T.C.

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Pseudomonas aeruginosa'nın VİRÜLANS FAKTÖRLERİNİN VE KOLİSTİN DİRENCİNİN ARAŞTIRILMASI

BERAT ÖZKAN

Kocaeli Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin

Mikrobiyoloji Programı için Öngördüğü

BİLİM UZMANLIĞI TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

KOCAELİ

2023

T.C.

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Pseudomonas aeruginosa'nın VİRÜLANS FAKTÖRLERİNİN VE KOLİSTİN DİRENCİNİN ARAŞTIRILMASI

BERAT ÖZKAN

Danışman: Prof.Dr. Fatma BUDAK

Kocaeli Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin Mikrobiyoloji Programı için Öngördüğü BİLİM UZMANLIĞI TEZİ Olarak Hazırlanmıştır

Bu Çalışma Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje No: TYL-2022-2829) Tarafından Desteklenmiştir. Etik Kurul Onay No: GOKAEK-2022/01.11 KOCAELİ

KOCAELİ

2023

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tez Adı: *P.aeruginosa*'nın Virülans Faktörlerinin ve Kolistin Direncinin Araştırılması

Tez Yazarı: Berat ÖZKAN

Tez Savunma Tarihi: 22.06.2023

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Fatma BUDAK

Bu çalışma, sınav kurulumuz tarafından Mikrobiyoloji Anabilim Dalında BİLİM UZMANLIĞI tezi olarak kabul edilmiştir.

Onay

Bu tez Kocaeli Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla onaylanmıştır.

.... /.... /20…

Prof. Dr. Sema Aşkın KEÇELİ

KOÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

***Pseudomonas aeruginosa*'nın Virülans Faktörlerinin ve Kolistin Direncinin Araştırılması**

ÖZET

Amaç: *Pseudomonas aeruginosa*, çoklu ilaç direncine sahip fırsatçı bir patojendir ve önde gelen nozokomiyal enfeksiyon etkenlerinden biridir. Yoğun bakım üniteleri antibiyotik direnci gelişimine ortam hazırlamakla birlikte en çok etkilenen hasta grubuna sahiptir. Bu çalışma, servis ve yoğun bakım hastalarından izole edilen *Pseudomonas aeruginosa*'nın virülans faktör prevalansını ve antibiyotik direnç profilini ortaya koymayı amaçlamaktadır.

Metod: Hastanede yatarak tedavi gören (yoğun bakım ve servis) toplam 208 hasta örneği çalışmaya dahil edilmiştir. Elastaz aktivitesi için nutrient agar-elastin yöntemi kullanılırken piyoverdin ve piyosiyanin için özel üretim besiyeri kullanılmıştır. Virulans faktörü olan biyofilm için kristal viyole yöntemi tercih edilirken polimeraz zincir reaksiyonu ile *las B* ve *mcr-1* genleri incelenmiştir. Antibiyotik duyarlılık testi için Sıvı Mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır. Kolistin duyarlılığı için ayrıca Rezasurine Dayalı Hızlı Polimiksin yöntemi ve disk elüsyon yöntemi değerlendirilmiştir.

Bulgular: Toplam 208 hastanın dahil edildiği çalışmamızda yoğun bakım ve servis izolatlarının antibiyotik direnci ve virülans faktör sonuçları; piyosiyanin %90,1, %89,6, piyoverdin %86,2, %86,7, elastaz %68,6, %67,9, *las B* %93,1, %89,6, biyofilm %51,9, %48,1, meropenem %41,1, %28,9, kolistin %11,7, %13,2, seftazidim %43,1, %41,1, sefepim %52,9, %48,5 olarak bulunmuştur. Disk elüsyon duyarlılık ve özgüllük sonuçlarımız sırasıyla %84 ve %88, Hızlı Polimiksin duyarlılık ve özgüllük sonuçlarımız sırasıyla %87 ve %92 bulunmuştur. Kolistin direnci bulunan suşların hiçbirisinde *mcr-1* geni tespit edilememiştir.

Sonuç: Çalışma grubumuzda en sık *las B* faktörü tespit edilmiştir. Gruplarda sefepim hariç antibiyotik dirençleri %50'nin altında kalmıştır. Kolistin direncinde *mcr-1*'in etken olmadığı görülmüştür. Ek olarak kolistin direncini düşük oranlarda bulmamız bölgemizde kolistine karşı direncin henüz yaygın olmadığını göstermektedir. Ayrıca kolistin için son dönemlerde geliştirilen Rezasurine Dayalı Hızlı Polimiksin ve Disk Elüsyon yöntemlerinin referans yöntem yerine geçebilecek iyi birer alternatif yöntem olduğu görülmektedir.

Anahtar kelimeler: *Pseudomonas aeruginosa*, virülans faktörü, antibiyotik direnci.

Investigation of virulence factors and colistin resistance of *Pseudomonas aeruginosa*

ABSTRACT

Objective: *Pseudomonas aeruginosa* has multidrug resistance and it is an opportunistic pathogen, and is one of the leading nosocomial infections agents. Intensive care units have the most affected patient group as well as preparing the environment for the development of antibiotic resistance. This study aims to reveal the prevalence of virulence factor and antibiotic resistance profile of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitalized patients.

Methods: A total of 208 patient samples hospitalized (intensive care unit and service) were included in the study. For the biochemical activity of elastase, a nutrient agar-elastin method was used. Special production medium for pyoverdine and, pyocyanin and polymerase chain reaction method for *las B* were used. The crystal violet method was preferred using microtiter plates for biofilm. Broth microdilution was used for antibiotic sensitivity.

Results: The results of antibiotic resistance percentages and virulence factor frequency in intensive care and service isolates in our study: pyocyanin 90.1%, 89.6%, pyoverdine 86.2%, 86.7%, elastase 68.6%, 67.9%, *las B* 93.1%, 89.6%, biofilm 51.9%, 48.1%, meropenem 41.1%, 28.9%, colistin 11.7%, 13.2%, ceftazidime 43.1%, 41.1%, cefepime 52.9%, 48.5%. For colistin, disc elution sensitivity and specificity results were 84% and 88%, and our Resazurin-Based Rapid Polymyxin sensitivity and specificity results were 87% and 92%, respectively.

Conclusion: The most common factor B was found in our study groups. The resistance of the studied antibiotics was found below 50% in the groups. In addition, low rates of colistin resistance indicate that colistin resistance is not yet widespread in our region. The recently developed Resazurin-Based Rapid Polymyxin and Disc Elution methods for colistin seem to be good alternative methods that can replace the reference method.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, virulence factors, antibiotic resistance

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim süresince tecrübeleriyle her daim yanımda olan tezimin planlanması ve yürütülmesinde bilgi ve hoşgörüsünü esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Fatma BUDAK'a, saygıdeğer hocam Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Zeki YUMUK'a,

Eğitimimde karşılaştığım her zorlukta desteklerini sunan, bilgilerini ve tecrübelerini benimle paylaşan saygıdeğer hocalarım; Prof. Dr. Aynur KARADENİZLİ, Prof. Dr. Sema KEÇELİ, Prof. Dr. Fetiye KOLAYLI, Prof. Dr. Devrim DÜNDAR, Dr. Öğr. Üyesi Erdener BALIKÇI'ya,

Tez projemdeki desteği için Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne, İstatistiksel analizlerin yapılması konusunda desteklerinden dolayı Prof. Dr. Canan BAYDEMİR hocama,

Tüm süreç boyunca desteklerini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Doğanhan Kadir ER, Arş. Gör. Eda YAZICI ÖZÇELİK, Uzm.Dr. Handan GENEZ, Arş.Gör. Gülşah ALTAN başta olmak üzere tüm Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarındaki asistan ve personel arkadaşlarımıza,

Ayrıca sevgili ailem ve kıymetli arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Berat ÖZKAN

Orijinallik Bildirimi

Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bilim Uzmanlığı tezi olarak hazırlayıp sunduğum "*P.aeruginosa*'nın Virülans Faktörlerinin ve Kolistin Direncinin Araştırılması" başlıklı tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan yazı, bilgi, şekil, tablo ve diğer malzemeler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimde yer alan deneysel çalışmalar/araştırmalar bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yapılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususlar bir intihal programı (Turnitin vb.) kullanılarak test edilmiş olup, doğruluğunu beyan ederim.

…….. / ….. / 20….

Berat ÖZKAN

İmza

İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY SAYFASI ..... **iii**
ÖZET ..... **iv**
ABSTRACT ..... **v**
TEŞEKKÜR ..... **vi**
ORJİNALLİK BİLDİRİMİ ..... **vii**
İÇİNDEKİLER ..... **viii**
Kısaltmalar Dizelgesi ..... **x**
Tablolar Dizelgesi ..... **xii**
Şekiller Dizelgesi ..... **xiii**
1.GİRİŞ 1
1.1.*P.aeruginosa*'nın Genel Özellikleri 2
1.2.Virülans Faktörleri 2
1.2.1.Flagella 3
1.2.2.Tip IV Pili 3
1.2.3.Aljinat 4
1.2.4.Lipopolisakkarid 5
1.2.5.Piyoverdin 5
1.2.6.Piyosiyanin 6
1.2.7.Ekzotoksinler 6
1.2.8.Ramnolipidler 7
1.2.9.Proteolitik Enzimler 7
1.2.10.Biyofilm 8
1.3.Klinik Önemi 10
1.4. Kronik Enfeksiyonlar 11
1.5.Antibiyotik Etki Mekanizmaları ve Antibiyotik Direnç Mekanizmaları 12
1.5.1.$\boldsymbol{\beta}$-Laktam grubu antibiyotiklerin Etki ve Direnç Mekanizmaları 12
1.5.1.1.Karbapenem Etki ve Direnç Mekanizmaları 13
1.5.1.2.Sefalasporin Etki ve Direnç Mekanizmaları 13
1.5.1.3.Florokinolon Etki ve Direnç Mekanizmaları 13
1.5.2.Aminoglikozit grubu antibiyotiklerin Etki ve Direnç Mekanizmaları 14
1.5.3.Polimiksin grubu Etki ve Direnç Mekanizmaları 14
1.6.Genetiği 17
2.AMAÇ 18
3.YÖNTEM 18
3.1.Çalışmada kullanılan izolatlar 19

3.2.Besiyerlerinin Hazırlanması 19
3.2.1.Triptik Soy Broth 19
3.2.2.Pseudomonas İzolasyon Agar P 19
3.2.3.Pseudomonas İzolasyon Agar F 19
3.2.4.Nutrient Agar 19
3.2.5.Katyon Ayarlı Mueller Hınton Broth 19
3.3.Hazırlanan Çözeltiler 20
3.3.1.Kristal Viyole 20
3.3.2.Rezasurin 20
3.3.3.Mcfarland Standardı 20
3.4.4. GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder 20
3.4.Master Mix 20
3.5.DNA İzolasyonu 20
3.6.Piyosiyanin 20
3.7.Piyoverdin 21
3.8.Elastaz 21
3.9.las B 21
3.10.Biyofilm 22
3.11.Antibiyotik Duyarlılık Testleri 22
3.11.1.Sıvı Mikrodilüsyon 22
3.11.1.1.Antibiyotik Çözeltilerinin Hazırlanması 23
3.11.2.Disk Elüsyon 23
3.11.3.Rezasurine Dayalı Hızlı Polimiksin 23
3.12.mcr-1 24
3.13.İstatistiksel Analiz 25
4.BULGULAR 25
4.1.Örnek Toplama ve İdentifikasyon 25
4.2.Piyosiyanin 28
4.3.Piyoverdin 28
4.4.Elastaz 29
4.5.las B 29
4.6.Biyofilm 30
4.7.Antibiyotik Duyarlılık Testleri 32
4.7.1.Sıvı Mikrodilüsyon 32
4.7.2.Disk Elüsyon 36
4.7.3.Rezasurine Dayalı Hızlı Polimiksin 37
4.8.mcr-1 39
5.TARTIŞMA 40
6.SONUÇLAR VE ÖNERİLER 47
7.KAYNAKLAR 48
8.EKLER 58

Kısaltmalar Dizelgesi

PVD : Piyoverdin

ROS: Reactive oxygen species

bç : Baz çifti

BOS : Beyin Omurilik Sıvısı

°C : Santigrat

CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute

EUCAST : The European Committee on Antimicrobial Susceptibility

BMD: Sıvı Mikrodilüsyon

KAHMHB: Katyon Ayarlı Müeller Hinton Broth

EMB: Eosin Methylen-Blue

ATPaz: Adenin trifosfataz

MUC1: Mucin-1 protein

cAMP: cyclic adenozin trifosfat

cCMP: cyclic monophosphate

Exo: Exotoxin

VAP: Ventilatör İlişkili Pnömoni

İYE: İdrar Yolu Enfeksiyonu

EPS: Ekzopolisakkarid

LPS: Lipopolisakkarid

TNF:Tümör nekrosis faktör

IL: Interlökin

IFN: İnterferon

AMPs: Antimikrobiyal peptit

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

CDC: Hastalıktan Koruma ve Önleme Merkezi

KF: Kistik Fibroz

PBP: Penisilin Bağlayan Proteinler

ESBL: Genişletilmiş spektrumlu beta-laktamazlar

eDNA: Hücre dışı DNA

CFU: Koloni Oluşturan Ünite

MİK: Minumum İnhibisyon Konsantrasyonu

µg : Mikrogram

µL : Mikrolitre

mg: Miligram

TSB: Triptik Soy Broth

YBÜ: Yoğun bakım ünitesi

PZR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu

ELISA: Enzim Bağlı Immünosorbent Deneyi

EtBr: Etidyum Bromür

TAE: Tris-asetat-EDTA

TABLOLAR

Tablo 3.1. *las B* primer sekans bilgileri 21
Tablo 3.2. *P.aeruginosa* için antibiyotiklerin sınır değerleri..... 23
Tablo 3.3. *mcr-1* için kullanılan primer sekans bilgileri 25
Tablo 4.1. *P.aeruginosa* izolatlarının alındığı örnek türlerinin gruplara göre dağılımı…. 26
Tablo 4.2. 208 *P.aeruginosa* izolatlarındaki virülans faktörlerinin dağılımı 31
Tablo 4.3. Sıvı Mikrodilüsyon ile antibiyotik duyarlılık sonuçları 33
Tablo 4.4. Yoğun bakım hasta grubundaki antibiyotik direnci ve virülans faktörleri arasındaki ilişki……..……...……34
Tablo 4.5. Servis hasta grubundaki antibiyotik direnci ve virülans faktörleri arasındaki ilişki 35
Tablo 4.6. Sıvı Mikrodilüsyon ve Disk Elüsyon Sonuçlarının Karşılaştırılması…….……...37
Tablo 4.7. Sıvı Mikrodilüsyon ve Rezasurine Dayalı Hızlı Polimiksin Sonuçlarının Karşılaştırılması……38

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Biyofilm oluşumu 10
Şekil 4.1. Örnek türlerinin cinsiyetlere göre dağılımı 26
Şekil 4.2. Yoğun bakım izolatlarının örnek türlerine göre dağılımı 27
Şekil 4.3. Servis izolatlarının örnek türlerine göre dağılımı 27
Şekil 4.4. Piyoverdin pozitif izolat görüntüsü 28
Şekil 4.5. Piyosiyanin pozitif izolat görüntüsü 28
Şekil 4.6. Elastaz pozitif sonuç görüntüsü 29
Şekil 4.7. *las B* geninin jel görüntüsü 29
Şekil 4.8. Kristal viyole metodu ile biyofilm oluşumu görüntüsü ……..……30
Şekil 4.9. Antibiytiklerin Sıvı Mikrodilüsyon Sonucu…….……....33
Şekil 4.10. Disk Elüsyon metodu ile kolistin duyarlılık sonucu……..……36
Şekil 4.11. Rezasurine Dayalı Hızlı Polimiksin ile kolistin duyarlılık sonucu…...…….…38
Şekil 4.12. *mcr-1* geni jel görüntüsü……...…….39

1.GİRİŞ

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*), klinik örneklerden en sık izole edilen bakteriyel patojenlerdendir. Birçok ortamda bulunmasının yanı sıra hastane ortamındaki lavabolarda, dezenfektanlarda, solunum ekipmanları ve kateter gibi hasta ile doğrudan teması olan malzemelerin yüzeyinde bulunabilmektedirler. Bu durum özellikle yatarak tedavi gören hastalarda ve immunsuprese hastalarda önemli bir tehdit unsuru olmaktadır.[1]

P. aeruginosa'nın her bir virülans faktörü konak organizmada hayatta kalma şansını artırmaya katkıda bulunurken çeşitli mekanizmaları ile de hasara neden olmaktadır. Çalışmamızda dahil ettiğimiz virülans faktörlerinden olan elastaz enzimi; konak organizmanın elastin, fibrin, kollajen gibi proteinleri parçalayarak doku hasarına neden olmaktadır. Özellikle akciğerdeki oluşturduğu tahribat nedeniyle kistik fibrozisli hastalar için önem arz etmektedir. Diğer faktörlerimiz arasında yer alan piyoverdin, piyosiyanin, biyofilm bakterinin konakta; ortamdaki demiri absorbe etme, reaktif oksijen üretilmesini sağlamak, antibiyotik direncinin oluşmasında etkin rol oynamak gibi görevleri yerine getirmektedirler.[2,3]

P. aeruginosa, enfeksiyonlarında en önemli konulardan biri tedavisinde kullanılan ilaç çeşitliliğinin azalmasıdır. *P.aeruginosa*, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından 2017 yılında insan sağlığı için en büyük tehdidi oluşturan ve öncelikli patojen listesinde "kritik" veya "yüksek" öncelikli olarak kabul edilen çoklu ilaç direnci bulunan organizmalar arasında yer almaktadır.[3] Bakterinin mevcut tedavisinde kullanılan karbapenemlere, florokinolonlara ve aminoglikozidlere direnç geliştirmesi, tedavi için yeni antibiyotik seçeneklerinin oluşturulmasını veya alternatif tedavi yöntemlerinin geliştirilmesini gerektirir. Polimiksinler (Polimiksin E ve Polimiksin B), bu değerlendirme sonucu tekrar uygulamaya girmiş bir antibiyotik grubudur.[4]Bu gruptan olan Polimiksin E (kolistin) *P. aeruginosa* için tercih edilen antibiyotiktir. Fakat kolistin için de *P. aeruginosa*'nın direnç geliştirmesi söz konusudur. Günümüzde kolistin direncini belirlemek için EUCAST ve CLSI tarafından tavsiye edilen sıvı mikrodilüsyon yöntemini kullanmaktadır. Bu yöntem yoğun emek ve zaman gerektirdiğinden alternatif yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Sıvı mikrodilüsyon yöntemine alternatif olarak birçok yöntem geliştirilmiştir. Rezasurine Dayalı Hızlı Polimiksin[5] ve Disk elüsyon[6] bu yöntemler arasındadır. Bu yöntemlerin duyarlılık ve özgüllüklerinin değerlendirilmesi ve klinik laboratuvarlarda uygulanabilirliğinin test

edilmesi kolistin direncini daha kısa zamanda ve daha kolay bir şekilde tespit etmek için önem arz etmektedir.

1.1.*Pseudomonas aeruginosa*'nın Genel Özellikleri

Pseudomonas grubu bakteriler nonfermantatif ve mikroskop görüntüsünde tek hücreye benzer iki hücre halinde bulunmaktadırlar. Mikroskop görüntülerinden dolayı pseudomonadlar olarak adlandırılmaktadırlar. *Pseudomonas* grubunda 200'den fazla bakteri olmasına karşın en önemli türü *P. aeruginosa*'dır. *P. aeruginosa*, ilk kez 1850 yılında yara örnekleri için kullanılan pansuman malzemelerindeki renk değişimi (mavi-yeşil) ve üzüm benzeri kokusu ile Sédillot tarafından fark edilse de başarılı olarak ilk izolasyonu Carl Gessard tarafından 1882 yılında gerçekleştirilmiştir.[7] *P. aeruginosa,* üremek için çok fazla gereksinimi olmadığından her ortamda üreyebilmektedir. Toprak, su ve bitkiler gibi doğal ortamlarda bulunmasının yanı sıra hastane ortamında; nemli bölgelerde, tuvaletlerde, temizlik malzemelerinde, hasta ile doğrudan teması olan kateter, solunum ekipmanlarında bulunabilmektedir. Bu yüzden klinik örneklerden en sık izole edilen bakterilendendir.[8] Sağlıklı bireylerin mikrobiyotasında çok az görülmektedir.[9] İnsanlarda spesifik bölgeler için temsili kolonizasyon oranları deri için %0 ila 2, burun mukozası için %0 ila 3,3, boğaz için %0 ila 6,6 ve dışkı örnekleri için %2,6 ila 24'tür.[10]

P. aeruginosa, Gram boyaması negatif, basil, hareketli, oksidaz ve katalaz pozitif, aerob bir bakteridir. Laboratuvar ortamında kullanılan kanlı agar, EMB, Mueller-Hinton agar gibi birçok besiyerinde üreme göstermektedir. Optimal üreme sıcaklığı 37^{o}C olmasına karşın 42^{o}C'de de üreme görülmektedir. Bu özelliği ile diğer *Pseudomonas* cinslerinden farklılık göstermektedirler.[9,11]

1.2.Virülans Faktörleri

P. aeruginosa çok çeşitli virülans faktörüne sahip bir mikroorganizmadır. Bunlardan bir kısmı adezinler olarak görev yaparken bir kısmı salgılanan enzim ve toksinlerdir. Adezinler; flagella, pili, lipopolisakkarit, aljinat olarak dört gruptan oluşmaktadır ve konak hücreye tutunmasının yanı sıra hastalık oluşturmada çeşitli fonksiyonlara da sahiptir. *P. aeruginosa*, yüzeyinde bulunan adezinleri, salgıladığı toksin ve enzimleri ve biyofilm oluşturması ile hem konak savunma sisteminden kendini korumaktadır hem de konak hücrede doğrudan veya dolaylı olarak hasara neden olmaktadır. Örneğin ortamdaki demiri

bağlayarak konak hücrenin kullanımını engellemek (Piyoverdin), reaktif oksijen türlerinin üretilmesini sağlayarak konağa zarar vermek (Piyosiyanin), konak hücrenin peptit sentezini inhibe etmek (ekzotoksin A), elastin, kollajen gibi proteinlerin yapısını parçalamak (elastaz), antibiyotik direncini artırarak varlığını sürdürmek gibi çeşitli fonksiyonlara sahiptir.

