ve ark., 2001).

1- 5-10 koloni test organizması, 0.50-0.62 McFarland aşılama yoğunluğu verecek şekilde bir pamuklu çubuk kullanılarak 3 ml serum fizyolojik içerisinde süspanse edildi.

2- Test organizmasının süspansiyonu VITEK-2 sistemine yüklendi ve her test kartı otomatik olarak bir bakteri süspansiyonu ile dolduruldu ve 6 saat süreyle inkübe edildi. Bu süre zarfında, büyümenin kontrolü için kinetik floresan ölçümü ile her kuyucuk 15 dakikada bir okundu (Ling ve ark., 2001).

3.2.3. Antibiyotik duyarlılık testi

Bakteriyel izolatların birçok antibiyotiğe duyarlılığı, Kirby-Bauer yöntemine ve WHO (2003)'ya göre aşağıdaki gibi çalışılmıştır:

1- Nutrient agar besiyerinde 37 °C'de 24 saat süreyle inkübe edilen bakterilerden bir ile beş bakteriyel koloni alınarak, 3 ml serum fizyolojik içeren test tüpüne aktarıldı. İnokulum 0.5 McFarland ($1.5x10^8$) CFU/ml bulanıklık yoğunluğuna ayarlandı.

2- Steril pamuklu çubuk, bakteriyel süspansiyonu içeren tüpe daldırıldı ve tüpün iç duvarındaki bakterilerden fazlalığı gidermek için döndürülerek sıkıştırıldı ve daha sonra Mueller-Hinton agarın yüzeyine bakteriyel süspansiyon her yöne eşit olacak şekilde yayma ekim yapıldı. Ardından plakların yüzeyi 10 dakika kurumaya bırakıldı.

3- Steril forseps ile ekim yapılan Mueller-Hinton agarının yüzeyine antibiyotik diskleri yerleştirildi ve hafifçe bastırıldı ve 37 °C'de 24 saat inkübe edildi.

4- İnkübasyondan sonra cetvel ile her diskin etrafındaki milimetre cinsinden inhibisyon bölgesi ölçülerek kaydedildi ve daha sonra standart tablolarla karşılaştırıldı (CLSI, 2016).

3.2.4. VITEK-2 kompakt sistemi kullanılarak minimal inhibitör antibiyotik konsantrasyonunun belirlenmesi

VITEK-2 kompakt sisteminde, *P. aeruginosa* izolatları için minimum inhibisyon konsantrasyonlarının (MIC) değerlerini belirlemek için Antibiyotik Duyarlılık Test Kartı (AST C) kullanıldı. Antibiyotik Test Kartında 64 deliğe dağılmış 18 ila 20 antibiyotik vardır. Cihaz, bakterilerin büyümesini takiben bulanıklık değişikliklerini kaydeder. Bütün işlemler üretici firmanın (BioMerieux) talimatlarına göre yapıldı (Pincus, 2006).

Çalışma yöntemi:

1- Tüm bakteri izolatları MacConkey agar üzerine yayıldı ve 24 saat ve 37 °C'de inkübe edildi.

2- Duyarlılığı incelemek için Khan tüpü alınmış ve 3 ml normal tuz çözeltisi eklenmiş ve daha sonra tek bir koloniden alınarak Khan tüpüne konuldu. VITEK Densichek cihazı ve süspansiyon bulanıklığı 0.63-0.50 ayarlandı.

3- AST kartı Khan tüpüne yerleştirildi ve cihaza yerleştirilmek üzere özel bir tutucuya sabitlendi.

4- Numuneyi Khan tüpünden AST Karta aktarmak için doldurma kapağına yerleştirildi. Numuneler daha sonra 37 °C'de inkübe edilecek yükleme kapağına manuel olarak aktarıldı. Antibiyotik duyarlılık testi sonuçları 12-16 saat arasında verilir. Daha sonra, inkübatörde bulunan her bir AST kartı için BioMerieux talimatlarına göre antibiyotik duyarlılık testi raporu yazdırıldı (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. VITEK-2 kompakt sistemi

3.2.5. Bakterilerin genetik çalışmaları

3.2.5.1. Genomik DNA ekstraksiyonu

Genomik DNA, üretilen bakterilerden ABIOpure Ekstraksiyon protokolüne göre izole edildi.

1- Pelet hücreleri için, 1 ml gecelik kültür 2 dakika boyunca 13000 rpm'de santrifüjlendi. Süpernatant atıldı.

2- Gram-negatif bakteriler için, nükleaz içermeyen sudan 100 µl ve lizozim çözeltisinden 100 µl pelete eklenmiş ve vortekslenmiştir. Daha sonra, 30 dakika boyunca 37 °C'de su banyosunda inkübe edilmiştir.

3- İnkübasyondan sonra, numuneler 2 dakika 13000 rpm'de santrifüjlendi. Süpernatant atıldı.

4- Protein sindirimi ve hücre lizisi için, 20 µl proteinaz K çözeltisi (20 mg/ml) ve 200 µl Tampon BL numuneye ilave edildi, daha sonra tüp vorteks kullanılarak kuvvetlice karıştırıldı ve 56 °C'de 30 dakika inkübe edildi. Daha fazla parçalama için 70 ° C'de 30 dakika inkübe edildi.

5- Mutlak etanolden numuneye 200 µl ilave edildi, numuneyi iyice vortekslendi.

6- Karışımların tamamı mini kolona dikkatlice aktarıldı, daha sonra 1 dakika boyunca 6.000 x g ve üzeri (> 8.000 rpm) devirde santrifüjlendi ve toplama tüpü yenisiyle değiştirildi.

7- Tampon BW'den, mini kolona 600 µl ilave edildi, daha sonra 6.000x g ve üzeri (> 8.000 rpm) devirde 1 dakika santrifüjlendi ve toplama tüpü yenisiyle değiştirildi.

8- Tampon TW'dan 700 µl uygulandı. Daha sonra 6.000 x g ve üzeri (> 8.000 rpm) devirde 1 dakika santrifüjlendi. Geçiş bölgesi atıldı ve mini kolon toplama tüpüne geri yerleştirildi.

9- Mini kolon, artık yıkama tamponunu uzaklaştırmak için 1 dakika boyunca tam hızda > 13,000 x g santrifüjlendi, daha sonra mini kolon, 1.5 ml'lik yeni bir tüpe yerleştirildi.

10- Tampon AE'den 100 µl ilave edildi ve 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi, daha sonra 5.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi.

3.2.5.2. DNA miktarının tayini

Gen bölgelerinin araştırılması ve sekanslama işlemleri için, ekstrakte edilen DNA'nın saflığı ve miktarı Quantus Fluorometer ile tayin edildi. 1 µl DNA için 199 µl seyreltilmiş Quantifluor Boya karıştırıldı. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyonun ardından DNA konsantrasyon değerleri saptandı.

3.2.5.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Gerçek zamanlı-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR), incelenen *Exo*U geninin farklı fragmanlarını çoğaltmak için gerçekleştirildi.

Primer Seçimi ve Hazırlanması

Exo-U (428 bç) tespit eden forward ve reverse primerler, (SENREGEN, Türkiye) tarif edilen yöntemlere göre seçildi. 100 pmol/µl nihai konsantrasyonda steril deiyonize damıtılmış su içinde çözündürülmüş liyofilize primerler temin edildi (Integrated DNA Technologies, ABD) (Çizelge 3.4) ve kullanılana kadar derin dondurucuda saklandı.

Çizelge 3.4. Ekzotoksin U *(ExoU)* genini belirlemek için kullanılan primerler

Primerler	Primer sekansları 5' → 3'	Ürün boyutu
***ExoU*-F**	**5-GGGAATACTTTCCGGGAAGTT-*3***	428 bp
***ExoU*-R**	**5-CGATCTCGCTGCTAATGTGTT-*3***	

3.2.5.4. Reaksiyon ayarı ve termal döngü protokolü

Ekstrakte edilen DNA, primerler ve Taq qPCR master miks, Nükleaz Serbest Su (Promega, ABD), 4 °C'de çözündürüldü, homojen içerik olması için vortekslendi, Çizelge 3.5'de tarif edildiği gibi toplam hacimde bir PCR karışımı yapıldı.

Çizelge 3.5. RT-PCR reaksiyon içeriği

Master mix İçeriği	Stok	Birim	Final	Birim	Volume	
					1 Örnekiçin	12 Örnek için
Master Mix	2	X	1	X	5	60 µl
Forward primer	10	µM	1	µM	0.5	6.05 µl
Reverse primer	10	µM	1	µM	0.5	6.05 µl
Nuclease Free Su					3	36.3 µl
DNA	10	ng/ µl	10	ng/ µl	1	
Total hacim					10	
Birim başına düşen miktar	Her tüp için 9 µl master mix ve1 µl kalıp DNA					

RT-PCR reaksiyon tüpleri bir PCR cihazına yerleştirildi. DNA, Çizelge 3.6'da gösterilen koşullarda olduğu gibi amplifiye edildi.

Çizelge 3.6. *Exo*U geni için Real Time PCR programı

RT-PCR program	Temperature (°C)	Süre	Döngü sayısı
Başlangıç denatürasyonu	95	5 dakika	1
Denatürasyon	95	30 dakika	40
Bağlanma	55	30 dakika	
Uzama	72	30 dakika	

3.2.5.5. Sekanslama, hizalama (alignmnet) ve filogenetik analiz

Sekanslama; *Exo*U için pozitif 10 izolatın RT-PCR ürünlerindeki mutasyonları tespit etmek için, *Exo*U Genetic Analyzer (Applied Biosystems) primerleri kullanılarak ve Sanger (1977) sekanslama yöntemi (Çizelge 3.7) kullanılarak Macrogen Company, ABD'ye tarafından gerçekleştirildi.

Çizelge 3.7. *Exo*U geni için Sanger metodunun programlanması

Sekanslama	Test adı	Primer	Tip	purring	Sekans Sonucu
1	QPCR 1	F	Sanger- PCR	yapıldı	Yüksek kalite
2	QPCR 2	F	Sanger- PCR	yapıldı	Yüksek kalite
3	QPCR 3	F	Sanger- PCR	yapıldı	Yüksek kalite
4	QPCR 4	F	Sanger- PCR	yapıldı	Yüksek kalite
5	QPCR 7	F	Sanger- PCR	yapıldı	Yüksek kalite
6	QPCR 8	F	Sanger- PCR	yapıldı	Yüksek kalite
7	QPCR 9	F	Sanger- PCR	yapıldı	Yüksek kalite
8	QPCR 10	F	Sanger- PCR	yapıldı	Yüksek kalite
9	QPCR 11	F	Sanger- PCR	yapıldı	Orta kalite
10	QPCR 12	F	Sanger- PCR	yapıldı	Yüksek kalite

Homoloji araması http://www.ncbi.nlm.nih.gov adresindeki Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi'nde (NCBI) bulunan blast algoritmaları ile Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) programı kullanılarak gerçekleştirildi.

Bioedit programı (V.7.2), Clustal W'da çoklu dizi hizalaması ve bakteriyel izolat grupları arasındaki benzerlik matrisini hesaplamak için kullanıldı.

P. aeruginosa izolat grupları arasındaki akrabalık ilişkilerini bulmak için, MEGA6 yazılımı kullanılarak neighbourhood joining (NJ) metodu ile filogenetik analiz yapıldı. Nod dallanma olasılığını tahmin etmek için 1000 bootstraps kullanıldı.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. *P. aeruginosa*'nın İzolasyonu ve Teşhisi

2019 yılının Ocak ve Mart ayları arasında Bağdat Eğitim Hastanesinden 1-70 yaşları arasındaki yara ve yanık hastalarından 206 swab örneği ile alınan numunelerin incelenmesi sonucunda elde edilen numunelerin kaynakları ve izole edilen *P. aeruginosa* oranları Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. İzolasyon kaynağına göre *P. aeruginosa* izolatlarının sayısı ve yüzde oranları

İzolasyon Kaynağı	Örnek Sayısı (%)	*P. aeruginosa* İzolat Sayısı (%)
Yara	67 (32.52)	19 (38)
Yanık	139 (67.47)	31 (62)
Toplam	206 (100)	50 (100)

Alınan 206 swab örneğinden izolasyonlar sonucunda yara örneklerinden 19 (% 38) ve yanık örneklerinden 31 (% 62) olmak üzere *Pseudomonas* şüphesi ile 50 adet izolat elde edilmiştir. Yapılan morfolojik, mikroskobik ve biyokimyasal testler sonucunda *P. aeruginosa* olarak elde edilen bu 50 izolatın; VITEK-2 ile yapılan doğrulama testinde sadece 12 izolatın belli bir indeksin üzerinde *P. aeruginosa* olduğu ortaya koyulmuştur. VITEK-2 daha kantitatif sonuçlar ortaya koyan ve identifikasyonda oldukça ileri düzeyde olan otomatize bir sistemdir. Sonuç olarak 7 suş yanık örneklerinden, 5 suş ise yara örneklerinden izole edilmiştir. Bu 12 *P. aeruginosa* suşunun yaşa ve cinsiyete göre dağılımı Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. *P. aeruginosa* suşlarının demografik dağılımı

Sıra no	İzole edilen örnek no	Yaş	Kaynak	Bakteri türü	Cinsiyet
1	12	25	Yanık	*P. aeruginosa*	Erkek
2	34	38	Yara	*P. aeruginosa*	Erkek
3	56	49	Yara	*P. aeruginosa*	Kadın
4	90	54	Yanık	*P. aeruginosa*	Erkek
5	97	43	Yara	*P. aeruginosa*	Erkek
6	112	51	Yanık	*P. aeruginosa*	Kadın
7	139	59	Yanık	*P. aeruginosa*	Erkek
8	154	44	Yanık	*P. aeruginosa*	Erkek
9	159	21	Yara	*P. aeruginosa*	Erkek
10	168	47	Yanık	*P. aeruginosa*	Erkek
11	187	55	Yanık	*P. aeruginosa*	Kadın
12	203	49	Yara	*P. aeruginosa*	Erkek

MacConkey agarda bakteri kolonileri, laktozu fermente etmedikleri için soluk sarı görünüyordu ve bu, önceki araştırmaların sonuçlarıyla uyumludur (Forbes ve ark., 1988). (Şekil 4.1)



Şekil 4.1. *Pseudomonas aeruginosa*'nın MacConkey agar üzerinde koloni görünümü (Prasanna ve ark., 2016)

Besi ortamında *P. aeruginosa* kolonilerinin büyümesi pigmentlere ve koku üretimi ile üzüm benzeri şekillerine bağlı olarak tanımlanmıştır. Kanlı agar ortamında, bakteri kolonileri Beta-hemoliz (β) oluşumu göstermiştir ve bu hemolizin üretimine dair bir kanıt olarak değerlendirilmiştir (Selim ve ark., 2015) (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. *Pseudomonas aeruginosa*'nın kanlı agar üzerindeki koloni görünümü (Naser, 2016)

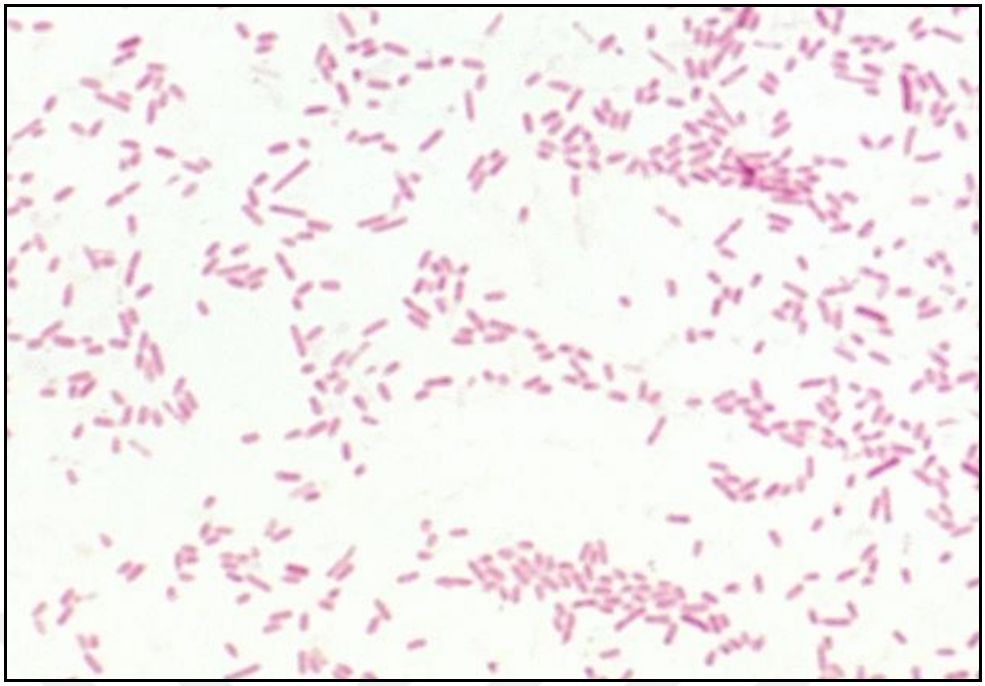
Setrimid agarda bakteri kolonileri yeşilimsi sarı renkte ortaya çıkmıştır. Çünkü bu kolonilerin çoğu yeşilimsi mavi bir boya olan piyosiyanin ve yeşilimsi sarı bir pigment olan pyoverdin üretir; bunlar ultraviyole (UV) ışınlarına maruz kaldığında parlar ve bu boyalar suda çözünürler (Sudhakar ve ark., 2015). Setrimid agar, *P. aeruginosa*'na için bir deterjan görevi gören ve diğer birçok organizmanın büyümesini engellemesiyle bilinmektedir ve bu sonuçlar Tang (2014) ile tutarlı olan (% 0.03) setrimid varlığında büyüme yeteneğini belirlemek için kullanılan seçici ve diferansiyel bir besiyeridir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. *Pseudomonas aeruginosa*'nın setrimid agar üzerindeki koloni görünümü (Naser, 2016)

Ayrıca King A agar ortamında büyütülen bakteri kolonileri mavi ve yeşil bir pigment (piyosiyanin) üretirken, King B agar besiyeri ortamında yetişen diğer tüm izolatlar piyosiyanin üretmediği gözlemlenmiştir. Bu, King B ortamında üretilen floresan üretimini engelleyen King A ortamında yeterince potasyum ve magnezyum tuzunun konsantrasyonundan kaynaklanmaktadır (Murray ve ark., 2007).

