

**SİNOP VE ÇEVRE İLLERDEKİ KLİNİKLERDEN
İZOLE EDİLEN *Pseudomonas aeruginosa*
SUŞLARININ TANISI VE ANTİBİYOTİK
DİRENÇLİLİĞİNİN BELİRLENMESİ
MELİKE TEKERCİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

T.C.
SİNOP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SİNOP VE ÇEVRE İLLERDEKİ KLİNİKLERDEN İZOLE EDİLEN
***Pseudomonas aeruginosa* SUŞLARININ TANISI VE ANTİBİYOTİK**
DİRENÇLİLİĞİNİN BELİRLENMESİ

Melike TEKERCİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. İsmet BERBER

SİNOP – 2015

T.C.
SİNOP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bu çalışma, jürimiz tarafından 11/02/2015 tarihinde yapılan sınav ile
BİYOLOJİ Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. İsmet BERBER



Üye : Doç. Dr. Serdar BEKTAŞ



Üye : Yrd. Doç. Dr. Elif TEZEL ERSANLI



ONAY :

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

2./3./20.15


Doç. Dr. Hünkar AYRI DUYAR
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

**SİNOP VE ÇEVRE İLLERDEKİ KLİNİKLERDEN İZOLE EDİLEN
Pseudomonas aeruginosa SUŞLARININ TANISI VE ANTİBİYOTİK
DİRENÇLİLİĞİNİN BELİRLENMESİ**

ÖZET

Hastane enfeksiyonları; tedaviyi güçleştiren, morbidite ve mortalitede artışlara neden olan önemli bir sağlık sorunudur. *Pseudomonas aeruginosa*, özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda solunum ve üriner sistemin, yanık ve açık yaraların fırsatçı patojenidir.

Bu çalışmada, Ocak 2014-Haziran 2014 tarihleri arasında Sinop ve çevre illerdeki üç farklı hastanenin çeşitli kliniklerinden izole edilen 54 yerel ve 1 referans olmak üzere toplam 55 *Pseudomonas aeruginosa* suşunun, fenotipik özellikleri, antibiyotik duyarlılıkları, plazmid DNA profilleri, toplam hücresel ve hücre dışı protein profillerine göre karakterizasyonu gerçekleştirildi.

Yerel izolatların izolasyon ve identifikasyonunda konvansiyonel biyokimyasal test prosedürleri kullanıldı. Morfolojik ve fizyolojik özelliklerine göre tüm yerel izolatların, hareketsiz, spor oluşturmayan, Gram-negatif, katalaz, oksidaz ve sitrat pozitif, DNaz, indol ve metil-red negatif oldukları belirlendi. Ayrıca, izolatların %41'inin jelatini hidrolize ettiği görüldü.

İzole edilen tüm suşların 19 farklı antibiyotiğe karşı duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi kullanılarak test edildi. Antibiyogram sonuçlarına göre; suşların antibiyotik dirençliliği, klindamisin (%100), penisilin G (%100), sulfametaksazol/trimetoprim (%100), tetrasiklin (%100), kloramfenikol (%100), sefotaksim (%98.1), kolistin (%70.4), ampisilin/sulbaktam (%61.1), siprofloksasin (%55.5), oflofloksasin (%46.3), gentamisin (%40.7), sefepime (%39), imipenem (%33.3), meropenem (%22.2), seftazidim (%22), piperasilin (%20.4), tazobaktam/piperasilin (18.5), aztreonam (%13), amikasin (%5.5) olarak belirlendi.

Toplam hücre protein profilleri esas alınarak yapılan nümerik analiz, test edilen suşların benzerlik düzeyi %76 ve üzerinde iki gruba (A ve B) ayrıldığını ortaya koydu. Grup A, referans suş ve 14 yerel izolatu içermekte olup benzerlik düzeyi %79 ve üzerinde iki alt gruba (A₁-A₂) ayrıldı.

Ayrıca, hücre dışı protein profilleri esas alınarak yapılan nümerik analiz ise suşlar arasındaki benzerlik düzeyinin %69 ve üzerinde iki gruba (C ve D) ayrıldığını gösterdi. Grup C, referans suş ile 14 yerel izolatu ve Grup D ise 4 yerel izolatu içermektedir.

Plazmid DNA analiz sonuçları, suşların tamamında 14.500-618 bp arasında değişen farklı plazmidlerin varlığını gösterdi. Molekül ağırlıkları 14.500 bp, 1.392 bp ve 983 bp olan plazmidlerin tüm suşlarda ortak olduğu görüldü.