1.2.1.Flagella

P. aeruginosa, sarmal dizilişlerden oluşan bir filament, polimerize flagellin (FliC), tipe özgü bir başlık proteini (FliD), filamentin tabanındaki kanca (FlgE), iki filament-kanca bağlantı proteini (FlgKL) ve bir dizi dış ve iç membran boyunca bazal vücut bileşenlerinden oluşan tek bir polar kamçıya sahiptir.[9]

Flagellum, *P. aeruginosa* 'nın katı yüzeyler üzerinde ileri doğru hareket ettiren bir ön kısım oluşturarak hareketini sağlamasının yanı sıra tirbuşon şeklinde dönerek düşük viskoziteli ortamlarda yüzme motilitesinden de birincil derecede sorumludur. Kemotaksis, *P. aeruginosa*'nın kistik fibröz solunum yolu epiteline ilk bağlanması için önemlidir çünkü bu hücrelere doğru flagella aracılı yüzmeyi yönlendirmek için kullanılmaktadır; sonuç olarak, flagellum önemli bir hastalık oluşturma faktörü olarak kabul edilmektedir. Motilitenin yanı sıra FliC proteini (i) akciğer epitel hücrelerinin apikal yüzeyindeki membran glikolipid asialo-GM1'e, (ii) bazolateral yüzeyde lokalize heparan sülfat proteoglikanlara ve (iii) SP-A yüzey aktif maddeye bağlanmaktan, FliD ise insan solunum MUC1 müsine yapışmaya aracılık etmekten sorumludur.[9,11]

Flagellar bağlanma yeteneği, ilk biyofilm oluşumuna yardımcı olurken hareketlilik, son adımlarda hücre dağılımına izin vermektedir; bununla birlikte, olgunlaşma aşamasında motilite kontrolü zamanlaması ile sağlam biyofilmler oluşturmaya katkıda bulunmaktadır.[11]

1.2.2.Tip IV Pili (T4P)

Tip IV pili kutupsal olarak bulunan saç benzeri ipliksi yapılardır. Bunlar, monomerik protein olan majör pilin (PilA) ile birlikte, pilusun ucunda lokalize olan ve çekirdek minör pilinler (pili formasyonu ve stabilizasyonu için önemli) ve çekirdek olmayan minör pilinler (agregasyon, adezyon ve DNA alımında yer alır) olarak alt bölümlere ayrılmış, daha az miktarda bulunan minör pilinlerin binlerce molekülünden oluşmaktadır. PilA, hidrofobik N-terminali a-heliks bölgesi, merkezi bölge ve C-terminal bölgesi olarak üç alandan oluşmaktadır.

Farklı biyofilm üretimi ve çoklu ilaç direnci modelleri ile ilişkili beş T4P (I, II, IV, V) grubu vardır. Pili, motilite ve adezyona aracılık ederek enfeksiyonun başlatılması için gerekli yapılardır.[9,10,11] Farklı yüzeylerde hızlı kolonizasyon için kullanılan twitching hareketliliğini kontrol etmektedirler. Bu, hücreyi ileriye doğru itme kuvvetini oluşturan T4P liflerinin sıralı uzama, yapışma ve geri çekilme döngülerini içermektedir. Pilusun uzaması ve geri çekilmesi, sırasıyla PilA alt birimlerini tabanlarında polimerize eden ve depolimerize eden iki sitoplazmik zarla ilişkili ATPaz (PilB ve PilT) aracılığıyla sağlanmaktadır. [11]

Küçük uçlu pilin PilY1, epitel hücrelerinin bazolateral yüzeyinde lokalize olan bir konakçı reseptörü özel olarak tanımaktadır ve arjinin-glisin-aspartik asit (RGD) içerisindeki integrini kalsiyuma bağımlı bir şekilde bağlamaktadır. PilY1 ayrıca T4P'nin ifadesi ve stabilizasyonu için gereklidir ve diğer minör pilinlerle birlikte *P. aeruginosa* ekinin neden olduğu virülans için bir mekanosensör olarak görev yapmaktadır.[11]

T4P, yapışkan ve hareketli özelliklerinden dolayı, biyofilm gelişimi ve agregasyonunda ve mantar benzeri biyofilm başlık yapılarının oluşumunda rol oynamaktadır. Ayrıca biyofilmde bulunan DNA'yı bağlayabilmektedir.[11,12]

1.2.3.Aljinat

Mukoid ekzopolisakkarit olan aljinat, en çok incelenen ekzopolisakkarittir (EPS) ve mukoid *P. aeruginosa* biyofilminin ana bileşenidir. Yüksek moleküler ağırlıklı, D-mannuronik ve L-guluronik asitlerin değişken oranlarına sahip, β1-4 bağlantılı ve kısmen O-asetile polimerdir. [9,11,12]

Bu eksopolisakkarit, mukoid *P. aeruginosa* suşları tarafından aşırı üretilmektedir ve biyofilm oluşumu için bir gereklilik olmamasına rağmen, olgunlaşmasına, mimarisine ve stabilitesine yardımcı olmaktadır. Asetil grupları su ve besini tutarak ortamın viskozitesini arttırmaktadır. Aljinat'ın en önemli görevi, akciğerlerde konakçı fagositozuna ve nötrofiller tarafından üretilen reaktif oksijen türlerine (ROS) karşı *P. aeruginosa'yı* korumaktadır. Diğer bir görevi ise antibiyotik direncine katkıda bulunmasıdır.[11,12] Aminoglikozid grubu antibiyotikleri bağlayabilmektedir ve biyofilm içindeki penetrasyonlarını azaltarak direncin artmasını sağlamaktadır.[12]

1.2.4.Liposakkarit

Gram negatif bakterilerin dış zarında bulunan lipopolisakkarit (LPS), üç domainden oluşmaktadır: lipid A, çekirdek bölgesi ve O antijen. Fiziksel bir bariyer oluşturmasının yanı sıra konak reseptörleri ile iletişim kurması ve endotoksik aktivitesi ile doku hasarına neden olması gibi görevleri vardır. LPS, astım, KOAH ve Kistik Fibrozisli hastaların morbiditesi ve mortalitesi ile ilişkili olarak solunum yolu epitel hücrelerinde ROS ve müsin üretimini uyarmaktadır.[12] Solunumda görevli hücrelerin permeabilitesini arttırmaktadır ve tümör nekrosis faktör (TNF), Interlökin (IL)-1, IL-6 ve ınterferon (IFN)- ϒ 'ı uyararak akciğer inflamasyonuna neden olmaktadır. Ayrıca LPS antibiyotik direncine katkıda bulunur ve dış zardaki elemanların formasyonunu ve biyofilmi etkilemektedir.[11,12]

1.2.5.Piyoverdin

Piyoverdin (PVD) peptit doğasına sahip bir siderofordur. PVD üretimi enerji gerektiren bir süreç olduğundan, *P. aeruginosa* öncelikle diğer bir siderofor olan piyosiyelin üretir ve yalnızca demir konsantrasyonu gerçekten düştüğünde PVD üretimine geçmektedir. PVD, değişken bir peptit zincirinden ve demiri bağlayan korunmuş bir hidroksikinolin kromoforundan oluşmaktadır. Peptid zincirindeki farklılıklara dayalı olarak üç tipte (PVDI, PVDII ve PVDIII) gruplandırılabilmelerine rağmen, farklı suşlar tarafından 50'den fazla piyoverdin üretilmektedir.[10,12] PVD hem serbest demiri şelatlamaktadır hem de onu konak proteinlerden temizlemektedir. Bu karmaşık bir zar ve periplazmik akış pompaları ve taşıyıcılar ağı tarafından gerçekleştirilmektedir.[10,12] Piyoverdinlerin enfeksiyon sırasında ikili bir rolü vardır. Demir temizlemeye ek olarak, iki hayati virülans faktörünün (endo-proteinaz PrpL ve ekzotoksin A) üretimi için sinyal molekülleri olarak işlev görmektedirler.[12]

Piyoverdin; yüksek demir afinitesine sahiptir ve piyoverdin üretemeyen suşların farelerdeki *P. aeruginosa* enfeksiyonları sırasında virülansı azalttığı bildirilmiştir.[13] 2019 yılında yayınlanan bir çalışmada 70 kistik fibrozlu pediatri hastalarından izole edilen *P. aeruginosa* örneklerinde ve incelenen canlı modellerinde (*C. elegans* ve akut pnömoni murine) piyoverdin birikiminin patojenite ve konak ölümü ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.[14]

Diğer bir siderofor olan piyosiyalin *P. aeruginosa* tarafından ilk olarak üretilmektedir. Piyosiyalin üretimi, kistik fibrozis akciğerlerinde olduğu gibi kronik

enfeksiyonlarda doku hasarına neden olan sürekli inflamatuar yanıtta rol oynayabilmektedir.[13,14] *P. aeruginosa* ayrıca demir dışındaki metal iyonlarının alımına özel üçüncü bir metalofor olan Psödopalin de üretmektedir.[15]

1.2.6.Piyosiyanin

Piyosiyanin, *Paeruginosa*'nın mavi-yeşil kolonileri oluşturmasını sağlayan ikincil metabolitidir. Bu metabolit hücre içi Reaktif Oksijen Türleri (ROS) ve H2O2'yi arttırarak hücre döngüsündeki komponentlere, bazı enzimlere zarar vermektedir ve konak hücre DNA'sında hasara neden olarak hücre lizisine yol açmaktadır.[16] Hücre lizizi ile serbest hale gelen DNA ile biyofilm oluşumuna katkıda bulunmaktadır. ROS üretimini indüklemekten ve nötrofillerin apoptozuna yol açmaktan sorumludur. Ek olarak, siliyer hareketi yavaşlatmaktadır, epitelyal bozulmaya neden olmaktadır ve solunum yolunda mukoza sekresyonunu arttırmaktadır ve akciğer kolonizasyonuna katkıda bulunmaktadır.[11]

1.2.7.Ekzotoksinler

P. aeruginosa, konakçıya saldırmak için çok çeşitli toksin ve hidrolitik enzim salgılayan beş salgı sistemine sahiptir. Tip I ve V sekresyon sistemi (T1SS ve T5SS) en basit salgılama yollarıdır. T1SS, kronik enfeksiyonlar sırasında nötrofil akışını bastıran alkalin proteaz APRA'yı ve TESG'yi serbest bırakmaktadır. T5SS, hücre dışı adezin ve LEPA ekzoproteaz salgılamaktadır. Tip II salgı sistemi çok yönlü bir sistemdir ve çok geniş bir ekzoprotein çeşidi salgılamaktadır. Tip III salgı sistemi *P. aeruginosa*'nın kullandığı en önemli salgı sistemidir ve konak immün sisteminin engellenmesi ve yok edilmesinde görev almaktadır.[17]

T2SS ve T5SS periplazmanın tahribi için iki basamaklı sistem kullanırken diğerleri tek basamaklı kullanmaktadır. T3SS, hedef hücreye doğrudan etki ederek ekzoproteinleri sitoplazmalarına enjekte etmektedir. Farklı suşlar tarafından, Tip III salgılama sistemi ile eksprese edilen en bilinen dört toksin vardır: Exo U, Exo T, Exo S ve Exo Y. [1,9,17]

Exo U, sitotoksindir. Konak hücre membranını dönüşümsüz olarak tahrip etmektedir ve hücre ölümüne neden olan fosfolipaz aktivitesi göstermektedir. Bu toksin, şiddetli akut akciğer hasarı, sepsis ve mortalite ile ilişkili olarak hastalık seyrinin ciddiyetinde en büyük etkiye sahiptir.[9,17]

ExoY, memeli hücrelerinde, proteinkinazları aktive eden çeşitli siklik nükleotidleri (CAMP, CCMP) arttıran bir adenilat siklazdır. Aktin mikrotübülünün düzenini, hücre nekrozunu ve akciğer hasarını ve ardından endotelyal bariyer bütünlüğünün geri dönüşümsüz olarak tahribine neden olmaktadır.[9,17]

Exo T, tek başına bakterinin uzun süre hayatta kalmasında etkili değildir. Fagositozu engellemek ve konak epitel membranını bozmak gibi fonksiyonların yanısıra NK (Natural killer) hücrelerinde interferon gamma üretimini arttırmaktadır. Aktin hücre iskeletinin tersinir bozulmasına yol açmaktadır.[9,17]

ExoS, Exo T ile benzer fonksiyona sahip olmasına rağmen çok çeşitli hücre faktörlerini ve yolaklarını hedef olarak alması ve sonuç olarak hücre ölümü, aktin hücre iskeletinin bozunması ve DNA sentezinin inhibisyonu gibi etkilere neden olması açısından farklılık göstermektedir.[9,10,17]

Exotoksin A, T2SS tarafından salgılanan ADP ribozil transferazdır. Birçok klinik *P. aeruginosa* izolatı taranfından salgılanan en toksik özelliğe sahip moleküldür.[18] Konak hücrelerinde protein sentezini inhibe etmektedir, apoptoz mekanizmalarını indüklemektedir, IL-18 salgılanmasını inhibe etmektedir ve TNF-a, IL-6, IL-8 ve IL-10 üretimini azaltmaktadır.[17,18]

1.2.8.Ramnolipidler

Ramnolipidler amfipatik, hücre dışı, ikincil metabolitlerdir. Akciğer yüzey aktif cismini bozarak, transepitelyal elektrik direncini azaltarak ve solunum epitelyumundaki sıkı bağlantıları (tight junction) bozarak akciğerdeki *P. aeruginosa* patogenezine önemli ölçüde katkıda bulunmaktadırlar.[18,19]Bu moleküllerin sentezi, ventilatörle ilişkili pnömoni (VAP) gelişiminde izolatların kolonizasyonundan sorumlu olmasıyla ilişkilendirilmiştir.[19]

Ramnolipidlerin aşırı üretimi biyofilm gelişimini engellerken, düşük konsantrasyonları LPS (lipopolisakkaritler) salınımını artırarak hidrofobikliği ve sonuç olarak bakterilerin afinitesini arttırmaktadır.[9,10]

1.2.9.Proteolitik Enzimler

P. aeruginosa, akut enfeksiyonlardaki invazyonu için kritik öneme sahip olan Las A ve Las B elastaz, alkalin proteaz (AprA), tip IV proteaz (PIV), Geniş ExoProteaz A, *P. aeruginosa* aminopeptidaz gibi çeşitli peroteolitik aktiviteye sahip enzim salgılamaktadır.[19,20]

Las A ve **Las B** elastazları, quarum sensing (QS) sistemi tarafından düzenlenen T2SS ile salgılanmaktadır. Las B elastaz, *las B* geninden sentezlenen ve en çok bulunan çinko bağımlı bir metalloproteazdır.[20] *P.aeruginosa*'nın hücre dışına saldığı virülans faktörü olarak kabul edilmektedir.[21] Las B, elastin, kollajen, fibronektin ve müsinler gibi hücre dışı matris bileşenlerini ve vasküler endotel kaderin gibi hücresel bağlantı bileşenlerini bozarak doku hasarına ve bakteriyel yayılmaya neden olabilmektedir.[20,21] *las B* geni daha düşük kronik akciğer kolonizasyonu insidansı ile ilişkili olmasının yanısıra *P.aeruginosa*'nın kronik kolonizasyonun erken aşamasında önemli bir rol oynamaktadır.[21] Las B elastaz akciğerde konak savunmasına karşı koyarak bakterinin konakta daha uzun süre bulunmasına olanak sağlamaktadır.[22] Ve ramnolipid regülasyonu ile biyofilm oluşumunu etkilemektedir.[21,22]

Las A, *las A* tarafından kodlanan bir serin proteazdır ve elastinolitik aktivitesi kısıtlıdır. Fakat elastin içeren glisin-glisin bağlarını parçalayarak Las B'nin aktivitesini arttırmaktadır.[22,23] Klinik suşlarda antibiyotik direnci ile korele edilmiştir.[23]

Alkalin proteaz, T1SS aracılığıyla salgılanan ve aprA geni tarafından kodlanan çinko bağımlı bir metaloendopeptidazdır.[22] Temel görevi endoteldeki fibronektin ve laminin ile etkileşime girerek bakterinin fagositozdan kaçmasını sağlamaktadır. Bunu yanı sıra kompleman proteinlerini (C1q, C2 ve C3) ve sitokinleri degrade etmektedir.[23]

Tip IV proteaz, T2SS tarafından salgılanan bir serin proteazdır.[17,24] Kornea virülansında önemli bir rolü olmasına rağmen, doku invazyonuna ve hasarına katkıda bulunarak fibrinojeni proteinlerini parçalayarak Kistik fibrozis akciğerindeki *P. aeruginosa* patogenezinde de önemli rol oynamaktadır.[24]

1.2.10.Biyofilm

Mikroorganizmaların birçoğu, çeşitli stres koşullarıyla karşı karşıya kaldıklarında farklı hayatta kalma mekanizmalarına sahiptir.[25] Bakterilerin büyük bir kısmı koruyucu bir ortam olan biyofilm oluşturmaktadır.[26] Bakteriyel biyofilmler, hücre dışı polimerik madde

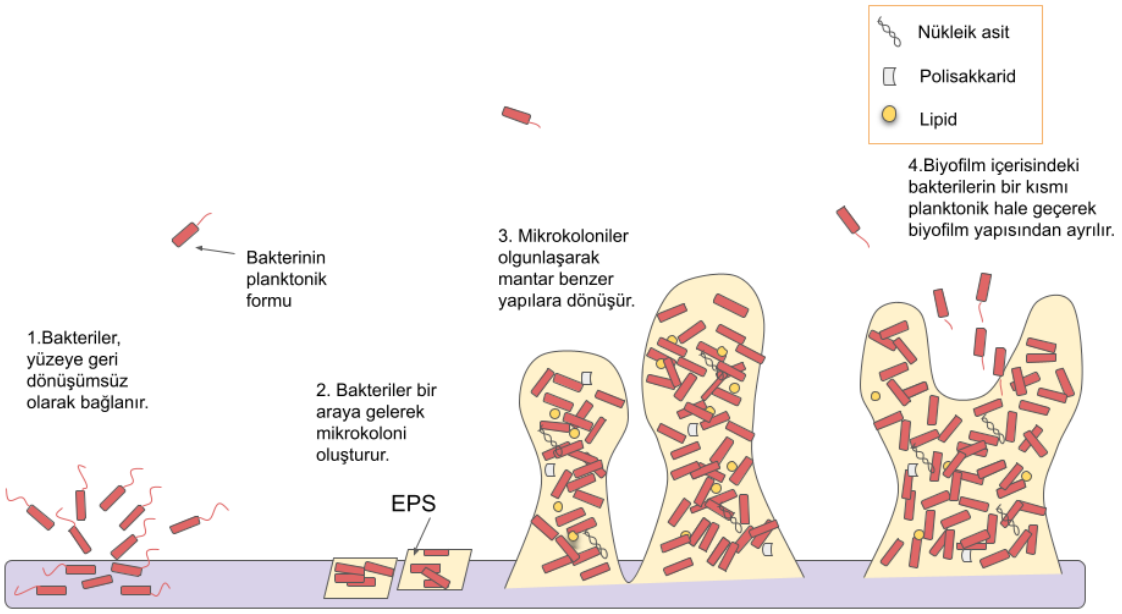
(EPS) matriksinin içerisinde; ekzopolisakkaritler, hücre dışı proteinler, hücre dışı DNA (eDNA) ve lipidlerin bulunduğu mikrobiyal topluluklardır.[25,26]

Hücre dışı polimerik maddeler adezyon ve agregasyonu kolaylaştırmaktadır, biyofilm hücresel bileşenini stabilize etmektedir, bakteriler arasında etkileşimli bir ortam oluşturmaktadır ve konakçı bağışıklık sistemine karşı koruyucu bir bariyer sağlamaktadır.[27]

Klinik olarak, bakterilerin insanlarda uzun süreli kolonizasyonu, biyofilmlerdeki bakterilerin, konakçının bağışıklık tepkilerine ve antibiyotik tedavisine dirençli olması nedeniyle kronik enfeksiyonlara neden olmaktadır.[25,26,27] *P. aeruginosa*'dan tanımlanmış olan biyofilm matris bileşenleri, esas olarak, biyofilmlerin yapısında ve ilaç direncinde önemli bir rol oynayan ekzopolisakaritleri, eDNA'yı ve matris proteinlerini içermektedir. *P. aeruginosa* en az üç tür ekzopolisakarit sentezler: aljinat, Pel polisakkarit ve Psl polisakkarit.[26,27]

P. aeruginosa'nın biyofilm yapısının oluşumu, dört ana aşamayı içeren sürekli bir süreçtir. İlk aşama, ilk bağlanmadır.[27]Bu aşamada asit-baz, hidrofobik ve elektrostatik etkileşimler ile bakteri hücreleri tersinir şekilde yüzeye yapışabilmektedir veya planktonik hücrelere geri dönebilmektedir. Biyofilm gelişiminin ikinci aşamasında, bağlı bakteriler kademeli olarak daha bağımsız bir yapıya dönüşmektedir ve bakteri hücreleri geri dönüşümlü bağlanmadan geri dönüşümsüz bağlanmaya geçiş yapmaktadır. Bu aşamada bakteriler büyümektedir ve mikro koloniler oluşturmaktadır ve antimikrobiyal maruziyet veya bağışıklık hücresi saldırısı gibi çeşitli stres koşullarından koruma sağlamak için biyofilm hücreleri ve çevresi arasında bir blokaj görevi gören EPS'leri sentezlemeye başlamaktadır.[26,27]

EPS'lerin salgılanması devam ederken, mikro kolonileri oluşturan hücreler yavaş yavaş olgunlaşmaktadır ve çeşitli fizyolojik değişikliklere uğrayarak besinleri, suyu ve atıkları taşıyan küçük kanallardan oluşan üç boyutlu mantar benzeri yapılar oluşturmaktadır ve besinlerin ve hücreler arası iletişim için olan sinyal moleküllerinin dağılımına katkıda bulunmaktadır.[27,28] Son aşama ayrılmadır. Biyofilm içerisindeki hücreler planktonik büyüme moduna geçiş yaparak hücreler diğer biyomoleküllerin yüzeyine bağlanabilir hale gelmektedir veya yeni bir biyofilm gelişim döngüsü başlatabilmektedir (Şekil 1.1).[28]



Şekil 1.1. Biyofilm oluşumunun temel olarak gerçekleşen basamakları: 1.Bakteri hücreleri yüzeye geri dönüşümlü olarak bağlanmakadır. Bir araya gelen ve çoğalan bakteriler mikrokoloniler oluşturmaktadır ve eksopolisakkarit salgılamaktadır. Ekzopolisakkarit içerisinde serbest DNA, lipid protein gibi birçok hücre dışı molekül ve bakteriler bulunmaktadır. Mikrokoloniler olgunlaşarak daha büyük mantar şeklinde yapılara dönüşmektedir. Son aşamada biyofilm yapısındaki bakterilerin bir kısmı planktonik hale geçerek yeni biyofilmler oluşturmak için yapıdan ayrılmaktadır.