Mikroskobik analizler sonucunda Gram-negatif basiller tespit edilmiştir (Şekil 4.4). Biyokimyasal testlerde ise, tüm izolatlar bakterinin hidrojen peroksidi su ve oksijen'e parçalama yeteneğini açıklayan katalaz testi için pozitif sonuçlar göstermiştir; bakterilerin oksidaz sitokromu olduğunu kanıtlayan oksidaz testi içinde pozitif sonuçlar tespit edilmiştir.



Şekil 4.4. Gram boyama sonucu Gram negatif *P. aeruginosa* basilleri

IMViC biyokimyasal testlerin sonuçları Çizelge 4.2'de gösterildiği gibidir. Bu sonuçlar ise, İndol testleri için negatif sonuçlar vermiştir (-). Bunların dışında, Metil kırmızı (-), Voges-Proskauer (VP) testi negatif (-), sitrat tüketimi için pozitif (+) sonuçlar tespit edilmiştir. Kligler'in Iron Agar (KIA), alkali etkileşime sahiptir (glikoz ve laktozu fermente edemez), H_2S üretimi ise negatif sonuç vermiştir. 37 $^{\circ}$C ile 42 $^{\circ}$C'deki farklı sıcaklık faktörlerinde ve üreaz testi için negatif sonuçlar göstermiştir. Bakterilerin flagellası olduğu için motilite testi için pozitif sonuçlar görülmüştür. Bu sonuçlar Todar (2004)'e ile paralellik göstermektedir.

Petri kapları üzerindeki bakteriyel implantlarda katalaz testi, oksidaz testi, motilite testi, IMVIC testi (İndol testi, MR-VP, Simmons'ın sitrat agar, Sitrat kullanım testi) ve API 20E tanımlama sistemi gibi diğer testler uygulanmıştır. 50 adet *Pseudomonas* izolatı tespit edilmiş olmasına rağmen, fitik analizleri yapılırken oransal olarak farklılıklar görülmüştür. Analizlerde % 60'ı aşan ve % 60'ı aşmayan yüksek göstergeli sedo'dan saflaştırılmış 12 izolat olduğu doğrulanmıştır. Rutin olarak kullanılan cihazlarda tanınmamasından dolayı PCR analizleri ile kontrolleri sağlanmıştır.

Çizelge 4.3. *P. aeruginosa* tanımlaması için morfolojik ve biyokimyasal sonuçlar

Analizler	Sonuç
Gram boyama	Gram negatif basil
MacConkey agar	Laktozu fermente edemez
Kanlı agar	β-hemoliz
Setrimid agar	+
37 °C	-
42 °C	+
Oksidaz	+
Katalaz	+
Üreaz	+/- (V)
İndol	-
Metil kırmızısı	-
Voges Proskauer	-
Sitrat Kullanımı	+
Kligler iron agar	k/k (eğik yüzeyde ve tabanda)

(+:pozitif - : Negatif, V: Variable; K: alkaline)

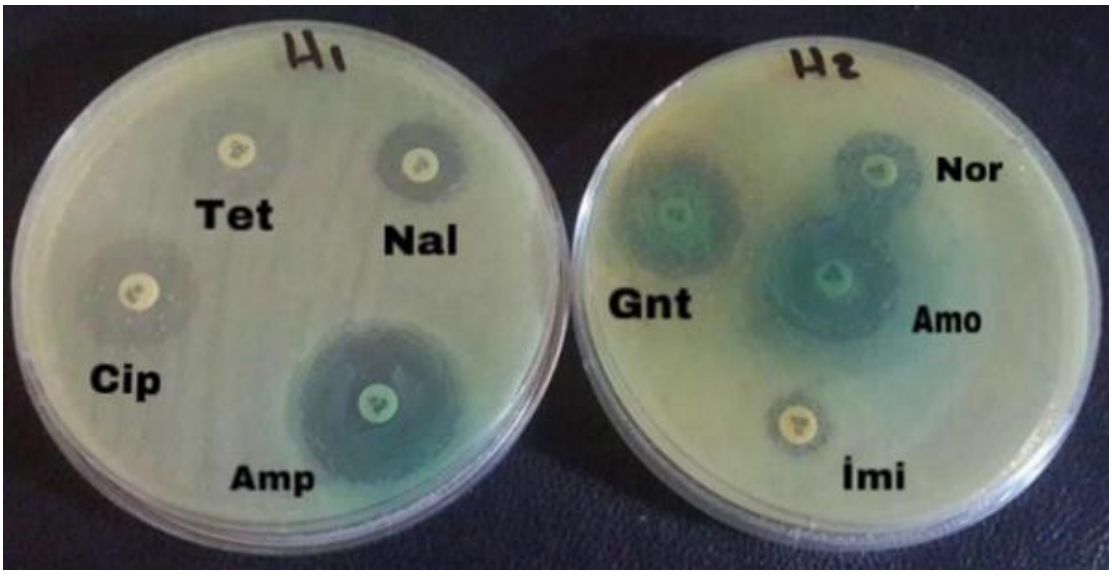
P. aeruginosa, en önemli *Pseudomonas* türlerinden biridir ve bunun en önemli sebeplerinden biri yaygınlığı ve patojenitesinin yüksek olmasıdır. Fırsatçı patojenler özellikle yoğun bakım ünitelerindeki (YBÜ) yanık tedavisi gören hastaların enfeksiyonlarının ana sebebidir (Patil ve ark., 2015). Çalışmalar, ölümlerin %75'inin, özellikle gelişmekte olan ülkelerde sepsis ile ilgili yanıklarla ilişkili olduğunu göstermiştir (Al-Aali, 2016).

P. aeruginosa, yanık yaralanmaları ve bu yaralardan en çok izole edilen bakteridir. Yaptığımız bu çalışma birçok çalışma ile uyum göstermektedir. Örnek olarak, Al-Khalisi (2014)'nin çalışmalarında, Bağdat şehrinde bulunan hastanelerden izole edilen ve izolasyon oranının % 76 ve sonuçların yaptığımız çalışma ile benzer olduğu görülmektedir (Pruitt ve ark. 2001).

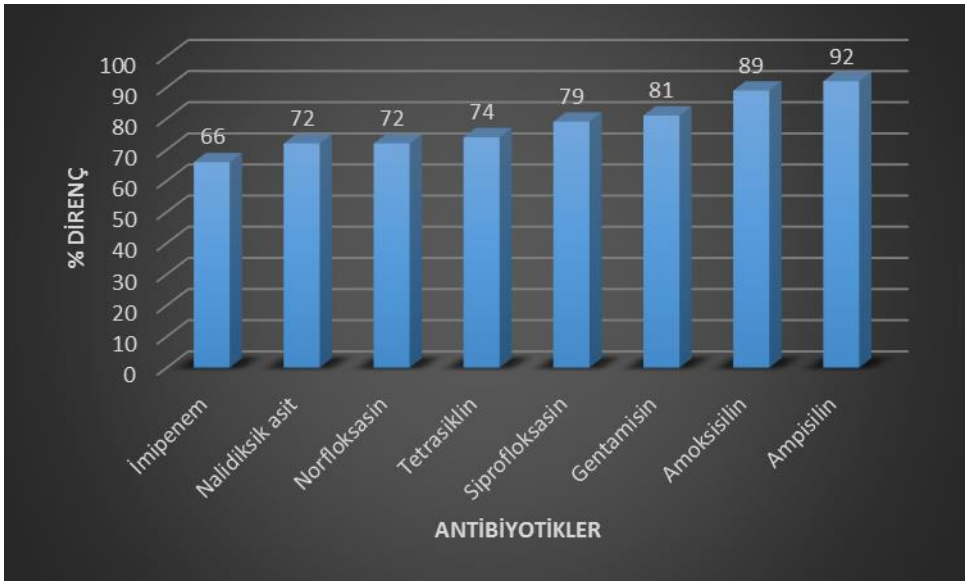
İzolasyon oranlarındaki fark, hastanın bakteriyel büyümeden önce hastaneye gelmesi veya hastanın önceden antibiyotik alma olasılığını içeren sağlık bakımının derecesine bağlı olarak değişim göstermekle birlikte bu durum özellikle yanık hastalarında izolasyon oranını arttırmaktadır. Hastane enfeksiyonundan doğrudan bulaşan bir enfeksiyonun sonucu olarak 72 saat içinde yoğunluk % 20'ye yükselebilir. Hastane enfeksiyonu doğrudan hastalarla temas sonucu veya dolaylı olarak bunların yayılmasına yardımcı olan kontamine cerrahi aletler ve araçlar kullanılarak da enfeksiyonda yayılım görülebilir (Zhapouni ve ark., 2009).

4.2. *P. aeruginosa* İzolatlarının Antibiyotiklere Karşı Direnci

Çalışma kapsamında, *P. aeruginosa* izolatlarına 8 farklı antibiyotik için duyarlılık testi uygulanmıştır (Şekil 4.5). Sonuçlarımız, *P. aeruginosa*'nın tüm izotlarının çalışmada kullanılan antibiyotiklere farklı oranlarda direnç gösterdiğini ortaya koymuştur. Oransal olarak değerler Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Buna göre suşlar sırasıyla en fazla ampisilin'e (% 92) ardından amoksisilin'e (% 89), gentamisin'e (% 81), siprofloksasin'e (% 79), tetrasiklin'e (% 74), nalidiksik asit ve norfloksasin'e (% 72) ve imipenem'e (% 66) dirençli oldukları belirlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarının, bakteriyel izolatların Ampisilin ve amoksisilin içeren penisilin - β-laktam grubuna karşı yüksek direnç gösterdiği kaydedilmiştir. Bu antagonistler bakteri hücresindeki özel bölgelere bağlanarak bakteri hücre duvarının sentezini önlemeye çalışmaktadır. Böylece hücre duvarının önemli bir bileşeni olan peptidoglikan tabakasında peptit köprüleri oluşturan transpeptidaz enziminin çalışmasını engeller. Fakat bu antibiyotiklere karşı görülen yüksek direnç; kullanılan bu antibiyotiklerin işlevlerinde başarılı olamadıklarının bir göstergesidir (Zervosen ve ark., 2012).



Şekil 4.5. *P. aeruginosa*'nın antibiyogram testi plağı



Şekil 4.6. *P. aeruginosa* izolatlarının antibiyotiklere direnci

Çeşitli çalışmalar, *Pseudomonas aeruginosa* bakterilerinin, özellikle β-laktam olmak üzere birçok antibiyotiğe direnme yeteneğinin ve bu bakterilerin farklı direnç mekanizmaları geliştirmesine yardımcı olan bölgelerinde hasarın olmadığını göstermiştir (Ali ve ark., 2015). Bakterilerin bu tür antibiyotiklere direnci, *P. aeruginosa* gibi bakterilerin sahip olduğu farklı direnç mekanizmalarından, membranın geçirgenliğini veya geniş spektrumlu β-laktamaz enzimleri de dahil olmak üzere antibiyotiği yok eden enzimlerin üretimini değiştirmesinden kaynaklanabilir (Geser ve ark., 2012). Bu çalışmanın sonuçları, *P. aeruginosa* bakterilerinin orta spektrumlu bir antibiyotik olan ampisilin ve amoksisiline direncinin çok yüksek olduğunu (sırasıyla % 92 ve% 89), bu oranın Al-Qasi (2012a)'nın yaptıkları çalışma ile tutarlı olduğunu göstermektedir. Bir diğer çalışmada, antibiyotik direncinin sonuçları Reish ve ark. (1993); % 90.47 idi. Başka bir çalışmada ise, *P. aeruginosa*'nın tüm izolatlarının penisiline ve amoksisiline dirençli olduğu tespit edilmiştir (Zhang ve ark., 2002).

Aminoglikozite direnç, *P. aeruginosa* tarafından üretilen fosfotransferaz ve N-asetil transferaz gibi modifiye edilmiş enzimler tarafından kaynaklanmaktadır. Bu enzimlerin genleri bir plazmid veya kromozom üzerinde taşınır (Morita ve ark., 2012). Direnç aynı zamanda zarın geçirgenliğindeki bir değişiklikten veya kromozomal mutasyonların ortaya çıkmasından kaynaklanır (Ochoa ve ark., 2013). Çalışmamızda bir aminoglikozit olan gentamisin'e karşı %81 oranında direnç

belirlenmiştir. Kinolon grubu antibiyotikler olan nalidiksik asit, norfloksasin ve siprofloksasine ise direnç oranları sırasıyla % 72, % 72 ve % 79 olarak saptanmıştır.

Bu noktadan hareketle, *P. aeruginosa* bakterilerinin en önemli özelliğinin antibiyotiklere karşı düşük duyarlılıkları olduğu açıktır. Bakterilerin hücresel zarlarının düşük geçirgenliğine ve *P. aeruginosa* bakterilerinin, kodlanmış genlerde mutasyon veya antibiyotiğe dirençli gen markörlerinin yatay iletimi yoluyla kolayca elde edilen dirençlerini geliştirme yeteneğine sahiptir (Häußler, 2008). Birçok antibiyotiğe karşı görülen çoklu direnç, farklı antibiyotiklere direnci arttıran bakteriyel izolatların farklı virülans faktörlerinden kaynaklanabilir (Heydari ve Eftekhar, 2015). Bu durum, patojene seçici hayatta kalma avantajını kazandırır (Henrichfreise ve ark., 2007).

4.3. VITEK 2 Sistemi ile Antibiyotiklerin Minimum İnhibitör Konsantrasyon Değerinin (MIC) Tayini

VITEK 2 Compact sistemi ile 12 antibiyotiğe karşı (Tikarsilin, Piperasilin/ Tazobaktam, Tikarsilin / Klavulanik asit, Piperasilin, Sefepim, Gentamisin, İmipenem, Meropenem, Tobramisin, Siprofloksasin, Seftazidim, Amikasin) antibiyotiğin minimum inhibitör konsantrasyonları (MIC) belirlenmiştir. Suşların direnç oranları Çizelge 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Vitek 2 kullanılarak yara ve yanıklardan izole edilen *P. aeruginosa* bakterilerine karşı kullanılan bazı antibiyotiklere direnç, orta duyarlı ve duyarlılık oranları

Antibiyotikler	Direnç		Orta Duyarlı		Duyarlı	
	Örnek Numarası	%	Örnek Numarası	%	Örnek Numarası	%
Amikasin	21	60.9	0	0	14	39.1
Sefepim	26	76.8	1	1.4	8	23.1
Seftazidim	22	63.8	2	7.2	10	29
Siprofloksasin	23	68.1	0	0	11	31.9
Gentamisin	26	73.9	1	1.4	9	26
İmipenem	25	71	0	0	10	29
Meropenem	22	63.8	1	2.9	12	33.3
Piperasilin	29	85.5	1	1.5	5	13
Piperasilin/ Tazobaktam	29	85.5	1	1.5	4	13
Tikarsilin	30	87	0	0	5	13
Tikarsilin / klavulanik asit	29	85.5	0	0	5	14.5
Tobramisin	25	71	0	0	10	29

Çalışmada kullanılan *P.aeruginosa* izolatlarının bazı antibiyotiklere karşı minimum inhibitör konsantrasyonunun (MIC) değerleri ve direnç oranları; Tikarsilin 32 µg/ml (% 87); Piperasilin/Tazobaktam 8-16 µg/ml (% 85.5); Tikarsilin/Klavulanik

asit asit 16-64 μg/ml (% 85.5)'de, Piperasilin ≥ 4-16 μg/ml (% 85.5); Sefepim 2-8 μg/ml (% 76.8), Gentamisin ≤ 1-4 μg/ml (% 73.9); İmipenem 0.5-2 μg/ml (% 71); Meropenem ≤ 0.25 μg/ml (% 63.8); Tobramisin ≤ 1-2 μg/ml (% 71); Siprofloksasin ≤ 0.5-0.25 μg/ml (% 68.1), Amikasin ≤ 8-2 μg/ml (% 60.9), Seftazidim 2-8 μg / ml (% 60.9) olarak belirlenmiştir.