Çalışmamızda, *P. aeruginosa* enfeksiyonları tedavisinde etkin olarak kullanılan imipenem ve meropenem direncinin sırasıyla %33.3 ve %22.2 oranında olması, imipenemin tercih edildiği tedavilerde başarısızlık oranlarının yüksek olacağını göstermektedir. Çalışmamızda en düşük direnç amikasin (aminoglikozit) karşı belirlenmiştir. Sonuç olarak, rasyonel olmayan ilaç kullanımını önlemek için alınan önlemler dikkatle incelenmeli ve direnç gelişimi düzenli olarak takip edilmelidir. Ayrıca, bu çalışmadan elde edilen morfolojik ve fizyolojik bulguların yanı sıra SDS-PAGE tekniğiyle elde edilen toplam hücre ve hücre dışı protein profilleri de Sinop ve çevre illerden izole edilen *P. aeruginosa* türlerinin tür altı seviyede ayrımı için oldukça faydalı epidemiyolojik bilgiler sağlamıştır.

Anahtar Kelimeler : *P. aeruginosa*, Antibiyogram, SDS-PAGE, Protein Profilleri, Plazmid

IDENTIFICATION AND ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITIES OF *Pseudomonas aeruginosa* STRAINS ISOLATED FROM SİNOP AND ENVIRONS PROVINCES

ABSTRACT

Nosocomial infections are a major health problem that complicates treatment, causing increased morbidity and mortality. *Pseudomonas aeruginosa*, is especially in patients with suppressed immune system, respiratory and urinary tract, burns and open wounds of an opportunistic pathogen.

In this study were carried out the characterization of the total of 55 strains of *Pseudomonas aeruginosa* including 54 local and one reference from various clinics of three different hospitals in Sinop and neighboring provinces according to phenotypic characteristics, antimicrobial properties, plasmid DNA profiles, the characterization of total cellular and extracellular protein profile between January 2014-June 2014.

Conventional biochemical testing procedures were used for the isolation and identification of local isolates. According to morphological and physiological characteristics, all local isolates were motile, spore-forming, Gram-negative, catalase, oxidase and citrate positive, whereas they were DNase, indole and methyl red negative. Furthermore, the 41% isolates hydrolysis to gelatin.

The antibiotic susceptibility of all strains against 19 standard drugs was tested using disc diffusion method. According to antibiogram results, it was determined that antibiotic susceptibilities of all strains; were clindamycin (100%), penicillin G (100%), sulfamethoxazole/trimethoprim (100%), tetracycline (100%), chloramphenicol (100%), cefotaxime (98.1%), colistin (70.4%), ampicillin/sulbactam (61.1%), ciprofloxacin (55.5%), ofloxacin (46.3%), gentamicin (40.7%), cefepime (39%), imipenem (33.3%), meropenem (22.2%), ceftazidime (22%), piperacillin (20.4%), tazobactam/piperacillin (18.5%), aztreonam (13%) and amikacin (5.5%), respectively.

The numerical analysis of whole total cell protein profiles revealed that the tested strains separated to two groups at similarity levels 76% and above it. The Group A includes reference strains and 14 local isolates were divided into two subgroups (A₁-A₂) on the level of similarity and 79%. In addition, the numerical analysis of extracellular protein profiles of strains has showed that the level of similarity in 69%

and created two (C-D) groups were formed. The group C, includes 14 local strain and Group D, includes the 4 local isolates.

Plasmid DNA analysis results showed that the change different plasmids in all strains between 14.500-618 bp. In the tested strains, molecular weight 14.500 bp, 1.392 bp and 983 bp plasmid, this case was determined to be common to all strains.

As a result, the resistance of isolates the imipenem and meropenem are orderly 33.3% and 22.2%, the treatments in which imipenem is preferred shows that it will be high failure results. Isolates has showed the lowest resistance against to amikacin (aminoglycosides). Although aminoglycosides which are still preferred antibiotics in the treatment of infections caused by *P. aeruginosa*, it should be taken cure that the increasing rates of resistance for this group and the other majority of antibiotics groups. Therefore, the measures that have taken to prevent irrational drug use should be examined carefully and the development of resistance should be followed regularly. Moreover, in addition to the morphological and the physiological findings obtained from this study, the total cell and extracellular protein profile obtained from SDS-PAGE technique can also provide useful epidemiological information for discrimination of *P. aeruginosa* species isolated from Sinop and environs provinces at the subspecies level.