Antibiyotikler, biyofilm enfeksiyonlarını tedavi etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır, fakat ilaç direnci sorunları, ilaç penetrasyonunu engelleyen biyofilm matrisleri ve ilaç-mikrop etkileşimleri gibi nedenlerden dolayı tedavide birçok zorluk hala devam etmektedir.[29] Bu nedenle, geleneksel tek antibiyotik tedavisi, biyofilm enfeksiyonlarının tedavisinde sınırlıdır ve artan sayıda çalışma, *P. aeruginosa* enfeksiyonunu tedavi etmek için yeni antimikrobiyal ilaçların ve anti-biyofilm terapötik programlarının geliştirilmesini araştırmaktadır. Bakteriyofaj terapisi, Antimikrobiyal peptid (AMPs), DNaz uygulaması gibi birçok uygulama ile antibiyotik tedavisine alternatif sunulmaya yönelik çalışmalar bulunmaktadır.[29,30]

1.3.Klinik Önemi

P. aeruginosa, birçok akut ve kronik enfeksiyonlarda rol oynayarak hastalığın seyrini etkilemektedir özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda sepsis ve bakteriyemi gibi ciddi enfeksiyonlar oluşturmaktadır.[1] Çoğunlukla başka nedenle hastanede tedavi gören kişilerde enfeksiyona neden olmaktadır (nosokomiyal). Nosokomiyal kaynaklı pnömoni ve solunum yetmezliği gibi hastalıklarda etken bakteridir.[1,3] *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının önemi, bakterinin çok çeşitli virülans faktörleri ve antibiyotik direnç mekanizmalarına sahip

olmasından kaynaklanmaktadır.[1,3,29] Böylelikle bulunduğu konak canlıda yaşamını uzun süre muhafaza ederek enfeksiyon şiddetini arttırmaktadır. Bu nedenle tedavisi zor bir mikroorganizmadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) ve Hastalıktan Koruma ve Önleme Merkezi (CDC)'ne göre ESKAPE (*Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa,* ve *Enterobacter spp.*) grubu bakteriler içerisine dahil etmiştir.[31]

Antibiyotiğe karşı dirençli mikroorganizmaların hastane ve diğer klinik ortamlarda bulunma insidansı farklıdır.[1,31,32] Yoğum bakım, diğer klinik ortamlara göre bu tür patojenleri daha fazla barındırmaktadır.[32] Yoğun bakım ünitelerinde enfeksiyon tedavisi için kullanılan antibiyotiklerin sıklığı, antibiyotiğe dirençli bakterilerin gelişmesi için bir kaynaktır ayrıca tedavi gören hastalarda zayıflayan konak savunması ve kullanılan mekanik ventilasyon, santral venöz kateterizasyon ve idrar yolu kateterizasyonları gibi çoklu prosedür ve invaziv cihazların kullanımı bu insidans farkının oluşmasının nedenleri arasındadır.[32]

P. aeruginosa, akut idrar yolu enfeksiyonlarının (İYE) en yaygın üçüncü nedenidir. *P. aeruginosa*, komplike İYE'lerde, özellikle kateteri olan kişilerde hayatı tehdit eden piyelonefrite yol açan ciddi bir patojendir.[31] *P. aeruginosa*, savunmasız konakçıda kan dolaşımı enfeksiyonu, solunum, idrar yolu, yumuşak doku ile ilişkili enfeksiyonlar da dahil olmak üzere birçok hastalıkta önemli bir etkendir.[33] Yaralar, *P. aeruginosa* enfeksiyonları için oldukça elverişlidir. Özellikle hastanede yatan kişilerde yanıklar, travma ve basınç yaralanmaları gibi durumlarda *P.aeruginosa* enfeksiyonları ciddi doku hasarına ve bakteriyemiye yol açabileceği ve bu yaraların iyileşme sürecini güçleştireceği için tedavisi ciddi önem arz etmektedir.[34] *P. aeruginosa*, diyabetik ayak ülserleri, venöz bacak ülserleri ve basınç ülserleri dahil olmak üzere tüm kronik yaralarda (3 ay içinde iyileşmeyen yaralar) en çok bulunan ve sıklıkla bildirilen Gram negatif patojenik bakteridir.[11,31]

1.4.Kronik Enfeksiyonlar

P. aeruginosa, Kistik Fibrozis (KF)'e sahip kişilerde en önemli morbidite sebebidir. KF, epitelyal yüzeylerdeki iyon taşıma kanalı ile ilgili gende oluşan mutasyonlar nedeniyle meydana gelen bir hastalıktır.[35] Pankreas, sindirim sistemi, ter bezleri dahil olmak üzere birçok organı etkilemesine rağmen en ciddi patoloji solunum sisteminde görülmektedir.[35,36] *P.aeruginosa*, KF'ye sahip yetişkinlerde daha çok görülür ve oluşturduğu enfeksiyonla solunum yetmezliğinde önemli rol oynamaktadır.[35,36] KF enfeksiyonlarındaki kişilerde

P.aeruginosa aşırı aljinat üretimi ile hem biyofilm tabakasının kalınlaşmasını hem de mukoid formunun oluşmasını sağlayarak antibiyotik direncini arttırmaktadır ve immün hücrelerinden kaçarak hayatta kalmasını kolaylaştırmaktadır.[35,36] Bu da hastalarda akciğer fonksiyonlarının bozulmasına ve kötü prognoza yol açmaktadır.[36]

1.5.Antibiyotik Etki Mekanizmaları ve Antibiyotik Direnç Mekanizmaları

P.aeruginosa, klinik izolatları arasındaki antimikrobiyal direnç oranı dünya çapında son 5 yılda keskin bir şekilde artmıştır.[37] Özellikle birden fazla antimikrobiyal sınıfına direnç (çoklu ilaç direnci), *P. aeruginosa*'da giderek yaygınlaşmaktadır.[37] Sıklıkla beta laktamlar, aminoglikozidler, florokinolonlar ve hatta polimiksinler dahil olmak üzere çeşitli antibiyotik sınıflarına karşı direnç göstermektedir ve bu antibiyotiklere karşı en yüksek direnç insidansını gösteren yoğun bakım ünitelerinden izole edilen suşlardır.[37,38]

Genel olarak *P. aeruginosa*'nın antibiyotiklere karşı kullandığı direnç mekanizmaları üç kategoriye ayrılabilmektedir; içsel (intrinsik), edinilmiş ve uyarlanabilir (adaptif). *P. aeruginosa*'nın içsel direnci, azalmış dış zar geçirgenliğini, hücreden antibiyotik salgılayan akış pompalarının ekspresyonunu ve β-laktamaz gibi antibiyotikleri etkisiz hale getiren enzimlerin üretimini içermektedir.[37,38] Edinilmiş direnç, *P. aeruginosa*'nın mutasyonel değişikliklerle direnç kazanabildiği mekanizmadır.[38] Adaptif mutasyonlar yoluyla kazanılmış direnç, kronik enfeksiyonun uzun süreli antibiyotik tedavisi sırasında uzun süreli seçici basınç ve konakçı immün efektörlerin eylemleri nedeniyle KF izolatlarında yaygındır.[37,38]

*P. aeruginosa'*nın bir diğer önemli direnç mekanizması, adaptif direnç mekanizmasıdır; büyüme durumu veya strese maruz kalma gibi çevresel koşullardan kaynaklanan değişiklikler ile gelişen direnç mekanizmasıdır.[39] Stres faktörleri ve bazı antibiyotiklerin varlığı gibi dış uyaranlarla indüklenmektedirler.[38,39]Bu, kazanılmış mutasyon direncinden farklıdır, çünkü adaptif direnç geçici ve kararsızdır. Adaptif direnç mekanizmaları, mutasyonel olaylardan farklı olarak kalıcı değildir ve stres faktörünün ortadan kalkmasıyla etkisiz hale gelmektedir. [37,38,39]

1.5.1.β-Laktam Grubu Antibiyotiklerin Etki Mekanizmaları ve Direnç

β-laktamlar, yapılarında β-laktam halkası bulunduran ve bakterinin hücre duvarının önemli bir bileşeni olan peptidoglikan sentezini inhibe eden antibiyotik grubudur.[40] Bu

etkileri ile bakterilerin çoğalma ve bölünme yeteneğini engellerken aynı zamanda hücre duvarının bütünlüğünü azaltarak hücresel parçalanmaya yol açmaktadır.[40] *P.aeruginosa,* mutasyon yoluyla PBP3 (penisilin bağlayıcı protein) hedef proteinindeki değişikliklere, azalan antibiyotik alımına, antibiyotik moleküllerinin bozunmasına yol açarak β-laktam grubu antibiyotiklere karşı direnç geliştirebilmektedir.[41] Ayrıca horizontal gen transferi ile diğer bakterilerden β-laktam grubu antibiyotikleri parçalayan enzimler (β-laktamazlar) ile ilgili genleri alarak da direnç kazanabilmektedir.[42]

1.5.1.1.Karbapenem Etki Mekanizması ve Direnç

P. aeruginosa, 1980'lerin ortalarında ilk karbapenem olan imipenemin piyasaya sürülmesinden sonra karbapenem direncinin ortaya çıktığı ilk türdür.[43] Karbapenemler, β-laktam halkası ile birlikte bir penemik taşımaktadırlar ve diğer tüm β-laktamlar gibi, Penisilin Bağlayıcı Proteinlere (PBP'ler) bağlanarak ve onları etkisiz hale getirerek bakteri hücre duvarı sentezini inhibe etmektedirler. Bu yapı, AmpC ve genişletilmiş spektrumlu beta-laktamazların (ESBL'ler) çoğu dahil olmak üzere birçok β-laktamazlar karşı stabilite sağlamaktadır.[44]

1.5.1.2.Sefalosporin Etki Mekanizması ve Direnç

P. aeruginosa tipik olarak iki β-laktamaz, bir C sınıfı sefalosporinaz, AmpC ve bir D sınıfı oksasilinaz, PoxB (prüvat oksidaz) için kromozomal genler taşımaktadır.[37] AmpC, klinik izolatlarda yaygın olarak β-laktam direnciyle bağlantılı, iyi karakterize edilmiş bir β-laktamazdır.[44,37] PoxB aktivitesi ise yalnızca AmpC'den yoksun laboratuar mutantlarında tespit edilmiştir ve klinik önemi belirsizdir. Birçok Gram-negatif bakteride kromozomal olarak kodlanan ortak bir enzim olan AmpC, bir dizi β-laktam antibiyotik (örn., benzil penisilin ve dar spektrumlu sefalosporinler) tarafından indüklenebilmektedir ve bu nedenle bunlara karşı bakterinin içsel direnç geliştirmesini sağlamaktadır.[37] AmpC'nin mutasyonel derepresyonu (aşırı β-laktamaz üretimi), *P.aeruginosa*'da genişletilmiş spektrumlu sefalosporinler (örn. seftazidim) ve penisilinler (örn. tikarsilin) dahil olmak üzere β-laktamlara karşı en yaygın direnç mekanizmasıdır.[11,37]

1.5.2.Florokinolon Etki Mekanizması ve Direnç

P. aeruginosa tedavisinde sıklıkla kullanılan bir antibiyotik grubudur. Siprofloksasin ve Levofloksasin bu gruba ait antibiyotiklerdendir.[45] İlacın temel etki mekanizması DNA giraz ve topoizomerazı inhibe ederek bakterinin DNA sentezinin durdurmaktır.[45,46]

Böylelikle bakterinin çoğalması engellenmiş olmaktadır. *P. aeruginosa* bu ilaçlara karşı temel olarak *DNA giraz (gyrA*) ve topoizomeraz IV (*parC*)[45] kodlayan hedef genlerdeki mutasyonlarla ve efflux pompa sistemleri ile ilişkili düzenleyici genlerdeki mutasyonlar ile direnç geliştirmektedir.[46]

1.5.3.Aminoglikozit Etki Mekanizması ve Direnç

P. aeruginosa enfeksiyonlarını tedavi etmek için kullanılan antibiyotiklerin çoğu, hücre içi hedeflere ulaşmak için hücre zarını geçebilmektedir.[47] Gentamisin ve amikasin gibi aminoglikozit antibiyotik ailesi üyeleri, bakterinin ribozomal 30S alt birimlerine bağlanarak bakteriyel protein sentezini inhibe etmektedir.[48] *P.aeruginosa* bu grup antibiyotiklere karşı edinilmiş direnç mekanizmaları ile aminoglozitleri modifiye edici enzimler, rRNA metilazlar ve efflux pompa sistemleri ile direnç geliştirmektedir.[47,48] Modifiye edici enzimler ile antibiyotik inaktivasyonuna neden olan aminoglikozit modifikasyonu; fosforilasyon (aminoglikozit fosforiltransferazlar ile), asetilasyon (aminoglikozit asetiltransferazlar, AAC'ler tarafından) veya adenilasyondan (aminoglikozit nükleotidiltransferazlar (ANT)) oluşmaktadır.[49] rRNA metilazlar, bakterinin 30S ribozomal alt biriminin, 16S rRNA'sına aminoglikozid bağlanmasını engelleyerek gentamisin, tobramisin ve amikasin gibi klinikte kullanılan aminoglikozitlere direnç geliştirmesini sağlamaktadır.[37] Efflux pompa sistemleri ise ilacın bakteriden atılarak birikiminin engellenmesini sağlamaktadır.[37]

1.5.4.Polimiksin Direnci

P. aeruginosa'nın birçok antibiyotiğe karşı geliştirdiği direnç nedeniyle son yıllarda polimiksin grubu antibiyotikler, *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavi programlarına dahil edilmiştir. Antibakteriyel özelliği 1940 yılında keşfedilen polimiksinlerin klinikte kullanılan en önemli iki sınıfı polimiksin E (kolistin) ve polimiksin B (PMB) 'dir.[50] Her iki sınıftaki polimiksinler (E ve B) bakteride aynı etki mekanizmasına sahiptir. Polimiksin E ve B, *P.aeruginosa*'nın dış zarında bulunan lipopolisakkaritin lipid A kısmındaki negatif yüklü fosfat grupları ile etkileşime girerek bakteriyel dış zarın stabilizasyonun bozulmasına ve sonucunda bakterinin sitoplazmasının sızmasına, polimiksinlerin bakteriye daha fazla geçmesi ile bakterinin hücresel solunumunun bozulmasına, hücre parçalanmasına dolayısıyla hücre ölümüne neden olmaktadır.[50] Ayrıca polimiksinler güçlü anti-endotoksin aktiviteye sahiptir ve Lipid A'ya bağlandıktan sonra endotoksin nötralizasyonuna yardımcı olmaktadır.[51]

Güncel tedavilerde Polimiksin grubu antibiyotiklerin eklenmesi ile *P. aeruginosa*'nın bu antibiyotiklere karşı direnç geliştirmesi ve bu direncin devam eden yıllarda artacağı düşünülmektedir.

P. aeruginosa'nın dış zarına etki eden bu antibiyotik grubuna karşı koyabilmesi için bakteri, duvar yapısını ve zar yapısını değiştirmeye yönelik fonksiyonlar göstermektedir. Polimiksinlere karşı direnç, esas olarak, LPS lipid A kısmındaki negatif yüklü fosfat gruplarının yerine pozitif yüklü 4-amino-deoksi-L-arabinoz (L-Ara4-N) ve/veya fosfoetanolamin (pEtN) kalıntılarının eklenmesinden kaynaklanmaktadır.[51,52] Dış zarın negatif yükündeki bu değişiklikler, polimiksinin bağlanmasını önlemektedir. Bu tür değişikliklere, LPS modifikasyonu için gerekli genleri düzenleyen iki bileşenli sinyal iletim sistemlerindeki mutasyonlar neden olmaktadır. [51]

Bu direnç için kromozomal mutasyonların etkili olduğu düşünülürken 2015 yılında Çin'de bildirilen bir çalışmada plazmid aracılığıyla aktarılan bir genin (*mcr-1*) de kolistin direncinde etkili olduğunu ve bakterinin Lipid A molekülünün yükünü değiştirecek bir molekül sentezinde görev aldığını göstermiştir.[51,52] Bu moleküller, bakteriyel hücre zarındaki lipopolisakaritin lipid A'sına bir fosfoetanolamin (pEtN) parçası bağlayarak ve böylece katyonik kolistin/polimiksinlerin afiniteye sahip olduğu negatif yükleri ortadan kaldırarak kolistine direnç kazandıran fosfoetanolamin transferazlardır.[52]

mcr-1 geninin keşfedilmesinden sonra, yedi kıtanın altısında insanlardan, hayvanlardan ve çevreden alınan izolatlarda çok sayıda varyantıyla birlikte dokuz başka mcr gen tipi (mcr-2 ila mcr-10) tespit edilmiştir.[52,53] Plazmid aracılı hareketli kolistin (COL) direnci (mcr) genlerinin ortaya çıkışı ve yayılması, çoklu ve yaygın olarak ilaca dirençli Gram-negatif basillerin (GNB) neden olduğu ölümcül enfeksiyonları tedavi etmek için son çare olarak kabul edilen kolistinin etkinliğiyle ilgili bir tehdit unsurudur.[53]

İn vitro polimiksin duyarlılık testi zordur ve birkaç farklı faktörden etkilenmektedir. Polimiksinlerin katyonik polipeptitlerinin doğal özellikleri, onu rutin laboratuvar testlerinde elverişsiz ve zahmetli hale getirmektedir. Kolistinin minumum inhibisyon konsantrasyonunu (MİK) belirlemek için EUCAST ve CLSI sıvı mikrodilüsyon yöntemini önermektedir.[64,89] Diğer antibiyotik duyarlılık metodlarından olan agar dilüsyon kolistinin plakalara adsorbsiyonunu engelleyebileceğinden tercih edilmemektedir. Ayrıca disk ve gradyan difüzyon yöntemleri, kabul edilemeyecek kadar yüksek hata oranları nedeniyle, CLSI veya EUCAST tarafından kolistin testi için önerilmemektedir. Kolistinin kolistin metat sodyum

(KMS) ve kolistin sülfat olarak iki formülü vardır.[54] Yapılan çalışmalarda KMS'nin MİK değerleri kolistin sülfat ile karşılaştırıldığında 3-8 kat daha fazla olduğu görülmüştür.[54] Bunun sebebi olarak sulandırılmış KMS'nin farklı sıcaklıklarda stabilitesinin korunmadığı düşünülmektedir. Bu yüzden kolistin direnci belirleme de etken madde olarak kolistin sülfat tercih edilmelidir.[54]

Rutin laboratuvarlarda kullanılan otomatize sistem VITEK® cihazı kolistini 0,5–16 mg/mL aralığında değerlendirimektedir. Cihazın kolistin duyarlılığı, referans yöntem olan sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile kıyaslandığında genel uyum %78,6 olarak bildirilmiştir.[54] Bu zayıf uyumdan dolayı VITEK® otomatize sistemi kolistin hetero direncini saptamak için güvenilir olmamaktadır.[54]

Kolistin direncinin belirlenmesinde EUCAST ve CLSI tarafından önerilen Sıvı Mikrodilüsyon yöntemi, çok zahmetli ve zaman gerektiren bir yöntem olduğundan yeni, uygun, ekonomik, hızlı ve doğru kolistin duyarlılığı saptama yönteminin geliştirilmesi ve yaygınlaştırılması gerekmektedir. Bu alanda yapılan çalışmalardan birisi Lescat ve arkadaşlarının 2019 yılında yayınladığı bir çalışmada kolistinin hem Enterobacteriaceae türleri hem de fermente olmayan bakteriler için duyarlılığını 4 saat içinde hızlı bir şekilde tespit edebilen Rapid ResaPolymyxin Acinetobacter/Pseudomonas NP testi adlı hızlı bir resazurin-mukoid duyarlılık testi yöntemi geliştirmişlerdir.[5] Testin temel prensibi, 3,75mg/L kolistin varlığında üreme gösteren bakterilerin, rezasurini (mavi renkli), pembe floresan resofurine indirgenmesine dayanmaktadır.[55] *P.aeruginosa* için bu yöntemin duyarlılığı referans yöntem olan sıvı mikrodilüsyona göre %100 bulunmuştur.[5]

Diğer bir güncel yöntem ise disk elüsyon yöntemidir. Bu yöntem, kolay bulunabilen ve uygun fiyatlı malzemeler kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Çalışma prensibi, bilinen bir konsantrasyondaki antimikrobiyal disklerin, MİK'leri belirlemek için belirli bir sıvı besiyeri (Katyon Ayarlı Mueller Hınton Broth) hacminde ayrıştırılmasına dayanmaktadır.[6] Hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki sıralı sıvı besiyerlerine (örn.2ug/ml, 4ug/ml) eklenen 0,5 Mcfarland bakteri süspansiyonlarının, ilgili konsantrasyondaki besiyerindeki bulanıklığın gözlenmesi ile değerlendirilmektedir. Bulanıklığın olmadığı ilk besiyerindeki konsantrasyon değerlendirilen bakteri için kolistinin MİK değerini vermektedir.[6]