4.4. *Exo*U Geninin Saptanması

4.4.1. *P. aeruginosa* izolatlarından DNA ekstraksiyonu

DNA izolasyon kiti kullanılarak 12 *P. aeruginosa* izolatının DNA'ları ekstrakte edildi, saflık ve konsantrasyon kontrolleri ise Quantus Florometre ile doğrulandı. Buna göre 12 DNA örneğinin 60 - 110 ng / μl arasındaki konsantrasyonu, PCR analizi için yeterli bir düzeyde olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.5).

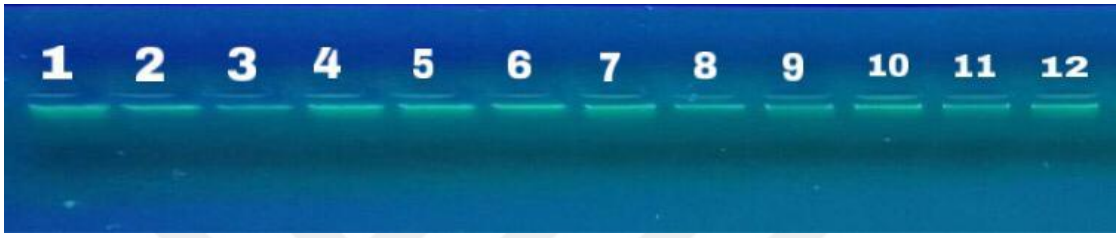
Çizelge 4.5. Tespit edilen DNA konsantrasyonları (ng/μl)

Örnek no	Konsantrasyon
Pr70-01	**20**
Pr70-02	**25**
Pr70-03	**15**
Pr70-04	**22**
Pr70-05	**25**
Pr70-06	**20**
Pr70-07	**21**
Pr70-08	**20**
Pr70-09	**24**
Pr70-10	**26**
Pr70-11	**24**
Pr70-12	**21**

12 DNA örneğinin tümünün saflığı 1.8-2 arasındadır. DNA ekstraksiyon yönteminin uygunluğu, ekstrakte edilen DNA'nın miktarı ve tipi karakterize edilerek belirlendi. DNA miktarı, DNA'nın PCR inhibitörlerinden arınmış olduğunu ve boyutlarının uygun olduğunu gösteren ekstraksiyon etkinliği ve kalite standartlarının (saflık) bir göstergesidir ve bu birçok araştırmacı tarafından kanıtlanmıştır (Wilfinger ve ark., 2006).

4.4.2. Elektroforetik çalışma

Yanık ve yaradan elde edilen farklı 12 izolatın DNA numuneleri, bir jel elektroforez sistemi ve ultraviyole ışık transillüminatörü kullanılarak görüntülendi. Ekstrakte edilmiş DNA fragmanlarının boyut dağılımını değerlendirmek ve DNA'nın saf olduğunu göstermek için bu yöntem kullanılmıştır (Brennan ve ark., 2009). Bozulmamış DNA bantları, Şekil 4.7'de gösterildiği gibi jel elektroforezi yoluyla doğrulanmıştır.



Şekil 4.7.Yükleme boyası ile *P. aeruginosa*'nın genomik DNA'sının jel görünümü. (Agaroz % 2), 1 saat boyunca 80 V / cm ve bir UV transillüminatör üzerinde görüntülendi.

4.4.3. qRT-PCR ile *Exo*U geninin saptanması

RT-PCR analizi, *Exo*U primerleri kullanılarak 12 izolat üzerinde gerçekleştirilmiştir. Buradaki sonuçlar 10 adet izolatta *Exo*U geninin bulunduğunu gösterdi.

4.5. Sekans Analizi

4.5.1. NCBI veritabanı kullanarak *P. aeruginosa* lokal izolatlarının *Exo*U genlerinin tanımlanması

Bu çalışmada, elde edilen 12 izolatın PCR ürünleri sekanslanmış, analiz edilmiş ve NCBI veritabanının GenBank veritabanında bulunan referans suşlarla karşılaştırılmıştır.

NCBI'de bulunan Temel Yerel Hizalama Arama Aracı (BLAST) kullanılarak, sıralama sonuçları Çizelge 4.6'da gösterildiği gibi referans suşlar ile % 98-100 uyumlu olduğu saptanmıştır.

Bit değerleri, benzerliğin istatistiksel bir ölçüsü olarak tanımlanır ve daha yüksek değer, yüksek derecede benzerlik olduğunu gösterir. 50 puanlık sınıftan

düşülürse, benzerlik olmadığı kaanatine varılacağını gösterir. Beklenti değeri (E), aynı benzerliği tesadüfen alması ve E-değerini düşürmesi beklenen süreyi tahmin etmek için tanımlanır. Bu, sekanslar arasındaki benzerlik derecesinin yüksek olduğunu gösterir. Sıfıra çok yakın bir değer, bu dizilerin aynı olduğu anlamına gelir.

Çizelge 4.6. GenBank referans alınarak, *P. aeruginosa*'da *Exo*U geni için DNA sekanslarının skoru, beklentisi ve uyumluluğu

İzolat Numarası	Sekanslama Adı	Sonuç	Beklenen (E-Miktar) değeri	Benzerlik	GenBank'da ki durumu
Pr-01	CP032569.2	724	0.0	100%	**4397021 to 4397382**
Pr-02F	CP032569.2	681	9e-172	98%	**4397021 to 4397382**
Pr-02R	CP032569.2	340	4e-176	98%	**4397021 to 4397382**
Pr-03F	CP032569.2	681	9e-172	98%	**4397021 to 4397310**
Pr-03R	CP032569.2	340	4e-176	98%	**4397021 to 4397382**
Pr-04F	CP032569.2	284	4e-145	99%	**4397021 to 4397382**
Pr-05R	CP032569.2	284	4e-145	99%	**4397021 to 4397382**
Pr-05F	CP032569.2	710	7e-180	99%	**4397021 to 4397382**
Pr-05R	CP032569.2	355	0.0	99%	**4397021 to 4397382**
Pr-06	CP032569.2	724	0.0	100%	**4397021 to 4397382**
Pr-07	Kontaminasyon				**-**
Pr-08	CP032569.2	724	0.0	100%	**4397021 to 4397382**
Pr-9	Kontaminasyon				**-**
Pr-10	CP032569.2	724	0.0	100%	**4397021 to 4397382**

4.5.2. Mutasyonlu veriler için sekanslama

P. aeruginosa ile ilgili mutasyonları saptamak için *Exo*U geninin PCR ürünleri üzerinde DNA sekanslama yapıldı, sonuçlar Çizelge 4.7'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.7. *P. aeruginosa* izolatlarının *Exo*U genlerindeki nükleotit değişimi, kodon sayısı, aminoasit değişimi ve mutasyon tipi

*Exo*U gene					
No.	**Genbank Kodu**	**Nükleotit değişimi**	**Aminoasit değişimi**	**Beklenen Etki**	**Mutasyon Tipi**
1	G/C 4397400	CTC/CTG	L/L	Silent (Sessiz), Frame shift (Çerçeve kayması)	Transversiyon
2	G/A4397415	GGG/GGA	G/G	Silent (Sessiz)	Transisyon
3	C/A 4397416 C/A4397417 G/A 4397418	CCG/AAA	P/K	Mismatch (Uyumsuz)	Transisyon Transisyon Transversiyon
4	C/G G/A 4397419	CCG/GCA	R/A	Mismatch (Uyumsuz)	Transversiyon
5	C/A 4397419	CTC/CTA	L/L	Silent (Sessiz)	Transversiyon
6	A/G439790	AAG/AAA	K/K	Silent (Sessiz), Frame shift (Çerçeve kayması)	Transisyon
7	C/T 437048 C/G 4307049	TGC/CCG	P/C	Frame shift (Çerçeve kayması)	Transisyon Transversiyon

L:Lösin **G**: Glisin **P**: Prolin **K**:Lizin **R**: Arjinin **C**:Sistein

Transversiyon ve transisyon, tüm izolatlarda *Exo*U geni için 5 mutasyon sıklığı göstermiştir. Çerçeve kayması öngörülen etkisi gibi üç tip mutasyona sadece 3 transisyon eşlik ederken, tüm izolatlarda 4 sessiz mutasyon olduğu belirlenmiştir. Ek olarak, 2 mutasyonun uyumsuz olduğu tespit edilmiştir.

Transisyon, iki halkalı pürinler (Adenin↔Guanin) veya tek halkalı pirimidinlerin (C↔T) arasındaki değişimlerdir, bu nedenle benzer şekle sahip bazları içerirler. Transversiyon pirimidin bazları için pürine değişimlerini ifade eder. Bu nedenle bir halkanın iki halkalı yapılara ve tersine değişmesini içerir (Qin ve ark., 2013).

Üretildikleri moleküler mekanizmalar nedeniyle olası iki transversiyon olmasına rağmen, transisyon mutasyonları totomerik kaymaya bağlı olarak transversiyonlardan daha yüksek frekansta üretilir.

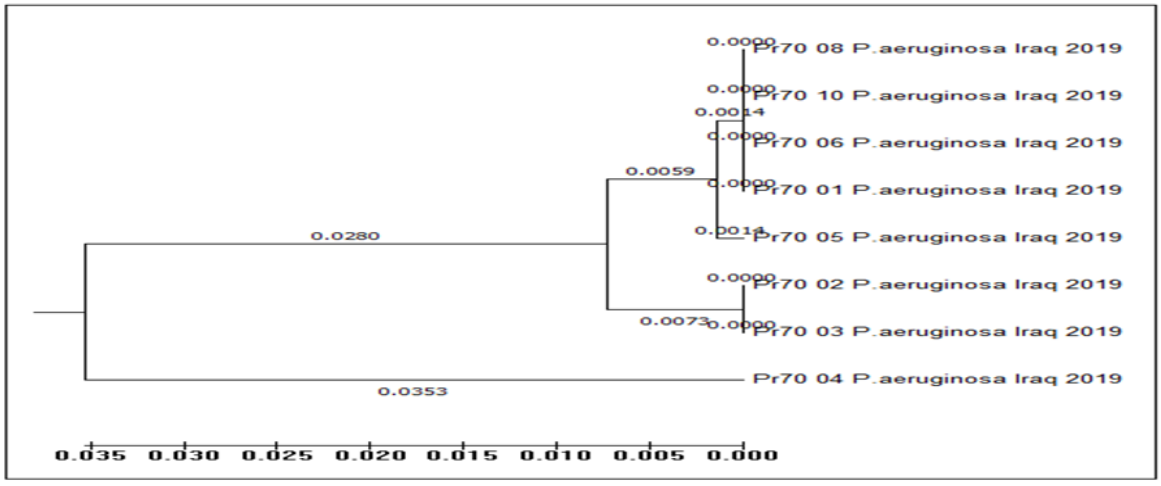
Transisyonların aminoasit değişimlerine ("Wooble" nedeniyle) neden olma olasılığı daha düşüktür ve bu nedenle tek nükleotit polimorfizmleri (SNP) olarak popülasyonlarda "sessiz değişimler" olarak devam etme olasılıkları daha yüksektir

(Gaur ve ark., 2015) ve ayrıca transisyonel mutasyonlarının doğal seleksiyonla uzaklaştırılması daha az olasıdır. Çünkü daha sıklıkla orijinal DNA ile aynı aminoasit dizisini kodlayan eş anlamlı değişimler oluştururlar (Lyons ve ark., 2011).

Sekanslama, *P. aeruginosa* izolatlarımızda bulunan mutasyonları doğrulamak için referans suşu BA7823'ün nükleik asit sekanslarının hizalanması kullanılarak yapılmıştır. Sorgu (Query) yerel örneği, Subject, NCBI'nin bir veritabanını temsil eder. Sarı renkte gösterilen nükleotitler varyasyona işaret eder. Pembe renkli aminoasit, aminoasit varyasyonlarını gösterir. *P. aeruginosa* izolatlarının *ExoU* gen hizalaması Ek: 3-5, 3-6, 3-7, 3-8, 3-9, 3-10, 3.11 ve 3.12'de gösterilmiştir.

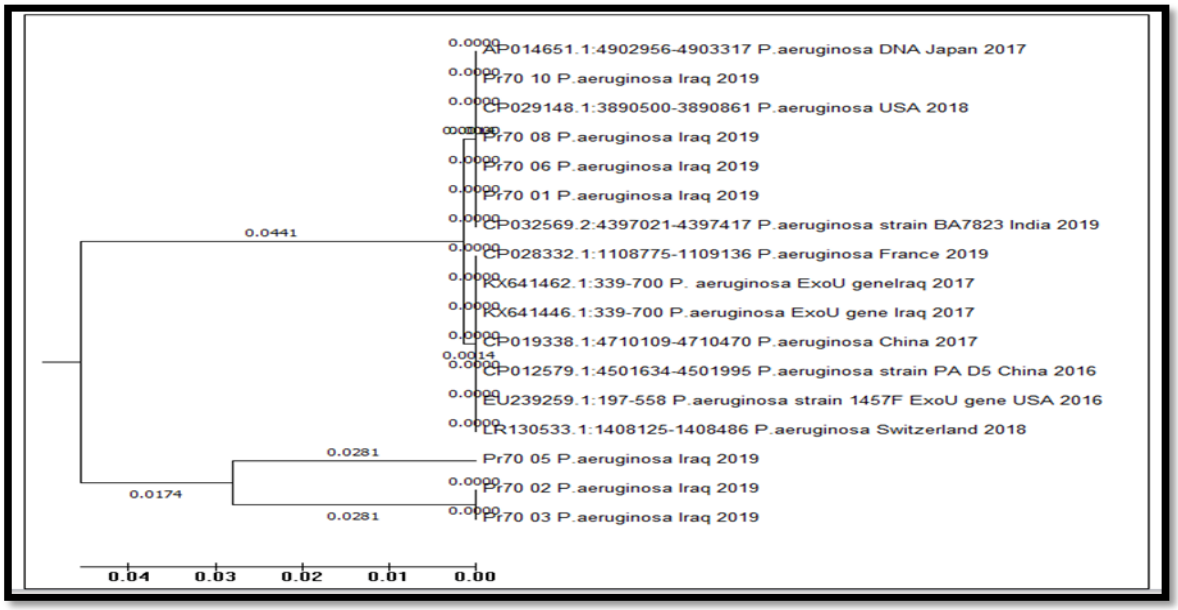
4.5.3. *P. aeruginosa*'nın *Exo*U geninin sekans benzerlik matrisi ve filogenetik ağacı

Sekiz *P. aeruginosa* klinik lokal izolatının *Exo*U geninin sekans benzerlik matrisi ve nükleotidin sekanslanması için Mega 6 programı kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde *Exo*U gruplarının % 98-100 arasında yüksek sekans benzerliğine sahip olduğunu göstermiştir (Çizelge 4.6). Bu çalışmadan elde edilen *Exo*U sekanslarını NCBI'daki GenBank veritabanı sekansları ile karşılaştırarak, çalışılan gruplar arasındaki ilişkileri belirlemek için filogenetik analiz yapılmıştır. Şekil 4.8'de, bir kümenin iki alt gruba ayrıldığını gösteren *Exo*U sekansları için neighbor-joining filogenetik ağacını (dendrogram, köklenmemiş) göstermektedir. Birinci alt grup, ikinci alt gruba yerleştirilen (pr-04)'e ait izolatlar hariç tüm lokal izolatları (Pr-01,02,03,05,06,08,010) içermiştir.



