



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

***PSEUDOMONAS AERUGINOSA* İZOLATLARINDA VİRULANS
GENLERİNİN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR) İLE
TESPİTİ VE
YÜKSEK RİSKLİ KLONLARIN MATRİKS İLE
DESTEKLENMİŞ LAZER DESORPSİYON/İYONİZASYON
UÇUŞ ZAMANI KÜTLE SPEKTROMETRESİ YÖNTEMİ
(MALDI-TOF MS) İLE ARAŞTIRILMASI**

Dr. GÜLŞAH KARACAN TEMÜR
TIPTA UZMANLIK TEZİ

SAMSUN- 2023



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

***PSEUDOMONAS AERUGINOSA* İZOLATLARINDA VİRULANS
GENLERİNİN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR) İLE
TESPİTİ VE**

**YÜKSEK RİSKLİ KLONLARIN MATRİKS İLE
DESTEKLENMİŞ LAZER DESORPSİYON/İYONİZASYON
UÇUŞ ZAMANI KÜTLE SPEKTROMETRESİ YÖNTEMİ
(MALDI-TOF MS) İLE ARAŞTIRILMASI**

Dr. Gülşah KARACAN TEMÜR
TIPTA UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Yeliz TANRIVERDİ ÇAYCI

Bu tez, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Yönetim Birimi tarafından
PYO.TIP.1904.22.011 proje numarası ile desteklenmiştir

SAMSUN- 2023

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve birikimleri ile bana her konuda yol gösteren, tezimi hazırlama sürecinde deneyimlerini esirgemeyen, yanında çalışmaktan mutluluk duyduğum değerli hocam ve tez danışmanım Doç. Dr. Yeliz TANRIVERDİ ÇAYCI' ya,

Uzmanlık eğitimim sürecinde bilgi ve tecrübelerini her zaman bizlerle paylaşan, meslek hayatıma değerli katkıları olan Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı başkanımız değerli hocam Prof. Dr. Asuman BİRİNCİ'ye, öğretim üyeleri değerli hocalarım Doç. Dr. Kemal BİLGİN ve Dr. Öğr. Üyesi Demet GÜR VURAL'a,

Asistanlığım boyunca çalışmaktan ve tanışmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarım ve tüm mikrobiyoloji laboratuvarı çalışanlarına, desteklerinden dolayı değerli arkadaşlarım Arş. Grv. İlknur BIYIK'a, Bio. Çağrı ÇAVDAR'a, Uzm. Dr. Canberk ÇINAR'a,

Hayatımın her döneminde tüm fedakârlıkları ile her zaman yanımda olan sevgi ve desteklerini hep hissettiğim annem Gülay KARACAN, babam Feti KARACAN, kardeşlerim Mehmet Orçun KARACAN, Kemal Ogün KARACAN ve eşim Zeki TEMÜR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Gülşah KARACAN TEMÜR
Mart, 2023

BEYAN

Pseudomonas aeruginosa izolatlarında virulans genlerinin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile tespiti ve yüksek riskli klonların matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/ionizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi yöntemi (MALDI-TOF MS) ile araştırılması” başlıklı tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, başka bir çalışmadan kopya edilmediğini, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Gülşah KARACAN TEMÜR

ÖZET

Giriş ve Amaç: *Pseudomonas aeruginosa*, nonfermentatif Gram negatif basildir. *P. aeruginosa* patogeneğinde, birçok virülans faktörü rol oynamaktadır. Bu çalışmada *P.aeruginosa* çoklu ilaç direnci ile birlikte artmış salgın yapma potansiyeli olan yüksek riskli klonları olarak adlandırılan ST111, ST175, ST235, ST253, ST395’in MALDI-TOF MS yöntemi ile erken tespiti ve *P. aeruginosa* virulans faktörlerinin üretiminde rol alan genlerin PZR ile araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarına 01.01.2021-07.06.2022 tarihleri arasında çeşitli kliniklerden gönderilen örneklerden izole edilen *P. aeruginosa* izolatları (n:100) kullanılmıştır. *P. aeruginosa* izolatlarında, toxA tespiti için uniplex; algD, plcN, lasB, plcH tespiti için multiplex PZR yapılmıştır.Yüksek riskli klonlara özgü piklerin araştırılması, MALDI-TOF MS yöntemiyle, Vitek- MS (Biomeriux, France) kullanılarak yapılmıştır.

Bulgular: PZR işlemi sonuçlarında ToxA %89, LasB %99, PlcH %98, PlcN %100 ve AlgD %100 oranında pozitif olarak saptanmıştır. MALDI-TOF MS ile yüksek riskli klonlarının varlığı değerlendirildiğinde en sık saptanan yüksek riskli klon ST111 (%49) olup bunu, ST253 (%7), ST175 (%6) takip etmektedir. ST235 ile ST395 klonları ise çalışmamızda saptanmamıştır.

Tartışma ve Sonuç: Virulans faktörleri hem yüksek riskli klonlarda hem de diğer suşlarda yüksek oranlarda tespit edilmiş olup, yüksek riskli klonlar ile virulans faktörleri arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir. Bu ilişkiyi değerlendirmek için daha ileri moleküler çalışmaların yapılmasına ihtiyaç olduğu düşünülmektedir. Yüksek riskli klonların erken tespiti ve uygun antimikrobiyal tedavi gibi stratejik tedavi seçeneklerinin geliştirilebilmesi yüksek riskli klonların dünya çapında yayılımını engellemeye yardımcı olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Virulans faktörleri, Yüksek riskli klon, MALDI-TOF MS.

ABSTRACT

Objective: *Pseudomonas aeruginosa* is a nonfermentative Gram negative bacillus. Many virulence factors play a role in the pathogenesis of *P. aeruginosa*. In this study, early detection of ST111, ST175, ST235, ST253, ST395, which are high-risk clones with increased epidemic potential with *P.aeruginosa* by MALDI-TOF MS method and It was aimed to investigate the genes involved in the production of virulence factors by PCR.

Materials and Methods: *P. aeruginosa* isolates (n:100) isolated from samples sent from various clinics to Ondokuz Mayıs University Hospital Medical Microbiology laboratory between 01.01.2021 and 07.06.2022 were used. Uniplex PCR for *toxA*; multiplex PCR was performed for the detection of *algD*, *plcN*, *lasB*, *plcH*. Investigation of peaks specific to high-risk clones was performed using MALDI-TOF MS method using Vitek-MS (Biomérieux, France).

Results: In the PCR results, *ToxA* 89%, *LasB* 99%, *PlcH* 98%, *PlcN* 100% and *AlgD* 100% were positive. When the presence of high-risk clones was evaluated with MALDI-TOF MS, the most frequently detected high-risk clone was ST111 (49%), followed by ST253 (7%) and ST175 (6%). ST235 and ST395 clones were not detected in our study.

Conclusion: Virulence factors were detected at high rates in both high-risk clones and other strains, and no significant relationship was found between high-risk clones and virulence factors. It is thought that further molecular studies are needed to evaluate this relationship. Early detection and appropriate antimicrobial therapy will help prevent the worldwide spread of high-risk clones.

Keywords: Virulence factors, High-risk clones, MALDI-TOF MS.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
BEYAN.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
2.1.1. <i>P. aeruginosa</i> mikrobiyolojik özellikleri	3
2.1.2. Virulans faktörleri.....	4
2.1.3. Epidemiyoloji.....	7
2.2 Klinik Hastalıklar	8
2.2.1. Solunum yolu enfeksiyonları.....	8
2.2.2. Bakteriyemi	8
2.2.3. Santral sinir sistemi enfeksiyonları.....	8
2.2.4. Kulak enfeksiyonları.....	9
2.2.5. Göz enfeksiyonları.....	9
2.2.6. Gastrointestinal enfeksiyonlar.....	9
2.2.7. Üriner sistem enfeksiyonları.....	9
2.2.8. Kemik ve eklem enfeksiyonları	9
2.2.9. Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları	10
2.2.10. Endokardit	10
2.3. <i>P. aeruginosa</i> Enfeksiyonlarının Tedavisi	10
2.3.1. Beta-laktamlar.....	10
2.3.2. Aminoglikozidler	12
2.3.3. Kinolonlar	12
2.3.4. Kolistin.....	12
2.3.5. Yeni antipsödomonal antibiyotikler	12
2.4. <i>P. aeruginosa</i> Antimikrobiyal Direnç Mekanizmaları	13
2.4.1. Beta-laktam direnci	13
2.4.2. Aminoglikozid direnci.....	14
2.4.3. Kinolon direnci	15
2.4.4. Kolistin direnci	15
2.5. <i>P. aeruginosa</i> Yüksek Riskli Klonları	15
2.6. Matriks ile Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon/ İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF MS)	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM	18
3.1. Bakterilerin Tanımlanması ve Duyarlılık Testleri.....	18
3.2. Virulans Genlerinin Moleküler Yöntemler ile Tespit Edilmesi.....	18

3.2.1. <i>P. aeruginosa</i> DNA' sının izolasyonu	18
3.2.2. DNA amplifikasyonu	19
3.2.3. DNA elektroforezi	20
3.3. MALDI-TOF MS ile Yüksek Riskli Klonların Varlığının Araştırılması	20
3.4. İstatistiksel Analiz	21
4. BULGULAR	22
4.1. <i>P. aeruginosa</i> İzolatların Özellikleri	22
4.2. <i>P. aeruginosa</i> Antimikrobiyal Duyarlılık Profilleri	22
4.3. Virulans Genlerinin Tespiti İçin Yapılan PZR Sonuçları	23
4.4. Yüksek Riskli Klonları Tanımlama İçin Yapılan MALDI-TOF MS Sonuçları	25
5. TARTIŞMA	28
6. SONUÇLAR	35
7. KAYNAKLAR	36
8. EKLER	46



SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	: Santigrat derece
µL	: Mikrolitre
AlgD	: Alginat
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
ÇİD	: Çoklu İlaça Dirençli
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksiribonükleotit Trifosfat
EUCAST	: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
Exo	: Ekzoenzim
GES	: Guiana Extended Spectrum
GIM	: German imipenemase
GSBL	: Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz
IL	: İnterlökin
KF	: Kistik Fibrozis
KOAH	: Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
KPC	: <i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
kV	: Kilovolt
LasB	: Elastaz
m/z	: Mass-to-Charge Ratios
MALDI-TOF MS	: Matrix Assisted Lazer Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (Matriks İle Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi)
MBL	: Metallobetalaktamaz
MCR	: Mobilized Colistin Resistance
MIK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyon
MLST	: Multilocus Sequence Typing
MLVA	: Multiple Locus Variable Number of Tandem Repeats Analysis
mM	: Milimol
NDM	: New Delhi metallo beta laktamaz
NPD	: Negatif Prediktif Değer
Opr	: Outer Membrane Protein
OXA	: Oksasilinaz
PlcH	: Fosfolipaz C Hemolitik
PlcN	: Fosfolipaz C Non-hemolitik
pM	: Pikomol
PPD	: Pozitif Prediktif Değer
Psl	: Polisakkarit Sentez Lokusu
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Qnr	: Quinolone Resistance
QS	: Quorum Sensing
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik Asit
ST	: Sequence Type
Taq	: <i>Thermus aquaticus</i>
ToxA	: Ekzotoksin A
VIM	: Veronese imipenemase
YBÜ	: Yoğun Bakım Ünitesi
YİD	: Yaygın İlaça Dirençli

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 1. Pseudomonadların sınıflandırılması

Tablo 2. Karbapenemazların sınıflandırılması

Tablo 3. ToxA, LasB, AlgD, PlcN, PlcH gen bölgelerine ait spesifik primer dizileri

Tablo 4. ToxA PZR karışımı

Tablo 5. LasB, AlgD, PlcN, PlcH PZR karışımı

Tablo 6. Virulans genlerinin PZR amplifikasyon programı

Tablo 7. *P. aeruginosa* yüksek riskli klonlarına ait pik biyobelirteçleri

Tablo 8. *P. aeruginosa* izolatlarının örnek türü ve gönderildikleri kliniklere göre dağılımı

Tablo 9. *P. aeruginosa* izolatlarının antibiyotik duyarlılık profilleri

Tablo 10. *P. aeruginosa*’ların izole edildikleri örnekler ve virulans genlerinin dağılımı

Tablo 11. *P. aeruginosa*’ların antibiyotik direnç oranları ile virulans genlerinin dağılımı

Tablo 12. *P. aeruginosa* yüksek riskli klonlarının izole edildiği örnek türlerinin dağılımı

Tablo 13. *P. aeruginosa* yüksek riskli klonlarının antibiyotik direnç oranlarının dağılımı

Tablo 14. *P. aeruginosa* yüksek riskli klonlarında virulans genlerinin saptanma oranlarının dağılımı

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. *P. aeruginosa* virulans faktörleri ve mekanizmaları

Şekil 2. ToxA genine ait amplifikasyon ürünlerinin %1,5'lik agaroz jelde görüntülenmesi

Şekil 3. AlgD, LasB, PlcN, PlcH genlerine ait amplifikasyon ürünlerinin %1,5'lik agaroz jelde görüntülenmesi

Şekil 4. AlgD, LasB, PlcN, PlcH genlerine ait amplifikasyon ürünlerinin %1,5'lik agaroz jelde görüntülenmesi

Şekil 5. MALDI-TOF MS ile tespit edilen ST111, ST175, ST253 klonlarına özgü pik biyobelirteçleri



1.GİRİŞ VE AMAÇ

Pseudomonas aeruginosa aerob, sporsuz, hareketli, nonfermentatif Gram negatif basildir. Genellikle doğada ve nemli ortamlarda bulunan *P. aeruginosa*, hastanelerde dezenfektanlarda, yanık ünitelerinde, entübasyon tüpleri ve stentler gibi birçok implante medikal aletlerde kolonize olarak nozokomiyal enfeksiyonlara sebep olmaktadır (1). Özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış, kistik fibrozis hastalarından izole edilen çoklu ilaca dirençli (ÇİD) ve yaygın ilaca dirençli (YİD) izolatları kronik enfeksiyonlara sebep olan fırsatçı bir patojendir (2). Son yıllarda artan insidansı, ürettiği virülans faktörlerinin çeşitliliği ve sürekli artan antibiyotik direnç oranlarıyla tedavisi zor, sık rastlanan, mortalite ve morbiditesi yüksek enfeksiyonlara neden olmaktadır(3,4).

P. aeruginosa patogeneğinde, çeşitli genler aracılığıyla salgılanan virülans faktörleri ve toksinler gibi hücre dışı proteinlerle ilişkili birçok faktör rol oynamaktadır. Alginat, pili, lipopolisakkarid, ekzotoksin A, fosfolipaz, elastaz, piyosiyeninler tanımlanmış virülans faktörlerinden bazılarıdır (5). Alginat biyofilm oluşumunu sağlayarak bakteriyi antibiyotiklerin ve immun yanıtın etkisinden korur (6,7). Ekzotoksin A lokal doku hasarı, protein sentezinin inhibisyonu, hücresel aktivite ve makrofaj yanıtının bozulmasında rol alır (5). Fosfolipaz C sitoplazmik membran ve akciğer sürfaktanı yıkımına neden olur. Opsoninleri inaktive ederek bakteriyi fagositozdan korur (8). Elastaz immünglobulinler ve kompleman komponentlerinin parçalanmasına sebep olur, nötrofillerin aktivitesini bozar (9). Piyosiyeninler diğer bakterilerin baskılanmasına, solunum yolu silier aktivitesinin bozulmasına ve dokularda oksidatif hasara neden olurlar. Virülans faktörlerinin üretiminin ve patogeneindeki işlevlerinin tespiti, tedavi seçimi ve yeni antibakteriyel stratejilerin geliştirilmesinde önem arz etmektedir.

P. aeruginosa dünya çapında hastanelerde salgınlardan sorumlu, çoklu ilaca dirençli yüksek riskli klonlara sahiptir. ST235, ST111 ve ST175 daha yaygın olanlarıdır. Yüksek riskli klonların özellikle de ST235'in aktarılabilir dirençle ilişkisi bulunmaktadır. ST235 izolatlarında şimdiye kadar 100'den fazla kazanılmış direnç ve 60 kadar edinilmiş beta-laktamaz bildirilmiştir (10). Yüksek riskli klonların küresel yayılımının kontrolü ve çoklu antimikrobiyal dirence etkilerinin araştırılması yeni

terapötik seçenekler geliştirilmesi açısından önemlidir. Bu çalışmada *P.aeruginosa* çoklu ilaç direnci ile birlikte artmış salgın yapma potansiyeli olan yüksek riskli klonları olarak adlandırılan ST111, ST175, ST235, ST253, ST395'in hızlı, pratik bir yöntem olan matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS) yöntemi ile erken tespiti ve *P. aeruginosa* toksin A, alginat, fosfolipaz, elastaz virulans faktörlerinin üretiminde rol alan gen bölgelerinin (toxA, algD, plcN, lasB, plcH) polimeraz zincir reaksiyonu ile araştırılması amaçlanmıştır.