1.6. Genetiği

P. aeruginosa, ortalama 6,6 Mbç boyutuyla bakteriyel insan patojenleri arasında en büyük genomlardan birine sahiptir.[56]Genomu; metabolik enzimleri, çoklu ikincil metabolitleri ve polimerleri ekspresyonu ile ilişkili genlerden ve düzenleyici genlerden oluşmaktadır. Teknolojinin ilerlemesi ile sekanslama analizlerinin gelişmesi canlıların genomunu daha iyi anlamamızı sağlamaktadır. Bu teknolojiler *P. aeruginosa* izolatlarındaki genom sekanslamasının yapılmasını ve izolatların genetik bilgisinin karşılaştırılmasını mümkün hale getirmektedir. Çalışmalar, *P. aeruginosa*'nın tüm genom sekanslaması yapıldığında her suşunda bulunmayan bir aksesuar gen bölgesinin varlığını ve bir de korunmuş çekirdek bölgesi olduğunu ortaya çıkarmıştır.[57,17] *P. aeruginosa'nın* çekirdek genomu hemen hemen tüm suşlarında bulunan ve kaynağına bakılmaksızın (çevresel, klinik veya laboratuvar) tüm *P. aeruginosa* suşları tarafından paylaşılan bir dizi metabolik ve patojenik faktörü kodlayan genler olarak tanımlanmaktadır.[17] Çekirdek genom, toplam genomun yaklaşık %90'ını oluşturmaktadır ve suştan suşa yüksek oranda korunmaktadır.[17,57] Aksesuar gen bölgesi; bütünleştirici ve konjugatif elementler, değiştirme adaları, profajlar ve faj benzeri elementler, transpozonlar ve integronlardan oluşan bir bölgedir.[57]

Aksesuar gen bölgesi, *P. aeruginosa* suşunun belirli bir ortamda varlığını sürdürme yeteneğinin önemli bir unsurudur. *P. aeruginosa*'nın normal yaşam ortamında bulunmayan ağır metaller ve toksik organik bileşikler gibi hayatını tehdit eden ortamlarda yaşamasını sağlamaktadır. Bakteriyel aksesuar genomun da önemli klinik sonuçları olabilmektedir. Pek çok bakteride olduğu gibi *P. aeruginosa*'da da aksesuar genom virülans genleri açısından zengindir.[57,58]Örneğin, PAPI-2 ve ilgili adalar, insan hastalarda artan virülansla bağlantılı bir tip-III salgı sistemi tarafından üretilen ExoU'yu kodlayan geni içermektedir. İntrinsik antibiyotik direnç mekanizmaları *P. aeruginosa*'nın çekirdek genomunda kodlanmış olsa da, edinilmiş antibiyotik direnç genleri aksesuar genomda mevcut olmaktadır.[58] Bu genlerin suşlar arasında transferi, sağlık hizmeti ortamlarında çoklu antibiyotiğe dirençli suşların yaygınlaşmasına katkıda bulunabilmektedir. Kolistin direnci ile ilişkilendirilen *mcr-1* geni bu direnç tipine örnek olarak verilebilmektedir.[57,59] Plazmid aracılığıyla aktarılan bu gen ilk kez Çin'de Liu ve ark. tarafından yürütülen bir çalışmada *E. coli* suşları üzerinde bu genin direnç mekanizmasını tanımlamıştır.[59]

2.AMAÇ

P. aeruginosa, çoklu ilaç direncine sahip, nozokomiyal enfeksiyon etkeni fırsatçı patojendir (Wood ve ark.,2023). Çeşitli virülans faktörlerine ve antibiyotik direncine sahip olması, tedavisinin güçleşmesine neden olarak enfeksiyonların seyrini etkilemektedir ve ciddi patolojik sonuçlara yol açarak mortalite ve morbidite oranlarına katkıda bulunmaktadır (Martin ve ark., 2021). *P. aeruginosa*, hastane ortamında; lavabolar, temizlik malzemeleri, doğrudan hasta ile temasta bulunan kateter, solunum ekipmanları gibi birçok yüzeyde bulunmaktadır. Bu yüzden klinik örneklerden en sık izole edilen bakteriler arasındadır. Özellikle immün sistemi zayıflamış hastalarda ciddi sonuçlara yol açmaktadır. Hastanelerde uzun süreli yatarak tedavi gören hasta grupları *P. aeruginosa* enfeksiyonları için daha fazla risk altındadır (Kollef ve ark., 2001).

P. aeruginosa, tedavisi için kullanılan antibiyotiklere karşı geliştirdiği direnç nedeniyle son yıllarda polimiksin grubu kolistin kullanımı gündeme gelmiştir (Chung ve ark.,2017). Bu kısıtlı antibiyotik çeşidi nedeniyle kolistine karşı gelişen direnç ve bunun ülkelerdeki insidansı önemli bir konudur.

Bu çalışmada yatarak tedavi gören hasta gruplarındaki, *P. aeruginosa* virülans faktörlerinin ve antibiyotik direncinin araştırılması, gruplar arası farklılıkların incelenmesi ve kolistin direnci için referans yöntem olarak kullanılan Sıvı Mikrodilüsyon yöntemine alternatif yöntemlerin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

3. YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan İzolatlar:

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına 2018-2021 yılları arasında gönderilen yatarak tedavi gören hasta örneklerinden izole edilen 208 *P. aeruginosa* çalışmaya dahil edilmiştir. Dahil edilen hasta suşları gram boyama, hemoliz ve oksidaz testi ile doğrulanmıştır.

P. aeruginosa izolatları yoğun bakım (102) ve servis (106) örnekleri olarak iki grupta çalışılmıştır.

Antibiyotik duyarlılık testleri için *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E.coli* NCTC 13846, *E.coli* ATCC 25922, virülans faktörlerinden biyofilm için *P.aeruginosa* ATCC 27853 diğer virülans faktörleri için *P. aeruginosa* PAO1 (ATCC 47085) kullanılmıştır.

3.2.Besiyerlerinin Hazırlanması

3.2.1.Triptik Soy Broth (TSB) (Merck, Almanya)

1000 ml distile su içerisinde 30 gr toz besiyeri karışımından eklenerek karıştırılmıştır. Ardından hazırlanan karışım 121°C' de 15 dakika otoklavla (Alp, Türkiye) steril edilmiştir. Steril edilen besiyeri karışımı +4 °C'de kullanılacağı zamana kadar saklanmıştır.

3.2.2.Pseudomonas izolasyon agar P (Biolife, İtalya)

1000 ml distile su içerisine 46,4 gr besiyerinden eklenerek içerisine 10 ml gliserol ilave edilmiştir. Karışım 121℃'de 15 dakika otoklav ile sterilize edilmiştir. Sterilizasyon süresi sonunda besiyeri karışımının 47-50 ℃'ye kadar soğuması beklenmiştir. Ardından hazırlanan besiyeri karışımı petri kutularına dökülmüştür.

3.2.3.Pseudomonas izolasyon agar F (Biolife, İtalya)

1000 ml distile su içerisinde 38 gr besiyerinden eklenerek içerisine 10 ml gliserol ilave edilmiştir. 121℃'de 15 dakika otoklav ile sterilize edilmiştir. Sterilizasyon süresi sonunda besiyeri karışımı 47-50 ℃'ye kadar soğuması beklenmiştir. Ardından petri kutularına bölüştürülmüştür.

3.2.4.Nutrient Agar (Biolife, İtalya)

1000 ml distile su içerisine 23 gr besiyerinden eklenerek karıştırmıştır ve ardından otoklav ile sterilizasyon gerçekleştirilmiştir. 47-50 ℃'ye kadar soğuması beklenen karışıma %0,1'lik elastin (Sigma, Almanya) eklenmiştir.

3.2.5.Katyon Ayarlı Mueller Hınton Broth (KAMHB)

Katyon ayarlı 1000 ml distile su içerisinde 21gr besiyeri toz karışımından eklenerek karıştırılmıştır ve ardından 121℃'de 15 dk sterilizasyona bırakılmıştır. Sterilizasyon işlemi gerçekleşen besiyeri soğuduktan sonra +4 ℃'de muhafaza edilmiştir.

3.3.Hazırlanan Çözeltiler

3.3.1.%1'lik Kristal Viyole

100 ml'de 1gr olacak şekilde toz kristal viyole tartılıp distile su içerisinde çözülmüştür. Ardından kâğıt filtreden geçirilip cam boya kavanozuna aktarılmıştır.

3.3.2.Rezasurin (Sigma, Almanya)

10 ml'lik çözelti hazırlanmıştır. Bunun için 0,01 gr rezasurin tartılarak 10 ml steril distile su içerisinde çözülmüştür. Hazırlanan çözelti steril 15 ml falconlara alınmış ve ışık ile teması engellemek için alimunyum folyo ile sarılmıştır.

3.3.3. 0,5 Mcfarland standardı

Baryum klorür ($BaCl_2$) (0,048 mol/l) çözeltisinden 0,5 ml, sülfürik asit çözeltisinden (0,18 mol/l) 99,5 ml alınarak cam bir tüp içerisinde karıştırılmıştır.

3.3.4. GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder

50µl Ladder, 200 µl deiyonize su, 50 µl DNA loading dye steril bir ependorf konularak pipetaj yapılmıştır. Ardından +4 ℃'de muhafaza edilmiştir.

3.4.Mastermix

Hot-Start GoTaq® DNA Polymerase in a Ready-to-Use Master Mix, M512B, 100 reaksiyonluk kullanılmıştır.

3.5.DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için kaynatma metodu tercih edilmiştir. Steril eppendorf içerisinde 200ul distile su konularak 5-6 koloni taze pasaj bakteri örneği alınarak karıştırılmıştır. Ardından karışım vortekslenmiştir. Vortekslenen karışım ısıtıcı bloğa yerleştirilerek 96 ℃'de 10dk bekletilmiştir. Daha sonra soğuması beklenen süspansiyon 13000 rpm'de 3 dk santrifüj uygulanmıştır. Ayrışan süspansiyonun süpernatant kısmı başka bir tüpe aktarılarak -80℃'de çalışılacağı zamana kadar muhafaza edilmiştir.

3.6.Piyosiyanin

Özel izolasyon agar kullanılmıştır. Piyosiyanin için Pseudomonas İzolasyon agar F kullanılmıştır.[60]

3.7.Piyoverdin

Piyoverdin değerlendirilmesi için özel izolasyon agar P tercih edilmiştir. [60]

3.8.Elastaz Aktivitesi

Nutrient agar-elastin yöntemi kullanılmıştır. Hazırlanan %0,01'lik elastin Nutrient agar besiyerlerine, bir besiyerinde 2-3 adet hasta örneği olacak şekilde örnekler çizgi ekim yöntemiyle inokule edilmiştir. Daha sonra inkübasyon için 37 ℃'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Besiyerinde ekim çizgisinin etrafındaki açıklık değerlendirilerek (açıklık pozitif) sonuçlar kaydedilmiştir.[61]

3.9.*las B*

Daha önce izolasyonu gerçekleştirilen ve -80 ℃'deki DNA örnekleri çalışmaya dahil edilmiştir. Klasik polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile *lasB* gen bölgesi incelenmiştir. PZR koşulları: Başlangıç sıcaklığı 5 dk 94℃ denatürasyon, 35 siklus 94 ℃ 1 dk, bağlanma sıcaklığı 57 °C 1 dk ve uzama 72 °C'de 1 dk, son uzama 72 °C'de 10dk olacak şekilde belirlenmiştir. %0,5 Etidyum bromür içeren %1'lik jelde yürütülerek otoradyografide bant görüntüleri incelenmiştir.[62] *las B* için kullanılan primer (Sentebio, Türkiye) bilgileri tabloda gösterilmiştir (Tablo 3.1.).

Tablo 3.1. *las B* primer sekans bilgileri

Hedef gen	Primer sekansı	Çoğaltılacak bölgenin büyüklüğü(bç)	Bağlanma sıcaklığı
las B	F- 5′ACAGGTAGAACGCACGGTTG 3′ R-5′ GATCGACGTGTCCAAACTCC3′	1220 bç	57°C

%1'lik agaroz jel için 0,3 gr agar tartılmıştır. 30 ml 1X TAE ile 250 ml'lik cam kavanozda mikrodalgada ısıtılarak karıştırılmıştır. Karışım homojenize olma sürecinde ara ara mikrodalgadan çıkartılarak homojenliği kontrol edilmiştir. Homojenizasyonundan emin olunan karışım 45-50℃'ye soğutulduktan sonra Etidyum bromür (EtBr) (2ul) eklenmiştir. EtBr eklenen karışım homojen oluncaya dek hafifçe döndürülerek çalkalanmıştır. Ve ardından jel kalıbına dökülmüştür. Hazırlanan jel kalıbına yüklenen örnekler 100V, 45 dk yürütülerek incelenmiştir.

3.10. Biyofilm Yöntemi

Kristal viyole boyama ile mikrotiter plak metodu kullanılmıştır. U tabanlı 96 kuyucuklu plakların her bir kuyucuğuna 180µl TSB (Tryptic Soy Broth) eklenmiştir. İlk kuyucuk negatif kontrol (20 µl distile su) için bırakılmıştır. Diğer kuyucukların her birine 0,5 Mcfarland bakteri süspansiyonundan 20µl her üç kuyucuk tek bir izolata ait olacak şekilde eklenmiştir. 18-20s çalkalamalı etüvde (100rpm) inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklarda bulunan TSB pipet yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Kuyucuklara, 200µl distile su ile üç kere yıkama işlemi uygulanmıştır. Daha sonra 200µl metanol eklenerek 20 dk beklenmiştir. Metanol uzaklaştırılarak plaklar kabin içerisindeki steril ortamda kapakları açık şekilde bekletilerek kurutulmuştur. Ardından her bir kuyucuğa %1'lik kristal viyole eklenerek 15 dk bekletilmiştir. Distile su ile tekrar üç kez yıkama yapılmıştır. Son olarak bir süre kuruması beklenen plakların her bir kuyucuğuna 100µl etil alkol eklenerek 620 nm'de ELISA cihazında okutulmuştur. [63]

3.11.Antibiyotik Duyarlılık Testleri

3.11.1.Sıvı Mikrodilüsyon

Antibiyotik duyarlılığı için sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır. Katyon ayarlı Mueller-Hinton sıvı besiyerinden U tabanlı 96 kuyucuklu mikroplak kuyucuklarının her birine 100 µl konulmuştur. A1 sterilite kontrol olarak bırakılırken A2 üreme kontrol olarak kullanılmıştır. Üreme kontrol olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853 kullanılmıştır. Sterilite kontrol için KAMHB kullanılmıştır. Kalan kuyucuklardan ilkine her bir antibiyotiğin ilk konsantrasyonundan 100ul eklenerek seri dilüsyon ile son kuyucuğa kadar seyreltme işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından EUCAST önerilerine göre bakteri süspansiyonu 0,5 Mcfarland ($5x10^8$ CFU/ml)) olarak ayarlandıktan sonra 1/10 dilüe edilerek $5x10^7$ konsantrasyonu elde edilmiştir ve bu konsantrasyondaki süspansiyondan ilgili kuyucuklara 5ul eklenmiştir. Kuyucuklardaki son bakteri konsantrasyonu $5x10^5$ (CFU/ml) olmuştur. 37°C 24s inkübasyona bırakılmıştır. Son olarak kuyucuklardaki bulanıklıklar gözle değerlendirilerek MİK (Minumum İnhibisyon Konsantrasyonu)[64] sonuçları kaydedilmiştir.

Tablo 3.2. *P. aeruginosa* için antibiyotiklerin sınır değerleri

Antibiyotik adı	**MİK Sınır Değeri (mg/L)**	
	Duyarlı (S)≤	**Dirençli (R)>**
Meropenem	2	8
Seftazidim	0,0001	8
Sefepim	0,0001	8
Kolistin	4	4

3.11.1.1.Antibiyotik Çözeltilerinin Hazırlanması

Tüm antibiyotiklerin çözücüsü olarak steril distile su tercih edilmiştir. EUCAST önerilerine göre her bir antibiyotik için duyarlılık ve direnç sınır değerlerini kapsayacak şekilde dilüsyon oranları belirlenmiştir.

Antibiyotik miktarı; ml cinsinden çözücü hacminin, antibiyotik konsantrasyonu (µg/ml) ile çarpımının antibiyotiğin potensine (µg/ml) bölünmesi ile elde edilmiştir.

3.11.2.Disk Elüsyon

Katyon ayarlı Mueller Hinton Broth (KAMHB) besiyeri hazırlanmıştır. Testte 15ml steril cam tüpler kullanılmıştır. Bir izolat için 4 cam tüp ayrılmıştır. Her tüpe 10ml KAMHB eklenmiş ve ilk tüp üreme kontrol için bırakılmıştır. Üreme kontrol için *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşu kullanılmıştır. Sonraki tüpleri sırasıyla 1, 2 ve 4 adet kolistin disk (10ug) eklenmiştir. 30 dk boyunca oda sıcaklığına bırakılmıştır. Sonrasında hazırlanan 0,5 Mcfarland bakteri süspansiyonundan her bir tüpe 50ul inokule edilmiştir. Ve 37°C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Test sonucunda tüplerdeki bulanıklarlar değerlendirilmiştir.[6] Bulanıklığın gözlenmediği ilk kuyucuk MİK değeri olarak belirlenmiştir.

Sonuçlar EUCAST breakpoint tablosuna göre değerlendirilmiştir.[64]

3.11.3.Rezasurine Dayalı Hızlı Polimiksin-NP

İki tane kolistin içeren ve kolistin içermeyen iki Müeller-Hınton Broth (MHB) solüsyonu hazırlanmıştır. Kolistin içeren MHB besiyeri konsantrasyonu 4mg/L olarak ayarlanmıştır.

96 kuyucuklu mikroplatelerin ilk yatay sırasına A1-A8 arası kolistin içermeyen MHB'den 180µl her bir kuyucuğa eklenmiştir. Sonraki yatay sıradaki kuyucukların her birisine (B1-B8) kolistin içeren MHB besiyerinden 180µl eklenmiştir. Bu şekilde bir sıra kolistin içermeyen besiyerlerinden bir sıra kolistin içeren besiyerlerinden eklenerek plaklar hazırlanmıştır. A1-B1 kuyucukları sterilite kontrol için A2-B2 üreme kontrol (*P. aeruginosa* ATCC 27853) A3-B3 pozitif kontrol (*E.coli* NCTC 13846) için bırakılmıştır. Bir örnek için aynı sütundaki üst üste denk gelen iki kuyucuk (A4-B4,...,A8-B8) çalışılmıştır. Sterilite kontrol için ayrılan kuyucuklara 20ul %0,85'lik NaCl çözeltisi eklenmiştir. Üreme kontrol, pozitif kontrol ve örneklerde kullanılacak bakteri süspansiyonları 3 Mcfarland olarak ayarlanmıştır. Ve ilgili kuyucuklara 20 ul inoküle edilmiştir. Böylelikle kolistin içeren kuyucuklardaki son konsantrasyon 3,75mg/L hale gelmiştir. Hazırlanan plateler 37℃'de 3s inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon süresi sonunda %0,1'lik rezasurin boya çözeltisinden 22ul her bir kuyucuğa eklenmiştir. Her 15 dk'da bir renk değişimleri kontrol edilecek şekilde 1s etüve kaldırılmıştır.

Üremenin olduğu kuyucuklarda maviden pembe/mor rengine dönüşüm görüldüğü kuyucuklarda test pozitif olarak kabul edilmiştir.

3.12.*mcr-1*

Sıvı Mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenen kolistin dirençli suşlarda *mcr-1* genine bakılmıştır. Yoğun bakım ve servis hasta gruplarında kolistin direnci gözlenen toplam 26 hasta çalışmaya dahil edilmiştir.

PZR amplifikasyonu, 2 µl örnek DNA'sı, 25 µl 2x GoTaq DNA PCR Master Mix ve 1 µM konsantrasyonda her bir primerden 5 µl eklenmiştir. Primer (Sentebio, Türkiye) bilgileri tabloda gösterilmiştir (Tablo 3.3.). 13µl nükleaz içermeyen su ilave edilmiştir. Böylelikle pzr tüplerindeki total hacim 50µl olmuştur.

PZR koşulları;

94 °C'de 15 dakika ilk denatürasyon, 94 °C'de 30 saniye 25 döngü denatürasyon, 54 °C'de 90 sn bağlanma, 72 °C' de 60 saniye uzama ardından 72 °C'de 10 dk süreyle son bir uzatma adımı şeklinde gerçekleştirilmiştir.[65]

Tablo 3.3 *mcr-1* için kullanılan primer sekans bilgileri

Hedef gen	Primer sekansı	Çoğaltılacak bölge büyüklüğü(bç)	Bağlanma sıcaklığı
mcr-1	F-5′-CGGTCAGTCCGTTTGTTC-3′ R-5′-CTTGGTCGGTCTGTAGGG-3′	309 bç	54°C

%1,5'luk agaroz jel için 0,45gr agar tartılarak 30ml 1X TAE içerisinde çözülmüştür. Mikrodalga kullanılarak homojenize hale getirilen çözelti 45-50°C'ye soğutulduktan sonra 1,5µl EtBr eklenmiştir. Çözelti jel kalıbına dökülmeye hazır hale geldiğinde kalıba dökülerek katılaşması beklenmiştir. Ardından katılaşan jel tanka yerleştirilerek örnekler kuyucuklara yüklenmiştir. PZR'da çoğaltılan örnekler jelde 100V 40 dk yürütülerek otoradyografide sonuçlar incelenmiştir.

3.13.İstatistiksel Analiz

Tüm sonuçların istatistiksel yorumlanması, IBM SPSS 20.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) paket programı ile gerçekleştirilmiştir. Nümerik değişkenler frekans (yüzdelikler) olarak verilmiştir.

Gruplar arası farklılıkları kategorik değişkenlerde Fisher's Exact kikare testi, Yates' kikare testi ve Monte Carlo kikare testi ile değerlendirilmiştir. Ek olarak yeni yöntemlerin tanı değerlerini belirlemek amacıyla duyarlılık ve özgüllük oranları belirlenmiştir. $p<0.05$ iki yönlü testlerde istatistiksel önemlilik için yeterli kabul edilmiştir.