Key Words : *P. aeruginosa*, Antibigram, SDS-PAGE, Protein Profiles, Plasmid

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince hiçbir zaman anlayışını esirgemeyen, bilgi ve deneyimleri ile çalışmamın her anında destekleyen değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. İsmet BERBER'e,

Laboratuvar ve tez yazım çalışmalarım sırasında bilgilerini bizimle paylaşan Arş. Gör. Cumhur AVŞAR'a, örnekleri toplama sürecinde yardımcı olan Sinop Atatürk Devlet Hastanesi'nde görevli Klinik Mikrobiyoloji Uzmanları Hakan KESKİN ve Zeynep CİNGÖR'e; Kastamonu Münif İslamoğlu Devlet Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında görevli Dr. Melahat GÜRBÜZ'e, her zaman desteğiyle yanımda olan Vet. Hek. Okan ARACI'ya, birlikte çalıştığım tüm yüksek lisans arkadaşlarıma,

Hayatımın her anında maddi manevi desteklerini eksik etmeyen, aldığım her kararda yanımda olan, sonsuz sevgi ve fedakarlıkları ile beni cesaretlendiren aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa no
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
SEMBOLLER VE KISALTMALAR LİSTESİ	viii
ŞEKİLLER VE ÇİZELGELER LİSTESİ	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
2.1.1. Mikrobiyolojik Özellikler	4
2.1.2. Epidemiyoloji ve Patogenez	6
2.1.3. Virülans Faktörleri	7
2.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Tanısında Kullanılan Metotlar	8
2.2.1. Fenotipik Metotlar	8
2.2.2. Genotipik Metotlar	10
2.2.2.1. Protein Profillerine Dayalı Metotlar	11
2.2.2.2. Plazmid Profillerine Dayalı Metotlar	12
2.2.2.3. DNA ve RNA Profillerine Dayalı Metotlar	13
2.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Enfeksiyonları	16
2.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Suşlarında Antibiyotik Dirençliliği	18
3. MATERYAL ve METOT	21
3.1. Materyal	21
3.2. Metod	21
3.2.1. Morfolojik ve Biyokimyasal Testler	21
3.2.1.1. Gram Boyama	22
3.2.1.2. Jelatin Hidrolizasyon Testi	22
3.2.1.3. Tuz Tolerans Testi	23
3.2.1.4. Katalaz Testi	23
3.2.1.5. 42°C ve 46°C Sıcaklıkta Üreme	23

3.2.1.6. Nitrat Redüksiyon Testi	23
3.2.1.7. Oksidaz Testi	24
3.2.1.8. Hareket Testi	24
3.2.1.9. DNaz Testi	24
3.2.1.10. İndol Testi	25
3.2.1.11. Metil Red Testi	25
3.2.1.12. Voges-Proskauer Testi	25
3.2.1.13. Sitrat Testi	26
3.2.1.14. King B Agar Testi	26
3.2.1.15. Karbonhidrat Fermantasyon Testi	27
3.2.1.16. Antibiyogram	27
3.2.1.17. Elektroforez İçin Protein Örneklerinin Hazırlanışı	28
3.2.1.18. SDS-PAGE'in Yapılışı	28
3.2.1.19. Plazmid DNA İzolasyonu	29
3.2.1.20. Agaroze Jel Elektroforez	29
3.2.1.21. İstatistiksel Analiz	30
4. BULGULAR	31
4.1. Epidemiyolojik Bulgular	31
4.2. İzolatların Biyokimyasal Test Sonuçlarına İlişkin Bulgular	33
4.3. Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçlarına İlişkin Bulgular	36
4.4. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforez (PAGE) Bulguları	38
4.5. İzolatlar Arasındaki Kümeleme Analiz Bulguları	41
4.6. Plazmid DNA Analiz Sonuçlarına İlişkin Bulgular	42
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	45
6. KAYNAKÇA	55
7. EKLER	70
EK-1. Suşların Tanısında Kullanılan Besi Yerleri	70
EK-2. Araştırmada Kullanılan Boya ve Diğer Çözeltiler	73
EK-3. Poliakrilamid Jel Elektroforezinde Kullanılan Tampon ve Çözeltiler	75
EK-4. Plazmid Analizinde Kullanılan Tampon Çözeltiler	79
8. ÖZGEÇMİŞ	81