Şekil 4.8. İki grup halinde düzenlenmiş 8 *P. aeruginosa* klinik lokal izolatları için *Exo*U'nun komşu birleştirme filogenetik analizi. Analiz MEGA6 kullanılarak gerçekleştirildi.

Bir kümenin iki alt gruba ayrıldığını gösteren *Exo*U dizileri (Şekil 4.9) için neighbor-joining filogenetik ağaç (dendrogram, köksüz) gösterilmiştir. Grup 1, GenBank veri tabanından *P. aeruginosa* suşu BA7823 (Hindistan) referans suşuna sahip akraba grubunu göstermiş ve bu yapılan çalışma lokal izolatlarındaki mutasyonları ve polimorfizmleri belirlemek için kullanılmıştır.



Şekil 4.9. Uluslararası izolatlarla karşılaştırıldığında 8 *P. aeruginosa* klinik lokal izolatları için *Exo*U'nun neighbor-joining filogenetik analizi. Analiz MEGA6 kullanılarak yapıldı.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

1. Bu çalışma, *Pseudomonas aeruginosa* bakterilerinin yara enfeksiyonlarından izolasyon yüzdesinin yanık bölgelerinden izolasyon oranından nispeten daha yüksek olduğunu ve % 28.35'e ulaştığını gösterdi.
2. Çoğu *Pseudomonas aeruginosa*'nın izolatı, bu çalışmada kullanılan çoğu antibiyotik türüne (özellikle direnç oranının % 92 olduğu Amoksisiline) yüksek direnç göstermiştir.
3. *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının en duyarlı olduğu antibiyotik % 66'lık bir direnç oranı ile imipenem; onu takiben % 72 direnç oranı ile Nalidiksik asit ve Norfloksasin'dir.
4. *Exo*U geni, *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında saptanmıştır. Buradaki sonuçlar 10 adet izolatta *Exo*U geninin bulunduğunu göstermiştir.
5. *Exo*U genini taşıyan bir dizi *Pseudomonas aeruginosa* izolatının azotlu bazlarının sekans analizinin sonuçları ve bunların birkaç küresel izolat ile eşleştirilmesi sonucunda, referans suşlar ile % 98-100 uyumlu oldukları görülmüştür.
6. *P. aeruginosa* ile ilişkili *Exo*U geninin PCR ürünleri üzerinde mutasyonları saptamak için yapılan DNA sekans sonuçları, tüm izolatlarda *Exo*U geninin 5 mutasyon taşıdığını gösterdi. Ek olarak, üç tip mutasyon tespit edilmiştir. Bunlar 3 çerçeve kayması mutasyonu, 4 sessiz mutasyon ve 2 uyumsuz mutasyon şeklinde dağlım göstermiştir.

5.2. Öneriler

Bu çalışmanın sonuçlarının ileriki çalışmalar için bir literatür kaynağı oluşturacağı kanaatindeyiz. Ayrıca bu çalışma;

Antibiyotiklerin sağlıklı kullanımını teşvik eden, rastgele kullanımının zararlarını açıklayan ve antibiyotiklere dirençli bakteri suşlarının ortaya çıkmasında eğitim programlarının hazırlanmasında,

P. aeruginosa'nın, özellikle hastanelerde, yayılmasını kontrol etmek ve önlemek amacıyla salgınları takip etmek ve izlemek için programların geliştirilmesinde,

P. aeruginosa'nın antibiyotiklerle ilgili çoklu direncin ortaya çıkma nedenlerini inceleyen çalışmaların yapılmasında,

P. aeruginosa'nın neden olduğu bakteriyel enfeksiyonlara karşı hangi antibiyotiğin daha fazla etkili olduğunu belirlemek için ülke hastanelerinde kapsamlı ve periyodik antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması hususunda gelecekte yapılacak araştırmalar için bir ön hazırlık niteliğindedir.

6. KAYNAKLAR

Agnello, M. ve Wong-Beringer, A., 2012, Differentiation in quinolone resistance by virulence genotype in *Pseudomonas aeruginosa*, *PloS one*, 7 (8).

Al-Aali, K., 2016, Microbial profile of burn wound infections in burn patients, Taif, Saudi Arabia, *Arch Clin Microbiol*, 7 (2), 1-9.

Al-Qasi, L., 2012a, Purification, characterization and genetic evaluation of Phenazine produced by *Pseudomonas aeruginosa* local isolates, *Degree of Doctorate. College of Science, University of Baghdad*.

Al-Qasi, L., 2012b, Purification, characterization and genetic evaluation of Phenazine produced by *Pseudomonas aeruginosa* local isolates, *Degree of Doctorate. College of Science, University of Baghdad.*

Al-Wrafy, F., Brzozowska, E., Górska, S. ve Gamian, A., 2017, Pathogenic factors of Pseudomonas aeruginosa-the role of biofilm in pathogenicity and as a target for phage therapy, *Advances in Hygiene & Experimental Medicine/Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej*, 71.

Alaghehbandan, R., Azimi, L. ve Lari, A. R., 2012, Nosocomial infections among burn patients in Teheran, Iran: a decade later, *Annals of burns and fire disasters*, 25 (1), 3.

Ali, Z., Mumtaz, N., Naz, S. A., Jabeen, N. ve Shafique, M., 2015, Multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*: a threat of nosocomial infections in tertiary care hospitals, *JPMA*, 65 (12).

Alikhani, M. Y., Parsavash, S., Arabestani, M. R. ve Hosseini, S., 2017, Prevalence of antibiotic resistance and class 1 integrons in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Avicenna J. Clin. Microbiol. Infect,*, 4.

Amirkamali, S., Naserpour-Farivar, T., Azarhoosh, K. ve Peymani, A., 2017, Distribution of the bla OXA, bla VEB-1, and bla GES-1 genes and resistance patterns of ESBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitals in Tehran and Qazvin, Iran, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 50 (3), 315-320.

An, Y., Bhagwat, S., Bokranz, W., Bradshaw, D., Brown, M., Burne, R., Chen, Y., de Kievit, T., Friedman, R. ve Gerstel, U., 2003, *Medical Implications of Biofilms, Cambridge University Press*.

Anantharajah, A., Mingeot-Leclercq, M. ve Van Bambeke, F., 2016, Targeting the type three secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*, *Trends in Pharmacological Sciences*, 37 (9), 734-749.

Anderson, D., Schmalzer, K., Sato, H., Casey, M., Terhune, S., Haas, A., Feix, J. ve Frank, D., 2011, Ubiquitin and ubiquitin-modified proteins activate the *Pseudomonas aeruginosa* T3SS cytotoxin, ExoU, *Molecular Microbiology*, 82 (6), 1454-1467.

Atlas, R. M., Parks, L. ve Brown, A., 1995, Laboratory manual of experimental microbiology.

Azimi, L., Alaghehbandan, R., Asadian, M., Alinejad, F. ve Lari, A. R., 2019, Multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* circulation in a burn hospital, Tehran, Iran, *GMS Hygiene and Infection Control*, 14.

Azimi, S., Kafil, H., Baghi, H., Shokrian, S., Najaf, K., Asgharzadeh, M., Yousefi, M., Shahrivar, F. ve Aghazadeh, M., 2016, Presence of exoY, exoS, exoU and exoT genes, antibiotic resistance and biofilm production among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Northwest Iran, *GMS Hygiene and Infection Control*, 11.

Baron, S., 1996, Alphaviruses (Togaviridae) and Flaviviruses (Flaviviridae)-*Medical Microbiology, University of Texas Medical Branch at Galveston*, p.

Benz, R. ve Hancock, R. E., 1981, Properties of the large ion-permeable pores formed from protein F of *Pseudomonas aeruginosa* in lipid bilayer membranes, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 646 (2), 298-308.

Berthelot, P., Attree, I., Plesiat, P., Chabert, J., De Bentzmann, S., Pozzetto, B. ve Grattard, F., 2003, *Pseudomonas aeruginosa*. Genotypic and phenotypic analysis of type III secretion system in a cohort of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia isolates: Evidence for a possible association between O serotypes and exo genes, *J. Infect*, 188, 512-518.

Bradbury, R. S., Roddam, L., Merritt, A., Reid, D. ve Champion, A., 2010, Virulence gene distribution in clinical, nosocomial and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Medical Microbiology*, 59 (8), 881-890.

Brennan, C., Momota, H., Hambardzumyan, D., Ozawa, T., Tandon, A., Pedraza, A. ve Holland, E., 2009, Glioblastoma subclasses can be defined by activity among signal transduction pathways and associated genomic alterations, *Plos one*, 4 (11).

Brooks, G., Carroll, K., Butel, J., Morse, S. ve Mietzer, T., 2013, Rubella (German Measles) Virus, *Jawetz, Melnick, and Adelberg's Medical Microbiology. 26th ed. USA: McGraw-Hill Lange Companies*, 607-612.

Brown, A. ve Smith, H., 2014, Benson's Microbiological Applications, Laboratory Manual in General Microbiology, Short Version, McGraw-Hill Education, p.

Brown, J. H., 1939, Bergey's manual of determinative bacteriology, *American Public Health Association*.

Cabot, G., Zamorano, L., Moyà, B., Juan, C., Navas, A., Blázquez, J. ve Oliver, A., 2016, Evolution of *Pseudomonas aeruginosa* antimicrobial resistance and fitness under low and high mutation rates, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60 (3), 1767-1778.

Christensen, G. D., Simpson, W. A., Bisno, A. L. ve Beachey, E. H., 1982, Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces, *Infection and Immunity*, 37 (1), 318-326.

CLSI, C., 2016, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, *Clinical Lab Standards Institute*.

Collee, J., Fraser, A., Marmion, B. ve Simmons, A., 1996, Infections of wounds and other tissues, *Practical Medical Microbiology. 14th ed. Singapore: Longman Publishers (Pte) Ltd*, 66-67.

Davane, M., Suryawanshi, N., Pichare, A., Nagoba, B. ve Diseases, I., 2014, *Pseudomonas aeruginosa* from hospital environment, *Journal of Microbiology and Infectious Diseases*, 4 (01).

de Abreu, P., Farias, P., Paiva, G., Almeida, A. ve Morais, P., 2014, Persistence of microbial communities including *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital environment: a potential health hazard, *BMC Microbiology*, 14 (1), 118.

Domingo-Calap, P., Georgel, P. ve Bahram, S., 2016, Back to the future: bacteriophages as promising therapeutic tools, *Hla*, 87 (3), 133-140.

Elraih, H., 2015, Correlation of integrons to multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates using molecular standard method in Khartoum state, *The National Ribat University-A thesis*, 6-30.

Feltman, H., Schulert, G., Khan, S., Jain, M., Peterson, L. ve Hauser, A., 2001, Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Microbiology*, 147 (10), 2659-2669.

Finck-Barbançon, V., Yahr, T. ve Frank, D, 1998, Identification and characterization of SpcU, a chaperone required for efficient secretion of the ExoU cytotoxin, *Journal of Bacteriology*, 180 (23), 6224-6231.

Finck-Barbançon, V., Goranson, J., Zhu, L., Sawa, T., Wiener-Kronish, J., Fleiszig, S. M., Wu, C., Mende-Mueller, L. ve Frank, D., 1997, ExoU expression by Pseudomonas aeruginosa correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury, *Molecular Microbiology*, 25 (3), 547-557.

Firouzi, L., Pooladi, M., Nowroozi, J., Akhvan, S. ve Hooshiyar, M., 2016, Presence of exoU and exoS genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from urinary tract infections, *Infect Epidemiol Med.,* 2(2): 8-11.

Forbes, B. A., Sahm, D. ve Weissfeld, A., 1988, Diagnostic Microbiology, *Bailey & Scott1s Diagnostic Microbiology*, 11.

Forbes, B. A., Sahm, F. ve Weissfeld, S., 2002, Bailey & Scotts, *Diagnostic Microbiology. 11th. ed. St. Louis, Missouri. Mosby*.

Forbes, A., Sahm, F. ve Weissfeld, S., 2007, Study guide for Bailey & Scott's diagnostic microbiology, *Mosby USA*, p.

Freschi, L., Vincent, A. T., Jeukens, J., Emond-Rheault, J., Kukavica-Ibrulj, I., Dupont, M.-J., Charette, S. J., Boyle, B. ve Levesque, R., 2018, The *Pseudomonas aeruginosa* Pan-Genome Provides New Insights on its population structure, horizontal gene transfer, and pathogenicity, *Genome Biology and Evolution*, 11 (1), 109-120.

Frimmersdorf, E., Horatzek, S., Pelnikevich, A., Wiehlmann, L. ve Schomburg, D., 2010, How *Pseudomonas aeruginosa* adapts to various environments: a metabolomic approach, *Environmental Microbiology*, 12 (6), 1734-1747.

Gaur, R., Jeena, G., Shah, N., Gupta, S., Pradhan, S., Tyagi, K., Jain, M., Chattopadhyay, D. ve Bhatia, S., 2015, High density linkage mapping of genomic and transcriptomic SNPs for synteny analysis and anchoring the genome sequence of chickpea, *Scientific Reports*, 5, 13387.

Geser, N., Stephan, R. ve Hächler, H., 2012, Occurrence and characteristics of extended-spectrum β-lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae in food producing animals, minced meat and raw milk, *BMC Veterinary Research*, 8 (1), 21.

Halavaty, S., Borek, D., Tyson, H., Veesenmeyer, L., Shuvalova, L., Minasov, G., Otwinowski, Z., Hauser, R. ve Anderson, F., 2012, Structure of the type III secretion effector protein ExoU in complex with its chaperone SpcU, *Plos one*, 7 (11).

Harly, J. ve Prescott, L., 2002, Laboratory Exercises Microbiology. WCB, *The Mcgraw-Hill*, Inc., New York, USA.

Hauser, A. R., Cobb, E., Bodí, M., Mariscal, D., Vallés, J., Engel, J. ve Rello, J., 2002, Type III protein secretion is associated with poor clinical outcomes in patients with ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*, *Critical Care Medicine*, 30 (3), 521-528.

Häußler, S., 2008, *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: impact of small colony variants on chronic persistant infections, In: *Pseudomonas* Genomics and Molecular Biology, Eds: Caister Academic Press Norfolk, p. 159-175.

Henrichfreise, B., Wiegand, I., Pfister, W. ve Wiedemann, B., 2007, Resistance mechanisms of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from Germany and correlation with hypermutation, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51 (11), 4062-4070.

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

Hirsch, E. B. ve Tam, V., 2010, Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 54(9): 3717–3722.

Horna, G., Amaro, C., Palacios, A., Guerra, H. ve Ruiz, J., 2019, High frequency of the $exoU^{+}/exoS^{+}$ genotype associated with multidrug-resistant "high-risk clones" of P*seudomonas aeruginosa* clinical isolates from Peruvian hospitals, *Scientific Reports*, 9.

Hostacka, A. ve Majtan, V., 1997, Serotyping and virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates, *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 44 (2), 141-146.

Huber, P., Basso, P., Reboud, E. ve Attrée, I., 2016, *Pseudomonas aeruginosa* renews its virulence factors, *Environmental Microbiology Reports*, 8 (5), 564-571.

Jalal, S. ve Wretlind, B., 1998, Mechanisms of quinolone resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Microbial Drug Resistance*, 4 (4), 257-261.

Jean, F., 2000, Biochemical test for identification of medical bacteria, *Publisher: Lippincott Williams and Wilkins*, 912.

Jenny, M. ve Kingsbury, J., 2018, Properties and prevention: A review of *Pseudomonas aeruginosa*, *J Biol Med Res. Voffl*, 2.

Joyanes, P., del Carmen Conejo, M., Martínez-Martínez, L. ve Perea, J., 2001, Evaluation of the VITEK 2 system for the identification and susceptibility testing of three species of nonfermenting gram-negative rods frequently isolated from clinical samples, *Journal of Clinical Microbiology*, 39 (9), 3247-3253.

Kanj, S. ve Sexton, D. J., 2019, Principles of antimicrobial therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infections, *UpToDate Inc, Waltham, MA*.

Karami, P., Bazmamoun, H., Sedighi, I., Nejad, A., Aslani, M. M. ve Alikhani, M., 2017, Antibacterial resistance patterns of extended spectrum b-lactamase producing enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from children, *Arab J. Gastroenterol.*

Kingsley, S. J. ve Verghese, S., 2013, First Report of OXA-4, an ESBL Isolated from *Pseudomonas aeruginosa* a South Indian Strain, *Indian Journal of Microbiology*, 53 (3), 308-314.

Kipnis, E., Sawa, T. ve Wiener-Kronish, J., 2006, Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis, *Medecine et Maladies Infectieuses*, 36 (2), 78-91.