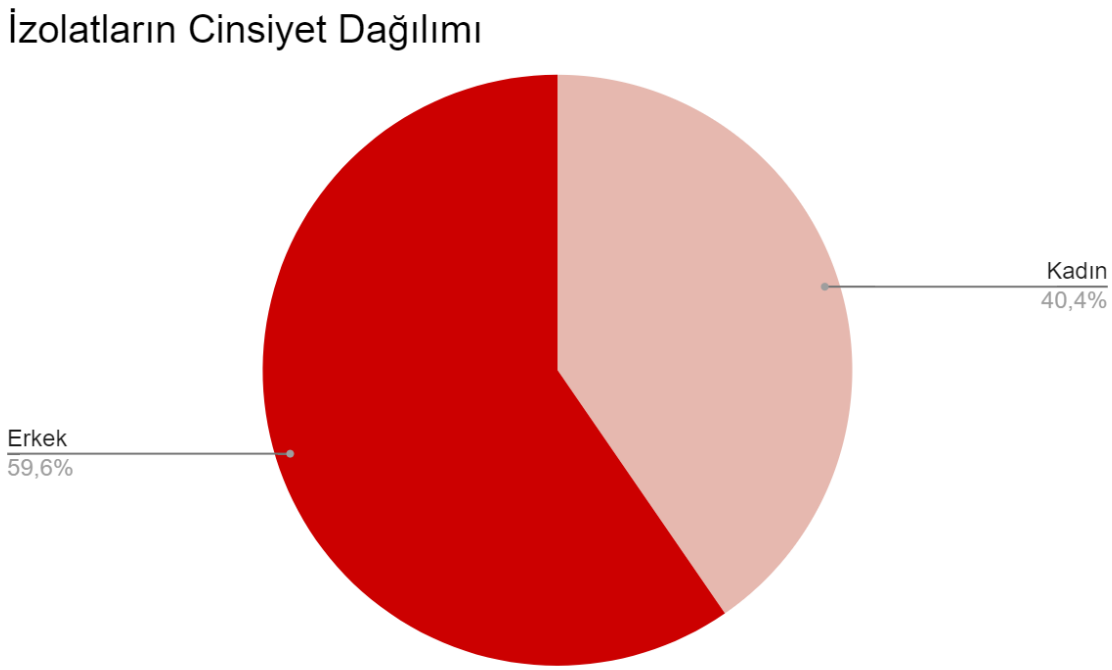
4.BULGULAR

4.1.Örnek Toplama ve İdentifikasyon

Çalışmaya dahil edilen örneklerin Gram boyaması, hemoliz aktivitesi ve oksidaz testi yapılmıştır. İzolatlar Gram negatif hücre duvar yapısına sahip olduğundan mikroskop altında bakteriler kırmızı renkte görülmüştür. Oksidaz test sonuçları da pozitif sonuç vermiştir.

Kan, idrar, diğer (kateter, göz v.b.) örneklerden izole edilen *P. aeruginosa* suşlarının yoğun bakım ve servis örneklerine göre dağılımı tabloda gösterilmiştir (Tablo 4.1.).

Çalışma grubunda total örnek sayısının (208) 84'ü kadın hastalardan oluşurken 124'ü erkek hasta örneklerinden oluşmaktadır (Şekil 4.1.).

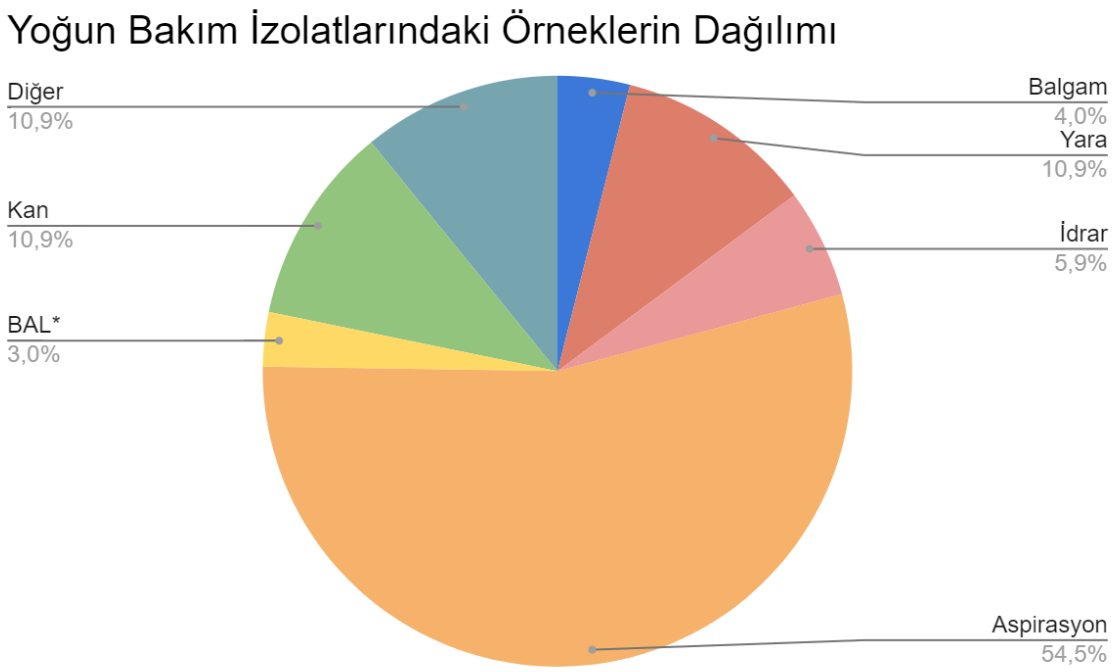


Şekil 4.1. Örneklerin cinsiyetlere göre dağılımı

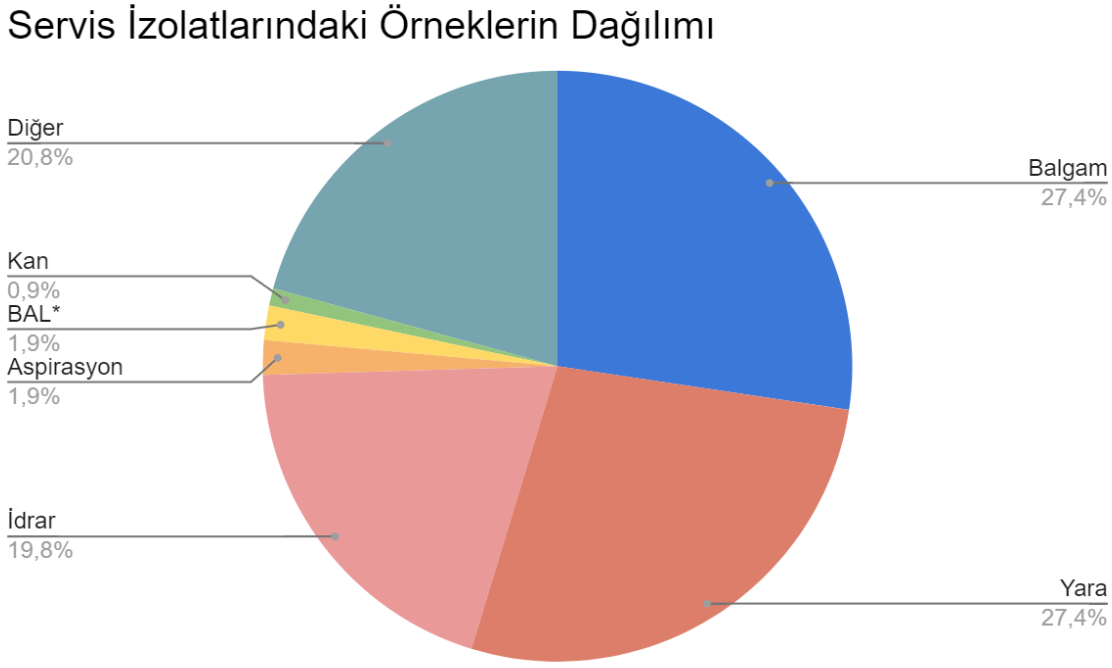
Tablo 4.1. *P. aeruginosa* izolatlarının alındığı örnek türlerinin gruplara göre dağılımı

Örnek türü	**Yoğun bakım**	**Servis**
Balgam	4	29
Yara	11	29
İdrar	6	21
Aspirasyon	55	2
BAL*	4	2
Kan	11	1
Diğer	11	22

*BAL:Bronkoalveolar lavaj



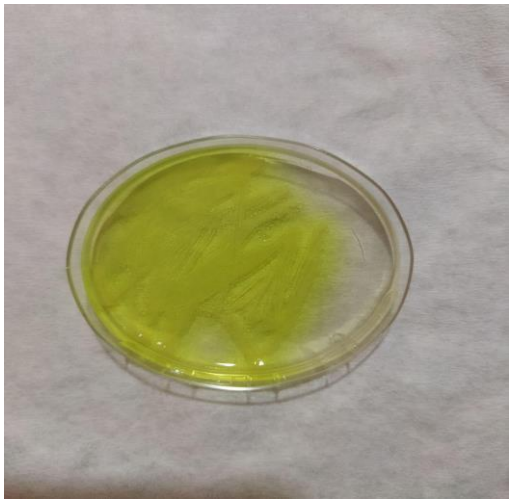
Şekil 4.2. Yoğun bakım izolatlarının örnek türlerine göre dağılımı



Şekil 4.3. Servis izolatlarının örnek türlerine göre dağılımı

4.2.Piyoverdin

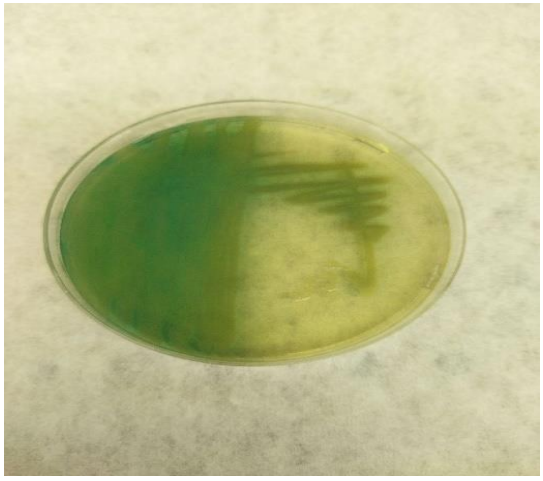
Çalışılan izolatların büyük bir çoğunluğunda piyoverdin üretimi görülmüştür. Yoğun bakım hasta örneklerinin %86,2'inde ve servis hastalarının %86,7'sinde piyoverdin üretimi gözlenmiştir.



Şekil 4.4. Piyoverdin pozitif izolat sonucu

4.3.Piyosiyanin

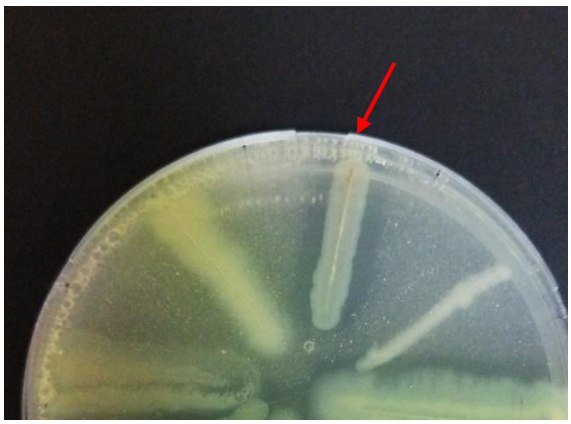
Piyosiyanin üreten suşların toplam suşlara oranı yoğun bakım hasta grubunda %90,1 ve servis hasta gruplarında %89,6 olarak görülmüştür.



Şekil 4.5. Piyosiyanin pozitif izolat sonucu

4.4.Elastaz Aktivitesi

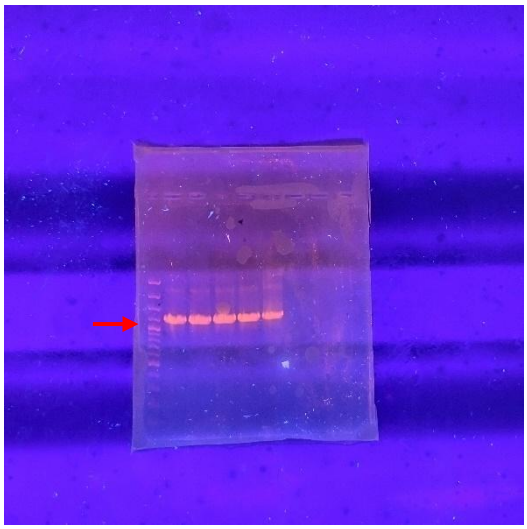
Ekim çizgisinin etrafındaki açıklık (Şekil 4.6.) pozitif kabul edilir. Servis hastalarının %67,9'sında ve yoğun bakım hastalarının %68,6'sında elastaz aktivitesi pozitif olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.6. Elastaz test sonucu pozitif izolat görüntüsü

4.5.*las B*

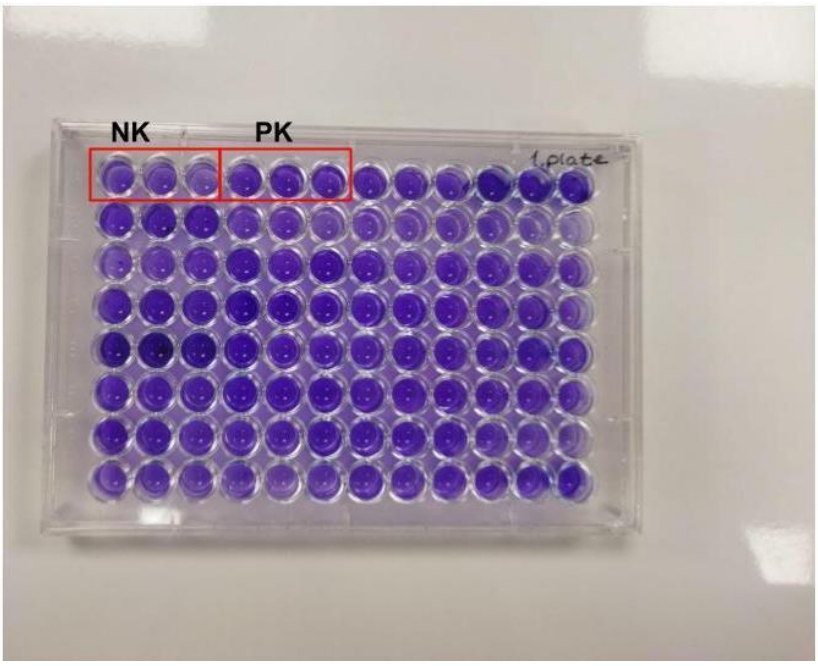
Elastaz aktivitesinin moleküler olarak değerlendirdiği bu yöntemde çalışılan izolatlardan yoğun bakım hasta gruplarında %93,1'ünde ve servis hasta gruplarında %89,6'unda pozitif olarak gözlenmiştir. Şekilde görüldüğü üzere yükleme kuyucuklarından sonraki görülen 4.bant (1200bç) çizgisine yakın bir konumda görülmüştür (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. *las B* geni (1220 bç) jel görüntüsü.

4.6.Biyofilm

Yoğun bakım hasta örneklerinin (102), 53'ünde biyofilm varlığı görülürken servis hastalarının (106), 51'inde biyofilm varlığı görülmüştür. Negatif kontrol olarak steril TSB besiyeri ve pozitif kontrol olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853 kullanılmıştır.



Şekil 4.8. Kristal viyole yöntemi kullanılarak hazırlanan mikroplak

Tablo 4.2. 208 *P. aeruginosa* izolatındaki virülans faktörlerinin dağılımı

Örnek Türü	Yoğun Bakım					Servis				
	Piyosiyanin	Piyoverdin	*las B*	Elastaz	Biyofilm	Piyosiyanin	Piyoverdin	*las B*	Elastaz	Biyofilm
Balgam	2	2	3	3	3	23	27	26	19	17
Yara	10	10	11	8	6	26	25	26	26	12
İdrar	4	6	4	3	6	18	17	18	14	11
ASP*	50	50	55	39	28	2	2	2	1	0
BAL*	3	3	3	2	1	2	2	2	2	1
Kan	8	10	9	8	6	1	1	1	1	0
Diğer	11	11	11	7	1	20	21	20	15	10

* ASP:Aspirasyon, *BAL:Bronkoalveolar lavaj

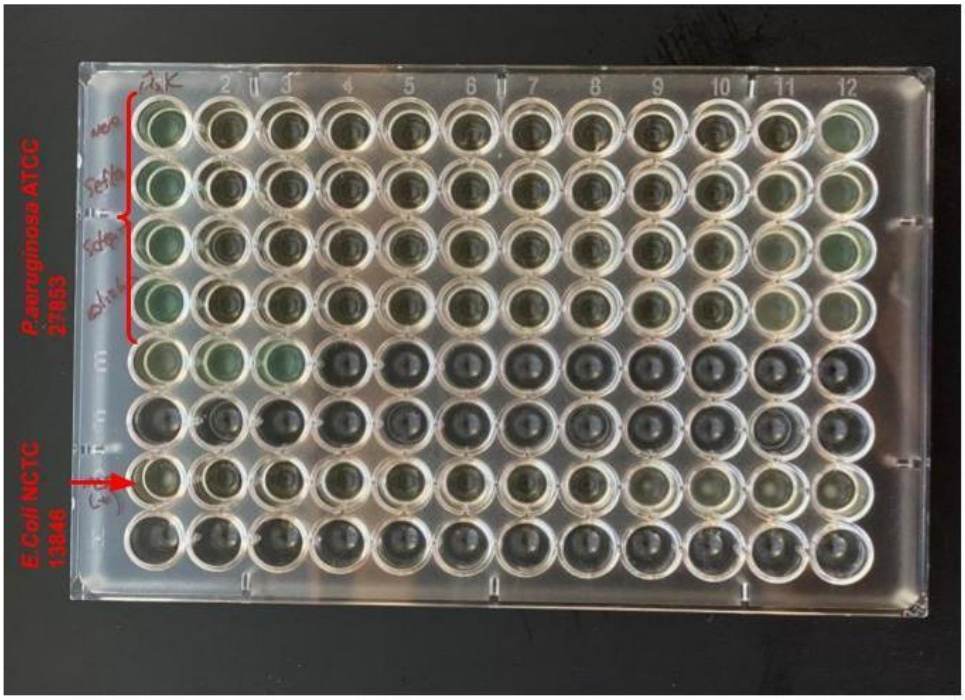
Yoğun bakım hasta grubundaki 55 aspirasyon örneğinin 50'sinde piyosiyanin ve piyoverdin ve tamamında *las B* faktörleri tespit edilirken, servis hasta grubundaki çoğunluğu oluşturan balgam (29) ve yara (29) örneklerinde en sık piyosiyanin, piyoverdin, *las B* ve elastaz faktörleri görülmüştür (Tablo 4.2.).

4.7.Antibiyotik Duyarlılıkları

4.7.1.Sıvı Mikrodilüsyon

P. aeruginosa için meropenem, kolistin, seftazidim, sefepim antibiyotikleri değerlendirilmiştir. Sonuçların EUCAST tablosuna göre MİK değerleri belirlenmiştir. Şekildeki görselde ilk sütun A1-G1 üreme kontrol için bırakılmıştır. Meropenem antibiyotiğinin değerlendirildiği kuyucukların (A2-12) ilk konsantrasyonu 128 µg/ml belirlenmiştir. Görüldüğü gibi MİK değeri 0,25µg/ml olarak bulunmuştur (Şekil.4.9.). Bu da standart suşumuz (*P. aeruginosa* ATCC 27853) için EUCAST'da gösterilen kalite kontrol tablosundaki[64] değerler ile örtüşmüştür. Seftazidim ve sefepim için ilk kuyucuk konsantrasyonları 256 µg/ml olarak ayarlanmıştır. Her ikisinde de standart suşumuz (*P. aeruginosa* ATCC 27853) için bulunan MİK değeri 1µg/ml olarak bulunmuştur.

Kolistin için iki standart suş değerlendirmesi gerçekleştirilmiştir. Bunlardan birisi negatif kontrol (NK) kolistin duyarlı suşumuz *P. aeruginosa* ATCC 27853 diğeri ise pozitif kontrol (PK) kolistin dirençli suşumuz *mcr-1* NCTC 13846 *E. coli*'dir. Kolistin için duyarlı suşumuz D-E yatay sırasında çalışılmıştır. Kolistinin ilk konsantrasyonu (D2) 128ug/ml olarak belirlenmiştir. Negatif kontrol, MİK değeri 0,5µg/ml olarak gözlenmiştir. Pozitif kontrol için G yatay sırasında değerlendirilmiş olup MİK değeri 2µg/ml olarak bulunmuştur.



Şekil 4.9. Sıvı Mikrodilüsyon ile antibiyotik duyarlılık sonuçları

Yoğun bakım ve servis hasta gruplarında görülen antibiyotik direnç sayıları ve yüzdeleri tabloda gösterilmiş ve sıvı mikrodilüsyon ile belirlenen antibiyotik duyarlılıkları gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemiştir (Tablo 4.3.). Çalışılan antibiyotiklerden en yüksek direnç oranına sahip antibiyotik, her iki grupta da dördüncü kuşak sefalosporin grubuna ait olan sefepim olmuştur. Her iki grupta en düşük direnç oranı kolistin antibiyotiğine karşı olmuştur.

Tablo 4.3. Sıvı Mikrodilüsyon ile Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları

Antibiyotikler	**Yoğun Bakım(YB) N (%)**	**MİK50 Yoğun Bakım (µg/ml)**	**MİK90 Yoğun Bakım (µg/ml)**	**Servis (S) N (%)**	**MİK50 Servis (µg/ml)**	**MİK90 Servis (µg/ml)**	***p* değeri**
Meropenem	42(41,1)	4	32	31(28,9)	1	16	0,079
Kolistin	12(11,7)	<0,125	2	14(13,2)	<0,125	1	0,733
Seftazidim	44(43,1)	4	128	44(41,1)	4	64	0,860
Sefepim	54(52,9)	8	64	52(48,5)	8	32	0,626

Tablo 4.4. Yoğun bakım hasta grubundaki antibiyotik direnci ve virülans faktörleri görülme sıklığı arasındaki ilişki

Virülans Faktörleri		Meropenem		Kolistin		Seftazidim		Sefepim	
		D	R	D	R	D	R	D	R
Piyosiyanin	+	54	38	81	11	53	39	44	48
	-	6	4	9	1	5	5	4	6
p değeri		1,000		1,000		0,742		0,746	
Piyoverdin	+	53	35	78	10	51	37	44	44
	-	7	7	12	2	7	7	4	10
p değeri		0,667		0,668		0,789		0,360	
las B	+	55	40	84	11	52	43	46	49
	-	5	2	6	1	6	1	2	5
p değeri		0,697		1,000		0,137		0,442	
Elastaz	+	50	20	60	10	44	26	42	28
	-	10	22	30	2	14	18	6	26
p değeri		<0,001		0,331		0,111		<0,001	
Biyofilm	+	29	24	44	9	32	21	24	29
	-	31	18	46	3	26	23	24	25
p değeri		0,500		0,164		0,586		0,861	

Yoğun bakım hasta grubundaki izolatlarda değerledirilen tüm virülans faktörleri ve antibiyotik dirençleri arasındaki ilişki incelendiğinde elastaz ile meropenem ve sefepim direnci arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunmuştur (Tablo 4.4.).