SEMBOLLER ve KISALTMALAR LİSTESİ

AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
AHLs	Açıl Homoserin Lakton Molekülleri
AK	Amikasin
APS	Amonium Per Sulfate
ATCC	American Types Cultures Collection
ATM	Aztreonam
CAZ	Seftazidim
CFU	Colony Forming Unit
CIP	Siprofloksasin
CLSI	Clinical and Laboratory Standarts Institute
CN	Gentamisin
CT	Kolistin
CTAB	Cetyl Trimethylammonium Bromide
CTX	Sefotaksim
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DNaz	Deoksiribonükleaz
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EMB	Levis's Eozin Metilen Blue
EPIC	European Prevalence Infection in Intensive Care
ETA	Endotrekeal Aspirat
FEP	Sefepime
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IPM	Imipenem
İMVEC	Indole, Metyl Red, Voges-Proskauer, Eijkman and Citrate
KÜKENS	Kültür Koleksiyonları Enstitüsü
MEM	Meropenem
MHA	Mueller Hinton Agar
MHB	Mueller Hinton Broth
MYSTIC	Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection
ONPG	O-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid

PBP	Penisilin Bağlayıcı Protein
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
PRL	Piperasilin
RNA	Ribonükleik Asit
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
SAM	Ampisilin/Sulbaktam
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SDS	Sodium Dodesil Sulfate
SXT	Sulfametoksazol/Trimetoprim
TE	Tris-EDTA
TZP	Tazobaktam/piperasilin
UPGMA	Unweight Pair Group Method Algorithm
USEPA	United States Environtmental Protection Agency
bp	Baz çifti
l	Litre
ml	Mililitre
g	Gram
mg	Miligram
mm	Milimetre
µg	Mikrogram
µm	Mikrometre
µl	Mikrolitre
sn	Saniye
dk	Dakika
β	Beta
kDa	Kilodalton
rpm	Rotary Per Minute

ŞEKİLLER ve ÇİZELGELER LİSTESİ

ŞEKİLLER

		Sayfa no
Şekil 3.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın mikroskop görüntüsü	22
Şekil 3.2	King B agarda UV ışık altında <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	26
Şekil 3.3	Phoretix 1D programında, manuel band ve moleküler ağırlık belirleme profilleri	30
Şekil 4.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> suşlarının izole edildiği hastaların yaş aralığı	32
Şekil 4.2	İzole edilen suşlarının kökenlerine göre dağılımı	33
Şekil 4.3	19 adet <i>P. aeruginosa</i> suşunun SDS-PAGE ile elde edilen toplam hücre protein profilleri	39
Şekil 4.4	19 adet <i>P. aeruginosa</i> suşunun SDS-PAGE ile elde edilen toplam hücre dışı protein profilleri	40
Şekil 4.5	Toplam hücre protein profilleri esas alınarak Jaccard'a göre UPGMA metodu kullanılarak oluşturulan dendogram	41
Şekil 4.6	Toplam hücre dışı protein profilleri esas alınarak Jaccard'a göre UPGMA metodu kullanılarak oluşturulan dendogram	42
Şekil 4.7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> suşlarının plazmid DNA profilleri	43
Şekil 4.8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> suşlarının plazmid DNA profilleri	43
Şekil 4.9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> suşlarının plazmid DNA profilleri	44

ÇİZELGELER

		Sayfa no
Çizelge 2.1	Tıbbi önemi olan bazı <i>Pseudomonadaceae</i> üyesi grupların sınıflandırılması	3
Çizelge 2.2	<i>Pseudomonas</i> genusunda yer alan bazı türlerin ayırıcı özellikleri	5
Çizelge 4.1	Farklı kliniklerden toplanan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> izolatlarına ait klinik bilgiler	31-32
Çizelge 4.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> izolatlarının biyokimyasal test sonuçları	34
Çizelge 4.3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> izolatlarının karbonhidrat fermentasyon test sonuçları	35
Çizelge 4.4	İzolatların test edilen antibiyotiklere karşı direnç oranları (%)	36
Çizelge 4.5	İzolatların test edilen antibiyotiklere karşı duyarlılıkları	37-38

1. GİRİŞ

Hastane enfeksiyonları, bakterilerin antibiyotiklere direnç geliştirmesiyle birlikte tüm dünyada ciddi sorun haline gelmiştir. Bakterilerin her geçen gün antibiyotiklere daha da dirençli hale gelmeleri, mortalite ve morbiditeyi (hasta olma hali) yüksek oranda artırmaktadır (Teresa ve ark., 2008). Hastane enfeksiyonlarının sıklığı ve antibiyotik dirençliliği, ülkeden ülkeye, hastaneden hastaneye değişiklik göstermektedir (Paterson, 2006).