Yüksek riskli klonların varlığı ile virulans genleri arasındaki ilişki değerlendirilecektir. Elde edilecek verilerin enfeksiyon kontrol önlemlerinin hızlı bir şekilde uygulanabilmesine, tanıda ve antimikrobiyal tedavide yeni stratejiler geliştirilmesine ve epidemiyolojik verilere katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa, *Pseudomonaceae* ailesi içinde yer almakta olup *Pseudomonas* cinsi içinde sınıflandırılan nonfermentatif Gram negatif basildir. İlk kez 1882 yılında Gessard'ın enfeksiyon bölgelerinde mavi- yeşil püy etkeni olarak izole ettiği bu mikroorganizmaları, 1894'te Migula tanımlamıştır (11). *Pseudomonas* türleri rRNA gruplarındaki farklılıklara bağlı olarak taksonomik olarak beş gruba ayrılırlar (5). *P. aeruginosa* grup 1'de yer almaktadır.

Tablo 1. Pseudomonadların sınıflandırılması.

rRNA grubu	Alt Grup, Cins ve Tür
I	Floresan grup <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas putida</i> Stutzeri grubu <i>Pseudomonas stutzeri</i> <i>Pseudomonas mendocina</i> Alkaligenes grubu <i>Pseudomonas alcaligenes</i> <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>
II	Pseudomallei grubu <i>Burkholderia mallei</i> <i>B. pseudomallei</i> <i>B. cepacia</i> kompleks <i>B. gladioli</i>
III	Zayıf oksidan grup <i>Acidovorax delafieldii</i> <i>Acidovorax facilis</i> <i>Comamonas terrigena</i> <i>Comamonas aquatica</i>
IV	Diminuta grubu <i>Brevundimonas diminuta</i> <i>Brevundimonas vesicularis</i>
V	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>

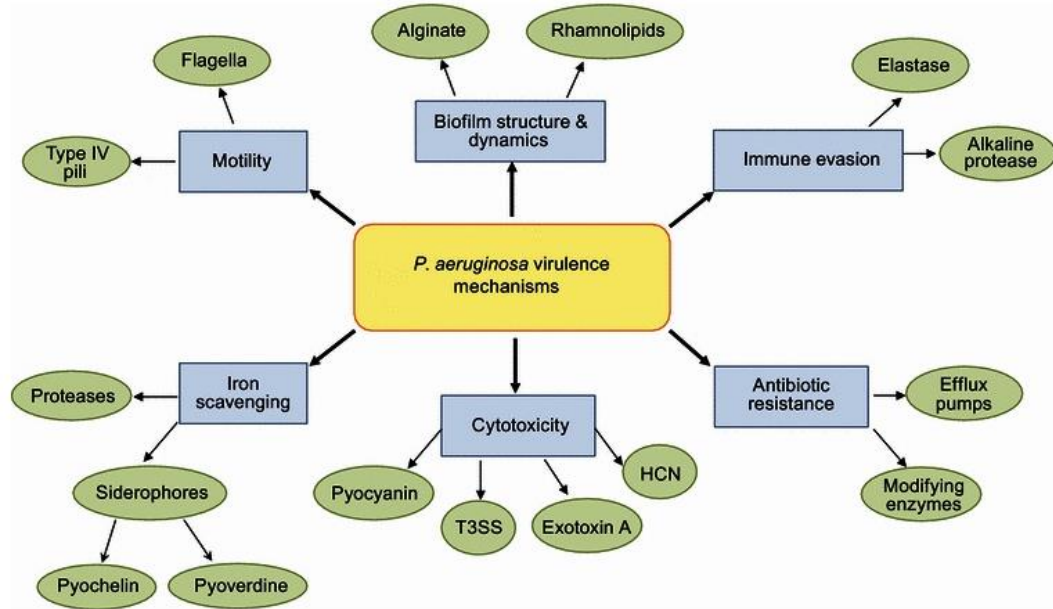
2.1.1. *P. aeruginosa* mikrobiyolojik özellikleri

P. aeruginosa bir uçta tek flagellası ile hareketli, düz veya hafif kıvrımlı Gram negatif basildir. Klinik örneklerden en sık izole edilen türdür. Karbonhidratları son elektron alıcısının oksijen olduğu aerobik solunum ile kullanırlar (1). Koyun kanlı agarda ürettiğinde karakteristik bir görünüm oluşturur. Çevreye yayılan geniş gri koloniler şeklinde görünür ve beta hemoliz yapar. Koloniler sıklıkla timsah derisi görünümündedir ve metalik parlaklık verir. Piyosiyenin (mavi), piyoverdin (yeşil- sarı), piyorubin (kırmızı), piyomelanin (kahverengi- siyah) pigmentlerini oluşturur. Klinik izolatların yarıdan fazlası piyosiyenin pigmentini oluşturur (12). Kültürde *P. aeruginosa*'nın hızlı tanımlanması tipik koloni morfolojisi, pigment üretimi, meyvemsi kokusu ve

oksidaz pozitifliği ile yapılabilir. Piyosiyanin üretimi ve 42°C’de üreyebilme yeteneği ile floresan grubunun diğer üyelerinden ayrılır (5).

2.1.2. Virulans faktörleri

P. aeruginosa fırsatçı bir patojen olduğundan enfeksiyon oluşturmada konağa ve bakteriye ait faktörler rol oynamaktadır. *P. aeruginosa*’nın enfeksiyon patogeneğinde ve antimikrobiyal direnç gelişiminde virulans faktörleri işlev görmektedir. Virulans faktörlerinin salınımı üremenin arttığı logaritmik fazda artış gösterir. Salınımlarının düzenlenmesinde hücreler arası iletişim sistemi görev yapmaktadır. Virulans faktörlerinin üretimi genetik düzeyde kontrol edilir (13).



Şekil 1. *P. aeruginosa* virulans faktörleri ve mekanizmaları (13)

2.1.2.1. Adezinler

P. aeruginosa’nın piluslar ve tutunucu hücre yüzey yapıları olmak üzere iki protein adezini bulunmaktadır. Bu yapılar epitele tutunmadan sorumludur. Pilusları ile öncelikle sialik asitsiz gangliosid reseptörlere tutunur (14). Piluslar musine tutunmaz. Non- pilus adezinlerin bir bölümü ise hem epitele hem de musine tutunmayı sağlamaktadır. Piluslar solunum yollarında kolonizasyon ve biyofilm oluşumunda da görev almaktadırlar (15).

2.1.2.2. Alginat

Alginat tekrar eden yapılar şeklinde mannuronik asit ve glukuronik asitten

oluşmaktadır. Hücre dışında bu yapıya slime tabaka denilmektedir. *P. aeruginosa* biyofilminin ana bileşenidir. Bakterinin etrafında bakteriyi iyice tespit ederek onu mukosiliyer aktivite, fagositoz, antikor ve kompleman gibi konakçı savunmasından korumaktadır (16). Alginat üreten mukoid suşlar, sıklıkla kistik fibrozisli (KF) hastaların solunum yollarından izole edilir. Ayrıca alginat tobramisin gibi aminoglikozidlerin bakterisidal etkisini inhibe edebilir. (17,18).

2.1.2.3. Lipopolisakkarit

Bakteri hücre duvarının dış membranının dış yüzeyinde bulunan kompleks bir glikolipiddir. Lipopolisakkarit tabaka lipid A, çekirdek bölge ve O-polisakkaridi olmak üzere üç bölümden oluşur (19). Astım, kronik obstruktif akciğer hastalığı (KOA) ve KF hastalarının morbidite ve mortalitesi ile ilişkili olan hava yolu epitel hücrelerinde serbest oksijen radikalleri ve müsin üretimini uyarır (20). Lipid A fraksiyonu endotoksin işlevi görür ve mikroorganizmanın biyolojik aktivitesini düzenler. Özellikle sepsis gelişiminde önemli rol oynamaktadır. O polisakkaridi majör yüzey antijenidir. Membran atak kompleksinin lizis etkisinden bakteriyi korur (21).

2.1.2.4. Elastaz

P. aeruginosa'nın hücre dışı proteazlarından biridir. Elastini parçalayarak doku hasarına sebep olur. Elastin solunum yolu epitelindeki sıkı bağlantılar arasında bulunduğu için elastini parçaladığında epitel geçirgenliği artarak enfeksiyon bölgesindeki inflamasyonu artırır (22). Elastin akciğer ve damar duvarının majör komponentidir. Pnömoni ve bakteri yayılımı ile beraber hemorajik lezyonlar olan ektima gangrenozum oluşumu ile ilişkilidir. LasA bir serin proteaz, LasB çinko bağımlı bir metalloproteazdır. LasA elastin içindeki glisin- glisin bağlarını parçalar. Bu işlevi LasB'nin proteolitik aktivitesini artırır (23). LasB en bol bulunan proteazdır ve ana hücre dışı virülans faktörü olarak kabul edilir. Güçlü proteolitik özelliğe sahiptir (24).

2.1.2.5. Fosfolipaz C

Fosfolipaz hemolitik aktivite özelliklerine göre iki tipe ayrılır. Hemolitik fosfolipaz C fosfotidilkolin ve sfingomiyelini hidrolize uğratar. Hemolitik olmayan fosfolipaz C ise fosfotidilkolin ve fosfotidilserini hidrolize uğratar. Akut akciğer hasarı patogeneğinde önemli rol almaktadır. Akciğer sürfaktanını parçayarak etki gösterir. Kistik fibrozis

hastalarının akciğerinde IL-8 üretimini modüle eder. (25,26).

2.1.2.6. Ekzotoksin A

Hücre dışı bir enzim olup çoğu *P. aeruginosa* tarafından salgılanmaktadır. Difteri toksini için tanımlanan mekanizma ile adenozin difosfat transferini katalize eder. Bu reaksiyon elongasyon faktör 2'yi inaktive ederek konakçı protein sentezini inhibe eder (27). İnvazyondan ve bölgesel doku hasarından sorumludur. Ayrıca apoptoz sürecinde yer alan kaspazların aktivasyonunu da tetikler (28). Bu toksini üreten suşların çok daha virulan olduğu belirtilmiştir (5).

2.1.2.7. Piyosiyanin

Öncü molekülü korizmik asit olan mavi pigment metabolitidir (29). Piyosiyanin oksijenin toksik formu olan hidrojen peroksit ve süperoksit oluşumlarını katalize ederek oksidatif hasara sebep olur. Serbest radikal ve proinflamatuvar etkileri nedeniyle hastalık şiddeti ve akciğer fonksiyonu azalması ile ilişkilidir. Akciğerde kalsiyum homeostazını bozduğu, hücre solunum inhibisyonu, siliyer aktivite bozukluğu ve epidermis çoğalmasını durdurduğu gösterilmiştir (30).

2.1.2.8. Biyofilm

P. aeruginosa antibiyotiklere, dezenfektanlara ve konak savunmasına yüksek dirençli sağlam biyofilmler geliştiren bir bakteridir. Biyofilm bir yüzeye tutunan ve bakteriyel enfeksiyonların kalıcılığında önemli rol oynayan mikroorganizma topluluklarıdır. Biyofilm içerisinde bulunan bakteriler planktonik bakterilere kıyasla birkaç kat daha dirençlidir. Biyofilm gelişimi birkaç yol ile kontrol edilmekle birlikte hücreler arası iletişimi sağlayan “quorum sensing” sinyal sisteminin, stres tepkilerini düzenleyen genlerin ekspresyonunun, oksijen ve demir miktarına bağlı olarak ortama adaptasyonun bu süreç için hayati önem taşıdığı gösterilmiştir (31). Biyofilmler insan vücudunda akciğerde mukus tıkaçlarında, kateter, protez, kontakt lensler gibi canlı ve cansız yüzeylerde oluşabilir (32). *P. aeruginosa* biyofilminde hücreleri çevreleyen ve çevresel stresten korunmasını sağlayan bir matriks bulunur. Matriks polisakkarit, protein, lipid ve hücre dışı DNA'dan oluşur. Polisakkarit yapı Pel, Psl ve Alginat'tan oluşur (33,34). Psl biyofilm hücrelerini bağlayarak matriks oluşumunu sağlar (35). Pel hücreleri bağlamak ve hava-sıvı molekülleri arasında bir düzenek oluşmasını sağlamak için gereklidir (36). Alginat özellikle mukoid *P. aeruginosa* suşlarının biyofilmlerinde

yoğun olarak bulunur. Mukoid suşlar mukoid olmayanlara göre biyofilm yapısından dolayı antibiyotiklere daha dirençlidir (37).

2.1.2.9. Quorum sensing (Çoğunluğu algılama)

Quorum sensing (QS) bakteriyel virulans ve biyofilm oluşumunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan hücre yoğunluğuna dayalı hücreler arası iletişim sistemini oluşturmaktadır. QS ağının yalnızca bakteriyel popülasyondaki değişikliklere yanıt vermekle kalmayıp aynı zamanda çevresel stres faktörlerine de yanıt verdiği bilinmektedir. Bakteriler tarafından kullanıldığı bilinen üç tip QS sinyali vardır. Gram negatif bakteriler tipik olarak açıl-homoserin laktonlar (AHL) üretirken, Gram pozitif bakteriler küçük peptidler kullanır. Otoindükleyici-2 (AI-2) sinyal molekülü hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilerde tespit edilmiştir. Bu nedenle bakterinin diğer bakteri popülasyonlarını algılamasına izin veren evrensel bir sinyal molekülü olduğu düşünülmektedir (38,39,40). Quorum sensing ağını *las*, *iqs*, *pqs*, *rhl* dahil olmak üzere birkaç bağlantılı sistem oluşturmaktadır (13). Bakteri popülasyonu arttıkça *P.aeruginosa*, N- (3 oxohexanoyl)- L homoserin lakton (OHHL) ve N- bütiril homoserin lakton tarafından üretilen otoindükleyici sinyal molekülleri birikir ve hücre içi eşik konsantrasyonu elde edilir edilmez bu moleküller aynı kökenli transkripsiyonel düzenleyicilere bağlanır ve aktive eder (41). *Las* ve *rhl* sistemleri çoklu virulans faktörlerinin üretimini düzenlemektedir. Ana çekirdek algılayıcı sistem *lasR*'deki mutasyonlar özellikle kistik fibrozis hastalarının akciğer enfeksiyonlarından izole edilen *P. aeruginosa* suşlarında yaygındır (42,43).

2.1.3. Epidemiyoloji

P.aeruginosa tüm dünyada yaygın olarak bulunmaktadır. Sudan, havadan, hayvanlardan ve bitkilerden izole edilebilir. Üremek için çok az besin maddesine ihtiyaç duymaktadır. Distile su içinde dahi üreyebilmektedir. Farklı fiziksel koşullara çok kolay adapte olabilmektedir. Bu özellikleri etkili bir fırsatçı patojen olmasını sağlamıştır.

P. aeruginosa nemli ortamlarda kolay yaşabilmektedir. İnsanlarda kulak, koltuk altı, perine gibi nemli bölgelere yerleşir (1). Solunum cihazları, dezenfektanlar, küvet ve paspaslar önemli *P. aeruginosa* rezervuarlarıdır.

P. aeruginosa insanlarda normal florada nadiren de olsa bulunabilir. Deride % 0-2,

burun mukozasında % 0-3,3, boğazda % 0-6,6, dışkıda % 2,6-24 oranlarında görülebilmektedir. Hastaneye yatan yanıklı, solunum cihazına bağlı, kemoterapi alan ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanılan hastalarda taşıyıcılık % 50'lere kadar yükselmekte ve enfeksiyonlara zemin oluşturmaktadır (44).

2.2 Klinik Hastalıklar

2.2.1. Solunum yolu enfeksiyonları

Alt solunum yollarında *P. aeruginosa* enfeksiyonları asemptomatik kolonizasyon, trakeabronşit, pnömoni veya ciddi nekrotizan bronkopnömoniye kadar farklı klinik çeşitlilikte görülebilmektedir. Kolonizasyon nötropenik hastalarda, kistik fibrozis veya diğer kronik akciğer hastalıkları olan kişilerde görülmektedir. Geniş spektrumlu antibiyoterapi kullanımı, mikroorganizmanın kolonizasyonu kolaylaştıran mekanik ventilatör kullanımı özellikle immün sistemi bozuk olan hastaları *P.aeruginosa* enfeksiyonlarına yatkın hale getirmektedir (1). Bu tip hastalarda genellikle akciğer enfeksiyonu diffüz, bilateral ve nodüler infiltratlar içeren bronkopnömoni şeklindedir. Kistik fibrozis hastalarından sıklıkla mukoid suşlar izole edilmektedir. Ağır ve progresif seyirli akciğer hastalığı olanlarda daha fazla *P. aeruginosa* enfeksiyonu görülmekle birlikte *P. aeruginosa* enfeksiyonu geçirenlerde kistik fibrozis daha ağır seyirli olmaktadır (45).