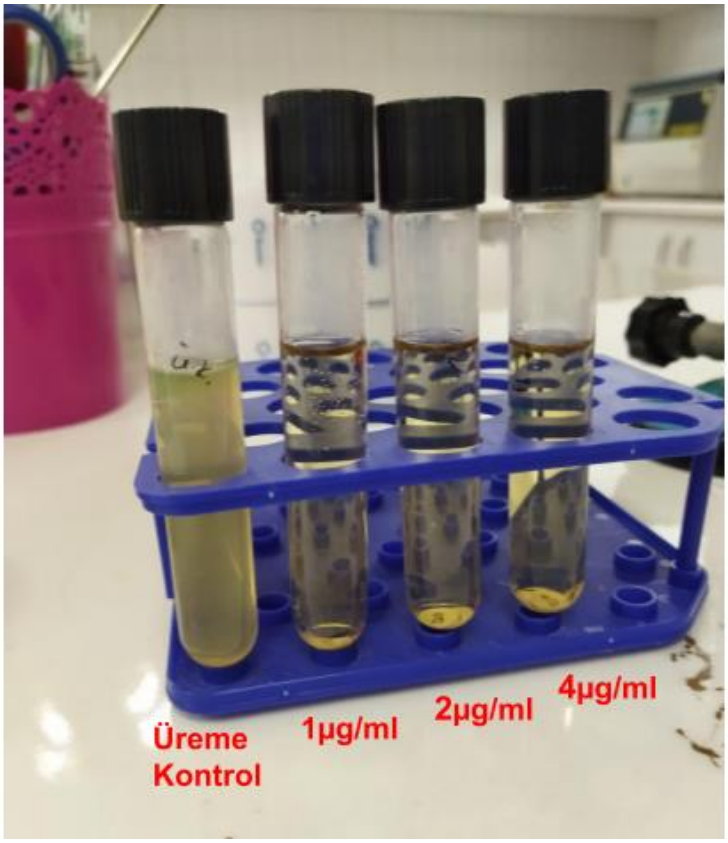
Tablo 4.5. Servis hasta grubu içerisindeki antibiyotik direnci ve virülans faktörleri arasındaki ilişki

Virülans Faktörleri		Meropenem		Kolistin		Seftazidim		Sefepim	
		D	R	D	R	D	R	D	R
Piyosiyanin	+	69	26	87	8	59	36	51	44
	-	6	5	5	6	3	8	3	8
p değeri		0,292		0,001		0,048		0,180	
Piyoverdin	+	63	29	82	10	54	38	47	45
	-	12	2	10	4	8	6	7	7
p değeri		0,226		0,088		1,000		1,000	
las B	+	65	30	85	10	55	40	48	47
	-	10	1	7	4	7	4	6	5
p değeri		0,169		0,037		1,000		1,000	
Elastaz	+	52	20	64	8	45	27	38	34
	-	23	11	28	6	17	17	16	18
p değeri		0,799		0,370		0,313		0,342	
Biyofilm	+	38	13	46	5	31	20	28	23
	-	37	18	46	9	31	24	26	29
p değeri		0,545		0,478		0,792		0,432	

Servis hasta grubundaki virülans faktörlerinin görülme sıklığı ve antibiyotik direnci arasındaki ilişki incelendiğinde *las B* ve piyosiyanin ile kolistin direnci arasında ve seftazidim ile piyosiyanin arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur (Tablo 4.5.).

4.7.2.Disk Elüsyon

Pozitif kontrol olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853 kullanılmıştır. Tüplerdeki bulanıklık pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.10.). Referans olarak EUCAST kullanılarak >4µg/ml dirençli olarak kabul edilmiştir. Çalışma sonuçlarımıza göre 106 servis hastasının 17'sinde (%16,0) ve 102 yoğun bakım hasta örneğinin 18'inde dirençli izolat (%17,6) tespit edilmiştir.



Şekil 4.10. *P. aerginosa* ATCC 27853 disk elüsyon sonucu.

Tablo 4.6. Sıvı Mikrodilüsyon ve Disk Elüsyon sonuçlarının karşılaştırılması

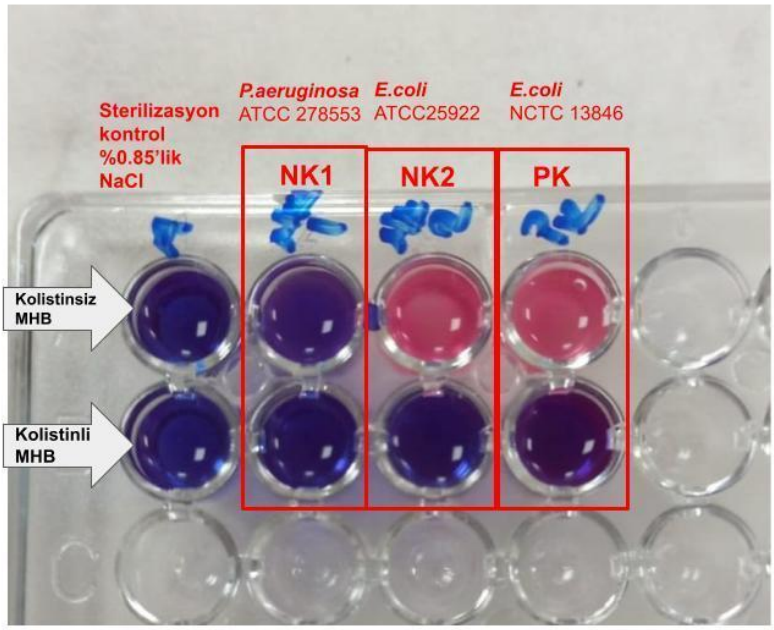
Yöntemler	Kolistin Duyarlı N(<4µg/ml)			Kolistin Dirençli N (>4µg/ml)		
	Yoğun Bakım	Servis	*p* değeri	Yoğun Bakım	Servis	*p* değeri
Sıvı Mikrodilüsyon	90	92	0,916	12	14	0,916
Disk Elüsyon	84	89	0,901	18	17	0,901

Sıvı mikrodilüsyon ile 102 yoğun bakım hasta örneğinin %11,7'sinde direnç gözlenirken, disk elüsyon yöntemi ile %17,6'sında direnç gözlenmiştir. 106 servis hasta örneğinin sıvı mikrodilüsyon ile %13,2'si disk elüsyon ile %16,0'ünde kolistin direnci tespit edilmiştir (Tablo 4.6.). Kolistin için değerlendirdiğimiz disk elüsyon yönteminin duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla %84 ve %88 olarak bulunmuştur.

4.7.3.Rezasurine Dayalı Hızlı Polimiksin

Yoğun bakım hasta örneklerinin %10,7'sinde servis hasta örneklerinin %16,9'unda kolistin direnci görülmüştür. Sonuçlar 4µg/ml MİK değerine göre duyarlı ve dirençli olarak belirlenmiştir. Kolistin içeren besiyerlerinde renk değişiminin olduğu kuyucuklardaki izolatlar kolistine dirençli olarak belirlenmiştir.

Resimde görülen A yatay sırası kolistin içermeyen MHB ve B yatay sırası kolistin içeren besiyerlerinden oluşturulmuştur. İlk sütün A1-B1 sterilizasyon kuyucuklarıdır ve %0,85'lik NaCl (20µl) çözeltisi ile hazırlanmıştır. İkinci sütun (A2-B2) ilk negatif kontrol *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşunun bulunduğu kuyucuklardan, üçüncü sütün diğer negatif kontrol *E.coli* ATCC 25922 suşunun bulunduğu ve son sütun pozitif kontrol *E.coli* NCTC 13846 suşunun bulunduğu kuyucuklardır. A2-A4 sırasında beklenildiği gibi kolistin içermeyen MHB içerisinde tüm suşlar üreme göstermiş ve kuyucuklardaki renk mor-pembe rengine dönmüştür. İkinci yatay sırada yine beklediğimiz gibi sadece kolistin direnci bulunan suşumuzun olduğu kuyucukta üreme görülmüştür (B4) (Şekil 4.11.).



Şekil 4.11. Rezasurine dayalı hızlı polimiksin test sonucu, pembe-mor (+)

Tablo 4.7. Sıvı Mikrodilüsyon ve Hızlı Polimiksin sonuçlarının karşılaştırılması

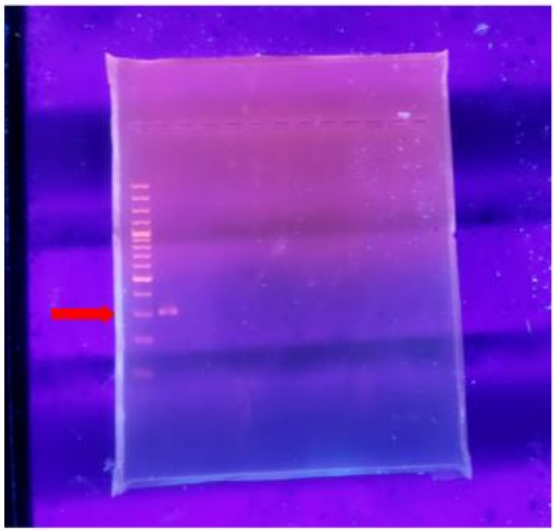
Yöntemler	**Kolistin Duyarlı N(<4µg/ml)**			**Kolistin Dirençli N (>4µg/ml)**		
	Yoğun Bakım	**Servis**	***p* değeri**	**Yoğun Bakım**	**Servis**	***p* değeri**
Sıvı Mikrodilüsyon	90	92	0,916	12	14	0,916
Rezasurine Dayalı Hızlı Polimiksin	91	88	0,276	11	18	0,276

Sıvı mikrodilüsyon sonucuna göre kolistin direnci yoğun bakım örneklerinin %11,7 servis hastalarının %13,2'sinde görülmüştür. Buna karşılık rezasurine dayalı hızlı polimiksin yöntemiyle yoğun bakım hasta örneklerinin %10,7'sinde servis hasta örneklerinin %16,9'unda kolistin direnci görülmüştür.

Her iki yöntemde de hasta grupları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. Bununla birlikte test edilen rezasurine dayalı hızlı polimiksin metodunun duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla %87 ve %92 bulunmuştur.

4.7.4.*mcr-1*

Kolistin için referans yöntem olan Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemine göre belirlenen her iki gruptaki kolistin dirençli suşlarımızın hiçbirisinde *mcr-1* genine rastlanmamıştır. Şekilde pozitif kontrolün jel görüntüsü görülmektedir (Şekil 4.12.). Çalışmada dirençli suş olarak *E. coli* NCTC 13846 (pozitif kontrol) ve duyarlı suş olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853 kullanılmıştır. PZR için negatif kontrol distile su kullanılmıştır.



Şekil 4.12. *E. coli* 13846 *mcr-1* (+) jel görüntüsü

5.Tartışma

Askeri doktor olan Charles-Emmanuel Sédillot, 1850'de *P. aeruginosa*'yı içeren enfeksiyondan bahseden ilk kişidir. Sonraki yıllarda Carl Gessard yara örneklerinden *P. aeruginosa*'yı ilk kez başarılı bir şekilde izole etmiştir. İkisi de cerrahi yara örneklerindeki mavi-yeşil renk değişimi ile fark etmiştir.[66]

P. aeruginosa, gram-negatif bakterilerin neden olduğu hastane kaynaklı enfeksiyonlarda; özellikle bağışıklığı baskılanmış bireylerde en sık görülen bakterilerdendir.[67,68] Kanser ilaçları alan hastalarda bakteriyemi ve sepsisin önde gelen nedenidir ayrıca diyabetik ülserlerde, yanık yaralarında, cerrahi yaralarda ve kornea ülserlerinde sık görülen bir enfeksiyon etkenidir ve kronik kistik fibroz hastaları için ölümcül bir etkiye sahiptir.[68] Bu bakterinin klinik açıdan önemli olmasının nedenleri arasında hücre ile ilişkili ve hücre dışı salgıladığı enzim, toksin ve yapısal elemanları dahil birçok virülans faktörüne sahip olması ve çok sayıda antibiyotiğe karşı direnç geliştirmiş olması bulunmaktadır.

Virülans faktörleri, konak organizmaya çeşitli mekanizmalar ile zarar vermesinin yanı sıra bakterinin, konak organizmanın bağışıklık yanıtına karşı savunmasını da sağlamaktadır.[11] Çalışmamızda *P. aeruginosa* için önemli olduğunu düşündüğümüz piyosiyanin, piyoverdin, elastaz enzim aktivitesi ve biyofilm oluşumu değerlendirilmiştir. Örneklem grubunda enfeksiyon açısından dezavantajlı görülen; yoğun bakım ve servis hastaları tercih edilmiştir. Toplam 208 adet *P. aeruginos*a izolatları çalışmaya dahil edilmiştir. Örneklerin 84'ü kadın hastalardan 124'ü erkek hastalardan oluşmaktadır. Yoğun bakım hasta grubunda en çok bulunan örnek türü aspirasyonken, servis hastası grubundaki en sık örnek türü yara ve balgam örnekleri olmuştur.

Piyosiyanin, *P. aeruginosa* için en önemli virülans faktörlerindendir ve suşlarının %90'ından fazlası tarafından üretilmektedir.[6] 2018 yılında solunum izolatları ile yapılan çalışmada izolatların %87'sinde piyosiyanin üretimi tespit edilmiştir.[70] Çalışmamızda da her iki izolat grubunda büyük oranda (%89,6 servis, %90,1 yoğun bakım) piyosiyanin tespit edilmiştir. Piyoverdin bakterinin sideroforu olarak görev yaparak ortamdaki demiri bağlamaktadır ve konak organizmanın demiri kullanmasını engellemede görev almaktadır.

Önemli bir virülans faktörü olan piyoverdinin, kistik fibrozis hastalarında hastalık patojenitesiyle ve akciğerlerdeki birikiminin mortalite artışı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.[14] 2023 yılında yayınlanan çoklu ilaç direncine sahip 10 *P.aeruginosa* izolatı ile yapılan çalışmada: izolatların %100' ünde piyoverdine üretimi gözlenmiştir.[71] Bir başka çalışmada nispeten düşük bir sonuç elde edilmiş ve 80 klinik izolatın %58,8'inde tespit edilmiştir.[72] Bunun nedeni olarak örneklem grubunun büyük bir çoğunluğunun çoklu ilaç direnci bulunan *P.aeruginosa* izolatları ile ilişkili olduğu düşünülmüştür. Örneklem grubumuzda çoklu ilaç direncine sahip izolatımız çok düşük bir orana sahiptir. Piyoverdin faktörü açısından bulgularımızı değerlendirdiğimizde her iki örneklem grubumuzda da piyoverdin (%86,7 servis, %86,2 yoğun bakım) daha yüksek frekanslarda bulunmuştur.

Klinik örneklerden elde edilen *P. aeruginosa* izolatlarında elastaz aktivitesi belirgin olarak gözlenmektedir. Elastaz, *las B* geninin asıl sorumlu olduğu ve bunun dışında üç gen (*las A, las R, rhlR*) tarafından da düzenlenen, elastin, fibrinojen, kolajen gibi hücresel ve hücreler arası bağlantı elemanlarını parçalayan bir enzimdir.[73] Çalışmamızda bu enzimin aktivitesi hem gen bazında hem de biyokimyasal metod ile incelenmiştir. Ayrıca örneklem gruplarındaki prevalansları arasında farklılık olup olmadığı da araştırılmıştır. Moleküler olarak değerlendirdiğimiz *las B*, daha önceki yayınlanan çalışmalar ile korele olarak izolatların çok büyük bir kısmında tespit edilmiştir.[70,74] 61 klinik izolat ile yapılan bir çalışmada *las B* varlığı %98 olarak bulunmuştur.[70] Brezilya'da elastaz aktivitesi için *las A* ve *las B*'inin incelendiği bir başka çalışmada izolatların %100'ünde *las B* ve %82,5'unda *las A* genini tespit etmişlerdir.[74] Elastaz aktivitesini fenotipik olarak değerlendirdiğimizde; servis hastalarının %67,9'unda, yoğun bakım hastalarının %68,6'sında görülmüştür. 2019 yılında yayınlanan bir çalışmada farklı kliniklerden izole edilen 83 adet *P.aeruginosa* örneğinde elastaz enzim aktivitesi değerlendirilmiş ve %100 enzim aktivitesi gözlenmiştir.[75] Bununla birlikte çalışmamızdaki sonuçlara benzer şekilde Kasım 2021'de yayınlanan Pittsburgh Üniversitesi Tıp Merkezi'ndeki yoğun bakım hastalarından izole edilen *P.aeruginosa* suşlarında elastaz aktivitesi incelendiğinde, izolatların %75'inde saptanmış ve bu durum mortalite artışı ile ilişkilendirilmiştir.[76] Elastaz aktivitesini moleküler ve fenotipik olarak değerlendirdiğimizde gruplar arası anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Bunun yanı sıra moleküler prevanlansı fenotipik prevalanstan daha fazla olarak tespit edilmiştir ve *las B* geni bulunan izolatlarımızın bazılarında fenotipik olarak enzim aktivitesi görülmemiştir. *las B* geninin ifadesinin baskılanmasını bu durumdan sorumlu olabileceğini düşünmekteyiz.

Biyofilm bakterilerin stres koşulları altında hayatta kalmalarını sağlayan mikrobiyal topluluklardır. Bakteriler bu oluşum sayesinde antibiyotiklere karşı da daha dirençli hale gelmektedirler. *P. aeruginosa*'nın virülansında en önemli faktörlerden biri olan biyofilm oluşumunu örneklem grubumuzdaki servis hastalarının %48,1'inde ve yoğun bakım hastalarının %51,9'unda saptanmıştır. Yoğun bakım hasta grubunda biyofilm varlığı en fazla aspirasyon örneklerinde gözlenmiştir. Aspirasyon örneklerinin örneklem grubumuzun büyük bir kısmını oluşturmasını bunun nedeni olarak düşünmekteyiz. Ülkemizde daha önce kistik fibrozisli hastalardan izole edilen 60 *P. aeruginosa* izolatı incelenmiş ve bunların %33'ünün biyofilm oluşturduğu görülmüştür.[77] Yanık yaralarından elde edilen *P. aeruginosa* izolatları ile 2015 yılında yayınlanan bir başka çalışmada 144 izolatta %92,4 oranında biyofilm oluşumu gözlenmiştir.[78] Çalışmamızda yoğun bakım hastalarındaki yara örneklerinden izole edilen *P. aeruginosa*'nın biyofilm varlığı daha düşük oranda bulunmuştur (%54,5 yoğun bakım; %41 servis ünitesi). Örneklem grubumuzda önceki çalışmadan farklı olarak izolatlarımızın çok küçük bir kısmı çoklu ilaç direncine sahip bakterilerden oluşmaktadır. Yanık yara örnekleri ile yapılan bir başka bir çalışmada 100 örnekten 27'sinde biyofilm oluşumu gözlenmiştir.[79] İran'da farklı klinik örneklerden izole edilen *P. aeruginosa* ile yapılan bir başka çalışmada 104 izolatın %58'inde biyofilm oluşumu tespit edilmiştir.[80]

Çoklu ilaca dirençli *P. aeruginosa*'nın neden olduğu enfeksiyonlar dünyada yaygınlaşmaktadır.[31] Antibiyotik direnci ve dirençli bakteriler özellikle hastanede uzun süre yatarak tedavi gören hasta gruplarını etkilemektedir.[1] *P. aeruginosa*'nın çok sayıda antibiyotiğe karşı geliştirdiği direnç ve birçok virülans faktörü ile enfeksiyonlarda morbidite ve mortalite oranlarının artması bu bakterinin önemini artırmaktadır. İran'da 2018 yılında yayınlanan bir çalışmada 138 *P.aeruginosa* klinik izolatında meropenem direnci %53,6 ve seftazidim direnci %63,7 olarak bulunmuştur.[32] Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *P.aeruginosa* ile yapılan farklı bir çalışmada ise, 175 izolatın %63'ü seftazidime, %5,3'ü meropeneme dirençli bulunmuştur.[33] Türkiye'de bir yoğun bakım ünitesinden alınan 120 *P.aeruginosa* izolatı ile yapılan bir çalışmada meropenem %90,1, seftazidim %7,5 olarak bulunmuştur.[34] Çalışmada meropenem direnci olan hastalarda serebrovasküler atak öyküsü olduğu açıklanmış ve seftazidim direnci nöroloji yoğun bakım ünitesinde yatış öyküsü olan hastalar ile ilişkilendirilmiştir.[34] Meropeneme dirençli grupta kardiyovasküler hastalık oranı ve serebrovasküler hastalık öyküsü anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Serebrovasküler hastalık öyküsünü, meropenem dirençli *P. aeruginosa* enfeksiyonları için

bağımsız bir risk faktörü olarak tanımlamışlardır.[34] Çalışmamızda seftazidim direnci daha yüksek (%43,1) ve meropenem (%41,1) direnci daha düşük bulunmuştur. Hasta grubumuzda sadece nöroloji yoğun bakım ünitesinden değil, genel yoğun bakım ünitesinden alınan örneklerin de bulunması bu farkta etkili olmuş olabilir. 2019 yılında ülkemizde yayınlanan retrospektif bir başka çalışmada ise klinik örneklerden elde edilen 631 *P. aeruginosa* izolatında meropenem, seftazidim ve sefepim direnci araştırılmış ve sırasıyla %23, %26 ve %28 olarak bulunmuştur.[81] Örnek grubunun büyüklüğü çalışma sonuçlarımızdaki direnç oranları arasındaki farklılıkta etkili olduğu düşünülmektedir. Dursun ve ark. çocuk yoğun bakım ünitesinde *P. aeruginosa* izolatları için seftazidime direnç oranını %33,8 ve sefepim direnç oranını %19,1 olarak saptamıştır.[82] Çalışmamızda yoğun bakım grubunda sefepim direnci %52,9 ve seftazidim direnci %43,1 olarak bulunmuştur. Dursun ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada sadece çocuk yoğun bakım ünitesindeki hastalar ile çalışılması ve örneklerin daha eski yıllara (2013-2017) ait olması bulgularımızdaki sefepim ve seftazidim direncindeki farklılığı açıklayabileceğini düşünmekteyiz.