Klockgether, J., Cramer, N., Wiehlmann, L., Davenport, C. F. ve Tümmler, B., 2011, *Pseudomonas aeruginosa* genomic structure and diversity, *Frontiers in Microbiology*, 2, 150.

Kurahashi, K., Kajikawa, O., Sawa, T., Ohara, M., Gropper, M. A., Frank, D. W., Martin, T. R. ve Wiener-Kronish, J. P., 1999, Pathogenesis of septic shock in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia, *The Journal of Clinical Investigation*, 104 (6), 743-750.

Lari, A. R., Azimi, L., Soroush, S. ve Taherikalani, M., 2015, Low prevalence of metallo-beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a tertiary burn care center in Tehran, *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 28 (3), 384-389.

Lee, D. G., Urbach, J. M., Wu, G., Liberati, N. T., Feinbaum, R. L., Miyata, S., Diggins, L. T., He, J., Saucier, M. ve Déziel, E., 2006, Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial, *Genome Biology*, 7 (10), R90.

Levinson, W., 2017, Review of medical microbiology and immunology, McGraw-Hill Education.

Liew, S. M., Rajasekaram, G., Puthucheary, S. A. ve Chua, K. H., 2019, Antimicrobial susceptibility and virulence genes of clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *PeerJ*, 7, e6217.

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

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

Lyczak, J. B., Cannon, C. L. ve Pier, G., 2000, Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist, *Microbes and Infection*, 2 (9), 1051-1060.

Lyons, E., Freeling, M., Kustu, S. ve Inwood, W., 2011, Using genomic sequencing for classical genetics in *E. coli* K12, *Plos One*, 6 (2).

Maroui, I., Barguigua, A., Aboulkacem, A., Elhafa, H., Ouarrak, K., Sbiti, M., Louzi, L., Timinouni, M. ve Belhaj, A., 2017, Clonal analysis of clinical and environmental *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Meknes region, Morocco, *Polish Journal of Microbiology*, 66 (3), 397-400.

Mathee, K., Narasimhan, G., Valdes, C., Qiu, X., Matewish, J. M., Koehrsen, M., Rokas, A., Yandava, C. N., Engels, R. ve Zeng, E., 2008, Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105 (8), 3100-3105.

Mohammed, R., Echeverry, A., Stinson, C., Green, M., Bonilla, T., Hartz, A., McCorquodale, D., Rogerson, A. ve Esiobu, N., 2012, Survival trends of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Clostridium perfringens* in a sandy South Florida beach, *Marine Pollution Bulletin*, 64 (6), 1201-1209.

Moore, N. M. ve Flaws, M. L., 2011, Introduction: *Pseudomonas aeruginosa*, *Clinical Laboratory Science*, 24 (1), 41.

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

Morita, Y., Tomida, J. ve Kawamura, Y., 2012, MexXY multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*, *Frontiers in Microbiology*, 3, 408.

Mouly, T. F., 2018, Detection of possible mutations in gyrA gene of ciprofloxacin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with lung infection, *BRAC University*.

Murray, P., Baron, E., Pfaller, M., Tenover, F. ve Yolken, R., 2007, Manual of clinical microbiology, *ASM Press*, Washington, DC.

Nakasone, I., Kinjo, T., Yamane, N., Kisanuki, K. ve Shiohira, C. M., 2007, Laboratory-based evaluation of the colorimetric VITEK-2 Compact system for species identification and of the Advanced Expert System for detection of antimicrobial resistances: VITEK-2 compact system identification and

antimicrobial susceptibility testing, *Diagnostic Microbiology and infectious Disease*, 58 (2), 191-198.

Naser, H. H., 2016, Detection of some aminoglycosides antimicrobial resistance genes in *Pseudomonas aeruginosa* cultured from mastitic milk cows, *Kufa Journal For Veterinary Medical Sciences*, 7 (2), 24-32.

Neuhauser, M. M., Weinstein, R. A., Rydman, R., Danziger, L. H., Karam, G. ve Quinn, J., 2003, Antibiotic resistance among gram-negative bacilli in US intensive care units: implications for fluoroquinolone use, *Jama*, 289 (7), 885-888.

Ochoa, T. J., Chea-Woo, E., Baiocchi, N., Pecho, I., Campos, M., Prada, A., Valdiviezo, G., Lluque, A., Lai, D. ve Cleary, T. G., 2013, Randomized double-blind controlled trial of bovine lactoferrin for prevention of diarrhea in children, *The Journal of Pediatrics*, 162 (2), 349-356.

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

Patil, S., Desai, N., Mahadik, K. ve Paradkar, A., 2015, Can green synthesized propolis loaded silver nanoparticulate gel enhance wound healing caused by burns?, *European Journal of Integrative Medicine*, 7 (3), 243-250.

Pazos, M. A., Lanter, B. B., Yonker, L. M., Eaton, A. D., Pirzai, W., Gronert, K., Bonventre, J. V. ve Hurley, B., 2017, *Pseudomonas aeruginosa* ExoU augments neutrophil transepithelial migration, *PLoS Pathogens*, 13 (8), e1006548.

Pier, G. B. ve Ramphal, R., 2005, *Pseudomonas aeruginosa*, *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 6 (2), 2587-2615.

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

Poole, K., 2001, Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms, *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 3 (2), 255-264.

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

Prasanna, S., Dharanidevi, S., Das, N. K. ve Raj, S., 2016, Prevalence, phenotypic characterization and antibiotic susceptibility of non-fermentative gram negative bacilli isolates at a Tertiary Care Centre, *Int J Curr Microbiol App Sci*, 5 (11), 442-454.

Qin, X. H., Torgersen, J., Saf, R., Mühleder, S., Pucher, N., Ligon, S. C., Holnthoner, W., Redl, H., Ovsianikov, A. ve Stampfl, J., 2013, Three-dimensional microfabrication of protein hydrogels via two-photon-excited thiol-vinyl ester photopolymerization, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 51 (22), 4799-4810.

Ramírez-Estrada, S., Borgatta, B. ve Rello, J., 2016, *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia management, *Infection and Drug Resistance*, 9, 7.

Reinhart, A. A. ve Oglesby-Sherrouse, A. G., 2016, Regulation of P*seudomonas aeruginosa* virulence by distinct iron sources, *Genes*, 7 (12), 126.

Reish, O., Ashkenazi, S., Naor, N., Samra, Z. ve Merlob, P., 1993, An outbreak of multiresistant *Klebsiella* in a neonatal intensive care unit, *Journal of Hospital Infection*, 25 (4), 287-291.

Roy-Burman, A., Savel, R. H., Racine, S., Swanson, B. L., Revadigar, N. S., Fujimoto, J., Sawa, T., Frank, D. W. ve Wiener-Kronish, J. P., 2001, Type III protein secretion is associated with death in lower respiratory and systemic *Pseudomonas aeruginosa* infections, *The Journal of Infectious Diseases*, 183 (12), 1767-1774.

Rybtke, M., Hultqvist, L. D., Givskov, M. ve Tolker-Nielsen, T., 2015, *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections: community structure, antimicrobial tolerance and immune response, *Journal of Molecular Biology*, 427 (23), 3628-3645.

Sadikot, R. T., Blackwell, T. S., Christman, J. W. ve Prince, A., 2005, Pathogen–host interactions in *Pseudomonas aeruginosa pneumonia*, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 171 (11), 1209-1223.

Safaei, H. G., Moghim, S., Isfahani, B. N., Fazeli, H., Poursina, F., Yadegari, S., Nasirmoghadas, P. ve Nodoushan, S., 2017, Distribution of the strains of multidrug-resistant, extensively drug-resistant, and pandrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from burn patients, *Advanced Biomedical Research*, 6.

Sana'a, N., 2013, Detection of Exo A and OPR I Genes in *Pseudomonas aeruginosa* using polymerase chain reaction, *Iraqi Journal of Biotechnology*, 12 (1), 44-50.

Sato, H. ve Frank, D., 2004, ExoU is a potent intracellular phospholipase, *Molecular Microbiology*, 53 (5), 1279-1290.

Sato, H., Feix, J. B. ve Frank, D. W., 2006, Identification of superoxide dismutase as a cofactor for the *Pseudomonas* type III toxin, ExoU, *Biochemistry*, 45 (34), 10368-10375.

Sawa, T., Shimizu, M., Moriyama, K. ve Wiener-Kronish, J. P., 2014, Association between *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion, antibiotic resistance, and clinical outcome: a review, *Critical Care*, 18 (6), 668.

Sawa, T., Hamaoka, S., Kinoshita, M., Kainuma, A., Naito, Y., Akiyama, K. ve Kato, H., 2016, *Pseudomonas aeruginosa* type III secretory toxin ExoU and its predicted homologs, *Toxins*, 8 (11), 307.

Schmalzer, K. M., Benson, M. A. ve Frank, D. W., 2010, Activation of ExoU phospholipase activity requires specific C-terminal regions, *Journal of Bacteriology*, 192 (7), 1801-1812.

Selim, S., Amin, A., Hassan, S. ve Hagazey, M., 2015, Antibacterial, cytotoxicity and anticoagulant activities from *Hypnea esperi* and *Caulerpa prolifera* marine algae, *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28 (2).

Silby, M. W., Winstanley, C., Godfrey, S. A., Levy, S. B. ve Jackson, R. W., 2011, *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable, *FEMS Microbiology Reviews*, 35 (4), 652-680.

Starr, M. P., 1981, Prokaryotes as plant pathogens, In: The Prokaryotes, Eds: Springer, p. 123-134.

Stover, C., Pham, X., Erwin, A., Mizoguchi, S., Warrener, P., Hickey, M., Brinkman, F., Hufnagle, W., Kowalik, D. ve Lagrou, M., 2000a, Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen, *Nature*, 406 (6799), 959.

Stover, C., Pham, X., Erwin, A., Mizoguchi, S., Warrener, P., Hickey, M., Brinkman, F., Hufnagle, W., Kowalik, D. ve Lagrou, M. J. N., 2000b, Complete genome

sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen, *Nature*, 406 (6799), 959.

Strateva, T. ve Yordanov, D., 2009, *Pseudomonas aeruginosa* phenomenon of bacterial resistance, *Journal of Medical Microbiology*, 58 (9), 1133-1148.

Subedi, D., Vijay, A. K., Kohli, G. S., Rice, S. A. ve Willcox, M., 2018, Association between possession of ExoU and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*, *PLoS One*, 13 (9), e0204936.

Sudhakar, M., Jagatheesan, A., Perumal, K. ve Arunkumar, K., 2015, Methods of phycobiliprotein extraction from *Gracilaria crassa* and its applications in food colourants, *Algal Research*, 8, 115-120.

Sun, J., Deng, Z. ve Yan, A., 2014, Biochemical and biophysical research communications bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations, *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 453, 254-267.

Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J. ve Carmeli, Y., 2018, Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis, *The Lancet Infectious Diseases*, 18 (3), 318-327.

Tadesse, A., Alem,M, 2006, Medical Bacteriology, *University of Gondar*, 175.

Tamura, M., Ajayi, T., Allmond, L. R., Moriyama, K., Wiener-Kronish, J. P. ve Sawa, T., 2004, Lysophospholipase A activity of *Pseudomonas aeruginosa* type III secretory toxin ExoU, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 316 (2), 323-331.

Tang, Y.-W., 2014, Molecular medical microbiology, *Academic press*.

Todar, K., 2004, Todar's online textbook of bacteriology, *University of Wisconsin Madison*.

Vandepitte, J., Verhaegen, J., Engbaek, K., Rohner, P., Piot, P., Heuck, C. ve Heuck, C., 2003, Basic laboratory procedures in clinical bacteriology, World Health Organization, p.

WHO, 2003, Basic laboratory procedures in clinical bacteriology, *World Health Organization*.

Wilfinger, W., Mackey, K. ve Chomczynski, P., 2006, Assessing the quantity, purity and integrity of RNA and DNA following nucleic acid purification, *DNA Sequencing II Optimizing Preparation and Cleanup*, 291, 312.

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

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

Yousefi-Avarvand, A., Khashei, R., Ebrahim-Saraie, H. S., Emami, A., Zomorodian, K. ve Motamedifar, M., 2015, The frequency of exotoxin A and exoenzymes S and U genes among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Shiraz, Iran, *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*, 4 (3), 167.

Zarei, O., Shokoohizadeh, L., Hossainpour, H. ve Alikhani, M., 2018, Molecular analysis of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical, environmental and cockroach sources by ERIC-PCR, *BMC Research Notes*, 11 (1), 668.

Zervosen, A., Bouillez, A., Herman, A., Amoroso, A., Joris, B., Sauvage, E., Charlier, P. ve Luxen, A., 2012, Synthesis and evaluation of boronic acids as inhibitors

of penicillin binding proteins of classes A, B and C, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20 (12), 3915-3924.

Zhang, W., Wu, Y., Yin, W. ve Yu, M., 2002, Study of isolation of fluoroquinolone-resistant *Ureaplasma urealyticum* and identification of mutant sites, *Chinese Medical Journal*, 115 (10), 1573-1575.

Zhapouni, A., Farshad, S. ve Alborzi, A., 2009, *Pseudomonas aeruginosa*: Burn infection, treatment and antibacterial resistance, *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 11(3):244-253.

EKLER

Ek 1. API-20 E'nin 20 biyokimyasal test tablosu

ID	Reaksiyon	Test
1-	ONPG	Beta- galaktosidaz testi
2-	ADH	Arginin dihidrolaz testi
3-	LDC	Lizin dekarboksilaz testi
4-	ODC	Ornitin dekarboksilaz testi
5-	CIT	Sitrat kullanım testi
6-	H2S	Hidrojen sülfür testi
7-	URE	Üreaz testi
8-	TDA	Triptofan deaminaz testi
9-	IND	Indol testi
10	VP	Voges Proskawer testi
11-	GEL	Gelatinligue faction testi
12-	GLU	Glikoz fermantasyon testi
13-	MAN	Mannitol fermantasyon testi
14-	INO	İnositol fermantasyon testi
15-	SOR	Sorbitol fermantasyon testi
16-	RHA	Ramnoz fermantasyon testi
17-	SAC t	Sükroz fermantasyon testi
18-	MEL	Melibiyoz fermantasyon testi
19-	AMY	Amigdalin fermantasyon testi
20-	ARA	Arabinoz fermantasyon testi

Ek.2. *P.aeruginosa*'nın tanımlanması için API-20 E sonuç tablosu

ID	Kısaltma	Negatif Sonuç	Pozitif Sonuç	*P. aeruginosa* Sonucu
1-	ONPG	Renksiz	Sarı	(-) Renksiz
2-	ADH	Sarı	Turuncu	(+) Turuncu
3-	LDC	Sarı	Turuncu	(-)Sarı
4-	ODC	Sarı	Turuncu	(-)Sarı
5-	CIT	Sarı	Yeşil/Mavi	(-)Yeşil/ Mavi
6-	H_2S	Renksiz	Siyah	(-) Renksiz
7-	URE	Sarı	Turuncu	(-)Sarı
8-	TDA	Sarı	Koyu kahverengi	(-)Sarı
9-	IND	Sarı	Kırmızı halka	(-)Sarıring
10-	VP	Renksiz	Pembe kırmızı	(-)Renksiz pembe
11-	GEL		Siyah	(+)Siyah
12-	GLU	Mavi	Sarı	(-)Mavi
13-	MAN	Mavi	Sarı	(-)Mavi
14-	INO	Mavi	Sarı	(-)Mavi
15-	SOR	Mavi	Sarı	(-)Mavi
16-	RHA	Mavi	Sarı	(-)Mavi
17-	SAC	Mavi	Sarı	(-)Mavi
18-	MEL	Mavi yeşil	Sarı	(-)Mavi yeşil
19-	AMY	Mavi	Sarı	(-)Mavi
20-	ARA	Mavi yeşil	Sarı	(-)Mavi yeşil

Ek 3. *Pseudomonas aeruginosa* suşunun genom dizilimi (BA7823)