2.2.2. Bakteriyemi

Bakteriyemi fokal bir enfeksiyon odağı yoksa primer olarak kabul edilir. Genellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda ortaya çıkmaktadır. Hematolojik malignite, diabetes mellitus, nötropeni, ağır yanıklar, organ transplantasyonu ve AIDS predispozan faktörlerdir. *P. aeruginosa* bakteriyemisinde diğer Gram negatif bakterilerden farklı olarak solunum yetmezliği ve sarılık daha sık görülür. Ektima gangrenozum gibi patognomonik deri lezyonları görülmektedir. Ektima gangrenozum veziküller şeklinde başlar. Hemoraji, nekroz ve ülserasyon ile küçük yuvarlak nodül şekli alır. Lezyondan Gram boyama ve kültür ile etken gösterilebilir (1,45).

2.2.3. Santral sinir sistemi enfeksiyonları

P. aeruginosa enfeksiyonlarında beyin absesi ve menenjit gelişimi kulak, paranasal sinus gibi bir kaynaktan komşuluk yoluyla, kafa travması veya invaziv bir girişimle,

nadir olarak da uzak bir kaynaktan bakteriyemi sırasında olabilmektedir (45).

2.2.4. Kulak enfeksiyonları

P. aeruginosa normal kulak florasında nadiren bulunur. Yüzücü kulağı olarak tabir edilen eksternal otit enfeksiyonunda yüzmek önemli bir risk faktörüdür. Bu enfeksiyon kendini sınırlayıcı, iyi huyludur. Malign eksternal otit ise daha çok diyabetli, yaşlı hastalarda ve küçük damar hastalığı olan kişilerde görülmektedir. Bu enfeksiyon alttaki yumuşak dokulara invaze olabilen daha virulan formdur (1).

2.2.5. Göz enfeksiyonları

P. aeruginosa bakteriyel keratitin en sık etkenlerindendir. Kontakt lens kullanımında, önceden göz radyasyonu almış, yoğun bakım hastalarında daha sık görülmektedir. Erken tedavi başlanılmazsa korneal ülser ve perforasyona kadar ilerleyebilmektedir (45).

2.2.6. Gastrointestinal enfeksiyonlar

P. aeruginosa gastrointestinal enfeksiyonları en sık yenidoğanlarda ve nötropenik hastalarda görülmektedir. Sepsis gelişimi için gastrointestinal yol önemli bir giriş kaynağıdır. Hastanede uzun süreli kemoterapi tedavisi alan nötropenik kanser hastalarında, geniş spektrumlu antibiyotik kullanım öyküsü de olması *P. aeruginosa*'nın gastrointestinal sistemde kolonize olmasına ve hastaların enfeksiyona yatkın hale gelmesine sebep olmaktadır. Yenidoğan ve nötropenik hastalarda ağır seyirli nekrotizan enterokolite etken olabilmektedir (45).

2.2.7. Üriner sistem enfeksiyonları

P. aeruginosa'nın üriner sistem enfeksiyonları sıklıkla sonda, kateterizasyon ve cerrahi girişime bağlı olarak hastane kaynaklı gelişmektedir. Enfeksiyon asendan olabileceği gibi primer bir odaktan bakteriyemi ile de gelebilmektedir. Özellikle çoklu antibiyoterapi kullanan hastalarda *P. aeruginosa* etken olmaktadır (1,45).

2.2.8. Kemik ve eklem enfeksiyonları

Bu enfeksiyonlar hematogen ve komşuluk yolu ile olmak üzere iki yol ile oluşmaktadır. Hematojen enfeksiyonlar daha çok intravenöz ilaç bağımlılarında gelişir. Eklem aralığı, kıkırdak ve komşu kemiği tutar. Komşuluk yolu ile gelişen enfeksiyonlar

travma, cerrahi girişim ya da yumuşak doku enfeksiyonuna bağlı olarak gelişir. Kemik ve eklem enfeksiyonları çocuklarda, yaşlılarda ve altta yatan hastalığı olan kişilerde görülür (45).

2.2.9. Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları

P. aeruginosa çeşitli primer deri ve yumuşak doku hastalıklarına sebep olur. Yanık, travma gibi bütünlüğü bozulmuş deride nem de varsa primer enfeksiyon meydana gelebilmektedir. Örneğin ağır yanıklarda deride hakim olan Gram pozitif bakteri florası yerini Gram negatif bakterilere özellikle de *P. aeruginosa*' ya bırakır (45). Lenfatikler boyunca ilerleyip, perivasküler dokuda çoğalarak kan dolaşıma geçer ve bakteriyemi ile sonuçlanır. Yanıklı hastalardaki *P. aeruginosa* sepsisinde mortalite oranları yüksek düzeydedir (1).

2.2.10. Endokardit

P. aeruginosa ilaç bağımlılarında doğal kapakta yerleşerek, diğer hastalarda ise prostetik kalp kapağına yerleşerek enfektif endokardite neden olmaktadır. Triküspit kapak tutulumu daha sıktır. Aortik veya mitral kapak endokarditlerine göre kronikleşmeye daha eğilimlidir fakat daha ılımlı seyretmektedir (1).

2.3. *P. aeruginosa* Enfeksiyonlarının Tedavisi

Son yıllarda çok ilaca dirençli (ÇİD)/ yaygın ilaca dirençli (YİD) *P. aeruginosa* yüksek riskli klonlarının dünya çapında yayılımı ile birlikte *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisi bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir. Bu durumun başlıca nedenleri; *P. aeruginosa*' nın özellikle hastane ortamında ve bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda ciddi enfeksiyonlara neden olması, antimikrobiyal direnç gelişimi ve aktarılması için yüksek kapasiteye sahip olmasıdır (46,47). Terapötik alternatiflerin olmaması nedeniyle bu antibiyotik dirençli bakterilere bağlı enfeksiyonlar dünya çapında önemli morbidite ve mortaliteye sahip bir tehdit unsuru olmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü 2017 yılında karbapenem dirençli *P. aeruginosa*' nın yeni antibiyotiklerin acilen gerekli olduğu “kritik” grupta listelendiğini bildirmiştir (48).

2.3.1. Beta-laktamlar

Beta laktam antibiyotikler penisilin bağlayan proteinlere bağlanarak transpeptidaz aktivasyonunu inhibe edip peptidoglikan sentezini engellemektedirler. Böylece bakteri

hücre duvar sentezi gerçekleşemez ve bakterisidal etki göstermiş olurlar (49).

2.3.1.1. Penisilinler

Aminopenisilinler *P. aeruginosa*’ya karşı etkisizdirler. Karboksipenisilin grubunda yer alan tikarsilin, karbenisilin ile üreidopenisilin grubunda yer alan piperasilin, mezlosilin, azlosilin antipseudomonal penisilinlerdir. Karboksipenisilinler yüksek oranda tuz içeriği ve yüksek direnç nedeniyle klinik olarak kullanılmamaktadır. Üreidopenisilinler, tazobaktam ve aminoglikozidlerle kombine kullanımda sinerjik etki gösterirler (49).

2.3.1.2. Sefalosporinler

Birinci ve 2. kuşak sefalosporinler *P. aeruginosa*’ya karşı etkisiz iken Gram negatif etkinliği yüksek olan 3. kuşaktan sefoperazon ve seftazidim *P. aeruginosa*’ya etkili sefalosporinlerdir. 4. kuşakta bulunan sefepim ve sefpirom da *P. aeruginosa*’ya karşı etki etmektedir ve parenteral olarak kullanılmaktadır (50).

2.3.1.3. Karbapenemler

Bu grupta klinikte sıklıkla kullanılan imipenem ve meropenem bulunmaktadır. *P. aeruginosa* bir diğer karbapenem olan ertapeneme karşı doğal dirençlidir. Doripenem *P. aeruginosa*’ya en etkili karbapenemdir. Meropenemin Gram negatif bakterilere, imipenemin ise Gram pozitif bakterilere etkinliği biraz daha fazladır. Çoklu ilaca dirençli *P. aeruginosa* suşlarında yeni stratejilere ihtiyaç duyulduğundan kullanılan dozun artırılması, infüzyon süresinin uzatılması veya kombinasyon rejimleri gibi seçenekler uygulanmaktadır. Örneğin; ciddi *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında karbapenemler aminoglikozidlerle kombine kullanılmaktadır (51).

2.3.1.4. Monobaktamlar

Bu grupta klinik olarak kullanımda bulunan tek üye aztroenamdır. Gram negatif bakterilere karşı etkili iken Gram pozitif bakterilere ve anaerob bakterilere karşı etkinliği yoktur. *P. aeruginosa*’ya karşı etkilidir. Ancak dar spektrumlu bir antibiyotik olduğundan polimikrobiyal ve nedeni bilinmeyen enfeksiyonlarda tek başına kullanılmamalıdır (52).

2.3.2. Aminoglikozidler

Aminoglikozidler genel olarak hücrenin protein sentezini engelleyerek bakterisidal etki gösterirler. Gram negatif bakterilere karşı etkinlik gösterirler. Anaeroblara karşı etkileri yoktur. *P. aeruginosa*'nın etken olduğu idrar yolları enfeksiyonlarında monoterapide kullanılabilmelerine rağmen ÇİD/YİD *P. aeruginosa* suşlarının neden olduğu daha ciddi enfeksiyonların tedavisi için diğer antimikrobiyallerle kombine kullanılmalıdır (53). Pnömoni ve menenjit gibi enfeksiyonlarda farklı uygulama yolları kullanılabilir. Pnömoni tedavisi için inhale, menenjit tedavisi için intraventriküler aminoglikozidler, sistemik yolla uygulanan bir ilaç ile kombine verilebilmektedir. Böylelikle enfeksiyon odağında yüksek konsantrasyon elde edilir ve sistemik toksisitenin etkilerinden kaçınılmış olunur (54,55).

2.3.3. Kinolonlar

Bu grup antibiyotikler DNA giraz ve topoizomeras 4'ün aktivitesini inhibe ederek bakterisidal etki gösterirler. Özellikle siprofloksasin *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında oral yolla kullanım avantajlarından ötürü sıklıkla tercih edilir. Tek başına ya da kombine olarak kullanılabilmektedir (56).

2.3.4. Kolistin

Kolistin (Polimiksin E) ve polimiksin B klinik kullanımda olan polimiksinlerdir. Polimiksinler pozitif yüklüdür ve lipopolisakkarit tabakanın negatif yüklü fosfat gruplarıyla etkileşime girerler. Ayrıca lipopolisakkarit tabaka ile etkileşime girebilen hidrofobik bölgelere sahiptirler. Bu etkileşimler sonucu sitoplazmik membranda porlar açarak bakterisidal etki gösterirler. Kolistin ÇİD/YİD *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisinde bir veya daha fazla ajanla kombinasyon halinde kullanılmalıdır (57,58).

2.3.5. Yeni antipsödomonal antibiyotikler

2.3.5.1. Sefiderokol

Sefiderokol bir siderefor sefalosporindir. Bakteriyel demir taşıma mekanizmasını kullanarak bakteri dış zarından geçer. Metallo betalaktamazlar dahil dört beta laktamaz sınıfının tümüne karşı etkindir ve çoklu ilaca dirençli suşlar dahil olmak üzere birçok gram negatif bakteriye karşı etkilidir (59).

2.3.5.2. Seftolozan-tazobaktam

Özellikle ÇİD/YİD *P. aeruginosa* olmak üzere birçok ÇİD gram negatif basile karşı etkili bir kombinasyondur. Seftolozan en aktif antipsödomonallerden biridir. AmpC' ye karşı etkili ancak KPC, MBL' e karşı etkinliği yoktur. Seftolozan-Tazobaktam, doz optimizasyonu yapılarak ve olası bir direnç gelişiminin önüne geçmek için kombinasyon tedavisi seçilerek kullanılmalıdır (60).

2.3.5.3. Meropenem-vaborbaktam

Vaborbaktam siklik boranik asit bazlı beta laktamaz inhibitörüdür. Serin beta laktamazlara karşı inhibitör etkiye sahiptir. Sınıf A ve C beta laktamazlara etkilidir (61).

2.3.5.4. Seftazidim-avibaktam

Avibaktamın seftazidime eklenmesi seftazidimi *P. aeruginosa*'nın Amp- C, GSBL ve GES'in neden olduğu enzimatik bozulmadan korur ve seftazidimin minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değerlerinin düşmesini sağlar. MBL üreten suşlara karşı etkinliği yoktur. Avibaktam sınıf A,C ve kısmen de D beta laktamazlara karşı etkili iken, *Acinetobacter* izolatlarının ürettiği sınıf D beta laktamazlara karşı etkinliği yoktur. Yeni antipsödomonal antibiyotiklerin etkinlikleri ile ilgili daha ayrıntılı bilgi için, bu antibiyotiklerle tedavi edilmiş daha fazla ÇİD/YİD *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının verilerine ihtiyaç vardır (62,63).

2.4. *P. aeruginosa* Antimikrobiyal Direnç Mekanizmaları

2.4.1. Beta-laktam direnci

Bu antibiyotiklere dirençten başlıca sorumlu mekanizma Beta-laktamaz enzim grubudur. Enzim beta-laktam halkasındaki karbonil grubu ile bir ester köprüsü kurarak siklik amid bağını parçalar (64,65). Ambler sınıflandırmasında beta-laktamazlar aminoasit ve nükleotid sekans analizine göre 4 ayrı sınıf olarak tanımlanmıştır. Bush, Jacoby ve Medeiros sınıflandırmasına göre beta-laktamazlar substrat profilleri, inhibitörlere duyarlılıkları, molekül ağırlıkları gibi özelliklerine göre sınıflandırılmıştır. A,C,D sınıfı serin-ester aracılığıyla işlev görürken, B sınıfı çinko iyonuna gereksinim duyan metalloenzimlerdir. A sınıfının temel substratı penisilinlerdir. Birinci kuşak sefolosporinleri ve karbapenemleri de parçalar. Çoğu

plazmidle taşınır (66,67). B sınıfı çinko iyonuna gereksinim duyan tiol grubu bulundurur. Çoğu karbapenemaz aktivitesi taşımaktadır ve penisilin, sefolosporinlerin yanında karbapenemleri de parçalamaktadır (68). C sınıfı esas olarak sefolosporinaz aktivitesi gösterir. Kromozomlarda lokalize AmpC geni tarafından kodlanırlar. Genellikle indüklenebilir niteliktedir. Beta-laktam varlığında üretimleri artar ve klavulanik asitle inhibe edilemezler. *P. aeruginosa* tarafından da aktif olarak üretilirler. D sınıfı ise oksasilini hidrolize edebilme yeteneğine sahip enzimlerdir ve bu sınıfın tamamına yakını *Acinetobacter baumannii*' de saptanmıştır (64,65). Karbapenemazlar, çoğunlukla plazmid üzerinde transpozonlarda kodlanan, kolayca aktarılabilen enzimlerdir.

Tablo 2. Karbapenemazların sınıflandırılması

Ambler Sınıf	Bush Jacoby Medeiros Sınıf	Enzimler
A	2f	KPC, GES, IMI
B	3	IMP, VIM, GIM, NDM
D	2d	OXA

Metallobetalaktamazlar aztreonam hariç tüm beta-laktamları hidroliz edebilirler. *P.aeruginosa*'da tanımlanmış karbapenemazların büyük çoğunluğunu oluştururlar. Dış membran proteinlerindeki değişiklikler ile de Gram negatif bakterilerde porin değişikliklerine bağlı olarak direnç gelişimi gözlenebilir. *P. aeruginosa*'da özel bir kanal proteini olarak bulunan OprD kaybı ile karbapenemlere direnç gelişir. Bir diğer direnç mekanizması aktif pompa sistemleriyle antibiyotiğin hücre içinde birikimi azalarak direnç gelişimidir. Aktif dışa atım (effluks) pompalama sistemleri çoğunlukla yapısal olup düzenleyici genler tarafından kontrol altındadır. Bu genlerdeki mutasyonlar ile direnç gelişimi görülmektedir. *P. aeruginosa*'da MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN gibi aktif dışa atım pompaları bulunmaktadır. Bunlardan en bilineni MexAB-OprM aktif pompalama sistemidir. Bu sistem imipenem hariç tüm beta-laktamalara ve kinolonlara direnç oluşturması ile dikkat çekmektedir (69).

2.4.2. Aminoglikozid direnci

Aminoglikozidlere karşı direnç gelişiminde en önemli mekanizma enzimatik inaktivasyon olmakla birlikte ribozomal ve aktif pompa sistemleri ile de direnç gelişimi gözlenebilmektedir. *P. aeruginosa*'da en yaygın saptanan enzimler amikasin,

gentamisin, tobramisin direncine yol açan nükleotidiltransferaz enzimidir (48).

2.4.3. Kinolon direnci

P. aeruginosa'da kinolon direncinde aktif pompa sistemleri tanımlanmıştır. Bunun dışında kromozomal kaynaklı DNA giraz enzim mutasyonları ile direnç gelişimi olmaktadır. DNA giraz enziminin alt birimlerine karşı direnç gelişmektedir. Bunlardan GyrA gen mutasyonları tüm kinolonlara karşı direnç gelişiminden sorumlu iken GyrB mutasyonu tarafından oluşturulan direnç tüm kinolonlara karşı olmayabilir. GyrB gen mutasyonları daha çok *P. aeruginosa* ve *E. coli*' de tanımlanmıştır (70). Qnr genleri ile de plazmid aracılı aktarılabilir florokinolon direnci görülmektedir (71).