2020 yılında Balıkesir Üniversitesi'nde yapılan bir başka çalışmada yoğun bakım ünitelerinden izole edilen *P. aeruginosa* suşlarında seftazidim direnci %29,4 ve sefepim direnci %28,13 olarak bulunmuştur.[83] Yine çalışmada *P. aeruginosa*'nın en çok izole edildiği örnek tipinin aspirasyon örneği olduğu tespit edilmiştir.

P. aeruginosa tedavisi için son seçeneklerden olduğu düşünülen kolistin, polmiksin grubu bir antibiyotiktir. Karbapenemler, florinolonlar ve sefalasporinler gibi *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında kullanılan antibiyotik gruplarına karşı artan direncin varlığı kolistinin tekrar tedavi programlarına eklenmesine neden olmuştur. Kolistin, katyonik bir polipeptit olarak, pozitif yüklüdür ve bakteriyel dış zarların LPS'sindeki lipid A'nın negatif yüklü fosfat grubuna bağlanabilmektedir. Bu etkileşim, zar stabilitesini bozarak sitoplazmik içeriğin sızmasına ve nihayetinde hücre parçalanmasına neden olmaktadır.[84]

P. aeruginosa enfeksiyonlarında kullanılmaya başlanan kolistine karşı direncin ortaya çıkması tedavi seçeneklerini kısıtlamaktadır. Bu yüzden kolistin direncinin insidansı önemli bir konudur. Ülkemizde bu konu hakkında yayınlanan makalelerde çalışma gruplarında çok düşük düzeyde kolistin direnci direnci tespit edilmiştir.[85,86]

Türkiye'de 2016 yılında Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde değerlendirilen klinik *P. aeruginosa* izolatlarının kolistin duyarlılığı %100 olarak bulunmuştur.[85] Yakın zamanda yapılan bir çalışmada yoğun bakım ünitelerinden izole edilen 420 *P. aeruginosa* izolatında %5 gibi çok düşük bir oranda kolistin direnci saptanmıştır.[86] Yoğun bakım hastalarından izole edilen suşlarımızın kolistin direnci %11,2 ile daha yüksek oranda

bulunmuştur. Örneklem grubumuzda kolistin direncinin daha yüksek bulunmasının nedenleri arasında yeni örneklerin (2018-2021) yer alması ve uzun süreli tedavi gören hastalardan izole edilen *P. aeruginosa* suşlarının dahil edilmesi yer almaktadır. 2018 yılında yayınlanan bir başka çalışmada Şafak ve ark. yatan hastalarda en etkili antibiyotiklerin amikasin ve kolistin olduğunu bildirmişlerdir.[87]

Santos ve ark. 62 klinik *P. aeruginosa* izolatında %3,89 oranında kolistin direnci bulmuştur.[88] 1997-2016 yılları arasında birçok bölgeden alınan verilerle yapılan sürveyans çalışmasında: *P. aeruginosa* en yaygın bakteri türlerinden biri olarak tespit edilmiştir. Aynı çalışmada Avrupa, Asya Pasifik Bölgesi ve Latin Amerika'da en sık izole edilen bakteriler arasında birinci sırada yer almıştır. Antibiyotik duyarlılıklarının da incelendiği bu çalışmada 2015-16 yılları arasındaki kolistin duyarlılığı Avrupa, Asya Pasifik bölgesi ve Latin Amerika'da sırasıyla %99,8, %99,7 ve %100,0 olarak bulunmuştur.[2]

Kolistin direncini belirlemek için EUCAST ve CLSI tarafından altın standart yöntem olarak Sıvı Mikrodilüsyon yöntemi önerilmektedir.[64,89] Fakat bu yöntem oldukça zahmetli ve zaman alıcı bir yöntemdir. Özellikle kritik öneme sahip hastalarda antibiyotik direnç profilinin belirlenip hızlı bir tedavi seçeneğinin oluşturulması önemlidir. Tedavi programlarının belirlenmesindeki sürenin kısalması tedavide etkinliğe katkı sağlamasının yanı sıra hastanede yatış süresini kısaltabilecek bir unsurdur. Hastane laboratuvarlarında kullanılan otomatize sistemler birçok antibiyotik için güvenilir sonuç verse de kolistin için duyarlılığı tartışma konusudur. Bu yüzden kolistin direncini daha hızlı tespit edebilecek ve sıvı mikrodilüsyon kadar güvenilir, kolay bir yönteme ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla geliştirilen birçok yöntem bulunmaktadır. Rezasurine dayalı hızlı polimiksin testi ve disk elüsyon yöntemi bu yöntemler arasında yer almaktadır.

İlk olarak 2016'da Nordmann ve arkadaşları, Enterobacteriaceae türleri için Hızlı polimiksin NP testini geliştirmişlerdir.[84] Yöntem, PH göstergelerinin renk değişimleri yoluyla polimiksin B veya kolistin varlığında büyüyebilen, glikozu metabolize edebilen ve asit üretebilen bakterileri tespit etmek için kullanılabilen bir yöntemdir. Bununla birlikte, bu yöntem, *Acinetobacter baumannii* ve *P. aeruginosa* gibi nonfermantatif bakteriler için uygun değildir. Daha yakın zamanlarda, Lescat ve arkadaşları, Rapid ResaPolymyxin Acinetobacter/Pseudomonas NP testi adı verilen ve kolistin direncini hızlı bir şekilde tespit edebilen bir resazurin-mukoid duyarlılık testi yöntemi geliştirmişlerdir.[90] Jia ve ark. bu

yöntemi kullanarak klinik örneklerden izole edilen 253 Gram-negatif bakteri ile çalışmış ve yöntemin sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile karşılaştırmasını yapmışlardır. Sonuç olarak değerlendirdikleri izolatlarda kolistin direnci için bu yöntemin duyarlılık ve özgüllüğünü %100 ve %99 olarak bulmuşlardır. Çalışmamızda Rezasurine Dayalı Hızlı Polimiksin testinin duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla %87 ve %90 olarak bulunmuştur. Bu farklılık örneklem grubumuzda sadece *P. aeruginosa* izolatlarının dahil edilmesinden kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda sıvı mikrodilüsyon yöntemine alternatif olarak disk elüsyon yöntemi de test edilmiştir. Bu yöntem sıvı mikrodilüsyon yöntemine alternatif olarak düşünülen ve hızlı polimiksin yöntemindeki eksiklikleri gidermek için geliştirilen bir yöntemdir. Testte temel olarak belirli konsantrasyonlardaki kolistin diskleri kullanılmaktadır ve bakteri süspansiyonlarındaki bulanıklıklar değerlendirilmektedr. Bulanıklığın gözlenmediği ilk tüp MİK değeri olarak belirlenmektedir. Simner ve ark. bu yöntemi geliştirerek 121 retrospektif klinik izolat, 45 prospektif klinik izolat ve 6 mcr-1-pozitif *E. coli* izolatı ile test etmişlerdir. Çalışmalarında Enterobacteriaceae grubu bakterilerde kolistin duyarlılık ve özgüllüğü %100 olarak bulunmuştur.[6] Sharma ve ark. 125 Gram negatif bakteri ile yaptıkları çalışmada disk elüsyon yönteminin duyarlılık ve özgüllerini sırasıyla %100 ve %98,40 bulmuşlardır.[91] Çalışmamızda disk elüsyon yöntemi için duyarlılık ve özgüllük sonuçları %84 ve %88 olarak daha düşük oranda bulunmuştur. Çalışma grubumuzda sadece *P.aeruginosa* izolatlarının değerlendirilmiş olması; diğer çalışmalarda *Acinetobacter baumanii* gibi farklı bakteri türlerinin de dahil edilmesinin yanı sıra örneklem gruplarımızın büyüklüğü de farklılık göstermektedir.

Hızlı polimiksin ve disk elüsyon karşılaştırıldığında; rezasurin hızlı polimiksin yöntemi özel reaktiflerin (rezasurin) hazırlanmasını ve renk değişikliklerinin yorumlanmasını gerektirdiğinden subjektif sonuçlar verebilmektedir. Bu sonuçları yanıltabilmektedir. Disk elüsyon yöntemi bu olumsuzlukları kaldıran daha objektif sonuçlar veren bir yöntemdir. Fakat çok sayıda örnek ile çalışmak için zahmetli bir yöntemdir. Kullanılan malzemelerin sterilizasyonu ve birden fazla örnek ile aynı anda çalışma imkanını zorlaştıran bir yöntemdir. Rezasurine dayalı hızlı polimiksin yöntemi bu açıdan daha avantajlıdır.

Kolistin direncinin plazmid aracılı gelişmesinde *mcr* (*mcr-1..mcr-9*) gen ailesinin etkili olduğu tespit edilmiştir.[92] Bu genler, fosfoetanolamin transferazları kodlayarak, lipid A'nın fosfat grubuna fosfoetanolamin eklenmesini katalize ederek bakteri dış zarının negatif yükünü azaltmaktadır ve kolistine olan afinitesini azaltarak antibiyotik direncine neden olmaktadır.[59] Wang ve ark. *mcr-10'un* yeni bir plazmid kaynaklı kolistin direnç geni olduğunu göstermiştir.[93] Coğrafi olarak dağılımına göre bu genlerden *mcr-1* ve *mcr-9* en yaygın bulunan genlerdir. *mcr-1* ilk kez Çin'de gıda olarak tüketilen hayvanlar ile yapılan çalışmada hayvanlardan izole edilen *E.coli* suşlarında bulunmuştur.[59] *mcr-1'in* muhtemelen hayvan kökenli bakterilerden kaynaklandığı ve daha sonra insanla ilişkili bakterilere yayıldığı bilinmektedir.[59,93] Wise *ve ark* . dünya çapında topladığı 908 Enterobacteriaceae izolatında 22 izolatın *mcr-1* genini taşıdığını bulmuştur.[94] Sonnevend ve arkadaşları insan kaynaklı dört *E. coli* izolatında *mcr-1* geninin varlığını rapor etmişlerdir.[95] Ülkemizde bu gen ailesinden *mcr-1* geni görülmektedir. Kürekçi ve ark. bu geni bildiren ilk çalışmayı gerçekleştirmişlerdir. Çalışmalarında perakende çiğ tavuk etinden izole ettikleri *E.coli* izolatlarında *mcr-1* geni tespit etmişlerdir.[96] Bir başka çalışmada 40 kolistin dirençli Enterobacterales izolatının 2'sinde *mcr-1* geni tespit edilmiştir.[97] Tarhan ve ark. 2021 yılında yayınlanan, klinik örneklerden izole edilen gram negatif bakterilerin dahil ettikleri çalışmalarında 11 *P.aeruginosa* izolatının 1'inde *mcr-1* geni saptamışlardır.[98]

Çalışmamızda değerlendirdiğimiz yoğun bakım ve servis hasta gruplarındaki kolistin dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının hiçbirinde *mcr-1* geni saptanmamıştır. Bunun nedeni olarak hasta grubumuzdaki kolistin direnç grubumuzun küçük olmasını ve kolistin direncinin plazmid aracılığı ile gerçekleşmemiş olduğunu düşünmekteyiz.

SONUÇ

1. *P. aeruginosa,* nosokomiyal enfeksiyon etkeni bakterilerin başında gelmektedir ve bu durumdan en çok hastanede yatarak tedavi gören hasta grubu etkilenmektedir. Çalışmamızda yatarak tedavi gören hasta gruplarından 103 yoğun ve 106 servis hastası dahil edilmiştir.
2. Virülans faktörlerinin fenotipik değerlendirmesinde piyosiyanin, piyoverdin her iki hasta grubunda da en sık görülen virülans faktörlerindendir. Moleküler olarak değerlendirilen *las B* bölgesi grupların büyük çoğunluğunda tespit edilmiştir.
3. Antibiyotik dirençlerinden sefepim, her iki hasta grubumuzda en fazla görülen antibiyotik direncidir. Sırasıyla seftazidim, meropenem ve kolistin takip etmektedir.
4. Antibiyotik direnci ile ilişkili olduğu düşünülen biyofilm üretimi çalışmamızda antibiyotik direnci ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.
5. Yoğun bakım hasta grubunda en sık görülen virülans faktörü las b elastaz ve piyosiyanin olmuştur. Servis hastalarında en sık görülen virülans faktörleri *las B,* piyosiyanin ve piyoverdin olmuştur.
6. *las B* elastaz her iki grupta da yüksek oranda bulunmasına karşın enzimin fenotipik değerlendirmesinde aynı sıklık gözlenmemiştir.
7. Kolistin direnci her iki grupta da düşük oranda tespit edilmiştir. Fakat servis hastaları oransal olarak yoğun bakım hasta grubundan daha fazla bulunmuştur.
8. Direnci belirlemek için sıvı mikrodilüsyon yöntemine alternatif olarak Rezasurine Dayalı Hızlı Polimiksin testi ve Disk elüsyon yöntemleri kullanılmıştır.
9. İş yükü ve zaman açısından Rezasurine Dayalı Hızlı polimiksin testi daha avantajlıyken sonuçları değerlendirmede disk elüsyon daha pratik ve basittir.
10. Özgüllükleri her iki test için de yüksek olmasına karşın Rezasurine Dayalı Hızlı Polimiksin yönteminin özgüllük oranı daha yüksektir.
11. Duyarlılık için Rezasurine Dayalı Hızlı Polimiksin testi daha iyi sonuca sahiptir.
12. Kolistin direnci tespit edilen suşlardan plazmid aracılı direnç aktarımı ile ilişkili mcr-1 geni incelenmiştir. Ve dirençli suşların hiçbirisinde bulunamamıştır.
13. Çalışma gruplarımızda kolistin direncinin düşük oranda bulunması kolistin antibiyotiğinin bölgemizde *P. aeruginosa* enfeksiyonları için hala bir seçenek olduğunu ortaya çıkarmıştır.
14. *P.aeruginosa* enfeksiyonlarında önemli rol oynayan *las B* elastaz, piyosiyanin, piyoverdin gibi virülans faktörlerini inhibe etmeye yönelik çalışmalar ile

enfeksiyonların şiddetinin azalmasına ve *P.aeruginosa* patogenezinin olumsuz etkilenmesine katkı sağlayacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAK

1. Kollef, M. H., & Fraser, V. J. (2001). *Antibiotic Resistance in the Intensive Care Unit. Annals of Internal Medicine, 134(4), 298.*
2. Sader, H. S., Castanheira, M., Arends, S. J. R., Goossens, H., & Flamm, R. K. (2019). Geographical and temporal variation in the frequency and antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from patients hospitalized with bacterial pneumonia: results from 20 years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2016). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *74*(6), 1595–1606.
3. Sulis, G., Sayood, S., Katukoori, S., Bollam, N., George, I., Yaeger, L. H., Chavez, M. A., Tetteh, E., Yarrabelli, S., Pulcini, C., Harbarth, S., Mertz, D., Sharland, M., Moja, L., Huttner, B., & Gandra, S. (2022). Exposure to World Health Organization's AWaRe antibiotics and isolation of multidrug resistant bacteria: a systematic review and meta-analysis. In *Clinical Microbiology and Infection* (Vol. 28, Issue 9, pp. 1193–1202). Elsevier B.V.
4. Andrade, F. F., Silva, D., Rodrigues, A., & Pina-Vaz, C. (2020). Colistin update on its mechanism of action and resistance, present and future challenges. In *Microorganisms* (Vol. 8, Issue 11, pp. 1–12). MDPI AG.
5. Jia, H., Fang, R., Lin, J. *et al.* (2020). Evaluation of resazurin-based assay for rapid detection of polymyxin-resistant gram-negative bacteria. *BMC Microbiol* 20, 7 .
6. Simner PJ, Bergman Y, Trejo M, Roberts AA, Marayan R, Tekle T, Campeau S, Kazmi AQ, Bell DT, Lewis S, Tamma PD, Humphries R, Hindler JA. (2019). Two-site evaluation of the colistin broth disk elution test to determine colistin in vitro activity against Gram-negative bacilli. J Clin Microbiol 57:e01163-18.
7. Xu, Y., Jin, D., Ye, H. *et al.* A rare case of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in a newborn with 58 perforations in the small intestine (2021). *BMC Pediatr* 21, 9 .
8. Bogiel, T., Depka, D., Rzepka, M., Kwiecińska-Piróg, J., & Gospodarek-Komkowska, E. (2021). Prevalence of the genes associated with biofilm and toxins synthesis amongst the pseudomonas aeruginosa clinical strains. *Antibiotics*, *10*(3), 1–14.

9. Murray, R., P. Tıbbi Mikrobiyoloji. (Çev) Us, A. D., Başustaoğlu, A. Çev Ed (Us, A. D., Başustaoğlu, A).Pelikan Yayıncılı
10. Morrison, A. J., and R. P. Wenzel. (1984). Epidemiology of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. Rev. Infect. Dis. 6 (Suppl. 3):S627-S642.
11. Jurado-Martín, I., Sainz-Mejías, M., & McClean, S. (2021). Pseudomonas aeruginosa: An audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 6, pp. 1–37). MDPI AG.
12. Yan, F.; Li, W.; Jono, H.; Li, Q.; Zhang, S.; Li, J.D.; Shen, H. (2008). Reactive oxygen species regulate Pseudomonas aeruginosa lipopolysaccharide-induced MUC5AC mucin expression via PKC-NADPH oxidase-ROS-TGF-alpha signaling pathways inhuman airway epithelial cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 366, 513–519
13. Meyer, J.M.; Neely, A.; Stintzi, A.; Georges, C.; Holder, A.I. (1996). Pyoverdin is essential for virulence of Pseudomonas aeruginosa.Infect.Immun.64, 518–523
14. Kang D, Revtovich AV, Chen Q, Shah KN, Cannon CL and Kirienko NV (2019) Pyoverdine-Dependent Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates From Cystic Fibrosis Patients. *Front. Microbiol.* 10:2048. doi: 10.3389/fmicb.2019.02048
15. Ghssein, G., & Ezzeddine, Z. (2022). A Review of Pseudomonas aeruginosa Metallophores: Pyoverdine, Pyochelin and Pseudopaline. In *Biology* (Vol. 11, Issue 12). MDPI.
16. Hall, S.; McDermott, C.; Anoopkumar-Dukie, S.; McFarland, A.J.; Forbes, A.; Perkins, A.V.; Davey, A.K.; Chess-Williams, R.;Kiefel, M.J.; Arora, D.; et al. (2016). Cellular Effects of Pyocyanin, a Secreted Virulence Factor of Pseudomonas aeruginosa Toxins 8,236
17. Kung VL, Ozer EA, Hauser AR: (2010) The accessory genome of Pseudomonas aeruginosa. Microbiol Mol Biol Rev. 74 (4): 621-641.
18. Michalska M and Wolf P (2015) Pseudomonas Exotoxin A: optimized by evolution for effective killing. Front. Microbiol. 6:963. doi: 10.3389/fmicb.2015.00963
19. Köhler, T.; Guanella, R.; Carlet, J.; van Delden, C. (2010) Quorum sensing-dependent virulence during Pseudomonas aeruginosa colonisa-tion and pneumonia in mechanically ventilated patients.Thorax 65, 703–710)

20. Li, X., Gu, N., Huang, T. Y., Zhong, F., & Peng, G. (2023). Pseudomonas aeruginosa: A typical biofilm forming pathogen and an emerging but underestimated pathogen in food processing. *Frontiers in Microbiology*, *13*.
21. Galdino, A.C.M.; Branquinha, M.H.; Santos, A.L.S.; Viganor, L. (2017) Pseudomonas aeruginosa and its arsenal of proteases: Weapons to battle the host. In Pathophysiological Aspects of Proteases; Springer Nature: Singapore, pp. 381–397
22. Cigana, C., Castandet, J., Sprynski, N., Melessike, M., Beyria, L., Ranucci, S., Alcalá-Franco, B., Rossi, A., Bragonzi, A., Zalacain, M., & Everett, M. (2021). Pseudomonas aeruginosa Elastase Contributes to the Establishment of Chronic Lung Colonization and Modulates the Immune Response in a Murine Model. *Frontiers in Microbiology*, *11*.
23. Krishnan, G.; Sethumadhavan, A.; Muthusamy, S.; Mani, M. (2019) Antibiotic resistant clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa harbor LasA gene. Internet J. Microbiol. pp.16
24. Smith, L.; Rose, B.; Tingpej, P.; Zhu, H.; Conibear, T.; Manos, J.; Bye, P.; Elkins, M.; Willcox, M.; Bell, S.; et al. (2006) Protease IV production in Pseudomonas aeruginosa from the lungs of adults with cystic fibrosis. J. Med. Microbiol. pp. 1641–1644.
25. Kumar, A., Alam, A., Rani, M., Ehtesham, N. Z., and Hasnain, S. E. (2017). Biofilms: survival and defense strategy for pathogens. Int. J. Med. Microbiol. 307, 481–489.
26. Flemming, H. C., and Wuertz, S. (2019). Bacteria and archaea on earth and their abundance in biofilms. Nat. Rev. Microbiol. 17, 247–260.
27. Diban, F., di Lodovico, S., di Fermo, P., D'Ercole, S., D'Arcangelo, S., di Giulio, M., & Cellini, L. (2023). Biofilms in Chronic Wound Infections: Innovative Antimicrobial Approaches Using the In Vitro Lubbock Chronic Wound Biofilm Model. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(2), 1004.
28. Li X, Gu N, Huang TY, Zhong F and Peng G (2023) Pseudomonas aeruginosa: A typical biofilm forming pathogen and an emerging but underestimated pathogen in food processing. Front. Microbiol. 13:1114199.
29. Yin, R., Cheng, J., Wang, J., Li, P., & Lin, J. (2022). Treatment of Pseudomonas aeruginosa infectious biofilms: Challenges and strategies. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A.