Length: 6876113

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
654 bits(724)	0.0	362/362(100%)	0/362(0%)	Plus/Plus

```
Query  1        CGATCTCGCTGCTAATGTGTTGGAACAGCTTCAGCTTCTTGTTCGAGCTGTCGAGCAGCG  60
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397021  CGATCTCGCTGCTAATGTGTTGGAACAGCTTCAGCTTCTTGTTCGAGCTGTCGAGCAGCG  4397080

Query  61       AAATAAGATCCATCTTGTCGGAAAGGGTCTTGAACGCCGCCGGGCTCATACCTGAGGCCA  120
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397081  AAATAAGATCCATCTTGTCGGAAAGGGTCTTGAACGCCGCCGGGCTCATACCTGAGGCCA  4397140

Query  121      AAAGGGCGGCGGTGATGCCGCCAGCGGACGAACCGGACATGCTGCGGATGCCATCGAGCA  180
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397141  AAAGGGCGGCGGTGATGCCGCCAGCGGACGAACCGGACATGCTGCGGATGCCATCGAGCA  4397200

Query  181      TGCCTTTCTCTTCTAGCGCCAGCATTGCTCCCGGGTATGCCGCACCTTTGGCACCACCGC  240
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397201  TGCCTTTCTCTTCTAGCGCCAGCATTGCTCCCGGGTATGCCGCACCTTTGGCACCACCGC  4397260

Query  241      CGCTTAGGACCAGACTGGTCAATGGTGGCCGACTGAGCTGTAGCTCGGTGATTCCGTTCT  300
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397261  CGCTTAGGACCAGACTGGTCAATGGTGGCCGACTGAGCTGTAGCTCGGTGATTCCGTTCT  4397320

Query  301      CAAACTGGCGCAGAGTGATCTGCCGCGGCCCTGCCGAGTCAGTCAGAGTACGGGACTCCC  360
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397321  CAAACTGGCGCAGAGTGATCTGCCGCGGCCCTGCCGAGTCAGTCAGAGTACGGGACTCCC  4397380

Query  361      CT  362
               ||
Sbjct  4397381  CT  4397382
```

3'5' Frame 2

```
GESRTLTDSAGPRQITLRQFENGITELQLSRPPLTSLVLSGGGAKGAAYPGAMLALEEKGMLDGIRSMSGSSAGGITAA
LLASGMSPAAFKTLSDKMDLISLLDSSNKKLKLFQHISSEI
```

3'5' Frame 2

```
aggg gag tcc cgt act ctg act gac tcg gca ggg ccg cgg cag atc act ctg cgc cag ttt
  G   E   S   R   T   L   T   D   S   A   G   P   R   Q   I   T   L   R   Q   F
gag aac gga atc acc gag cta cag ctc agt cgg cca cca ttg acc agt ctg gtc cta agc
 E   N   G   I   T   E   L   Q   L   S   R   P   P   L   T   S   L   V   L   S
ggc ggt ggt gcc aaa ggt gcg gca tac ccg gga gca atg ctg gcg cta gaa gag aaa ggc
 G   G   G   A   K   G   A   A   Y   P   G   A   M   L   A   L   E   E   K   G
atg ctc gat ggc atc cgc agc atg tcc ggt tcg tcc gct ggc ggc atc acc gcc gcc ctt
 M   L   D   G   I   R   S   M   S   G   S   S   A   G   G   I   T   A   A   L
ttg gcc tca ggt atg agc ccg gcg gcg ttc aag acc ctt tcc gac aag atg gat ctt att
 L   A   S   G   M   S   P   A   A   F   K   T   L   S   D   K   M   D   L   I
tcg ctg ctc gac agc tcg aac aag aag ctg aag ctg ttc caa cac att agc agc gag atc
 S   L   L   D   S   S   N   K   K   L   K   L   F   Q   H   I   S   S   E   I
```

Ek 3.1 *P. aeruginosa* BA7823 izolatlarının sekans sonucu

-*Pseudomonas aeruginosa* strain BA7823 chromosome, complete genome
Sequence ID: CP032569.2
Length: 6876113

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
615 bits(681)	9e-172	355/362(98%)	2/362(0%)	Plus/Plus

```
Query  1        CGATCTCGCTGCTAATGTGTTGGAACAGCTTCAGCTTCTTGTTCGAGCTGTCGAGCAGCG  60
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397021  CGATCTCGCTGCTAATGTGTTGGAACAGCTTCAGCTTCTTGTTCGAGCTGTCGAGCAGCG  4397080

Query  61       AAATAAGATCCATCTTGTCGGAAAGGGTCTTGAACGCCGCCGGGCTCATACCTGAGGCCA  120
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397081  AAATAAGATCCATCTTGTCGGAAAGGGTCTTGAACGCCGCCGGGCTCATACCTGAGGCCA  4397140

Query  121      AAAGGGCGGCGGTGATGCCGCCAGCGGACGAACCGGACATGCTGCGGATGCCATCGAGCA  180
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397141  AAAGGGCGGCGGTGATGCCGCCAGCGGACGAACCGGACATGCTGCGGATGCCATCGAGCA  4397200

Query  181      TGCCTTTCTCTTCTAGCGCCAGCATTGCTCCCGGGTATGCCGCACCTTTGGCACCACCGC  240
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397201  TGCCTTTCTCTTCTAGCGCCAGCATTGCTCCCGGGTATGCCGCACCTTTGGCACCACCGC  4397260

Query  241      CGCTTAGGACCAGACTGGTCAATGGTGGCCGACTGAGCTGTAGCTCGGTGATTCCGTTCT  300
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397261  CGCTTAGGACCAGACTGGTCAATGGTGGCCGACTGAGCTGTAGCTCGGTGATTCCGTTCT  4397320

Query  301      CAAACTGGCGCAGAGTGATCTG-CTTTTCCCTGCCGAGTCAG-GAGAGTACGGGACTCCC  358
                |||||||||||||||||||| |    ||||||||||||||  ||||||||||||||||
Sbjct  4397321  CAAACTGGCGCAGAGTGATCTGCCGCGGCCCTGCCGAGTCAGTCAGAGTACGGGACTCCC  4397380

Query  359      CT  360
                ||
Sbjct  4397381  CT  4397382
```

Ek 3.2. *P. aeruginosa* BA7823 izolatının 2. sekans sonucu

-*Pseudomonas aeruginosa* strain BA7823 chromosome, complete genome
Sequence ID: CP032569.2
Length: 6876113

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
628 bits(340)	4e-176	355/362(98%)	2/362(0%)	Plus/Minus

```
Query  1        AGGGGAGTCCCGTACTCT-CCTGACTCGGCAGGG-AAAAGCAGATCACTCTGCGCCAGTT  58
               ||||||||||||||||||  ||||||||||||||     ||||||||||||||||||||
Sbjct  4397382  AGGGGAGTCCCGTACTCTGACTGACTCGGCAGGGCCGCGGCAGATCACTCTGCGCCAGTT  4397323

Query  59       TGAGAACGGAATCACCGAGCTACAGCTCAGTCGGCCACCATTGACCAGTCTGGTCCTAAG  118
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397322  TGAGAACGGAATCACCGAGCTACAGCTCAGTCGGCCACCATTGACCAGTCTGGTCCTAAG  4397263

Query  119      CGGCGGTGGTGCCAAAGGTGCGGCATACCCGGGAGCAATGCTGGCGCTAGAAGAGAAAGG  178
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397262  CGGCGGTGGTGCCAAAGGTGCGGCATACCCGGGAGCAATGCTGGCGCTAGAAGAGAAAGG  4397203

Query  179      CATGCTCGATGGCATCCGCAGCATGTCCGGTTCGTCCGCTGGCGGCATCACCGCCGCCCT  238
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397202  CATGCTCGATGGCATCCGCAGCATGTCCGGTTCGTCCGCTGGCGGCATCACCGCCGCCCT  4397143

Query  239      TTTGGCCTCAGGTATGAGCCCGGCGGCGTTCAAGACCCTTTCCGACAAGATGGATCTTAT  298
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397142  TTTGGCCTCAGGTATGAGCCCGGCGGCGTTCAAGACCCTTTCCGACAAGATGGATCTTAT  4397083

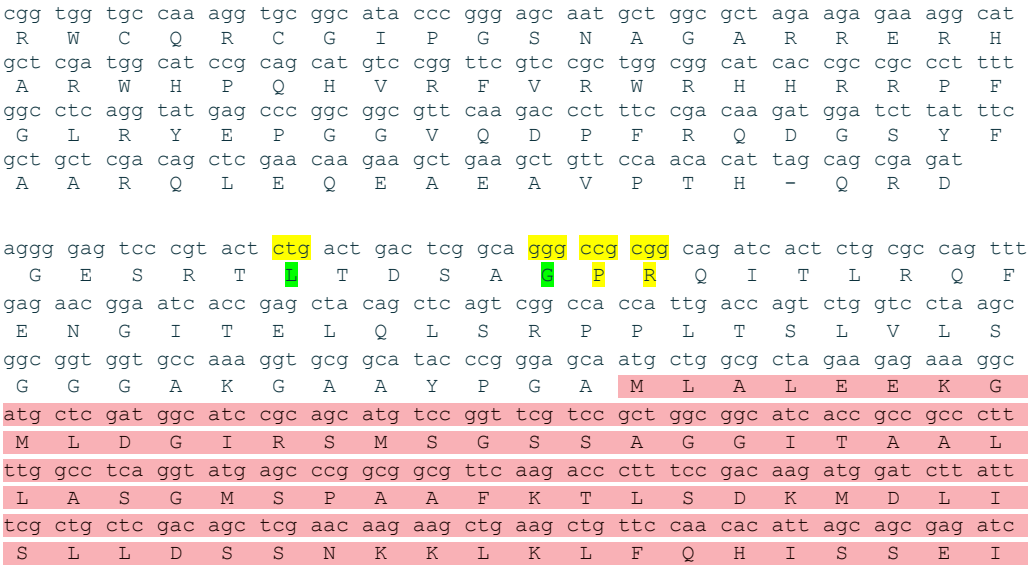
Query  299      TTCGCTGCTCGACAGCTCGAACAAGAAGCTGAAGCTGTTCCAACACATTAGCAGCGAGAT  358
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397082  TTCGCTGCTCGACAGCTCGAACAAGAAGCTGAAGCTGTTCCAACACATTAGCAGCGAGAT  4397023

Query  359      CG  360
               ||
Sbjct  4397022  CG  4397021
```

```
                                                    GESRTLLTRQGKADHSAPV-
                                                ERNHRATAQSATIDQSGPKRRWCQRCGIPGSNAGA
RRERHARWHPQHVRFVRWRHHRRPFGLRYEPGGVQDPFRQDGSYFAARQLEQE
                                                AEAVPTH-QRD
```

3'5' Frame 2

```
aggg gag tcc cgt act ctc ctg act cgg cag gga aaa gca gat cac tct gcg cca gtt tga
  G   E   S   R   T   L   L   T   R   Q   G   K   A   D   H   S   A   P   V   -
gaa cgg aat cac cga gct aca gct cag tcg gcc acc att gac cag tct ggt cct aag cgg
 E   R   N   H   R   A   T   A   Q   S   A   T   I   D   Q   S   G   P   K   R
```



Ek 3.3. *P. aeruginosa* BA7823 izolatının 3. sekans sonucu

-*Pseudomonas aeruginosa* strain BA7823 chromosome, complete genome
Sequence ID: CP032569.2
Length: 6876113

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
615 bits(681)	9e-172	355/362(98%)	2/362(0%)	Plus/Plus

Features: hypothetical proteintype III secretion system effector cytotoxin ExoU

```
Query  1        CGATCTCGCTGCTAATGTGTTGGAACAGCTTCAGCTTCTTGTTCGAGCTGTCGAGCAGCG  60
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397021  CGATCTCGCTGCTAATGTGTTGGAACAGCTTCAGCTTCTTGTTCGAGCTGTCGAGCAGCG  4397080

Query  61       AAATAAGATCCATCTTGTCGGAAAGGGTCTTGAACGCCGCCGGGCTCATACCTGAGGCCA  120
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397081  AAATAAGATCCATCTTGTCGGAAAGGGTCTTGAACGCCGCCGGGCTCATACCTGAGGCCA  4397140

Query  121      AAAGGGCGGCGGTGATGCCGCCAGCGGACGAACCGGACATGCTGCGGATGCCATCGAGCA  180
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397141  AAAGGGCGGCGGTGATGCCGCCAGCGGACGAACCGGACATGCTGCGGATGCCATCGAGCA  4397200

Query  181      TGCCTTTCTCTTCTAGCGCCAGCATTGCTCCCGGGTATGCCGCACCTTTGGCACCACCGC  240
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397201  TGCCTTTCTCTTCTAGCGCCAGCATTGCTCCCGGGTATGCCGCACCTTTGGCACCACCGC  4397260

Query  241      CGCTTAGGACCAGACTGGTCAATGGTGGCCGACTGAGCTGTAGCTCGGTGATTCCGTTCT  300
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397261  CGCTTAGGACCAGACTGGTCAATGGTGGCCGACTGAGCTGTAGCTCGGTGATTCCGTTCT  4397320

Query  301      CAAACTGGCGCAGAGTGATCTG-CTTTTCCCTGCCGAGTCAG-GAGAGTACGGGACTCCC  358
```

```
                ||||||||||||||||||||||| |    |||||||||||||  ||||||||||||||||
Sbjct  4397321  CAAACTGGCGCAGAGTGATCTGCCGCGGCCCTGCCGAGTCAGTCAGAGTACGGGACTCCC  4397380

Query  359      CT  360
                ||
Sbjct  4397381  CT  4397382
```

GESRTLLTRQGKADHSAPVERNHRATAQSATIDQSGPKRRWCQRCGIPG
SNAGARRERHARWHPQHVRFVRWRHHRRPFGLRYEPGGVQDPFRQDGSY
FAARQLEQEAEAVPTH-QRD

3'5' Frame 2

```
aggg gag tcc cgt act ctc ctg act cgg cag gga aaa gca gat cac tct gcg cca gtt tga
  G   E   S   R   T   L   L   T   R   Q   G   K   A   D   H   S   A   P   V   -
gaa cgg aat cac cga gct aca gct cag tcg gcc acc att gac cag tct ggt cct aag cgg
 E   R   N   H   R   A   T   A   Q   S   A   T   I   D   Q   S   G   P   K   R
cgg tgg tgc caa agg tgc ggc ata ccc ggg agc aat gct ggc gct aga aga gaa agg cat
 R   W   C   Q   R   C   G   I   P   G   S   N   A   G   A   R   R   E   R   H
gct cga tgg cat ccg cag cat gtc cgg ttc gtc cgc tgg cgg cat cac cgc cgc cct ttt
 A   R   W   H   P   Q   H   V   R   F   V   R   W   R   H   H   R   R   P   F
ggc ctc agg tat gag ccc ggc ggc gtt caa gac cct ttc cga caa gat gga tct tat ttc
 G   L   R   Y   E   P   G   G   V   Q   D   P   F   R   Q   D   G   S   Y   F
gct gct cga cag ctc gaa caa gaa gct gaa gct gtt cca aca cat tag cag cga gat
 A   A   R   Q   L   E   Q   E   A   E   A   V   P   T   H   -   Q   R   D
```

Ek 3.4. *P. aeruginosa* ve ExoU

-*Pseudomonas aeruginosa*, ExoU
Sequence ID: CP032569.2
Length: 6876113

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
628 bits(340)	4e-176	355/362(98%)	2/362(0%)	Plus/Minus

Features:
hypothetical proteintype III secretion system effector cytotoxin ExoU

```
Query  1        AGGGGAGTCCCGTACTCT-CCTGACTCGGCAGGG-AAAAGCAGATCACTCTGCGCCAGTT  58
                ||||||||||||||||||  ||||||||||||||    ||||||||||||||||||||
Sbjct  4397382  AGGGGAGTCCCGTACTCTGACTGACTCGGCAGGGCCGCGGCAGATCACTCTGCGCCAGTT  4397323

Query  59       TGAGAACGGAATCACCGAGCTACAGCTCAGTCGGCCACCATTGACCAGTCTGGTCCTAAG  118
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397322  TGAGAACGGAATCACCGAGCTACAGCTCAGTCGGCCACCATTGACCAGTCTGGTCCTAAG  4397263

Query  119      CGGCGGTGGTGCCAAAGGTGCGGCATACCCGGGAGCAATGCTGGCGCTAGAAGAGAAAGG  178
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397262  CGGCGGTGGTGCCAAAGGTGCGGCATACCCGGGAGCAATGCTGGCGCTAGAAGAGAAAGG  4397203

Query  179      CATGCTCGATGGCATCCGCAGCATGTCCGGTTCGTCCGCTGGCGGCATCACCGCCGCCCT  238
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397202  CATGCTCGATGGCATCCGCAGCATGTCCGGTTCGTCCGCTGGCGGCATCACCGCCGCCCT  4397143

Query  239      TTTGGCCTCAGGTATGAGCCCGGCGGCGTTCAAGACCCTTTCCGACAAGATGGATCTTAT  298
```

```
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397142  TTTGGCCTCAGGTATGAGCCCGGCGGCGTTCAAGACCCTTTCCGACAAGATGGATCTTAT  4397083

Query  299      TTCGCTGCTCGACAGCTCGAACAAGAAGCTGAAGCTGTTCCAACACATTAGCAGCGAGAT  358
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397082  TTCGCTGCTCGACAGCTCGAACAAGAAGCTGAAGCTGTTCCAACACATTAGCAGCGAGAT  4397023

Query  359      CG  360
                ||
Sbjct  4397022  CG  4397021
```