2.4.4. Kolistin direnci

P. aeruginosa' da kolistin direnci diğer antibiyotiklere oranla daha az görülmektedir. Ancak çoklu ilaca dirençli *P. aeruginosa* izolatlarında artan kolistin kullanımı nedeniyle direnç gelişimleri görülmektedir. Lipopolisakkarid tabakanın lipid A kısmındaki değişimlerden kaynaklanan PmrAB, PhPQ ile bağlantılı mutasyonlar ile kolistin direnci görülebilmektedir. Bunun dışında *P. aeruginosa*'da plazmid aracılı mcr-1 gen mutasyonu ile de direnç gelişimi görülebilmektedir (72).

2.5. *P. aeruginosa* Yüksek Riskli Klonları

Çok ilaca dirençli (ÇİD) ve yaygın ilaca dirençli (YİD) fenotipik özelliklerle ilişkili küresel *P. aeruginosa* türleri, yüksek riskli klonlar olarak adlandırılmaktadır. Yüksek riskli klonlar dünya çapında hastanelerdeki salgınlarla ilişkilidir. Sınırlı sayıda tedavi seçeneği mevcut olmasından dolayı büyüyen bir tehdit oluşturmaktadır (73,74). Özellikle geniş spektrumlu beta- laktamaz (GSBL) ve karbapenemaz enzimi üretimlerine göre küresel anlamda en önemli yeri ST111, ST175, ST233, ST235, ST244, ST277, ST298, ST308, ST357, ST654 almaktadır (75). ST235 A ve B sınıflarından çoklu karbapenemazlar dahil, 60' dan fazla çeşitli varyasyonla beta laktamaz üretimi ile hastanelerde yayılımından sorumludur ve dünya çapında baskın olan tiptir. Belçika, Portekiz, Yunanistan, Almanya, Kore, Japonya, Brezilya ve Rusya'da izole edilmiş olup geniş bir coğrafik dağılım göstermektedir. ST235 suşlarında kolistin direnci yaygın değildir fakat mcr pozitif ST235 suşları bildirilmiştir. ST175 daha sıklıkla bazı Avrupa ülkelerinde bulunur ve spesifik kromozomal mutasyonlar ile ÇİD/YİD izolatlar oluşturur ve diğer yüksek riskli

klonlara istinaden daha düşük virulansa sahiptir. 2019'da İspanya'da ÇİD bir *P.aeruginosa* suşunun OXA-681 taşıdığı tespit edilmiştir. OXA-681 seftolozan dahil olmak üzere sefolosporinleri hidroliz edebilmektedir. Seftolozan-tazobaktam ve seftazidim-avibaktam gibi yeni kombine antipseudomonal antibiyotiklere karşı çapraz direnç gelişimine sebep olabilmektedir (76). ST298, ST308, ST357 bir sitotoksin olan ekzoenzim U üretirler bu nedenle yüksek virulansa sahiptirler. ST277 Brezilya'da yaygın olarak bulunmaktadır. Özellikle SPM tip metallobetalaktamaz üretimi ile ilişkilidir ve çoğu suş sadece kolistine duyarlıdır. (77,78). ST277 suşunun yayılımında göçmen kuşların önemli rol oynadığı ve ayrıca çevresel su kaynaklarında da ST277'nin izole edildiği bildirilmiştir (79). ST111 çoğunlukla Avrupa ülkelerinde raporlanmıştır ve OprD karbapenem porin kaybı, effluks pompasının aşırı ekspresyonu ve GSBL üretimi ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (80). ST233 ilk başlarda kolistine duyarlı bir klon olarak rapor edilmiştir fakat son yıllarda kolistine dirençli YİD bir klon olarak bildirilmiştir (81).

2.6. Matriks ile Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon/ İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF MS)

MALDI-TOF MS klinik örneklerden mikroorganizmaların tanımlanmasında en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir. MALDI-TOF MS kullanılarak mikroorganizmaların tanımlanması hızlı, pratik ve uygun maliyetlidir. Böylelikle bu yöntem mikrobiyoloji laboratuvarlarında adeta bir devrim yaratmıştır (82,83). Bu yöntemde kültür plaklarında üretilen bakteri kolonileri kullanılmaktayken, kültüre ihtiyaç duymadan klinik örneklerden direkt bakteri izolasyonunun geliştirilmesi MALDI-TOF MS 'in kullanışlılığını artırmıştır. Kültürde üreyen bakteri kolonisi bir plaka üzerine yerleştirilir ve matriks eklenir. En sık kullanılan matriks a-siyano-4-hidroksisinamik asittir (CHCA). Matriks lazerin enerjisini verimli bir şekilde emer, moleküle proton transfer ederek molekülün iyonlaşmasını sağlar. Matriks eklenip kuruması beklenen plaka daha sonra MS cihazına yerleştirilir. Plaka daha sonra mor ötesi (UV) ışınlar kullanılarak ışınlanır ve bakterilerdeki proteinler (esas olarak ribozomal proteinler) iyonize edilir. İyonizasyon işlemi sonrasında katı veya likit halde bulunan moleküller yüklü iyonize gaz molekülleri haline dönüştürülürler. Ardından bu iyonlaşan moleküller plaktan ayrılarak serbest hale geçerler. Uçuş zamanlı kütle analizörlerinde, üretilen iyonların dedektöre ulaşmak için sabit bir mesafeyi

katetmeleri gerekmektedir. Bu nedenle iyonlara yaklaşık uzunluğu 1 metre olan bir t p içerisinde hareket etmeleri için hızlandırıcı voltaj (20 kV) uygulanır (84). Levhadan ayrılan iyonize analit molekülleri, uygulanan voltaj ile uçuş tüpü içerisinde dedektöre ulaşana kadar sürüklenirler. Analit moleküllerinin uçuş tüpünü katetme süreleri, moleküllerin kütlesi ile orantılıdır. Bu iyonize proteinlerin dedektöre uçması için gereken süre kütle/yük (m/z) oranını belirler. Bileşen proteinlerin ve sinyalin yoğunluğu kütle spektrumlarını oluşturur ve tepe noktaları 2000-20000 m/z arasında değişen kütle spektrumlarıyla sonuçlanırlar. Elde edilen kütle spektrumu bakterinin tanımlanması için referans veri tabanındaki bilgiler ile kar ıla tırılır. Karşılaştırma sonrasında cins ve tür düzeyinde tanımlama yapılabilir. MALDI-TOF MS bakterinin tanımlanma süresini yaklaşık bir gün kısaltabilmektedir. Böylelikle daha erken antibiyoterapi ve müdahale ile hızlı klinik yanıt sağlayabilmektedir (85,86). MALDI-TOF MS diğer teknolojilerle de birlikte uygulanmaya ba landığından bu alandaki gelişmeler ile mikrobiyal tiplendirme çalışmaları ve dirençli bakterilerin tespiti için daha yaygın kullanım alanı bulabilecektir (87,88).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışmasına dair etik kurul onayı, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 23.02.2022 tarihli 2022/96 karar nolu mikrobiyoloji çalışması olarak verilmiştir. Etik kurul onayı EK-1’de verilmiştir.

Bu çalışmada Ondokuz Mayıs Üniversitesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı’na çeşitli kliniklerden 01.07.2020- 07.06.2022 tarihleri arasında gönderilen örneklerden izole edilen imipenem veya meropenem antibiyotiklerinden en az birine dirençli olduğu saptanan 100 adet *P. aeruginosa* izolatu dahil edilmiştir. Her hastanın tek örneği çalışmaya alınmıştır.

3.1. Bakterilerin Tanımlanması ve Duyarlılık Testleri

Laboratuvara gelen klinik örnekler %5 koyun kanlı agar ve Eozin Metilen Blue agara ekilip 35°C’ de 18-24 saat inkübe edildi. Üreyen bakterileri tür düzeyinde tanımlama, Vitek MS (BioMeriux, Fransa) otomatize sistemi veya konvansiyonel yöntemler ile yapıldı. Gram negatif, karakteristik koloni morfolojisine sahip, laktoz negatif, oksidaz pozitif, mavi-yeşil pigment oluşturan mikroorganizmalar *P. aeruginosa* olarak tanımlandı. Antibiyotik duyarlılıkları Vitek 2 (BioMeriex, Fransa) otomatize sistemi veya Kirby Bauer disk difüzyon yöntemi ile European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) önerilerine göre yapıldı ve yorumlandı (89). İzolatlar moleküler testler yapılana kadar -20 °C’ de saklandı.

3.2. Virulans Genlerinin Moleküler Yöntemler ile Tespit Edilmesi

3.2.1. *P. aeruginosa* DNA’ sının izolasyonu

DNA ekstraksiyonu kaynatma yöntemi ile yapılmıştır.

1. Bakteriler kanlı agara pasajlanarak 35 °C’ de 18-24 saat inkübe edildi.
2. Elde edilen saf kolonilerden bir öze dolusu alınarak 500 µl distile su içeren mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı.
3. Vorteks ile homojenizasyon işlemi yapıldı.
4. Tüpler 100 °C’de 15 dakika bekletilecek şekilde kuru ısı bloğuna yerleştirildi.
5. Tüpler soğutmalı santrifüj cihazına yerleştirilerek 4 °C ve 15000 x g’de 20 dakika santrifüj edildi.
6. Daha sonra üstte kalan süpernatant DNA kullanmak üzere -20 °C’ de saklandı.

3.2.2. DNA amplifikasyonu

Virulans genlerinin tespiti optimizasyon çalışmaları yapılarak bir otomatik termal döngüleyicide (Eppendorf, Hamburg, Almanya) toxA için unipleks; algD, plcN, lasB, plcH için multipleks PZR işlemi gerçekleştirildi (90).

Tablo 3. ToxA, LasB, AlgD, PlcN, PlcH gen bölgelerine ait spesifik primer dizileri (90).

	Forward Primer	Reverse Primer	bp
tox A	5'-CTGCGCGGGTCTATGTGCC-3'	5'-GATGCTGGACGGGTCGAG-3'	270
las B	5'-GGAATGAACGAACGAAGCGTTCTCCGAC-3'	5'-TTGGCGTCGACGAACACCTCG-3'	284
alg D	5'-CGTCTGCCGCGAGATCGGCT-3'	5'-GACCTCGACGGTCTTGCGGA-3'	313
plc N	5'-TCCGTTATCGCAACCAGCCCTACG-3'	5'-TCGCTGTCGAGCAGGTCTGAAC-3'	481
plc H	5'-GCACGTGGTCATCCTGATGC-3'	5'-TCCGTAGGCGTCGACGTAC-3'	608

Tablo 4. ToxA PZR karışımı (90).

10X taq buffer	2,5 µl
25 mM MgCl ₂	2 µl
10 mM dNTP mix	1 µl
20 pmol ToxA-F primer	1 µl
20 pmol ToxA-R primer	1 µl
5 U/ µl Taq DNA polimeraz	0,5 µl
Kalıp DNA	2 µl
Saf Su	15 µl
Toplam	25 µl

Tablo 5. LasB, AlgD, PlcN, PlcH PZR karışımı (90).

10X taq buffer	2,5 µl
25 mM MgCl ₂	2 µl
10 mM dNTP mix	1 µl
20 pmol lasB-F primer	1 µl
20 pmol lasB-R primer	1 µl
20 pmol AlgD-F primer	1 µl
20 pmol AlgD-R primer	1 µl
20 pmol PlcN-F primer	1 µl
20 pmol PlcN-R primer	1 µl
20 pmol PlcH-F primer	1 µl
20 pmol PlcH-R primer	1 µl
5 U/ µl Taq DNA polimeraz	0,5 µl
Kalıp DNA	2 µl
Saf Su	9 µl
Toplam	25 µl

Tablo 6. Virulans genlerinin PZR amplifikasyon programı (90).

ToxA	İlk denatürasyon	94 °C	3 dakika	1 döngü
	Denatürasyon	94 °C	1 dakika	30 döngü
	Bağlanma	63 °C	1,5 dakika	
	Uzama	72 °C	1 dakika	
	Son Uzama	72 °C	5 dakika	1 döngü
LasB,AlgD, PlcN, PlcH	İlk denatürasyon	94 °C	3 dakika	1 döngü
	Denatürasyon	94 °C	1 dakika	30 döngü
	Bağlanma	60 °C	1,5 dakika	
	Uzama	72 °C	1 dakika	
	Son Uzama	72 °C	5 dakika	1 döngü

3.2.3. DNA elektroforezi

Amplifikasyon ürünlerinin elektroforezi, konsantrasyonu %2 'lik TBE (Tris- Borik Asit-EDTA) tamponu içinde %1,5'lik agaroz jel hazırlandı. Mikrodalga fırında eritilen agaroz yatay elektroforez jel kabına döküldü ve 30 dk soğumaya bırakıldı. Agaroz jel kuyucuklarına 10 µl amplifikasyon ürünü 2 µl 6X yükleme tamponu ile karıştırılarak uygulandı. 120 V 50 dk süresince moleküler boyutlarına göre DNA bantları ayrıştırıldı. 0,5 µg/ml etidyum bromid içeren distile suda 20 dk boyunca jel boyandı. DNA bantları GeneRuler 100 bp DNA ladder plus belirteçleri ile karşılaştırılarak BIO-RAD jel görüntüleme cihazında incelendi.

3.3. MALDI-TOF MS ile Yüksek Riskli Klonların Varlığının Araştırılması

Kanlı agarda üremiş olan bakteri kolonisi öze ile alınarak MALDI-TOF MS slaytlarındaki kuyucuklara yayılarak, üzerine 1 ml CHCA matriks solüsyonu damlatıldı. Slaytlar kuruduktan sonra Vitek MS (BioMeriux, Fransa) cihazına yerleştirilerek değerlendirmeye alındı. ST111, ST175, ST235, ST253 ve ST395 yüksek riskli klonlarının varlığı MALDI-TOF MS ile kütle spektrumlarının analizi yapılarak Saramis (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) yazılımının spektrum görünümü kullanılarak yüksek riskli klonlara özgü pik biyobelirteçlerinin varlığı araştırılmıştır (Tablo 7) (91, 92).

Tablo 7. *P. aeruginosa* yüksek riskli klonlarına ait pik biyobelirteçleri (91,92).

Yüksek riskli klonlar	Pik biyobelirteçleri (m/z)
ST111	3657, 10538
ST175	6911,7359
ST235	11610
ST253	5813
ST395	8550

3.4. İstatistiksel Analiz

Tanımlayıcı istatistik olarak kategorik değişkenler için sayı ve yüzde değerleri verilmiştir. Kategorik değişkenler için gruplar arası farklılık Pearson Ki kare testi ile incelenmiştir. Çalışmada P değeri 0,05'den küçük olduğunda istatistiksel açıdan anlamlı kabul edilmiştir. Tüm analizler, IBM SPSS (Statistical Package for Social Science) Statistics 20.0 programından yararlanılarak yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. *P. aeruginosa* İzolatların Özellikleri

Bu çalışmada Ondokuz Mayıs Üniversitesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na çeşitli kliniklerden 01.07.2020- 07.06.2022 tarihleri arasında gönderilen örneklerden izole edilen imipenem veya meropenem antibiyotiklerinden en az birine dirençli olduğu saptanan 100 adet *P. aeruginosa* izolatı dahil edilmiştir. İzolatlar en çok yoğun bakım ünitelerinden (%45), solunum yolu örneklerinden (%46) izole edilmiştir. Örnek türüne ve gönderildikleri kliniklere göre dağılımları Tablo 8' de gösterilmiştir.

Tablo 8. *P. aeruginosa* izolatlarının örnek türü ve gönderildikleri kliniklere göre dağılımı.

	Yoğun bakım n(%)	Dahili klinikler n(%)	Cerrahi klinikler n(%)	Toplam
Solunum Yolu Örneği	30 (66,7)	15 (39,47)	1 (5,88)	46
Yara/Abse	1 (2,22)	5 (13,16)	11 (64,71)	17
Kan	4 (8,89)	8 (21,05)	2 (11,76)	14
İdrar	5 (11,11)	8 (21,05)	1 (5,88)	14
Steril Vücut Sıvısı	-	2 (5,26)	2 (11,76)	4
Kateter	2 (4,44)	-	-	2
Kulak/Göbek Sürüntü Örneği	2 (4,44)	-	-	2
BOS	1 (2,22)	-	-	1
Toplam	45	38	17	100

4.2. *P. aeruginosa* Antimikrobiyal Duyarlılık Profilleri

Çalışmaya dahil edilen imipenem veya meropenemden en az birine dirençli 100 adet *P. aeruginosa* izolatı karbapenem grubu antibiyotikler dışında değerlendirildiğinde, en duyarlı olduğu antibiyotik amikasin iken, en dirençli olduğu antibiyotik ise piperasilin olarak saptanmıştır. Antibiyotik duyarlılıkları tablo 9' de verilmiştir.