30. Chegini, Z., Khoshbayan, A., Taati Moghadam, M., Farahani, I., Jazireian, P., & Shariati, A. (2020). Bacteriophage therapy against Pseudomonas aeruginosa biofilms: A review. In *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* (Vol. 19, Issue 1). BioMed Central Ltd.
31. Wood, S. J., Kuzel, T. M., & Shafikhani, S. H. (2023). Pseudomonas aeruginosa: Infections, Animal Modeling, and Therapeutics. *Cells*, *12*(1), 199.
32. Pachori, P., Gothalwal, R., & Gandhi, P. (2019). Emergence of antibiotic resistance Pseudomonas aeruginosa in intensive care unit; a critical review. In *Genes and Diseases* (Vol. 6, Issue 2, pp. 109–119). Chongqing University.
33. McCarthy, K. L., Kidd, T. J., & Paterson, D. L. (2017). Molecular epidemiology of Pseudomonas aeruginosa bloodstream infection isolates in a non-outbreak setting. *Journal of Medical Microbiology*, *66*(2), 154–159.
34. Zagaliotis, P., Michalik-Provasek, J., Gill, J. J., & Walsh, T. J. (2022). Therapeutic Bacteriophages for Gram-Negative Bacterial Infections in Animals and Humans. In *Pathogens and Immunity* (Vol. 7, Issue 2, pp. 1–45). Case Western Reserve University.
35. Chen, Q., Shen, Y., & Zheng, J. (2021). A review of cystic fibrosis: Basic and clinical aspects. In *Animal Models and Experimental Medicine* (Vol. 4, Issue 3, pp. 220–232). John Wiley and Sons Inc.
36. Reyne, N., McCarron, A., Cmielewski, P., Parsons, D., & Donnelley, M. (2023). To bead or not to bead: A review of Pseudomonas aeruginosa lung infection models for cystic fibrosis. In *Frontiers in Physiology* (Vol. 14). Frontiers Media S.A.
37. Poole, K. (2011). Pseudomonas aeruginosa: Resistance to the max. *Frontiers in Microbiology*, *2*(APR).
38. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. (2019)Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa: mechanisms and alternative therapeutic strategies. Biotechnol Adv. Jan-Feb;37(1):177-192.
39. Coleman, S. R., Blimkie, T., Falsafi, R., & Hancock, R. E. W. (2020). *Multidrug Adaptive Resistance of Pseudomonas aeruginosa Swarming Cells*.
40. Glen, K. A., & Lamont, I. L. (2021). β-lactam Resistance in Pseudomonas aeruginosa: Current Status, Future Prospects. *Pathogens*, *10*(12).
41. Reygaert, W.C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria AIMS Microbiol. , 4, 482–501

42. Munita, J.M.; Arias, C.A. (2016). Mechanisms of antibiotic resistance. Microbiol. Spectr. 4, 4.2.15.
43. Doi, Y. (2019). Treatment Options for Carbapenem-resistant Gram-negative Bacterial Infections. *Clinical Infectious Diseases*, *69*, S565–S575.
44. Meletis G. (2012). Mechanisms responsible for the emergence of carbapenem resistance in Pseudomonas aeruginosa. In *HIPPOKRATIA* (Vol. 16).
45. Kureishi A, Diver JM, Beckthold B, Schollaardt T, Bryan LE. (1994). Cloning and nucleotide sequence of Pseudomonas aeruginosa DNA gyrase gyrA gene from strain PAO1 and quinolone-resistant clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother. Sep;38(9):1944-52.
46. Jalal, S., Ciofu, O., Høiby, N., Gotoh, N., & Wretlind, B. (2000). *Molecular Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance in Pseudomonas aeruginosa Isolates from Cystic Fibrosis Patients* (Vol. 44, Issue 3).
47. Lambert PA. (2002). Mechanisms of antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa. J R Soc Med. 95 Suppl 41(Suppl 41):22-6.
48. M.P. Mingeot-Leclercq, Y. Glupczynski, P.M. (1999). Tulkens Aminoglycosides: activity and resistance. Antimicrob Agents Chemother, 43 , pp. 727-737
49. Ramirez, M. S., and Tolmasky, M. E. (2010). Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist.* 13, 151–171.
50. Chung ES, Lee JY, Rhee JY, Ko KS. (2017). Colistin resistance in Pseudomonas aeruginosa that is not linked to arnB. J Med Microbiol. Jun;66(6):833-841.
51. Bakthavatchalam, Y. D., Pragasam, A. K., Biswas, I., & Veeraraghavan, B. (2018). Polymyxin susceptibility testing, interpretative breakpoints and resistance mechanisms: An update. In *Journal of Global Antimicrobial Resistance* (Vol. 12, pp. 124–136). Elsevier Ltd.
52. Wang, C., Feng, Y., Liu, L., Wei, L., Kang, M., & Zong, Z. (2020). *Identification of novel mobile colistin resistance gene mcr-10. Emerging Microbes & Infections, 9(1), 508–516.*
53. Anyanwu, M. U., Jaja, I. F., & Nwobi, O. C. (2020). Occurrence and characteristics of mobile colistin resistance (Mcr) gene-containing isolates from the environment: A review. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 17, Issue 3).
54. Yan, F.; Li, W.; Jono, H.; Li, Q.; Zhang, S.; Li, J.D.; Shen, H. (2008) Reactive oxygen species regulate Pseudomonas aeruginosa lipopolysaccharide-induced

MUC5AC mucin expression via PKC-NADPH oxidase-ROS-TGF-alpha signaling pathways inhuman airway epithelial cells.Biochem. Biophys. Res. Commun. pp. 513–519

55. Costa, P.; Gomes, A.T.P.C.; Braz, M.; Pereira, C.; Almeida, A. (2021). Application of the Resazurin Cell Viability Assay to Monitor Escherichia coli and Salmonella Typhimurium Inactivation Mediated by Phages. Antibiotics 10, 974.
56. Ozer, E. A., Allen, J. P., & Hauser, A. R. (2014). Characterization of the core and accessory genomes of Pseudomonas aeruginosa using bioinformatic tools Spine and AGEnt. *BMC Genomics*, *15*(1).
57. Kung VL, Ozer EA, Hauser AR. (2010). The accessory genome of Pseudomonas aeruginosa. Microbiol Mol Biol Rev. 74 (4): 621-641.
58. Mesaros N, Nordmann P, Plesiat P, Roussel-Delvallez M, Van Eldere J, Glupczynski Y, Van Laethem Y, Jacobs F, Lebecque P, Malfroot A, Tulkens PM, Van Bambeke F: Pseudomonas aeruginosa: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. Clin Microbiol Infect. 2007, 13 (6): 19p-
59. Liu, Y. Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L. X., Zhang, R., Spencer, J., et al. (2015). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infect. Dis. 16, 161–168.
60. Khalil MF, Ibrahim Sonbol F, Mohamed AFB, et al. Comparative study of virulence factors among ESβL-producing and nonproducing Pseudomonas aeruginosa clinical isolates. Turk J Med Sci 2015; 45: 60-6
61. Rippon JW, Varadi DP. (1968). The elastases of pathogenic fungi and actinomycetes. J Invest Dermatol. Jan;50(1):54-8.
62. Mapipa, Q., Digban, T. O., Nnolim, N. E., & Nwodo, U. U. (2021). *Antibiogram profile and virulence signatures of Pseudomonas aeruginosa isolates recovered from selected agrestic hospital effluents. Scientific Reports, 11(1).*
63. Kafil HS, Mobarez AM. Assessment of biofilm formation by enterococci isolates from urinary tract infections with different virulence profiles. Journal of King Saud University-Science. 2015;27(4):312-317
64. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.0; 2023.

65. Ahmed, Z. S., Elshafiee, E. A., Khalefa, H. S., Kadry, M., & Hamza, D. A. (2019). *Evidence of colistin resistance genes (mcr-1 and mcr-2) in wild birds and its public health implication in Egypt. Antimicrobial Resistance & Infection Control, 8(1).*

66. Lister, P. D., Wolter, D. J., & Hanson, N. D. (2009). Antibacterial-resistant Pseudomonas aeruginosa: Clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 22, Issue 4, pp. 582–610).

67. Bassetti, M., Vena, A., Croxatto, A., Righi, E., & Guery, B. (2018). How to manage Pseudomonas aeruginosa infections. In *Drugs in Context* (Vol. 7). Bioexcel Publishing LTD.

68. Ng, Q. X., Ong, N. Y., Lee, D. Y. X., Yau, C. E., Lim, Y. L., Kwa, A. L. H., & Tan, B. H. (2023). Trends in Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa) Bacteremia during the COVID-19 Pandemic: A Systematic Review. In *Antibiotics* (Vol. 12, Issue 2). MDPI.

69. Michel-Briand Y, Baysse C. (2002). The pyocins of Pseudomonas aeruginosa. Biochimie. May-Jun;84(5-6):499-510.

70. Dawodeyah, H. Y., Obeidat, N., Abu-Qatouseh, L. F., & Shehabi, A. A. (2018). *Antimicrobial resistance and putative virulence genes of Pseudomonas aeruginosa isolates from patients with respiratory tract infection*. Germs. 2018 Mar 3;8(1):31-40.

71. Hamza, E. H., El-Shawadfy, A. M., Allam, A. A., & Hassanein, W. A. (2023). Study on pyoverdine and biofilm production with detection of LasR gene in MDR Pseudomonas aeruginosa. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *30*(1).

72. El-Mahdy, R., & El-Kannishy, G. (2019). Virulence factors of carbapenem-resistant pseudomonas aeruginosa in hospital-acquired infections in Mansoura, Egypt. *Infection and Drug Resistance*, *12*, 3455–3461.

73. Coin, D., Louis, D., Bernillon, J., Guinand, M., & Wallach, J. (1997). LasA, alkaline protease and elastase in clinical strains of Pseudomonas aeruginosa : quantification by immunochemical methods . *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, *18*(3), 175–184.

74. Galdino ACM, Viganor L, Ziccardi M, Nunes APF, Dos Santos KRN, Branquinha MH, Santos ALS. (2017). Heterogeneous production of proteases from Brazilian clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. Enferm Infecc Microbiol Clin. Dec;35(10):630-637. English, Spanish.
75. Uzunbayir-Akel, N., Tekintaş, Y., Yılmaz, F. F., Öztürk, I., Ökeer, M., Aydemir, S. Ş., Çilli, F. F., & Hoşgör-Limoncu, M. (2019). The virulence characteristics and epidemiological relationship of clinical pseudomonas aeruginosa isolates. *Turk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, *76*(4): 395–404.
76. Zupetic, J., Hernán F., Peñaloza, Bain,W., Hulver, M., Mettus, R., Jorth, P., Doi Y., Bomberger, J., Pilewski, J., Nouraie, M., Lee J.S., (2021). Elastase Activity From *Pseudomonas aeruginosa* Respiratory Isolates and ICU Mortality, Chest Infections: Original Research, Volume 160, Issue 5, Pages 1624-1633
77. Çoban, A.Y., Çiftci, A., Onuk,E.E., Erturan, Z., Çaycı, Y., Durupınar, B. (2009). Kistik Fibrozlu Hastalardan İzole Edilen Pseudomonas aeruginosa İzolatlarının Biyofilm Oluşturma Yeteneklerinin Araştırılması Ve Bu Özelliğin Genotip Ve Antibiyotik Duyarlılığı İle İlişkisinin Belirlenmesi, Mikrobiyol Bul 43:563-57
78. Corehtash, Z. G., Khorshidi, A., Firoozeh, F., Akbari, H., & Aznaveh, A. M. (2015). Biofilm formation and virulence factors among pseudomonas aeruginosa isolated from burn patients. *Jundishapur Journal of Microbiology*, *8*(10).
79. Abdelraheem, W. M., Abdelkader, A. E., Mohamed, E. S., & Mohammed, M. S. (2020). *Detection of biofilm formation and assessment of biofilm genes expression in different Pseudomonas aeruginosa clinical isolates. Meta Gene, 23, 100646.*
80. Ghadaksaz, A., Fooladi, A., A., I., Hosseini, H., M., H., Amin, M. (2015) The prevalence of some Pseudomonas virulence genes related to biofilm formation and alginate production among clinical isolates, Journal of Applied Biomedicine,Volume 13, Issue 1,Pages 61-68.
81. Kal Çakmaklıoğulları, E., & Kuru, C. (2019). Antimicrobial Susceptibility of Pseudomonas aeruginosa Strains: Evaluation in Different Sample Types. *Ankem Dergisi*.
82. Dursun, A., Özsoylu, S., Kılıç, H., Ulu Kılıç, A., & Akyıldız, B. N. (2018). Antibiotic Susceptibilities of *Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* Strains Isolated from Patients in the Pediatric Intensive Care Unit. *Turkish Journal of Intensive Care, 16*(3), 109–114.

83. Ceken, N., Duran, H., & Atik, B. (2020). Yoğun bakım ünitelerinden izole edilen Pseudomonas aeruginosa suşlarının 4 yıllık direnç profili. *Pamukkale Medical Journal*.
84. Poirel L ,jayol A ,Nordman P. Polimiksinler: plazmitler veya kromozomlar tarafından kodlanan antibakteriyel aktivite, duyarlılık testi ve direnç mekanizmaları.*Clin Microbiol Rev* 2017;30:557–96.
85. Sonmezer, M. C., Ertem, G., Erdinç, F.S., Kaya Kiliç, E., Tulek, N., Adiloğlu, A.,& Hatipoglu, C. (2016). Evalutaion of Risk Factors for Antibiotic Resistance in Patients with Nosocomial Infections Caused by Pseudomonas aeruginosa. Canadian Journal of Infetions Diseases and Medical Microbiology 1321487
86. Uğur, M., & Genç, S. (2019). Three Year Resistance Profile of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Intensive Care Units. *Turkish Journal of Intensive Care, 17*(3), 130–137.
87. Şafak, B., Kilinç, O., Tunç, N., & Topçu, B. (2018). Pseudomonas aeruginosa Antimicrobial Susceptibility Results at a State Hospital in Turkey (2010-2016). *Ankem Dergisi* 32(1):31-36
88. Santos, S. O. dos, Rocca, S. M. la, & Hörner, R. (2016). Colistin resistance in non-fermenting gram-negative bacilli in a university hospital. In *Brazilian Journal of Infectious Diseases* Nov-Dec;20(6):649-650.
89. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2018). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA
90. Lescat M, Poirel L, Tinguely C, Nordmann P. A (2019). Resazurin Reduction-Based Assay for Rapid Detection of Polymyxin Resistance in Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa. J Clin Microbiol. Feb 27;57(3):e01563-18.
91. Sharma S, Banerjee T, Garg R, Das P. (2022). Evaluation Report of the Colistin Broth Disk Elution Method with *Acinetobacter baumannii* Isolates from a Low-Resource Setting. Microbiol Spectr. Oct 26;10(5):e0087122.
92. Xavier BB, Lammens C, Ruhal R, Kumar-Singh S, Butaye P, Goossens H, Malhotra-Kumar S. (2016). Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, mcr-2, in Escherichia coli, Belgium, June 2016. Euro Surveill. Jul 7;21(27).

93. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu LF, Gu D, Ren H, Chen X, Lv L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu JH, Shen J. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infect Dis. Feb;16(2):161-8.
94. Wise MG, Estabrook MA, Sahm DF, Stone GG, Kazmierczak KM. (2018). Prevalence of mcr-type genes among colistin-resistant Enterobacteriaceae collected in 2014-2016 as part of the INFORM global surveillance program. PLoS One. Apr 2;13(4):e0195281.
95. Sonnevend A, Ghazawi A, Alqahtani M, Shibl A, Jamal W, Hashmey R, Pal T. (2016). Plasmid-mediated colistin resistance in *Escherichia coli* from the Arabian Peninsula. *Int. J. Infect. Dis.* 50(1):85–90.
96. Kurekci, C., Aydin, M., Nalbantoglu, O. U., & Gundogdu, A. (2018). *The first report of mobile colistin resistance gene (mcr-1) carrying Escherichia coli in Turkey. Journal of Global Antimicrobial Resistance.*
97. Özkaya E, Buruk CK, Tosun İ, Toraman B, Kaklıkkaya N, Aydın F. (2020). Klinik Enterobacterales izolatlarında plazmit aracılı mcr kolistin direnç geninin araştırılması. Mikrobiyol Bul 54(2):191-202.
98. Tarhan G, Şahin F, Cesur S. (2021). Karbapeneme dirençli Acinetobacter baumannii, Klebsiella pneumoniae ve Pseudomanas aeruginosa suşlarında OXA 48 ve mcr-1 gen varlığının in house-PCR yöntemi ile araştırılması. J Med Palliat Care 2(4): 118-123

Özgeçmiş Örneği

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Berat Özkan
Doğum Yeri ve Tarihi	20.06.1995 KOCAELİ
İletişim Adresi	Barbaros mah. Atatürk cad. Özkara sk. Başiskele/Kocaeli
Telefon	5458621393
E-posta	berat20h95@gmail.com
Eğitim Bilgileri (Tarih Sırasına Göre)	Moleküler Biyoloji ve Genetik-Lisans-Uludağ Üniversitesi (2015-2019) Mikrobiyoloji-Yüksek Lisans-Kocaeli Üniversitesi (2020-2023)
Mesleki Deneyim/ İşyeri Bilgileri	Yok
Yabancı Dil Bilgileri	
Üye Olduğu Mesleki / Sosyal Kuruluşlar	Yok
Bilimsel Etkinlikler	
Makaleler*	Investigation of virulence factors and antibiotic resistance of Pseudomonas aeruginosa isolated from various clinical samples-**Berat ÖZKAN**-Kocaeli Sağlık Bilimleri Dergisi (DOAJ (the Directory of Open Access Journals))
Projeler	
Bildiriler	*Pseudomonas aeruginosa*'nın Elastaz aktivitesinin Moleküler ve Biyokimyasal Yöntemlerle Değerlendirilmesi-9.Bilim Günleri-Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Ödüller	
Diğer	

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
Tıp Fakültesi Dekanlığı

Sayı : E-80418770-020-171979 17.01.2022
Konu : Etik kurul başvurunuz hk.

Sayın Prof.Dr. Fatma BUDAK

GOKAEK-2022/01.11 Prof. Dr. Fatma BUDAK sorumluluğunda yürütülmesi planlanan **2022/07** proje numaralı "Pseudomonas aeruginosa'nın virülans faktörlerinin ve kolistin direncinin araştırılması" başlıklı proje değerlendirilmiş, projenin yürütülmesi uygun bulunmuştur.

KARAR: KABUL, PROJENİN YÜRÜTÜLMESİ UYGUNDUR.

Projenizin yürütülmesi uygun bulunmuştur, çoklu imza formu ekte sunulmaktadır. Araştırmaya Etik Kurul onay tarihinden sonra en geç 90 gün içinde başlamanız, (i) Başlayamadığınızda veya protokolde bildirdiğiniz hususlarda herhangi bir değişiklik yaptığınızda Değişiklik Bilgi Formu ile, (ii) Araştırmanızı onay aldığınız şekilde tamamladığınızda Sonuç Raporu ile Etik Kurul'a başvurmanız gerekmektedir.

Prof.Dr. Nurettin Özgür DOĞAN
Kurul Başkanı

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU

Etik Kurul Bilgileri	Adı	Kocaeli Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu	
	Adres	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu, 3. Kat, 41380 Umuttepe Yerleşkesi /KOCAELİ	
	Tel / Faks / E-posta	0262 303 74 50 - 0262 303 74 63, gokaetikkurul@kocaeli.edu.tr	
Başvuru Bilgileri	Araştırmanın Adı	Pseudomonas aeruginosa'nın virülans faktörlerinin ve kolistin direncinin araştırılması	
	Sorumlu Araştırmacı	Prof. Dr. Fatma Budak	
	Sorumlu Arş. Uzmanlığı	Tıbbi Mikrobiyoloji	
	Araştırma Merkez(ler)i	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	
	Destekleyici		
	Araştırmanın Türü		
	Araştırmanın Tipi		
Karar ve Dayanak	**Tarih : 13/01/2022**	**Karar No: KÜ GOKAEK-2022/01.11**	**Proje No: 2022/07**
	Hasta Hakları Yönetmeliği (01.08.1998/23420); Biyoloji ve Tıbbın Uygulanması Bakımından İnsan Hakları ve İnsan Haysiyetinin Korunması Sözleşmesi: İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesinin Uygun Bulunduğuna Dair Kanun (09.12.2003/25311); Biyotıp Araştırmalarına İlişkin İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesine Ek Protokolün Onaylanmasının Uygun Bulunduğuna Dair Kanun (29.03.2011/27899); İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik (13.04.2013/28617); Tıbbi Cihaz Klinik Araştırmaları Yönetmeliği (06.09.2014/29111); Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesi; İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu; Türk Tabipleri Birliği Hekimlik Meslek Etiği Kuralları; Türk Tabipleri Birliği Araştırma Etiği Bildirgesi ilgili maddelerine göre; yukarıda ismi geçmekte olan araştırmacının sorumluluğunda yapılan ve yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler, araştırmanın gerekçesi, amacı, yaklaşım ve yöntemleri, gönüllüler için beklenen yarar ve riskler dikkate alınarak değerlendirilmiş ve araştırmanın ilgili protokol doğrultusunda belirtilen merkezlerde yürütülmesi etik ve bilimsel açıdan, ☒ Uygun bulunmuştur. ☐ Uygun bulunmamıştır. ☐ Kapsam dışı olarak değerlendirilmiştir.		

ETİK KURUL ÜYELERİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Toplantıda Bulunma		İmza
Prof. Dr. Nurettin Özgür DOĞAN Başkan	Acil Tıp	Kocaeli Üni. Tıp Fakültesi	Erkek	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Cem CERİT Başkan Yardımcısı	Psikiyatri	Kocaeli Üni. Tıp Fakültesi	Erkek	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Canan BAYDEMİR Üye	Biyoistatistik	Kocaeli Üni. Tıp Fakültesi	Kadın	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Yusufhan YAZIR Üye	Histoloji ve Embriyoloji	Kocaeli Üni. Tıp Fakültesi	Erkek	E ☒	H ☐	
Doç. Dr. Ceyla ERALDEMİR Üye	Biyokimya	Kocaeli Üni. Tıp Fakültesi	Kadın	E ☒	H ☐	
Doç. Dr. Çiğdem VURAL Üye	Patoloji	Kocaeli Üni. Tıp Fakültesi	Kadın	E ☒	H ☐	
Doç. Dr. Evren DEMİRSOY Üye	Dermatoloji	Kocaeli Üni. Tıp Fakültesi	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
Doç. Dr. Enver Alper SİNANOĞLU Üye	Ağız Diş ve Çene Radyolojisi	Kocaeli Üni. Diş Hek. Fak.	Erkek	E ☒	H ☐	
Doç. Dr. Aslıhan AKPINAR Raportör	Tıp Tarihi ve Etik	Kocaeli Üni. Tıp Fakültesi	Kadın	E ☒	H ☐	