Ek 3.5. *P. aeruginosa* BA7823 izolatının 4. sekans sonucu

-*Pseudomonas aeruginosa* strain BA7823 chromosome, complete genome
Sequence ID: CP032569.2Length: 6876113

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
525 bits(284)	4e-145	289/291(99%)	1/291(0%)	Plus/Plus

```
Query  5        CGATCTCGCTGCTAATGTGTTGGAACAGCTTTCAGCTTCTTGTTCGAGCTGTCGAGCAGC  64
                ||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397021  CGATCTCGCTGCTAATGTGTTGGAACAGC-TTCAGCTTCTTGTTCGAGCTGTCGAGCAGC  4397079

Query  65       GAAATAAGATCCATCTTGTCGGAAAGGGTCTTGAACGCCGCCGGGCTCATACCTGAGGCC  124
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397080  GAAATAAGATCCATCTTGTCGGAAAGGGTCTTGAACGCCGCCGGGCTCATACCTGAGGCC  4397139

Query  125      AAAAGGGCGGCGGTGATGCCGCCAGCGGACGAACCGGACATGCTGCGGATGCCATCGAGC  184
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397140  AAAAGGGCGGCGGTGATGCCGCCAGCGGACGAACCGGACATGCTGCGGATGCCATCGAGC  4397199

Query  185      ATGCCTTTCTCTTCTAGCGCCAGCATTGCTCCCGGGTATGCCGCACCTTTGGCACCACCG  244
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397200  ATGCCTTTCTCTTCTAGCGCCAGCATTGCTCCCGGGTATGCCGCACCTTTGGCACCACCG  4397259

Query  245      CCGCTTAGGACCAGACTGGTCAATGGTGGCCGACTTAGCTGTAGCTCGGTG  295
                |||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||
Sbjct  4397260  CCGCTTAGGACCAGACTGGTCAATGGTGGCCGACTGAGCTGTAGCTCGGTG  4397310
```

5'3' Frame 2

ELQLSRPPLTSLVLSGGGAKGAAYPGAMLALEEKGMLDGIRSMSGSSAGGITAALLASG
M
SPAAFKTLSDKMDLISLLDSSNKKLKAVPTH-QRD

```
cgag cta cag cta agt cgg cca cca ttg acc agt ctg gtc cta agc ggc ggt ggt gcc aaa
  E   L   Q   L   S   R   P   P   L   T   S   L   V   L   S   G   G   G   A   K
```



Ek 3.6. *P. aeruginosa* BA7823 izolatının 5. sekans sonucu

-*Pseudomonas aeruginosa* strain BA7823 chromosome, complete genome
Sequence ID: CP032569.2
Length: 6876113

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
525 bits(284)	4e-145	289/291(99%)	1/291(0%)	Plus/Minus

```
Query  1        CACCGAGCTACAGCTAAGTCGGCCACCATTGACCAGTCTGGTCCTAAGCGGCGGTGGTGC  60
                |||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397310  CACCGAGCTACAGCTCAGTCGGCCACCATTGACCAGTCTGGTCCTAAGCGGCGGTGGTGC  4397251

Query  61       CAAAGGTGCGGCATACCCGGGAGCAATGCTGGCGCTAGAAGAGAAAGGCATGCTCGATGG  120
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397250  CAAAGGTGCGGCATACCCGGGAGCAATGCTGGCGCTAGAAGAGAAAGGCATGCTCGATGG  4397191

Query  121      CATCCGCAGCATGTCCGGTTCGTCCGCTGGCGGCATCACCGCCGCCCTTTTGGCCTCAGG  180
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397190  CATCCGCAGCATGTCCGGTTCGTCCGCTGGCGGCATCACCGCCGCCCTTTTGGCCTCAGG  4397131

Query  181      TATGAGCCCGGCGGCGTTCAAGACCCTTTCCGACAAGATGGATCTTATTTCGCTGCTCGA  240
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397130  TATGAGCCCGGCGGCGTTCAAGACCCTTTCCGACAAGATGGATCTTATTTCGCTGCTCGA  4397071

Query  241      CAGCTCGAACAAGAAGCTGAAAGCTGTTCCAACACATTAGCAGCGAGATCG  291
                |||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397070  CAGCTCGAACAAGAAGCTGAA-GCTGTTCCAACACATTAGCAGCGAGATCG  4397021
```

Ek 3.7. *P. aeruginosa* BA7823 izolatrının 6. sekans sonucu

-Pseudomonas aeruginosa strain BA7823 chromosome, complete genome
Sequence ID: CP032569.2
Length: 6876113

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
641 bits(710)	7e-180	360/362(99%)	1/362(0%)	Plus/Plus

```
Query  1        CGATCTCGCTGCTAATGTGTTGGAACAGCTTCAGCTTCTTGTTCGAGCTGTCGAGCAGCG  60
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397021  CGATCTCGCTGCTAATGTGTTGGAACAGCTTCAGCTTCTTGTTCGAGCTGTCGAGCAGCG  4397080

Query  61       AAATAAGATCCATCTTGTCGGAAAGGGTCTTGAACGCCGCCGGGCTCATACCTGAGGCCA  120
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397081  AAATAAGATCCATCTTGTCGGAAAGGGTCTTGAACGCCGCCGGGCTCATACCTGAGGCCA  4397140

Query  121      AAAGGGCGGCGGTGATGCCGCCAGCGGACGAACCGGACATGCTGCGGATGCCATCGAGCA  180
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397141  AAAGGGCGGCGGTGATGCCGCCAGCGGACGAACCGGACATGCTGCGGATGCCATCGAGCA  4397200

Query  181      TGCCTTTCTCTTCTAGCGCCAGCATTGCTCCCGGGTATGCCGCACCTTTGGCACCACCGC  240
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397201  TGCCTTTCTCTTCTAGCGCCAGCATTGCTCCCGGGTATGCCGCACCTTTGGCACCACCGC  4397260

Query  241      CGCTTAGGACCAGACTGGTCAATGGTGGCCGACTGAGCTGTAGCTCGGTGATTCCGTTCT  300
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397261  CGCTTAGGACCAGACTGGTCAATGGTGGCCGACTGAGCTGTAGCTCGGTGATTCCGTTCT  4397320

Query  301      CAAACTGGCGCAGAGTGATCTGCCGC-ACCCTGCCGAGTCAGTCAGAGTACGGGACTCCC  359
                |||||||||||||||||||||||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397321  CAAACTGGCGCAGAGTGATCTGCCGCGGCCCTGCCGAGTCAGTCAGAGTACGGGACTCCC  4397380

Query  360      CT  361
                ||
Sbjct  4397381  CT  4397382
```

RSRC-CVGTASASCSSCRAAK-DPSCRKGSTPPGSYLRPKGRR
CRQRTNRTCCGCHRACLSLLAPALLPGMPHLWHHRRLGPDWSMVAD-AVAR

-FRSQTGAE-SAAPCRVSQSTGLP

```
aggg gag tcc cgt act ctg act gac tcg gca ggg tgc ggc aga tca ctc tgc gcc agt ttg
  G   E   S   R   T   L   T   D   S   A   G   C   G   R   S   L   C   A   S   L
aga acg gaa tca ccg agc tac agc tca gtc ggc cac cat tga cca gtc tgg tcc taa gcg
 R   T   E   S   P   S   Y   S   S   V   G   H   H   -   P   V   W   S   -   A
gcg gtg gtg cca aag gtg cgg cat acc cgg gag caa tgc tgg cgc tag aag aga aag gca
 A   V   V   P   K   V   R   H   T   R   E   Q   C   W   R   -   K   R   K   A
tgc tcg atg gca tcc gca gca tgt ccg gtt cgt ccg ctg gcg gca tca ccg ccg ccc ttt
 C   S   M   A   S   A   A   C   P   V   R   P   L   A   A   S   P   P   P   F
tgg cct cag gta tga gcc cgg cgg cgt tca aga ccc ttt ccg aca aga tgg atc tta ttt
```

```
 W   P   Q   V   -   A   R   R   R   S   R   P   F   P   T   R   W   I   L   F
cgc tgc tcg aca gct cga aca aga agc tga agc tgt tcc aac aca tta gca gcg aga tcg
 R   C   S   T   A   R   T   R   S   -   S   C   S   N   T   L   A   A   R   S

aggg gag tcc cgt act ctg act gac tcg gca ggg ccg cgg cag atc act ctg cgc cag ttt
  G   E   S   R   T   L   T   D   S   A   G   P   R   Q   I   T   L   R   Q   F
gag aac gga atc acc gag cta cag ctc agt cgg cca cca ttg acc agt ctg gtc cta agc
 E   N   G   I   T   E   L   Q   L   S   R   P   P   L   T   S   L   V   L   S
ggc ggt ggt gcc aaa ggt gcg gca tac ccg gga gca atg ctg gcg cta gaa gag aaa ggc
 G   G   G   A   K   G   A   A   Y   P   G   A   M   L   A   L   E   E   K   G
atg ctc gat ggc atc cgc agc atg tcc ggt tcg tcc gct ggc ggc atc acc gcc gcc ctt
 M   L   D   G   I   R   S   M   S   G   S   S   A   G   G   I   T   A   A   L
ttg gcc tca ggt atg agc ccg gcg gcg ttc aag acc ctt tcc gac aag atg gat ctt att
 L   A   S   G   M   S   P   A   A   F   K   T   L   S   D   K   M   D   L   I
tcg ctg ctc gac agc tcg aac aag aag ctg aag ctg ttc caa cac att agc agc gag atc
 S   L   L   D   S   S   N   K   K   L   K   L   F   Q   H   I   S   S   E   I
```

Ek 3.8. *P. aeruginosa* BA7823 izolatının 7. sekans sonucu

-*Pseudomonas aeruginosa* strain BA7823 chromosome, complete genome
Sequence ID: CP032569.2
Length: 6876113

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
656 bits(355)	0.0	360/362(99%)	1/362(0%)	Plus/Minus

```
Query  1        AGGGGAGTCCCGTACTCTGACTGACTCGGCAGGG-TGCGGCAGATCACTCTGCGCCAGTT  59
                |||||||||||||||||||||||||||||||||  ||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397382  AGGGGAGTCCCGTACTCTGACTGACTCGGCAGGGCCGCGGCAGATCACTCTGCGCCAGTT  4397323

Query  60       TGAGAACGGAATCACCGAGCTACAGCTCAGTCGGCCACCATTGACCAGTCTGGTCCTAAG  119
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397322  TGAGAACGGAATCACCGAGCTACAGCTCAGTCGGCCACCATTGACCAGTCTGGTCCTAAG  4397263

Query  120      CGGCGGTGGTGCCAAAGGTGCGGCATACCCGGGAGCAATGCTGGCGCTAGAAGAGAAAGG  179
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397262  CGGCGGTGGTGCCAAAGGTGCGGCATACCCGGGAGCAATGCTGGCGCTAGAAGAGAAAGG  4397203

Query  180      CATGCTCGATGGCATCCGCAGCATGTCCGGTTCGTCCGCTGGCGGCATCACCGCCGCCCT  239
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397202  CATGCTCGATGGCATCCGCAGCATGTCCGGTTCGTCCGCTGGCGGCATCACCGCCGCCCT  4397143

Query  240      TTTGGCCTCAGGTATGAGCCCGGCGGCGTTCAAGACCCTTTCCGACAAGATGGATCTTAT  299
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397142  TTTGGCCTCAGGTATGAGCCCGGCGGCGTTCAAGACCCTTTCCGACAAGATGGATCTTAT  4397083
Query  300      TTCGCTGCTCGACAGCTCGAACAAGAAGCTGAAGCTGTTCCAACACATTAGCAGCGAGAT  359
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397082  TTCGCTGCTCGACAGCTCGAACAAGAAGCTGAAGCTGTTCCAACACATTAGCAGCGAGAT  4397023
Query  360      CG  361
                ||
Sbjct  4397022  CG  4397021
```

Ek 3.9. *P. aeruginosa* BA7823 izolatının 8. sekans sonucu

-*Pseudomonas aeruginosa* strain BA7823 chromosome, complete genome
Sequence ID: CP032569.2
Length: 6876113

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
654 bits(724)	0.0	362/362(100%)	0/362(0%)	Plus/Plus

```
Query  1        CGATCTCGCTGCTAATGTGTTGGAACAGCTTCAGCTTCTTGTTCGAGCTGTCGAGCAGCG  60
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397021  CGATCTCGCTGCTAATGTGTTGGAACAGCTTCAGCTTCTTGTTCGAGCTGTCGAGCAGCG  4397080

Query  61       AAATAAGATCCATCTTGTCGGAAAGGGTCTTGAACGCCGCCGGGCTCATACCTGAGGCCA  120
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397081  AAATAAGATCCATCTTGTCGGAAAGGGTCTTGAACGCCGCCGGGCTCATACCTGAGGCCA  4397140

Query  121      AAAGGGCGGCGGTGATGCCGCCAGCGGACGAACCGGACATGCTGCGGATGCCATCGAGCA  180
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397141  AAAGGGCGGCGGTGATGCCGCCAGCGGACGAACCGGACATGCTGCGGATGCCATCGAGCA  4397200

Query  181      TGCCTTTCTCTTCTAGCGCCAGCATTGCTCCCGGGTATGCCGCACCTTTGGCACCACCGC  240
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397201  TGCCTTTCTCTTCTAGCGCCAGCATTGCTCCCGGGTATGCCGCACCTTTGGCACCACCGC  4397260

Query  241      CGCTTAGGACCAGACTGGTCAATGGTGGCCGACTGAGCTGTAGCTCGGTGATTCCGTTCT  300
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397261  CGCTTAGGACCAGACTGGTCAATGGTGGCCGACTGAGCTGTAGCTCGGTGATTCCGTTCT  4397320

Query  301      CAAACTGGCGCAGAGTGATCTGCCGCGGCCCTGCCGAGTCAGTCAGAGTACGGGACTCCC  360
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397321  CAAACTGGCGCAGAGTGATCTGCCGCGGCCCTGCCGAGTCAGTCAGAGTACGGGACTCCC  4397380

Query  361      CT  362
                ||
Sbjct  4397381  CT  4397382
```

3'5' Frame 2

GESRTLTDSAGPRQITLRQFENGITELQLSRPPLTSLVLSGGGAKGAAYPGAMLALEEK
GMLDGIRSMSGSSAGGITAALLASGMSPAAFKTLSDKMDLISLLDSSNKKLKLFQHISS
EI

3'5' Frame 2

```
aggg gag tcc cgt act ctg act gac tcg gca ggg ccg cgg cag atc act ctg cgc cag ttt
  G   E   S   R   T   L   T   D   S   A   G   P   R   Q   I   T   L   R   Q   F
gag aac gga atc acc gag cta cag ctc agt cgg cca cca ttg acc agt ctg gtc cta agc
 E   N   G   I   T   E   L   Q   L   S   R   P   P   L   T   S   L   V   L   S
ggc ggt ggt gcc aaa ggt gcg gca tac ccg gga gca atg ctg gcg cta gaa gag aaa ggc
 G   G   G   A   K   G   A   A   Y   P   G   A   M   L   A   L   E   E   K   G
atg ctc gat ggc atc cgc agc atg tcc ggt tcg tcc gct ggc ggc atc acc gcc gcc ctt
 M   L   D   G   I   R   S   M   S   G   S   S   A   G   G   I   T   A   A   L
ttg gcc tca ggt atg agc ccg gcg gcg ttc aag acc ctt tcc gac aag atg gat ctt att
```

L	A	S	G	M	S	P	A	A	F	K	T	L	S	D	K	M	D	L	I
tcg	ctg	ctc	gac	agc	tcg	aac	aag	aag	ctg	aag	ctg	ttc	caa	cac	att	agc	agc	gag	atc
S	L	L	D	S	S	N	K	K	L	K	L	F	Q	H	I	S	S	E	I

Ek 3.10. *P. aeruginosa* BA7823 izolatının 9. sekans sonucu

-*Pseudomonas aeruginosa* strain BA7823 chromosome, complete genome
Sequence ID: CP032569.2
Length: 6876113