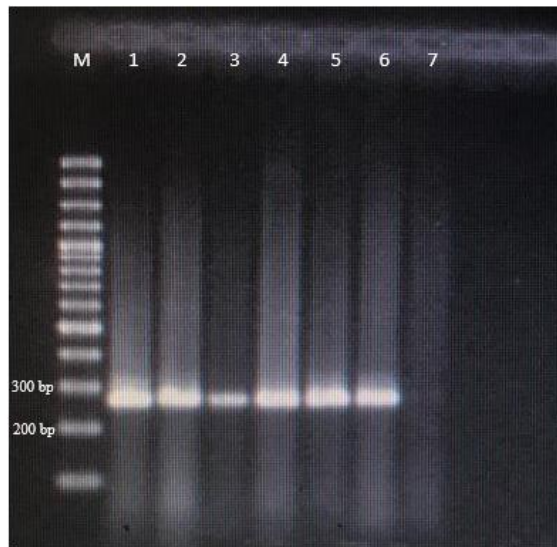
Tablo 9. *P. aeruginosa* izolatlarının antibiyotik duyarlılık profilleri

Antibiyotikler	Duyarlı n (%)	Orta Duyarlı* n (%)	Dirençli n (%)
Amikasin	78 (78)	0	22 (22)
İmipenem	0	0	100 (100)
Meropenem	0	36 (36)	64 (64)
Siprofloksasin	0	38 (38)	62 (62)
Levofloksasin	0	27 (28,12)	69 (71,88)
Piperasilin	0	12 (12,50)	84 (87,50)
Piperasilin/ Tazobaktam	0	29 (29,29)	70 (70,71)
Sefepim	0	45 (45)	55 (55)
Seftazidim	0	61 (61)	39 (39)

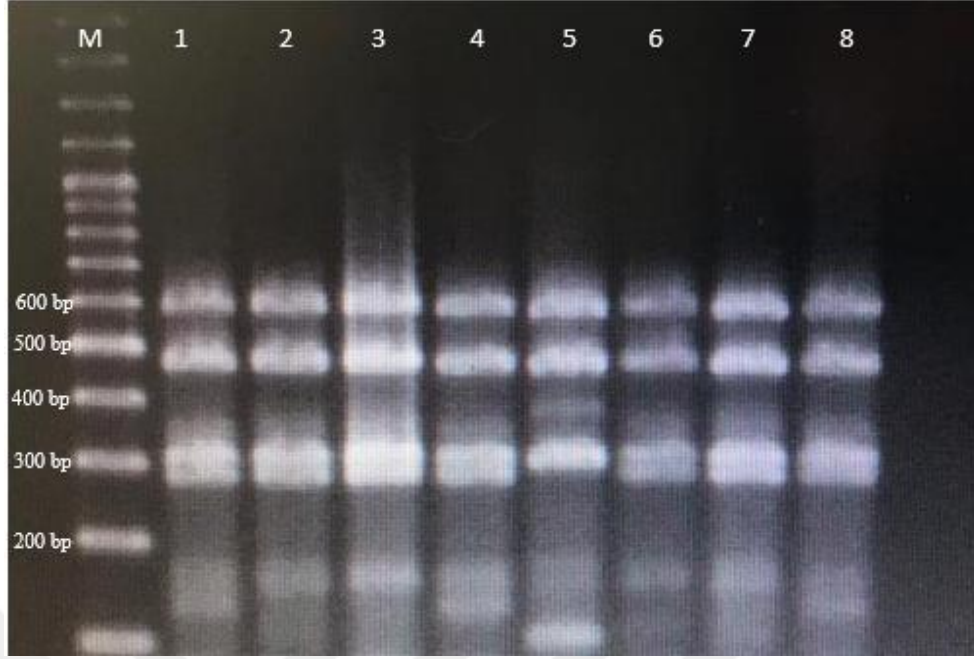
*Orta Duyarlı: Duyarlı, yüksek dozda- Bir mikroorganizmanın, antibiyotiğin dozlama rejimi değiştirilerek veya enfeksiyon yerinde antibiyotik konsantrasyonu artırılarak tedavi edilmesi durumunda başarı olasılığı yüksek olduğunda “artmış dozda duyarlı” olarak kategorize edilir.

4.3. Virulans Genlerinin Tespiti İçin Yapılan PZR Sonuçları

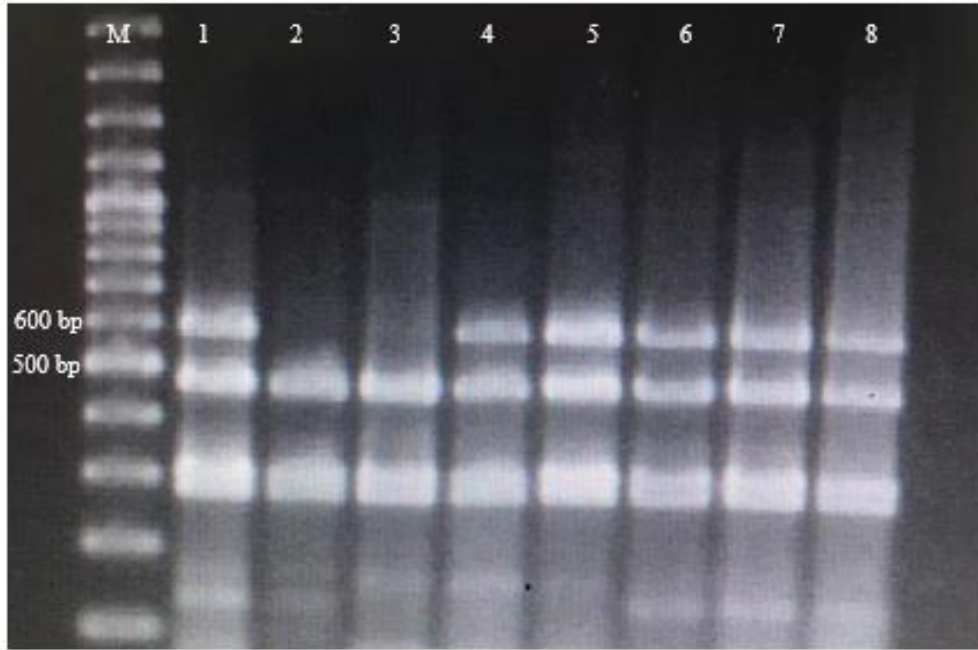
Çalışmaya alınan 100 izolatın PZR işlemi sonuçlarında ToxA 89 izolatta pozitif, LasB 99 izolatta pozitif, PlcH 98 izolatta pozitif, PlcN ve AlgD tüm izolatlarda pozitif olarak saptanmıştır. Tüm PZR çalışmalarında ToxA, LasB, PlcH, PlcN, AlgD genleri için pozitif kontrol çalışılmış olup hepsi olumlu sonuç vermiştir. PZR işlemleri sonucunda oluşan bantlara örnekler şekil 2,3 ve 4’te gösterilmiştir. *P. aeruginosa*’ ların izole edildikleri örnekler ve virulans genlerinin dağılımı tablo 10’ da verilmiştir. LasB geni varlığı açısından izole edildikleri örnekler arasında anlamlı farklılık bulunmuştur ($p<0,05$). Antibiyotik direnç oranları ile virulans genleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$) (tablo 11).



Şekil 2. ToxA genine ait amplifikasyon ürünlerinin %1,5’lik agaroz jelde görüntülenmesi. M: marker (100 bp), 1: Pozitif kontrol, 2-6: ToxA pozitif hasta suşu, 7: ToxA negatif hasta suşu.



Şekil 3. AlgD, LasB, PlcN, PlcH genlerine ait amplifikasyon ürünlerinin %1,5'lik agaroz jelde görüntülenmesi. M: Marker, 1: Pozitif kontrol, 2,3,4,6,7,8: AlgD, LasB, PlcN, PlcH pozitif hasta suşları, 5: AlgD, PlcN, PlcH pozitif; LasB negatif hasta suşu.



Şekil 4. AlgD, LasB, PlcN, PlcH genlerine ait amplifikasyon ürünlerinin %1,5'lik agaroz jelde görüntülenmesi. M: Marker, 1: Pozitif kontrol, 2-3: AlgD, LasB, PlcN pozitif; PlcH negatif hasta suşları, 4-8: AlgD, LasB, PlcN, PlcH pozitif hasta suşları.

Tablo 10. *P. aeruginosa* ' ların izole edildikleri örnekler ve virulans genlerinin dağılımı

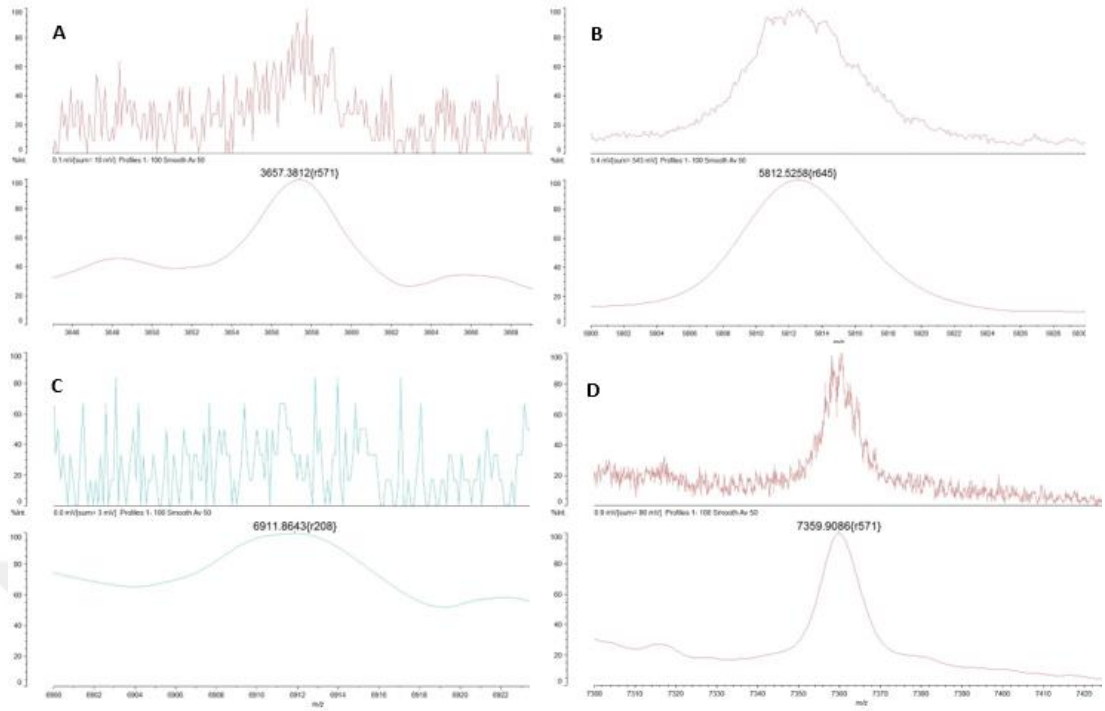
	ToxA	LasB	PlcH	PlcN	AlgD
Solunum Yolu Örneği n(%)	39 (84,78)	46 (100)	45 (97,83)	46 (100)	46 (100)
Yara/Abse n(%)	15 (88,24)	17 (100)	16 (94,12)	17 (100)	17 (100)
Kan n(%)	13 (92,86)	14 (100)	14 (100)	14 (100)	14 (100)
İdrar n(%)	13 (92,86)	14 (100)	14 (100)	14 (100)	14 (100)
Steril Vücut Sıvısı n(%)	4 (100)	4 (100)	4 (100)	4 (100)	4 (100)
Kateter n(%)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	2 (100)
Kulak/ Göbek Sürüntü Örneği n(%)	2 (100)	1 (50)	2 (100)	2 (100)	2 (100)
BOS n(%)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)
P değeri	0,936	< 0,05	0,956	> 0,05	> 0,05

Tablo 11. *P. aeruginosa* ' ların antibiyotik direnç oranları ile virulans genlerinin dağılımı.

	ToxA n(%)	LasB n(%)	PlcH n(%)	PlcN n(%)	AlgD n(%)
Amikasin	18 (20,22)	21 (21,21)	22 (22,45)	22 (22)	22 (22)
İmipenem	89 (100)	99 (100)	98 (100)	100 (100)	100 (100)
Meropenem	58 (65,17)	63 (63,64)	63 (64,29)	64 (64)	64 (64)
Siprofloksasin	62 (62)	61 (61,62)	61 (62,24)	62 (62)	62 (62)
Levofloksasin	62 (72,89)	68 (71,58)	68 (72,34)	69 (71,88)	69 (71,88)
Piperasilin	75 (88,24)	83 (87,37)	82 (87,23)	84 (87,50)	84 (87,50)
Piperasilin/ Tazobaktam	62 (70,45)	69 (70,41)	68 (70,10)	70 (70,71)	70 (70,71)
Sefepim	49 (55,06)	54 (54,55)	55 (56,12)	55 (55)	55 (55)
Seftazidim	36 (40,45)	39 (39,39)	39 (39,80)	39 (39)	39 (39)
P değeri	0,223	0,887	0,982	>0,05	>0,05

4.4. Yüksek Riskli Klonları Tanımlama İçin Yapılan MALDI-TOF MS Sonuçları

Çalışmaya dahil edilen 100 adet *P. aeruginosa* izolatının 49' unda ST111 klonuna ait biyobelirteçlerden sadece 3657 m/z' de pik görülmüş; 10538 m/z' de pik görülmemiştir. 7 izolatta ST253 klonuna ait 5813 m/z' de pik görülmüştür. ST175 klonuna ait biyobelirteçlere bakıldığında 1 izolatta sadece 6911 m/z'de, 3 izolatta sadece 7359 m/z'de, 2 izolatta ise her iki pik değeri de saptanmıştır. ST235 ve ST395 klonlarına ait pik biyobelirteçleri hiçbir izolatta saptanmamıştır. Yüksek riskli klonlara özgü pikler şekil 5' te gösterilmiştir. Yüksek riskli klonlar ile izole edildikleri örnek türleri arasında anlamlı fark bulunmuştur (p=0,034) (tablo 12). Bu fark solunum yolu örneklerinden kaynaklanmaktadır. ST111 klonlarının %36,73'ü, ST175 klonlarının %66,66'sı ve ST253 klonlarının %28,57'si solunum yolu örneklerinden izole edilmiştir. Yüksek riskli klonlar ile antibiyotik direnç oranları arasında anlamlı fark bulunmamıştır (p=0,990) (tablo 13). Yüksek riskli klonlar ile virulans genleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (p=1,00) (tablo 14).



Şekil 5. MALDI-TOF MS ile tespit edilen ST111,ST175,ST253 klonlarına özgü pik biyobelirteçleri. A: ST111 klonuna özgü 3657 m/z pik, B: ST253 klonuna özgü 5813 m/z pik, C-D: ST175 klonuna özgü 6911, 7359 m/z pikleri.

Tablo 12. *P. aeruginosa* yüksek riskli klonlarının izole edildiği örnek türlerinin dağılımı (p=0,034).

	ST111	ST175	ST253	Yüksek Riskli Klon Dışı İzolatlar	Toplam
Solunum Yolu Örneği	18	4	2	22	46
Yara/Abse	9	1	-	7	17
Kan	9	-	2	3	14
İdrar	9	1	-	4	14
Steril Vücut Sıvısı	1	-	1	2	4
Kateter	2	-	-	-	2
Kulak/ Göbek Sürüntü Örneği	1	-	1	-	2
BOS	-	-	1	-	1
Toplam	49	6	7	38	100

Tablo 13. *P. aeruginosa* yüksek riskli klonlarının antibiyotik direnç oranlarının dağılımı (p=0,990).

	ST111 n (%)	ST175 n(%)	ST253 n(%)	Yüksek Riskli Klon Dışı İzolatlar n(%)
Amikasin	15 (30,61)	0 (0)	0 (0)	7 (18,42)
İmipenem	49 (100)	6 (100)	7 (100)	38 (100)
Meropenem	41 (83,67)	3 (50)	3 (42,86)	17 (44,74)
Siprofloksasin	35 (71,43)	3 (60)	5 (71,43)	19 (50)
Levofloksasin	39 (84,78)	3 (60)	7 (100)	20 (52,63)
Piperasilin	44 (95,65)	5 (100)	6 (85,71)	29 (78,38)
Piperasilin/ Tazobaktam	39 (79,59)	5 (100)	4 (57,14)	22 (57,89)
Sefepim	33 (67,35)	3 (50)	4 (57,14)	15 (39,47)
Seftazidim	20 (40,82)	3 (50)	3 (42,86)	13 (34,21)

Tablo 14. *P. aeruginosa* yüksek riskli klonlarında virulans genlerinin saptanma oranlarının dağılımı (p=1,00).

	ST111 n (%)	ST175 n (%)	ST253 n (%)	Yüksek Riskli Klon Dışı İzolatlar n (%)	Toplam n (%)
ToxA	44 (89,80)	5 (83,33)	7 (100)	33 (68,75)	89 (89)
LasB	48 (97,96)	6 (100)	7 (100)	38 (100)	99 (99)
PlcH	49 (100)	6 (100)	7 (100)	36 (75)	98 (98)
PlcN	49 (100)	6 (100)	7 (100)	38 (100)	100 (100)
AlgD	49 (100)	6 (100)	7 (100)	38 (100)	100 (100)

5. TARTIŞMA

Doğada geniş yayılımı ile fırsatçı enfeksiyon oluşturma potansiyeline sahip olan *P. aeruginosa* hastane kaynaklı ciddi enfeksiyonlardan izole edilmektedir (93). Son yıllarda ÇİD/YİD *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının sıklığında artış görülmektedir. Virulans faktörlerinin üretimindeki çeşitlilik ve yüksek riskli klonların hızla yayılması ile antimikrobiyallere karşı direnç gelişim ve aktarım kapasiteleri küresel halk sağlığını tehdit edici unsurlar olmuştur (10). Dünya Sağlık Örgütü 2017 yılında karbapenem dirençli *P. aeruginosa*'nın yeni antibiyotiklerin acilen gerekli olduğu “kritik” grupta listelendiğini bildirmiştir (48). Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi 2015 ve 2016 yılındaki epidemiyolojik verilerinde, *P. Aeruginosa* izolatlarının %13,7' sinin en az üç antimikrobiyal gruba ve %5,5' inin en az beş antimikrobiyal gruba dirençli olduğunu belirtmiştir (94). Ayrıca *P. aeruginosa*'nın pnömoni alevlenmeleri, idrar yolu enfeksiyonları ve kan dolaşımı enfeksiyonları dahil olmak üzere çeşitli yoğun bakım ünitesi (YBÜ) ve hastane kaynaklı enfeksiyonlara neden olduğunu bildirmiştir (95,96). Bir diğer çalışmada Avrupa hastanelerinin dördüncü en yaygın patojeni olarak bildirilen *P. aeruginosa* 'nın, hastane kaynaklı enfeksiyonların %9' una neden olduğu belirtilmiştir (97). Benzer şekilde, Birleşik Devletler'de hastane enfeksiyonlarının %7,1'ine *P. aeruginosa* 'nın neden olduğu bildirilmiştir (98). Ayrıca, Çin Antimikrobiyal Gözetim Ağı yayınladığı verilerinde *P. aeruginosa* 'nın %7,96 görülme oranıyla *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Staphylococcus aureus* 'tan sonra dördüncü hastane enfeksiyonu etkeni olduğunu bildirmiştir (99).

Son zamanlarda karbapenem grubu antibiyotiklere karşı artan direnç oranları dikkat çekmektedir. OprD porin kaybı, effluks pompası ve karbapenemaz enzim üretimleri gibi çeşitli mekanizmalar direnç gelişimden sorumludur. Karbapenem dirençli suşlar çoğunlukla diğer antibiyotiklere de daha yüksek direnç oranlarına sahiptir. Bu durum tedavi seçeneklerini kısıtlayarak mortalitesi ve morbiditesi daha yüksek enfeksiyonlara neden olmaktadır (100,101). Buehrle ve ark. 37 karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatıyla yaptıkları çalışmada amikasin direncini %8, gentamisin direncini %27, sefepim direncini %32, piperasilin/tazobaktam direncini %43, siprofloksasin direncini %43, levofloksasin direncini %62 olarak bildirmişlerdir (102). Hoşbul ve ark. karbapenem dirençli 100 adet *P. aeruginosa* ile yaptıkları çalışmada

direnç oranlarını piperasilin %88,7, piperasilin/tazobaktam %86, sefepim %71, amikasin %39, siprofloksasin %84, levofloksasin %90 olarak bildirmişlerdir (103). Üstün ve ark. 150 *P. aeruginosa* izolatu ile yaptıkları çalışmada karbapenem dirençli izolatlarda amikasin direncini %61, siprofloksasin direncini %60, sefepim direncini %93, seftazidim direncini %89 oranında saptayarak, yüksek antibiyotik direnç oranları tespit edildiğini bildirmişlerdir (104). Azizoğlu ve ark. 301 *P. aeruginosa* ile yaptıkları çalışmada karbapenem dirençli izolatlarda amikasin direncini %40, siprofloksasin direncini %68, seftazidim direncini %70, piperasilin/tazobaktam direncini %82 olarak bildirmişlerdir (105). Çalışmamızdaki yüksek direnç oranları, diğer çalışmalardaki karbapenem dirençli izolatlarda görülen yüksek antibiyotik direnç oranlarını destekleyici niteliktedir.

Çeşitli çalışmalarda *P. aeruginosa*'nın izole edildiği örnek türleri ve virulans faktörleri arasındaki ilişki incelenmiş ve patogeneze dair araştırma yapılmıştır. Badamchi ve ark. idrar yolu örneklerinden izole edilen 150 adet *P. aeruginosa* izolatuyla yaptıkları çalışmada virulans genlerini sırasıyla lasB (%92,9), aprA (%81,2), toxA (%69,4), algD (%60), plcH (%38,8) ve plcN (%38,8) olarak tespit etmişlerdir. Virulans faktör genlerinin çoğunun, izolatların önemli bir kısmında tespit edildiğini göstermişlerdir. İdrar örneklerinden alınan *P. aeruginosa* izolatlarında AprA geninin yüksek derecede varlığını tespit etmişlerdir. Alkalın proteaz (aprA), temel mikrobiyal moleküllerden biri olan monomerik flagellini parçalar. Ayrıca aprA, kompleman proteinleri ve sitokinler gibi konakçı proteinleri degrade eder. Yüksek oranda algD varlığının kateterle ilgili biyofilm oluşumu ile ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir (106). Fazeli ve ark. 102 *P. aeruginosa* izolatu ile yaptıkları çalışmada virulans genlerini sıklık sırasına göre exoS (%67,64) plcH (%45,09), toxA (%35,29), plcN (%33,33), lasB (%17,4), algD (%7,84) olarak tespit etmişlerdir. Yanık enfeksiyonlarının en yüksek virulans gen oranına sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Özellikle akciğer enfeksiyonları patolojisinde önemli rol oynayan ExoS geninin yara, solunum ve idrar yolu enfeksiyonları olmak üzere klinik örneklerde en yüksek insidansa sahip olduğunu bildirmişlerdir (107). Ullah ve ark. beta-laktamaz üreten 54 *P. aeruginosa* ile yaptıkları çalışmada virulans genlerini sırasıyla oprI (%40,74), toxA (%33,3), lasB (%24) ve PlcH (%18,5) olarak saptamışlardır. OprI *P. aeruginosa*'ya karşı bağışıklama çalışmaları yürütülen dış membran proteindir. *P. aeruginosa*'da

virulans faktörlerinin varlığı ile beta-laktamaz üretimi arasında güçlü bir korelasyon olduğunu savunmuşlardır (108). Nikbin ve ark. 118 solunum yolu örneği, 100 yanık ve 50 yara örneğindeki *P. aeruginosa* ile yaptıkları çalışmada tüm izolatlarda lasB, oprI,oprL genlerini tespit etmişlerdir. Yanık örneklerinde toxA (%97) genini solunum yolu örneklerinden (%85,6) daha yüksek bulmuşlardır (109). Dawodeyah ve ark. 61 solunum yolu örneğinden izole edilen *P. aeruginosa* ile yaptıkları çalışmada algD, lasB, toxA virulans genlerini sırasıyla %98, %98, %80 olarak bildirmişlerdir. ÇİD *P. aeruginosa* izolatlarının tümünün algD, lasB, toxA geni pozitif olduğunu tespit etmişlerdir. Bu genlerin daha çok solunum yolu örnekleri ile ilişkili olduğu kanısına varılabileceğini bildirmişlerdir (110). Haghi ve ark. yanık yara örneklerinden izole edilen 93 *P. aeruginosa* izolatı ile yaptıkları çalışmada en yaygın virülans genini toxA (%97,8) olarak, bunu plcH (% 96,7), phzI (%96,7), exoY (%93,1) ve phzII (%90,3)'nin takip ettiğini bildirmişlerdir. Tüm ÇİD izolatların en az 5 virulans geni taşıdığını tespit etmişlerdir (111). Lanotte ve ark. 81' i KF hastalarına ait toplam 162 *P. aeruginosa* izolatı ile yaptıkları çalışmada izolatların tamamında algD, lasB, toxA, plcH, plcN genlerini tespit etmişlerdir. ExoS genini ise %84,5 oranında tespit etmişlerdir. ExoS prevalansını, KF solunum izolatlarında anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır (112). Bizim çalışmamızda araştırılan beş virulans geni de yüksek oranlarda bulunmuştur. 100 izolatın hepsinde en az üç virulans geninin varlığı tespit edilmiştir. Virulans genleri içerisinde en az toxA (%89) saptanmıştır. ToxA'nın en az saptandığı örnek solunum yolu örnekleri (%84,78) olmuştur.

P. aeruginosa'da diğer çoğu bakterinin aksine antibiyotiklere direnç bir virülans faktörü olarak sayılmaktadır. Çünkü *P. aeruginosa* ürettiği enzimler ve dışa atım pompaları sayesinde birçok antibiyotiğe doğal direnç göstermekte, geçirdiği mutasyonlar ile antibiyotiklere karşı hızlı direnç kazanabilmektedir (22).Virulans faktörleri ile antibiyotik dirençleri arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalarda Karatuna ve ark. solunum yolu örneklerinden izole edilen 100 adet *P. aeruginosa*' da lasB pozitif izolatların piperasilin ve seftazidime daha duyarlı olduklarını; aprA pozitif izolatların tobramisin, piperasilin, piperasilin/tazobaktam, sefepim, imipenem ve siproflokasine daha duyarlı olduklarını bildirmişlerdir (113). Maçın ve ark. 50' si KF hastasına ait 100 adet *P. aeruginosa* ile yaptıkları çalışmada elastaz üretimi ile antibiyotik direnci arasında anlamlı bir ilişki olmadığını; alkali proteaz üreten suşların

bu enzimi üretmeyen suşlara göre amikasin, seftazidime, siprofloksasine, piperasiline, tobramisine, sefepime, gentamisine ve levofloksasine daha duyarlı oldukları bildirmişlerdir (114). Çalışmamızda ise ToxA saptanan izolatlar saptanmayanlara göre amikasin ve piperasilin/tazobaktam daha duyarlı, plcH saptanan izolatlar saptanmayanlara göre piperasilin, piperasilin/tazobaktam ve seftazidime daha duyarlı bulunmuşlardır. LasB saptanan izolatlar ise saptanmayanlara göre amikasin, meropenem, siprofloksasin, levofloksasin, piperasilin, piperasilin/tazobaktam ve sefepime daha duyarlı bulunmakla birlikte; çalışmamızda toxA, lasB, algD, plcH, plcN virulans genleri ile antibiyotik dirençleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$).

P. aeruginosa'nın küresel yayılım gösteren ST111, ST175, ST235, ST253 ve ST395 yüksek riskli klonları çoğunlukla ÇİD/YİD ile ilişkilidir. Bununla birlikte yüksek riskli klonlar dünyadaki yayılımlarına, GSBL, karbapenemaz gibi beta-laktamaz üretimlerine bağlı olarak tanımlanmıştır. ST111, ST175 ve ST235 yüksek riskli klonları dünya çapında en geniş yayılımı olan, hızla artmakta olan yüksek riskli klonlardır. Pena ve ark. 81 YİD suşu ile yaptıkları çalışmada 62 suşun ST175, 9 suşun ST111 ve 2 suşun ST235 klonu olduğunu tespit ederek beklendiği gibi izolatların büyük çoğunluğun önceden tanımlanmış yüksek riskli klonlara ait olduğunu bildirmişlerdir (115). Üç büyük yüksek riskli klondan ST235, beş kıtadan birçok ülkede bulunan, en geniş dağılıma sahip olanıdır (10). Rusya' da ÇİD, VIM üreten ST235 klonunun Rusya'dan Belarus ve Kazakistan'a yayıldığı ortaya çıkmıştır (73). Ülkemizde de ST235 klonunun varlığı bildirilmiştir (116). Ancak bu yüksek riskli klonlara ait mutasyonel ve kazanılmış direnç mekanizmaları hakkında çok az bilgi bulunmaktadır (117). Mikrobiyoloji laboratuvarlarında, yüksek riskli klonların tespiti, epidemiyoloji, enfeksiyon kontrolü ve önlem alma açısından önemlidir. Moleküler yöntemler bu klonların tespitinde başlıca yöntemlerdir. Bunun dışında basit ve hızlı bir tarama tekniği olarak O-antijeni serotiplendirmesi öne çıkmaktadır. ST235 için O11, ST111 için O12, ST175 için O4 serotipinin belirlenmesi yüksek riskli klonların saptanmasını sağlamaktadır (118). Son dönemde yüksek riskli klonların tespitinde MALDI-TOF MS sisteminin kullanımı doğru ve hızlı tespit olanağı sağlamaktadır. Cabroler ve ark. yüksek riskli klonlara ait olduğu bilinen izolatların MALDI-TOF MS ile saptanmasına yönelik yaptıkları çalışmada MALDI-TOF MS' in özgüllüğünü

ST111, ST175, ST253 ve ST395 için %96,6 ve ST235 için %82,5 olarak tespit etmişlerdir. Pozitif prediktif değerin (PPD) %41,2 ile %89,5 arasında ve negatif prediktif değerin (NPD) %97,0 ile %100 arasında değiştiğini bildirmişlerdir (91). Mulet ve ark. ST175 klonunun MALDI-TOF MS ile saptanmasına yönelik 506 *P. aeruginosa* suşu ile yaptıkları çalışmada 35 (%6,9) izolatın ST175 klonuna ait olduğunu saptamışlardır. 6911 m/z tepe noktasını tüm ST175 izolatlarında bulduklarını, ancak 7359 m/z tepe noktasının izolatların sadece birinde olmadığını bildirmişlerdir. Tüm YİD izolatların %41,7 kadarı ST175 klonuna ait olduğunu ve bunların çoğunun sadece seftolozan/tazobaktam ve kolistine duyarlı olduğunu saptamışlardır. ST175 izolatlarının meropenem direncini %88,6, amikasin direncini %8,6 olarak bildirmişlerdir (119). ST175 klonuna ait olduğu doğrulanmış izolatlar ile yapılan başka bir çalışmada 7359 m/z zirvesinin varlığının ST175 tespiti için yüksek duyarlılık (%100) ve NPD'ye (%100) sahip olduğunu ancak; ST175 olmayan 26 izolatta da 7359 m/z piki saptandığını, bu durumda özgüllük (%92,6) ve PPD'in (%41,2) daha düşük olduğunu bildirmişlerdir. 6911 m/z ve 7359 m/z tepe noktalarının her ikisinin birlikte saptandığı izolatların içinde ise ST175 olmayan sadece 4 suş olduğunu ve iki pikin birlikteliğinin özgüllüğü ve PPD' i önemli ölçüde artırdığını saptamışlardır (92). Ülkemizde Çekin ve ark. 45 *P. aeruginosa* izolatında 5 yüksek riskli klonun varlığını araştırdıkları çalışmada MALDI-TOF MS analizine göre, karbapenemaz üreten izolatlarda yüksek riskli klonlara ait karakteristik tepe noktalarını saptamadıklarını, karbapenemaz üretmeyen bir izolatın ST253 için 5813 m/z' te karakteristik pik verdiğini bildirmişlerdir. ST253' ün yoğun bakım ünitesinden izole edildiğini ve kolistin dışındaki tüm antibiyotiklere dirençli olduğunu bildirmişlerdir (120). Ülkemizde yapılan bir diğer çalışmada Malkoçoğlu ve ark. 84 karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatında ST111, ST175, ST235, ST253 ve ST395 varlığını araştırmışlardır. MALDI-TOF MS analizine göre, karbapenemaz üreten suşların hiçbirinin yüksek riskli klonlara ait olmadığını bildirmişlerdir (121). MALDI-TOF MS ile yüksek riskli klonlarının varlığını araştırdığımız çalışmamızda en sık saptanan yüksek riskli klon ST111 (%49) olup bunu, ST253 (%7), ST175 (%6) takip etmektedir. Ülkemizde daha önce bildirilmiş olan ST235 ile ST395 klonu ise çalışmamızda saptanmamıştır. ST111 klonların %46,93' ü, ST175 klonlarının %50' si ve ST253 klonlarının %28,57' si yoğun bakım ünitelerinden gelen örneklerde izole