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
654 bits(724)	0.0	362/362(100%)	0/362(0%)	Plus/Plus

```
Query  1        CGATCTCGCTGCTAATGTGTTGGAACAGCTTCAGCTTCTTGTTCGAGCTGTCGAGCAGCG  60
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397021  CGATCTCGCTGCTAATGTGTTGGAACAGCTTCAGCTTCTTGTTCGAGCTGTCGAGCAGCG  4397080

Query  61       AAATAAGATCCATCTTGTCGGAAAGGGTCTTGAACGCCGCCGGGCTCATACCTGAGGCCA  120
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397081  AAATAAGATCCATCTTGTCGGAAAGGGTCTTGAACGCCGCCGGGCTCATACCTGAGGCCA  4397140

Query  121      AAAGGGCGGCGGTGATGCCGCCAGCGGACGAACCGGACATGCTGCGGATGCCATCGAGCA  180
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397141  AAAGGGCGGCGGTGATGCCGCCAGCGGACGAACCGGACATGCTGCGGATGCCATCGAGCA  4397200

Query  181      TGCCTTTCTCTTCTAGCGCCAGCATTGCTCCCGGGTATGCCGCACCTTTGGCACCACCGC  240
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397201  TGCCTTTCTCTTCTAGCGCCAGCATTGCTCCCGGGTATGCCGCACCTTTGGCACCACCGC  4397260

Query  241      CGCTTAGGACCAGACTGGTCAATGGTGGCCGACTGAGCTGTAGCTCGGTGATTCCGTTCT  300
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397261  CGCTTAGGACCAGACTGGTCAATGGTGGCCGACTGAGCTGTAGCTCGGTGATTCCGTTCT  4397320

Query  301      CAAACTGGCGCAGAGTGATCTGCCGCGGCCCTGCCGAGTCAGTCAGAGTACGGGACTCCC  360
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397321  CAAACTGGCGCAGAGTGATCTGCCGCGGCCCTGCCGAGTCAGTCAGAGTACGGGACTCCC  4397380

Query  361      CT  362
                ||
Sbjct  4397381  CT  4397382
```

3'5' Frame 2
GESRTLTDSAGPRQITLRQFENGITELQLSRPPLTSLVLSGGGAKGAAYPGAMLALEEK
GMLDGIRSMSGSSAGGITAALLASGMSPAAFKTLSDKMDLISLLDSSNKKLKLFQHISS
EI

3'5' Frame 2

```
aggg gag tcc cgt act ctg act gac tcg gca ggg ccg cgg cag atc act ctg cgc cag ttt
  G   E   S   R   T   L   T   D   S   A   G   P   R   Q   I   T   L   R   Q   F
gag aac gga atc acc gag cta cag ctc agt cgg cca cca ttg acc agt ctg gtc cta agc
 E   N   G   I   T   E   L   Q   L   S   R   P   P   L   T   S   L   V   L   S
ggc ggt ggt gcc aaa ggt gcg gca tac ccg gga gca atg ctg gcg cta gaa gag aaa ggc
 G   G   G   A   K   G   A   A   Y   P   G   A   M   L   A   L   E   E   K   G
atg ctc gat ggc atc cgc agc atg tcc ggt tcg tcc gct ggc ggc atc acc gcc gcc ctt
 M   L   D   G   I   R   S   M   S   G   S   S   A   G   G   I   T   A   A   L
ttg gcc tca ggt atg agc ccg gcg gcg ttc aag acc ctt tcc gac aag atg gat ctt att
 L   A   S   G   M   S   P   A   A   F   K   T   L   S   D   K   M   D   L   I
tcg ctg ctc gac agc tcg aac aag aag ctg aag ctg ttc caa cac att agc agc gag atc
 S   L   L   D   S   S   N   K   K   L   K   L   F   Q   H   I   S   S   E   I
```

Ek 3.10. *P. aeruginosa* BA7823 izolatının 10. sekans sonucu

-*Pseudomonas aeruginosa* strain BA7823 chromosome, complete genome
Sequence ID: CP032569.2
Length: 6876113

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
654 bits(724)	0.0	362/362(100%)	0/362(0%)	Plus/Plus

```
Query  1        CGATCTCGCTGCTAATGTGTTGGAACAGCTTCAGCTTCTTGTTCGAGCTGTCGAGCAGCG  60
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397021  CGATCTCGCTGCTAATGTGTTGGAACAGCTTCAGCTTCTTGTTCGAGCTGTCGAGCAGCG  4397080

Query  61       AAATAAGATCCATCTTGTCGGAAAGGGTCTTGAACGCCGCCGGGCTCATACCTGAGGCCA  120
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397081  AAATAAGATCCATCTTGTCGGAAAGGGTCTTGAACGCCGCCGGGCTCATACCTGAGGCCA  4397140

Query  121      AAAGGGCGGCGGTGATGCCGCCAGCGGACGAACCGGACATGCTGCGGATGCCATCGAGCA  180
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397141  AAAGGGCGGCGGTGATGCCGCCAGCGGACGAACCGGACATGCTGCGGATGCCATCGAGCA  4397200

Query  181      TGCCTTTCTCTTCTAGCGCCAGCATTGCTCCCGGGTATGCCGCACCTTTGGCACCACCGC  240
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397201  TGCCTTTCTCTTCTAGCGCCAGCATTGCTCCCGGGTATGCCGCACCTTTGGCACCACCGC  4397260

Query  241      CGCTTAGGACCAGACTGGTCAATGGTGGCCGACTGAGCTGTAGCTCGGTGATTCCGTTCT  300
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397261  CGCTTAGGACCAGACTGGTCAATGGTGGCCGACTGAGCTGTAGCTCGGTGATTCCGTTCT  4397320

Query  301      CAAACTGGCGCAGAGTGATCTGCCGCGGCCCTGCCGAGTCAGTCAGAGTACGGGACTCCC  360
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397321  CAAACTGGCGCAGAGTGATCTGCCGCGGCCCTGCCGAGTCAGTCAGAGTACGGGACTCCC  4397380

Query  361      CT  362
                ||
Sbjct  4397381  CT  4397382
```

3'5' Frame 2

GESRTLTDSAGPRQITLRQFENGITELQLSRPPLTSLVLSGGGAKGAAYPGAMLALEEK
GMLDGIRSMSGSSAGGITAALLASGMSPAAFKTLSDKMDLISLLDSSNKKLKLFQHISS
EI

3'5' Frame 2

```
aggg gag tcc cgt act ctg act gac tcg gca ggg ccg cgg cag atc act ctg cgc cag ttt
  G   E   S   R   T   L   T   D   S   A   G   P   R   Q   I   T   L   R   Q   F
gag aac gga atc acc gag cta cag ctc agt cgg cca cca ttg acc agt ctg gtc cta agc
 E   N   G   I   T   E   L   Q   L   S   R   P   P   L   T   S   L   V   L   S
ggc ggt ggt gcc aaa ggt gcg gca tac ccg gga gca atg ctg gcg cta gaa gag aaa ggc
 G   G   G   A   K   G   A   A   Y   P   G   A   M   L   A   L   E   E   K   G
atg ctc gat ggc atc cgc agc atg tcc ggt tcg tcc gct ggc ggc atc acc gcc gcc ctt
 M   L   D   G   I   R   S   M   S   G   S   S   A   G   G   I   T   A   A   L
ttg gcc tca ggt atg agc ccg gcg gcg ttc aag acc ctt tcc gac aag atg gat ctt att
 L   A   S   G   M   S   P   A   A   F   K   T   L   S   D   K   M   D   L   I
tcg ctg ctc gac agc tcg aac aag aag ctg aag ctg ttc caa cac att agc agc gag atc
 S   L   L   D   S   S   N   K   K   L   K   L   F   Q   H   I   S   S   E   I
```

Ek 3.11. *P. aeruginosa* BA7823 izolatının 11. sekans sonucu

-*Pseudomonas aeruginosa* strain BA7823 chromosome, complete genome
Sequence ID: CP032569.2
Length: 6876113

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
654 bits(724)	0.0	362/362(100%)	0/362(0%)	Plus/Plus

```
Query  1        CGATCTCGCTGCTAATGTGTTGGAACAGCTTCAGCTTCTTGTTCGAGCTGTCGAGCAGCG  60
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397021  CGATCTCGCTGCTAATGTGTTGGAACAGCTTCAGCTTCTTGTTCGAGCTGTCGAGCAGCG  4397080

Query  61       AAATAAGATCCATCTTGTCGGAAAGGGTCTTGAACGCCGCCGGGCTCATACCTGAGGCCA  120
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397081  AAATAAGATCCATCTTGTCGGAAAGGGTCTTGAACGCCGCCGGGCTCATACCTGAGGCCA  4397140

Query  121      AAAGGGCGGCGGTGATGCCGCCAGCGGACGAACCGGACATGCTGCGGATGCCATCGAGCA  180
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397141  AAAGGGCGGCGGTGATGCCGCCAGCGGACGAACCGGACATGCTGCGGATGCCATCGAGCA  4397200

Query  181      TGCCTTTCTCTTCTAGCGCCAGCATTGCTCCCGGGTATGCCGCACCTTTGGCACCACCGC  240
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397201  TGCCTTTCTCTTCTAGCGCCAGCATTGCTCCCGGGTATGCCGCACCTTTGGCACCACCGC  4397260

Query  241      CGCTTAGGACCAGACTGGTCAATGGTGGCCGACTGAGCTGTAGCTCGGTGATTCCGTTCT  300
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397261  CGCTTAGGACCAGACTGGTCAATGGTGGCCGACTGAGCTGTAGCTCGGTGATTCCGTTCT  4397320

Query  301      CAAACTGGCGCAGAGTGATCTGCCGCGGCCCTGCCGAGTCAGTCAGAGTACGGGACTCCC  360
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397321  CAAACTGGCGCAGAGTGATCTGCCGCGGCCCTGCCGAGTCAGTCAGAGTACGGGACTCCC  4397380

Query  361      CT  362
```

```
                ||
Sbjct  4397381  CT  4397382
```

3'5' Frame 2

GESRTLTDSAGPRQITLRQFENGITELQLSRPPLTSLVLSGGGAKGAAYPGAMLALEEK
GMLDGIRSMSGSSAGGITAALLASGMSPAAFKTLSDKMDLISLLDSSNKKLKLFQHISS
EI

3'5' Frame 2

```
aggg gag tcc cgt act ctg act gac tcg gca ggg ccg cgg cag atc act ctg cgc cag ttt
  G   E   S   R   T   L   T   D   S   A   G   P   R   Q   I   T   L   R   Q   F
gag aac gga atc acc gag cta cag ctc agt cgg cca cca ttg acc agt ctg gtc cta agc
 E   N   G   I   T   E   L   Q   L   S   R   P   P   L   T   S   L   V   L   S
ggc ggt ggt gcc aaa ggt gcg gca tac ccg gga gca atg ctg gcg cta gaa gag aaa ggc
 G   G   G   A   K   G   A   A   Y   P   G   A   M   L   A   L   E   E   K   G
atg ctc gat ggc atc cgc agc atg tcc ggt tcg tcc gct ggc ggc atc acc gcc gcc ctt
 M   L   D   G   I   R   S   M   S   G   S   S   A   G   G   I   T   A   A   L
ttg gcc tca ggt atg agc ccg gcg gcg ttc aag acc ctt tcc gac aag atg gat ctt att
 L   A   S   G   M   S   P   A   A   F   K   T   L   S   D   K   M   D   L   I
tcg ctg ctc gac agc tcg aac aag aag ctg aag ctg ttc caa cac att agc agc gag atc
 S   L   L   D   S   S   N   K   K   L   K   L   F   Q   H   I   S   S   E   I
```

Ek 3.12. *P. aeruginosa* BA7823 izolatının 12. sekans sonucu
−*Pseudomonas aeruginosa* strain BA7823 chromosome, complete genome
Sequence ID: CP032569.2
Length: 6876113\

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
654 bits(724)	0.0	362/362(100%)	0/362(0%)	Plus/Plus

```
Query  1        CGATCTCGCTGCTAATGTGTTGGAACAGCTTCAGCTTCTTGTTCGAGCTGTCGAGCAGCG  60
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397021  CGATCTCGCTGCTAATGTGTTGGAACAGCTTCAGCTTCTTGTTCGAGCTGTCGAGCAGCG  4397080

Query  61       AAATAAGATCCATCTTGTCGGAAAGGGTCTTGAACGCCGCCGGGCTCATACCTGAGGCCA  120
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397081  AAATAAGATCCATCTTGTCGGAAAGGGTCTTGAACGCCGCCGGGCTCATACCTGAGGCCA  4397140

Query  121      AAAGGGCGGCGGTGATGCCGCCAGCGGACGAACCGGACATGCTGCGGATGCCATCGAGCA  180
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397141  AAAGGGCGGCGGTGATGCCGCCAGCGGACGAACCGGACATGCTGCGGATGCCATCGAGCA  4397200

Query  181      TGCCTTTCTCTTCTAGCGCCAGCATTGCTCCCGGGTATGCCGCACCTTTGGCACCACCGC  240
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397201  TGCCTTTCTCTTCTAGCGCCAGCATTGCTCCCGGGTATGCCGCACCTTTGGCACCACCGC  4397260

Query  241      CGCTTAGGACCAGACTGGTCAATGGTGGCCGACTGAGCTGTAGCTCGGTGATTCCGTTCT  300
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397261  CGCTTAGGACCAGACTGGTCAATGGTGGCCGACTGAGCTGTAGCTCGGTGATTCCGTTCT  4397320

Query  301      CAAACTGGCGCAGAGTGATCTGCCGCGGCCCTGCCGAGTCAGTCAGAGTACGGGACTCCC  360
```

```
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4397321  CAAACTGGCGCAGAGTGATCTGCCGCGGCCCTGCCGAGTCAGTCAGAGTACGGGACTCCC  4397380


Query  361      CT  362
                ||
Sbjct  4397381  CT  4397382
```

3'5' Frame 2

GESRTLTDSAGPRQITLRQFENGITELQLSRPPLTSLVLSGGGAKGAAYPGAMLA
LEEKGMLDGIRSMSGSSAGGITAALLASGMSPAAFKTLSDKMDLISLLDSSNKKL
KLFQHISSEI

3'5' Frame 2

```
aggg gag tcc cgt act ctg act gac tcg gca ggg ccg cgg cag atc act ctg cgc cag ttt
  G   E   S   R   T   L   T   D   S   A   G   P   R   Q   I   T   L   R   Q   F
gag aac gga atc acc gag cta cag ctc agt cgg cca cca ttg acc agt ctg gtc cta agc
 E   N   G   I   T   E   L   Q   L   S   R   P   P   L   T   S   L   V   L   S
ggc ggt ggt gcc aaa ggt gcg gca tac ccg gga gca atg ctg gcg cta gaa gag aaa ggc
 G   G   G   A   K   G   A   A   Y   P   G   A   M   L   A   L   E   E   K   G
atg ctc gat ggc atc cgc agc atg tcc ggt tcg tcc gct ggc ggc atc acc gcc gcc ctt
 M   L   D   G   I   R   S   M   S   G   S   S   A   G   G   I   T   A   A   L
ttg gcc tca ggt atg agc ccg gcg gcg ttc aag acc ctt tcc gac aag atg gat ctt att
 L   A   S   G   M   S   P   A   A   F   K   T   L   S   D   K   M   D   L   I
tcg ctg ctc gac agc tcg aac aag aag ctg aag ctg ttc caa cac att agc agc gag atc
 S   L   L   D   S   S   N   K   K   L   K   L   F   Q   H   I   S   S   E   I
```

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	**:**	Mustafa ALRUBAYE
Uyruğu	**:**	Erkek
Doğum Yeri ve Tarihi	**:**	Irak Bağdat 1990
Telefon	**:**	05315082843
Faks	**:**	
e-mail	**:**	memo_992006@yahoo.com

EĞİTİM

Derece		**Adı, İlçe, İl**	**Bitirme Yılı**
Lise	:	Al-Resala Okulu	**2011**
Üniversite	:	Al-Mamoon Üniversitesi-Irak	**2015**
Yüksek Lisans	:	Selçuk Üniversite-Fen bilimleri-Biyoteknoloji	**2020**
Doktora	:		

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	**Kurum**	**Görevi**
2019	Educational laboratories, Medical City-Irak	**Biyolog**

UZMANLIK ALANI
Mikrobiyoloji
YABANCI DİLLER
İngilizce, Türkçe
BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

YAYINLAR

Al-Rubaye M.R.S. (2020). Isolation and diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa* from wound and burn patients and ınvestigation of their resistance patterns, *3rd International Medicine and Health Sciences Researches Congress (UTSAK)* (13 – 14 March 2020 / Ankara).