edilmiştir. Yüksek riskli klonların en sık izole edildiği örnek türü solunum yolu örnekleri olmuştur. ST111 klonlarının %36,73'ü, ST175 klonlarının %66,66'sı ve ST253 klonlarının %28,57'si solunum yolu örneklerinden izole edilmiştir. ST111 izolatlarının en duyarlı oldukları antibiyotikler amikasin (%69,39) ve seftazidim (%59,18) olarak bulunmuştur. ST175 izolatlarında amikaseine karşı direnç saptanmamış olup, ST253 izolatlarında da amikaseine karşı direnç saptanmamıştır. Karbapenem dirençli yüksek riskli klonlara karşı test edilen antibiyotikler içerisinde en etkili antibiyotik grubu aminoglikozidler olarak görülmektedir. Yunanistan' da meropenem minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) 2 mg/L' den yüksek olan 120 *P. aeruginosa* izolatında multilokus sekans tipleme (MLST) ile yüksek riskli klonları araştıran bir çalışmada sırasıyla ST111 (%42,5), ST235 (%30,83), ST395 (%13,33), ST253 (%1,66) olarak tespit etmişlerdir. Yüksek riskli klonlarda önemli oranlarda MBL üretimi tespit etmişler. ST111 klonlarının %66,66'sı, ST235 klonlarının %40,54'ü ve ST395 klonlarının %62,5'inin VIM ürettiğini bildirmişlerdir (122). ABD' de yapılan bir çalışmada kan kültürlerinden izole edilen 57 adet *P. aeruginosa* izolatının MLST ile analizinde en yüksek oranda ST111 (%38,6) klonunu tespit etmişlerdir. Yirmi iki ST111 klonunun 21'inin hastane kaynaklı enfeksiyon etkeni olduğunu ve 15'inin meropenem dirençli olduğunu bildirmişlerdir (123). Hollanda'da yapılan bir çalışmada 168 *P. aeruginosa* izolatının MLST ile analizinde %45'inin ST111 klonuna ait olduğu saptanmıştır. ST111 izolatlarının 73'ünün VIM, 1'inin IMP ürettiği ve geri kalan 1 suşun ise karbapenemaz üretmediği bildirilmiştir (124). Kolombiya'da yayımlanmış bir raporda, ST111 klonuna ait bir *P. aeruginosa* suşunda VIM-2 ve KPC-2'nin birlikte bulunduğu ve karbapenem, aztreonam dahil tüm beta-laktamlara ve amikasin, siprofloksasin, kolistine dirençli olduğu bildirilmiştir (125). İspanya'da karbapenemaz üreten 71 *P. aeruginosa* izolatının MLST ile analizinde en yaygın yüksek riskli klonun ST175 (%46,47) olduğunu, iki izolatın ST111, iki izolatın da ST253 klonuna ait olduğunu tespit etmişlerdir. ST175 izolatlarının diğer izolatlara göre antibiyotiklere daha dirençli olduğunu bildirmişlerdir (126). Başka bir çalışmada, çalışmaya dahil edilen *P. aeruginosa* izolatlarının 19'u YİD, 4' ü ÇİD olmak üzere 23'ünde ST175 klonu tanımlanmıştır. ST175 yüksek riskli klonuna ait 23 izolatın biri dışında diğerlerinin; sefalosporinler, penisilin beta-laktamaz inhibitör kombinasyonları, aztreonam, karbapenemler, florokinolonlar ve aminoglikozidleri

içeren benzer bir direnç profiline sahip olduğunu bildirmişlerdir (127). Başka bir çalışmada 183 *P. aeruginosa* izolatının MLST ile analizinde 104'ünün ST175 klonuna 29'unun ST235 klonuna ait olduğunu tespit etmişlerdir. ST175 klonların 103'ünün VIM, 1'inin IMP ürettiğini; ST235 klonlarının hepsinin GES ürettiğini saptamışlardır. ST175 klonlarının sadece piperasilin/tazobaktama (%79,8), aztreonama (%86,5), amikasin (%75) ve kolistin (%100) duyarlı olduklarını bildirmişlerdir. ST235 izolatlarının ise sadece aztreonama (%13,8), tobramisine (%70,4), amikasin (%13,8), siprofloksasine (%3,6) ve kolistin (%100) duyarlı olduklarını bildirmişlerdir (128). Polonya' da metallobetalaktamaz üreten 454 *P. aeruginosa* izolatının MLST ile yapılan analizinde en çok ST235 (%31,3) ve ST111 (%16,7) klonları saptanmıştır (129). Ülkemizde yapılan bir çalışmada OXA-48 ve NDM-1' in birlikte tespit edildiği 11 *P. aeruginosa* izolatının MLST ile analizinde 8' inin ST235 klonuna ait olduğunu ve tüm izolatların karbapenemlere ve kolistin dirençli olduğunu bildirmişlerdir (116).

Çalışmamızda virulans faktörleri ve yüksek riskli klonlar arasındaki ilişki araştırılmıştır. Virulans faktörleri hem yüksek riskli klonlarda hem de diğer suşlarda yüksek oranlarda tespit edilmiş olup, yüksek riskli klonlar ile virulans faktörleri arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir ($p=1,00$). Virulans faktörleri ve antibiyotik dirençleri arasındaki ilişkiler de dikkate alınarak yüksek riskli klonların global yayılımını etkileyen faktörler araştırılmalıdır. Mikrobiyoloji laboratuvarlarında uluslararası ÇİD/YİD yüksek riskli klonların tespiti epidemiyolojik, enfeksiyon kontrolü ve halk sağlığı açısından önem taşımaktadır. MLST şu an için en yaygın olarak kabul edilen altın standart yöntemdir. Ancak Çoklu Lokus Değişken Sayısı Tandem Tekrar Analizi (MLVA), O-antijen serotiplendirmesi ve MALDI-TOF MS gibi daha ucuz ve daha hızlı tiplendirme tekniklerinin uluslararası yüksek riskli klonların tespiti için karşılaştırılabilir sonuçlar sağladığı gösterilmiştir (73, 91). Biz de çalışmamızda MALDI-TOF MS'in yüksek riskli klonları saptama yeteneğini göstermiş olduk. Yüksek riskli klonların erken tespiti, enfeksiyon kontrolü için önemli sonuçlara sahiptir ve hastane ortamında yayılmalarını önlemeye yardımcıdır. Erken ve uygun antimikrobiyal tedavi, monoklonal antikorlar gibi stratejik tedavi seçeneklerinin geliştirilebilmesi yüksek riskli klonların dünya çapında yayılımını engellemeye yardımcı olacaktır.

6. SONUÇLAR

- Klinik örneklerden izole edilen *P. aeruginosa* izolatlarının (n:100) antibiyotik direnç oranları; amikasin %22, imipenem %100, meropenem %64, siprofloksasin %62, levofloksasin %71,88 piperasilin %87,50, piperasilin/tazobaktam %70,71, sefepim %55, seftazidim %39 olarak saptanmıştır. Çalışmamızda seçtiğimiz izolatlar imipenem veya meropenem antibiyotiklerden en az birine dirençli olacak şekilde seçildiğinden yüksek direnç oranları görülmektedir. Çalışmamızdaki yüksek direnç oranları diğer çalışmalardaki karbapenem dirençli izolatlarda görülen yüksek antibiyotik direnç oranlarını destekleyici niteliktedir.
- Tüm *P. aeruginosa* izolatlarının (n:100) virulans faktörleri değerlendirildiğinde ToxA %89, LasB %99, PlcH %98, PlcN %100 ve AlgD %100 oranında pozitif saptanmıştır. LasB geni varlığı açısından izole edilen örnekler arasında anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p<0,05$). Antibiyotik direnç oranları ile virulans faktörlerinin varlığı arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir ($p>0,05$).
- MALDI-TOF MS ile yüksek riskli klonların varlığı değerlendirildiğinde en sık saptanan yüksek riskli klon ST111 (%49) olup bunu, ST253 (%7), ST175 (%6) takip etmektedir. ST235 ile ST395 klonu ise çalışmamızda saptanmamıştır. Yüksek riskli klonlar ile izole edildikleri örnek türleri arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,034$). Yüksek riskli klonlar en sık solunum yolu örneklerinden izole edilmiştir. Yüksek riskli klonlar ile antibiyotik direnç oranları değerlendirildiğinde anlamlı farklılık tespit edilmemiştir ($p=0,990$).
- Virulans faktörleri hem yüksek riskli klonlarda hem de diğer suşlarda yüksek oranlarda tespit edilmiş olup, yüksek riskli klonlar ile virulans faktörleri arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir ($p=1,00$). Bu durum *P. aeruginosa* izolatlarında virulans faktörlerinin yüksek oranda üretildiğini göstermektedir.
- Çalışmamızda MALDI-TOF MS'in yüksek riskli klonları saptama yeteneğini değerlendirmiş olduk. Yöntemin geliştirilerek yüksek riskli klonların erken tespitiyle, enfeksiyon kontrolü için önemli sonuçlar alınabilecektir.

7. KAYNAKLAR

1. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Tıbbi Mikrobiyoloji. Çeviri Ed. Us AD, Başustaoğlu A. 7. baskı. Ankara, Pelikan Yayıncılık Ltd. Şti, 2016;288-92.
2. Nanvazadeh F, Khosravi AD, Zolfaghari MR, Parhizgari N. Genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients by RAPD-PCR. Burns. 2013;39(7):1409-13.
3. Van Delden C, Iglewski BH. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. Emerging infectious diseases. 1998;4(4):551.
4. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? Clinical infectious diseases. 2002;34(5):634-40.
5. Procop GW, Church DL, Hall GS et al. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Çeviri Ed Us AD, Başustaoğlu A. 7. baskı. Ankara, Hipokrat Kitabevi, 2017;340-45.
6. Theilacker C, Coleman FT, Mueschenborn S, Llosa N, Grout M, Pier GB. Construction and characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide-alginate conjugate vaccine. Infection and immunity. 2003;71(7):3875-84.
7. Hentzer M, Teitzel GM, Balzer GJ, et al. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. Journal of bacteriology. 2001;183(18):5395-401.
8. Ostroff R, Vasil A, Vasil M. Molecular comparison of a nonhemolytic and a hemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Bacteriology. 1990;172(10):5915-23.
9. Everett MJ, Davies DT. *Pseudomonas aeruginosa* elastase (LasB) as a therapeutic target. Drug Discovery Today. 2021.
10. Oliver A, Mulet X, López-Causapé C, Juan C. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. Drug Resistance Updates. 2015;21:41-59.
11. Toutain CM, Zegans ME, O'Toole GA. Evidence for two flagellar stators and their role in the motility of *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of bacteriology. 2005;187(2):771-7.
12. Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara, Güneş Kitabevi, 1999;551-57.
13. Lee J, Zhang L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. Protein & cell. 2015;6(1):26-41.
14. Bergagne E. *Pseudomonas* and miscellaneous gram negative bacilli. Infectious Diseases Second ed, Toronto. 2004;1733-48.
15. Woods DE. Comparative genomic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* virulence. Trends in microbiology. 2004;12(10):437-9.
16. Leid JG, Willson CJ, Shirliff ME, Hassett DJ, Parsek MR, Jeffers AK. The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from

- IFN- γ -mediated macrophage killing. The Journal of Immunology. 2005;175(11):7512-8.
17. Vahaboğlu H, Akhan S. *Pseudomonas aeruginosa* ve diğer *Pseudomonas* türleri. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. 2002;2:1608-8.
 18. Goltermann L, Tolker-Nielsen T. Importance of the exopolysaccharide matrix in antimicrobial tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* aggregates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2017;61(4):e02696-16.
 19. Maldonado RF, Sá-Correia I, Valvano MA. Lipopolysaccharide modification in Gram-negative bacteria during chronic infection. *FEMS microbiology reviews*. 2016;40(4):480-93.
 20. Yan F, Li W, Jono H, et al. Reactive oxygen species regulate *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide-induced MUC5AC mucin expression via PKC-NADPH oxidase-ROS-TGF- α signaling pathways in human airway epithelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008;366(2):513-9.
 21. Huszczynski SM, Lam JS, Khursigara CM. The role of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide in bacterial pathogenesis and physiology. *Pathogens*. 2019;9(1):6.
 22. Salyers AA, Whitt DD. *Bacterial pathogenesis: a molecular approach*: ASM press Washington, DC; 1994.
 23. Strateva T, Mitov I. Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Annals of microbiology*. 2011;61(4):717-32.
 24. Galdino ACM, Branquinha MH, Santos AL, Viganor L. *Pseudomonas aeruginosa* and its arsenal of proteases: weapons to battle the host. *Pathophysiological aspects of proteases*. 2017;381-97.
 25. Bezzerri V, d'Adamo P, Rimessi A, et al. Phospholipase C- β 3 is a key modulator of IL-8 expression in cystic fibrosis bronchial epithelial cells. *The Journal of Immunology*. 2011;186(8):4946-58.
 26. Wiener-Kronish JP, Sakuma T, Kudoh I, et al. Alveolar epithelial injury and pleural empyema in acute *P. aeruginosa* pneumonia in anesthetized rabbits. *Journal of applied physiology*. 1993;75(4):1661-9.
 27. Michalska M, Wolf P. *Pseudomonas* Exotoxin A: optimized by evolution for effective killing. *Frontiers in microbiology*. 2015;6:963.
 28. Wolf P, Elsässer-Beile U. *Pseudomonas* exotoxin A: from virulence factor to anti-cancer agent. *International Journal of Medical Microbiology*. 2009;299(3):161-76.
 29. Gellatly SL, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and disease*. 2013;67(3):159-73.
 30. Hall S, McDermott C, Anoopkumar-Dukie S, et al. Cellular effects of pyocyanin, a secreted virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxins*. 2016;8(8):236.

31. Thöming JG, Tomasch J, Preusse M, et al. Parallel evolutionary paths to produce more than one *Pseudomonas aeruginosa* biofilm phenotype. *npj Biofilms and Microbiomes*. 2020;6(1):1-13.
32. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annual review of microbiology*. 2000;54:49.
33. Tsuneda S, Aikawa H, Hayashi H, Yuasa A, Hirata A. Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface. *FEMS microbiology letters*. 2003;223(2):287-92.
34. Flemming H-C, Wingender J. The biofilm matrix. *Nature reviews microbiology*. 2010;8(9):623-33.
35. Ma L, Conover M, Lu H, Parsek MR, Bayles K, Wozniak DJ. Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS pathogens*. 2009;5(3):e1000354.
36. Coulon C, Vinogradov E, Filloux A, Sadovskaya I. Chemical analysis of cellular and extracellular carbohydrates of a biofilm-forming strain *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *PLoS One*. 2010;5(12):e14220.
37. Cross AR, Raghuram V, Wang Z, Dey D, Goldberg JB. Overproduction of the AlgT sigma factor is lethal to mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*. 2020;202(20):e00445-20.
38. De Kievit TR, Iglewski BH. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infection and immunity*. 2000;68(9):4839-49.
39. Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. *Annual review of microbiology*. 2001;55(1):165-99.
40. Whitehead NA, Barnard AM, Slater H, Simpson NJ, Salmond GP. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS microbiology reviews*. 2001;25(4):365-404.
41. Smith RS, Iglewski BH. *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Current opinion in microbiology*. 2003;6(1):56-60.
42. Smith EE, Buckley DG, Wu Z, et al. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(22):8487-92.
43. Bjarnsholt T, Jensen P, Jakobsen T, et al. the Scandinavian Cystic Fibrosis Study Consortium: Quorum Sensing and Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during Lung Infection of Cystic Fibrosis Patients. *PLoS One*. 2010;5:e10115.
44. Shannon KP, French GL. Increasing resistance to antimicrobial agents of Gram-negative organisms isolated at a London teaching hospital, 1995–2000. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2004;53(5):818-25.
45. Üçışık AC, Vahaboğlu H. *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. Ed. Willke Topcu A, Söyletir G, Doğanay M. 4. Baskı. 2. Cilt. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2017; 1896,1909.

46. Poole K. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Frontiers in microbiology*. 2011;2:65.
47. Breidenstein EB, de la Fuente-Núñez C, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends in microbiology*. 2011;19(8):419-26.
48. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 2018; 18:318 –327.
49. Ayaz C. Beta Laktamların Genel Özellikleri ve Penisilinler. In: Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Ed. Willke Topcu A, Söyletir G, Doğanay M. 4. Baskı. 1. Cilt. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2017; 243-53.
50. Leblebicioğlu H. Parenteral Sefalosporinler. In: Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler. Ed. Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S. Ankara, Bilimsel Tıp Yayınevi, 2008;285-98.
51. Horcajada JP, Montero M, Oliver A, et al. Epidemiology and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Clinical microbiology reviews*. 2019;32(4):e00031-19.
52. Köksal İ. *Pseudomonas* türlerinin neden olduğu enfeksiyonlar. In: İç Hastalıkları Enfeksiyon Hastalıkları. Ed. Erol Ç, Aktaş F. 1.baskı. Ankara, MN Medikal ve Nobel Tıp Kitabevi, 2008; 329-42.
53. Britt NS, Ritchie DJ, Kollef MH, et al. Importance of site of infection and antibiotic selection in the treatment of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* sepsis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2018;62(4):e02400-17.
54. Kalil AC, Metersky ML, Klompas M, et al. Executive summary: management of adults with hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia: 2016 clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society. *Clinical Infectious Diseases*. 2016;63(5):575-82.
55. Molinaro M, Morelli P, De Gregori M, et al. Efficacy of intraventricular amikacin treatment in pan-resistant *Pseudomonas aeruginosa* postsurgical meningitis. *Infection and Drug Resistance*. 2018;11:1369.
56. Correia S, Poeta P, Hébraud M, Capelo JL, Igrejas G. Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand? *Journal of medical microbiology*. 2017;66(5):551-9.
57. Nation RL, Velkov T, Li J. Colistin and polymyxin B: peas in a pod, or chalk and cheese? *Clinical infectious diseases*. 2014;59(1):88-94.
58. Velkov T, Roberts KD, Nation RL, Thompson PE, Li J. Pharmacology of polymyxins: new insights into an ‘old’ class of antibiotics. *Future microbiology*. 2013;8(6):711-24.
59. Syed YY. Cefiderocol: a review in serious Gram-negative bacterial infections. *Drugs*. 2021;81(13):1559-71.

60. Papp-Wallace KM, Bonomo RA. New β -lactamase inhibitors in the clinic. *Infectious Disease Clinics*. 2016;30(2):441-64.
61. Patel TS, Pogue JM, Mills JP, Kaye KS. Meropenem–vaborbactam: a new weapon in the war against infections due to resistant Gram-negative bacteria. *Future microbiology*. 2018;13(09):971-83.
62. Abboud MI, Damblon C, Brem J, et al. Interaction of avibactam with class B metallo- β -lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016;60(10):5655-62.
63. Sy SK, Zhuang L, Beaudoin M-E, et al. Potentiation of ceftazidime by avibactam against β -lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in an in vitro infection model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2017;72(4):1109-17.
64. Mayer KH, Opal SM, Medeiros AA. Mechanisms of antibiotic resistance. In: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Ed. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. 4. Baski. New York, Churchill Livingstone, 1995;212-25.
65. Medeiros AA. Evolution and dissemination of β -lactamases accelerated by generations of β -lactam antibiotics. *Clinical Infectious Diseases*. 1997;24(Supplement_1):S19-S45.
66. Jones RN, Baquero F, Privitera G, Inoue M, Wiedemann B. Inducible β -lactamase-mediated resistance to third-generation cephalosporins. *Clinical Microbiology and Infection*. 1997;3:s7-s20.
67. Philippon A, Arlet G, Lagrange P. Origin and impact of plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamases. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 1994;13(1):S17-S29.
68. Hauskey PM. Resistance to carbapenems. *J Med Microbiol*. 1997; 46:451-4.
69. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clinical microbiology reviews*. 2009;22(4):582-610.
70. Acar J, Goldstein F. Trends in bacterial resistance to fluoroquinolones. *Clinical Infectious Diseases*. 1997;24(Supplement_1):S67-S73.
71. Chávez-Jacobo VM, Hernández-Ramírez KC, Romo-Rodríguez P, et al. CrpP is a novel ciprofloxacin-modifying enzyme encoded by the *Pseudomonas aeruginosa* pUM505 plasmid. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2018;62(6):e02629-17.
72. Berrazeg M, Jeannot K, Ntsogo Enguéné VY, et al. Mutations in β -lactamase AmpC increase resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates to antipseudomonal cephalosporins. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015;59(10):6248-55.
73. Edelstein MV, Skleenova EN, Shevchenko OV, et al. Spread of extensively resistant VIM-2-positive ST235 *Pseudomonas aeruginosa* in Belarus, Kazakhstan, and Russia: a longitudinal epidemiological and clinical study. *The Lancet infectious diseases*. 2013;13(10):867-76.

74. Janvier F, Jeannot K, Tessé S, et al. Molecular characterization of bla NDM-1 in a sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa* isolate from France. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013;57(7):3408-11.
75. Hayashi W, Izumi K, Yoshida S, et al. Antimicrobial Resistance and Type III Secretion System Virulotypes of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Dogs and Cats in Primary Veterinary Hospitals in Japan: Identification of the International High-Risk Clone Sequence Type 235. *Microbiology Spectrum*. 2021;9(2):e00408-21.
76. Arca-Suárez J, Fraile-Ribot P, Vázquez-Ucha JC, et al. Challenging antimicrobial susceptibility and evolution of resistance (OXA-681) during treatment of a long-term nosocomial infection caused by a *Pseudomonas aeruginosa* ST175 clone. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2019;63(10):e01110-19.
77. del Barrio-Tofiño E, López-Causapé C, Oliver A. *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones and their association with horizontally-acquired β -lactamases: 2020 update. *International journal of antimicrobial agents*. 2020;56(6):106196.
78. Martins WM, Narciso AC, Cayo R, et al. SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST277 clone recovered from microbiota of migratory birds. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2018;90(3):221-7.
79. Turano H, Gomes F, Medeiros M, et al. Presence of high-risk clones of OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* (ST79) and SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* (ST277) in environmental water samples in Brazil. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2016;86(1):80-2.
80. Vatcheva-Dobrevska R, Mulet X, Ivanov I, et al. Molecular epidemiology and multidrug resistance mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Bulgarian hospitals. *Microbial Drug Resistance*. 2013;19(5):355-61.
81. Aguilar-Rodea P, Zúñiga G, Rodríguez-Espino BA, et al. Identification of extensive drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains: New clone ST1725 and high-risk clone ST233. *PloS one*. 2017;12(3):e0172882.
82. Nomura F. Proteome-based bacterial identification using matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS): A revolutionary shift in clinical diagnostic microbiology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. 2015;1854(6):528-37.
83. Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clinical microbiology reviews*. 2013;26(3):547-603.
84. Posteraro B, De Carolis E, Vella A, Sanguinetti M. MALDI-TOF mass spectrometry in the clinical mycology laboratory: identification of fungi and beyond. *Expert review of proteomics*. 2013;10(2):151-64.
85. Wattal C, Oberoi J, Goel N, Raveendran R, Khanna S. Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for rapid

- identification of micro-organisms in the routine clinical microbiology laboratory. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2017;36(5):807-12.
86. Argemi X, Riegel P, Lavigne T, et al. Implementation of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry in routine clinical laboratories improves identification of coagulase-negative staphylococci and reveals the pathogenic role of *Staphylococcus lugdunensis*. *Journal of clinical microbiology*. 2015;53(7):2030-6.
 87. Nomura F, Tsuchida S, Murata S, Satoh M, Matsushita K. Mass spectrometry-based microbiological testing for blood stream infection. *Clinical Proteomics*. 2020;17(1):1-11.
 88. Nomura F, Nakanishi T, Igarashi K, Yamaguchi S, Setou M, Niwa T. Medical mass spectrometrist (MMS) training and certification: a key step to expanding routine clinical mass spectrometry usage in Japan. *Clinical Mass Spectrometry*. 2020;15:13-5.
 89. Eucast, “European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters,” 2022
 90. Faraji F, Mahzounieh M, Ebrahimi A, Fallah F, Teymournejad O, Lajevardi B. Molecular detection of virulence genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from children with Cystic Fibrosis and burn wounds in Iran. *Microbial pathogenesis*. 2016;99:1-4.
 91. Cabrolhier N, Sauget M, Bertrand X, Hocquet D. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry identifies *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Journal of clinical microbiology*. 2015;53(4):1395-8.
 92. Mulet X, García R, Gayá M, Oliver A. O-antigen serotyping and MALDI-TOF, potentially useful tools for optimizing semi-empiric antipseudomonal treatments through the early detection of high-risk clones. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2019;38(3):541-4.
 93. Aloush V, Navon-Venezia S, Seigman-Igra Y, Cabili S, Carmeli Y. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and clinical impact. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006;50(1):43-8.
 94. Prevention ECfD, Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014. Annual report of the European antimicrobial resistance surveillance network (EARS-net). ECDC. 2015.
 95. Botelho J, Grosso F, Peixe L. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*–Mechanisms, epidemiology and evolution. *Drug Resistance Updates*. 2019;44:100640.
 96. Xin X-F, Kvitko B, He SY. *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen. *Nature Reviews Microbiology*. 2018;16(5):316-28.
 97. European Centre for Disease Prevention and Control publishes Annual epidemiological report 2011. *Euro. Surveill*. 16, 20012.2011.

98. McCarthy K, Paterson D. Increased risk of death with recurrent *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2017;88(2):152-7.
99. Qin S, Xiao W, Zhou C, Pu Q, Deng X, Lan L, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2022;7(1):1-27.
100. Walsh TR. Emerging carbapenemases: a global perspective. *International journal of antimicrobial agents*. 2010;36:S8-S14.
101. Zilberberg MD, Chen J, Mody SH, Ramsey AM, Shorr AF. Imipenem resistance of *Pseudomonas* in pneumonia: a systematic literature review. *BMC Pulmonary Medicine*. 2010;10(1):1-11.
102. Buehrle DJ, Shields RK, Clarke LG, Potoski BA, Clancy CJ, Nguyen MH. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: risk factors for mortality and microbiologic treatment failure. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2017;61(1):e01243-16.
103. Gümral R. Seftazidim-avibaktam ve kolistin karbapenem dirençli *pseudomonas aeruginosa* klinik izolatlarına karşı in vitro aktivitesi. *İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi*. 2022;85(3):355-61.
104. Üstün C. Hastane kökenli karbapenem dirençli ve duyarlı *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının çeşitli antibiyotiklere direnç oranları. *Ankem Derg*. 2010;24(1):1-6.
105. Azizoğlu V. Karbapenem dirençli ve karbapenem duyarlı *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinin antibiyotik duyarlılıklarının karşılaştırılması ve karbapenem dirençli kökenlerde bazı karbapenemaz genlerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, 2020.
106. Badamchi A, Masoumi H, Javadinia S, Asgarian R, Tabatabaee A. Molecular detection of six virulence genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates detected in children with urinary tract infection. *Microbial pathogenesis*. 2017;107:44-7.
107. Fazeli N, Momtaz H. Virulence gene profiles of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Iranian hospital infections. *Iranian Red Crescent Medical Journal*. 2014;16(10).
108. Ullah W, Qasim M, Rahman H, Jie Y, Muhammad N. Beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: Phenotypic characteristics and molecular identification of virulence genes. *Journal of the Chinese Medical Association*. 2017;80(3):173-7.
109. Nikbin V, Aslani MM, Sharafi Z, Hashemipour M, Shahcheraghi F, Ebrahimipour G. Molecular identification and detection of virulence genes among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from different infectious origins. *Iranian journal of microbiology*. 2012;4(3):118.

110. Al Dawodeyah HY, Obeidat N, Abu-Qatouseh LF, Shehabi AA. Antimicrobial resistance and putative virulence genes of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with respiratory tract infection. *Germs*. 2018;8(1):31.
111. Haghi F, Zeighami H, Monazami A, Toutouchi F, Nazaralian S, Naderi G. Diversity of virulence genes in multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn wound infections. *Microbial pathogenesis*. 2018;115:251-6.
112. Lanotte P, Watt S, Mereghetti L, Dartiguelongue N, Rastegar-Lari A, Goudeau A, et al. Genetic features of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients compared with those of isolates from other origins. *Journal of medical microbiology*. 2004;53(1):73-81.
113. Karatuna O, Yağcı A. *Pseudomonas aeruginosa*'da virülans faktörleri ve quorum sensing. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*. 2008;38(1):42-51.
114. Maçın S. Pigmentli ve pigmentsiz *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının virülans faktörlerinin fenotipik ve genotipik olarak karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi. Hacettepe Üniversitesi, 2014.
115. Peña C, Cabot G, Gómez-Zorrilla S, Zamorano L, Ocampo-Sosa A, Murillas J, et al. Influence of virulence genotype and resistance profile in the mortality of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *Clinical Infectious Diseases*. 2015;60(4):539-48.
116. Vatansever C, Menekse S, Dogan O, Gucer LS, Ozer B, Ergonul O, et al. Co-existence of OXA-48 and NDM-1 in colistin resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST235. *Emerging Microbes & Infections*. 2020;9(1):152-4.
117. Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Domínguez MA, Gago JF, Juan C, Tubau F, et al. Genetic markers of widespread extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(12):6349-57.
118. del Barrio-Tofiño E, Sánchez-Diener I, Zamorano L, Cortes-Lara S, López-Causapé C, Cabot G, et al. Association between *Pseudomonas aeruginosa* O-antigen serotypes, resistance profiles and high-risk clones: results from a Spanish nationwide survey. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2019;74(11):3217-20.
119. Mulet X, Fernández-Esgueva M, Norte C, Zamorano L, del Barrio-Tofiño E, Oliver A, et al. Validation of MALDI-TOF for the early detection of the ST175 high-risk clone of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical isolates belonging to a Spanish nationwide multicenter study. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*. 2021;39(6):279-82.
120. Çekin ZK, Dabos L, Malkoçoğlu G, Fortineau N, Bayraktar B, Iorga BI, et al. Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Turkey: first report of *P. aeruginosa* high-risk clones with VIM-5- and IMP-7-type carbapenemases in a tertiary hospital. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2021;99(1):115174.

121. Malkoçoğlu G, Aktaş E, Bayraktar B, Otlu B, Bulut ME. VIM-1, VIM-2, and GES-5 carbapenemases among *Pseudomonas aeruginosa* isolates at a tertiary hospital in Istanbul, Turkey. *Microbial Drug Resistance*. 2017;23(3):328-34.
122. Papagiannitsis CC, Verra A, Galani V, Xitsas S, Bitar I, Hrabak J, et al. Unravelling the Features of Success of VIM-Producing ST111 and ST235 *Pseudomonas aeruginosa* in a Greek Hospital. *Microorganisms*. 2020;8(12):1884.
123. Zhang L, Tan FC, Strasfeld L, Hakki M, Kirienko NV. Long-Term Dominance of Carbapenem-Non-Susceptible *Pseudomonas aeruginosa* ST111 in Hematologic Malignancy Patients and Hematopoietic Cell Transplant Recipients. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2022:766.
124. Pirzadian J, Persoon MC, Severin JA, Klaassen CH, de Greeff SC, Mennen MG, et al. National surveillance pilot study unveils a multicenter, clonal outbreak of VIM-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST111 in the Netherlands between 2015 and 2017. *Scientific Reports*. 2021;11(1):1-10.
125. Kocsis B, Gulyás D, Szabó D. Diversity and distribution of resistance markers in *Pseudomonas aeruginosa* international high-risk clones. *Microorganisms*. 2021;9(2):359.
126. Perez-Vazquez M, Sola-Campoy PJ, Zurita ÁM, Avila A, Gomez-Bertomeu F, Solis S, et al. Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Spain: interregional dissemination of the high-risk clones ST175 and ST244 carrying blaVIM-2, blaVIM-1, blaIMP-8, blaVIM-20 and blaKPC-2. *International journal of antimicrobial agents*. 2020;56(1):106026.
127. Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Tubau F, Macia MD, Rodríguez C, Moya B, et al. Overexpression of AmpC and efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from bloodstream infections: prevalence and impact on resistance in a Spanish multicenter study. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;55(5):1906-11.
128. Viedma E, Juan C, Villa J, Barrado L, Orellana MÁ, Sanz F, et al. VIM-2-producing multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST175 clone, Spain. *Emerging infectious diseases*. 2012;18(8):1235.
129. Urbanowicz P, Izdebski R, Baraniak A, Żabicka D, Hryniewicz W, Gniadkowski M. Molecular and genomic epidemiology of VIM/IMP-like metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* genotypes in Poland. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2021;76(9):2273-84.

8. EKLER

Ek 1. Etik Kurul Onayı



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı: B.30.2.ODM.0.20.08/120

24.02.2022

Sayın Doç. Dr. Yeliz Tanrıverdi ÇAYCI

Etik Kurulumuza sunmuş olduğunuz *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında virulans genlerinin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile tespiti ve yüksek riskli klonların matris ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi yöntemi (MALDI-TOF MS) ile araştırılması başlıklı OMÜ KAEK 2022/96 Karar nolu Mikrobiyoloji çalışması nitelikli araştırma projeniz amaç, gerekçe, yaklaşım ve yöntemle ilgili açıklamaları açısından Klinik Araştırmalar Etik Kurulu yönergesine göre incelenmiş ve etik açıdan bir sakınca olmadığına, çalışmanın süresi 6 ayı geçerse 6 aylık bildirimlerinin yapılmasına, çalışma tamamlandıktan sonra sonucunun tarafımıza en geç üç(3) ay içerisinde bildirilmesine 23.02.2022 tarihli Etik kurulumuzda oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinize arz/rica ederim.

Ek 2. Turnitin Orjinallik Raporu

PSEUDOMONAS AERUGINOSA İZOLATLARINDA VİRULANS
GENLERİNİN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR) İLE TESPİTİ
VE YÜKSEK RİSKLİ KLONLARIN MATRİKS İLE DESTEKLENMİŞ
LAZER DESORPSİYON/İYONİZASYON UÇUŞ ZAMANI KÜT

ORJİNALLİK RAPORU

% 13	% 13	% 3	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%4
2	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%2
3	www.klimikdergisi.org İnternet Kaynağı	%2
4	www.istanbulsaglik.gov.tr İnternet Kaynağı	%1
5	academic.oup.com İnternet Kaynağı	%1
6	acikerisim.aku.edu.tr İnternet Kaynağı	%1
7	www.ekmud.org.tr İnternet Kaynağı	<%1
8	prezi.com İnternet Kaynağı	<%1