Pseudomonas aeruginosa, Gram-negatif, non-fermentatif, spor oluşturmeyen enterik bir basildir. *P. aeruginosa* bir asırdan uzun süredir bilinmesine karşın, insanlarda enfeksiyon etkeni olarak ilk kez 1960'lı yıllarda tanımlanmaya başlamıştır (Gaynes ve Edwards, 2005). Sağlıklı bir bireyde hastalık oluşturabilmelerine rağmen sıklıkla fırsatçı bir patojen olan *P. aeruginosa*; özellikle kistik fibrozisli, nötropenik ve yanıklı hastalar gibi enfeksiyona açık kişilerde ciddi rahatsızlıklara neden olabilmektedir. Tüm hastane kaynaklı enfeksiyonların %10-25'inden sorumlu tutulmaktadır (Matar ve ark., 2005). Yoğun bakım hastalarında menenjit, pnömoni, gastroenterit, üriner sistem, cerrahi yara yeri enfeksiyonu gibi çeşitli klinik enfeksiyonlara neden olabilir. Centers for Disease Control and Prevention (CDC)'nin bildirdiğine göre, nazokominal pnömonilerde ikinci, üriner sistem enfeksiyonlarında ve bakteriyemide yedinci sırada bulunmaktadır (Kılıç, 2012).

Pseudomonas aeruginosa'nın minimal koşullarda üreyebilmesi ve farklı çevresel faktörlere adaptasyon geliştirerek kolonize olması neden olduğu hastalıkların tedavisinde büyük engeldir. Nemli ortamlarda yaygın oldukları için insanda perine, aksilla, kulak gibi nemli bölgelerde kolayca kolonize olur. Hastanelerde solunum cihazları, solüsyonlar, ilaçlar, dezenfektanlar ve lavabolar rezervuar görevi görür. Bunların yanı sıra; *P. aeruginosa*'da çoklu antimikrobiyal direncin sık görülmesi de tedavi süresinin uzamasına veya tedavinin olanaksız hale gelmesine neden olmaktadır (Kerr ve Snelling, 2009).

Tedavi sırasında direnç gelişimini önlemek ve geniş etki spektrumu sağlamak amacıyla kombinasyon tedavisi önerilir. Aminoglikozidler bu tedavide sık olarak kullanılan antibiyotik grubudur. Amikasin, *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında aminoglikozid grubunun diğer üyelerine oranla daha büyük bir etkiye sahiptir (Yücel ve ark., 2006).

Fırsatçı patojen olan *P. aeruginosa*'nın antibiyotiklere olan direnç gelişimi, tedavinin zor olması ve hastane salgınlarının önlenmesi amacıyla tür altı düzeyde tanımlamanın yapılmasını gerekli kılmaktadır. Bu tanımlamalar fenotipik ve genotipik tiplendirme şeklinde yapılabilir. Fenotipik tiplendirme; biyokimyasal özelliklere antibiyotik duyarlılıklarına, serolojik reaksiyonlara dayanır. Genotipik tiplendirmede ise plazmid profillerine, jel elektroforezi, DNA amplifikasyonu, ribotiplendirme, rastgele ayrılmış polimorfik DNA (RAPD-PCR) ve repetitive element palindromik polimeraz zincir reaksiyonu (REP-PCR) gibi yöntemler yer alır. Bu tiplendirmeler sayesinde, belirli antibiyotiklere karşı direnç profilleri belirlenebilir, endojen ve ekzojen kaynaklı enfeksiyonlar ayırt edilebilir.

Bu çalışmada, Sinop, Karabük ve Kastamonu'da bulunan bazı hastanelerin, farklı klinik materyallerinden izole edilen *P. aeruginosa* suşlarının fenotipik özellikleri, antibiyotik duyarlılıkları, plazmid DNA profilleri ve protein profillerine göre karakterize edilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda öncelikle izolatların fenotipik tanıları ve antibiyotik duyarlılıkları belirlendi. Daha sonra, toplam hücre içi ve hücre dışı protein profilleri ile plazmid DNA profilleri saptandı. Yapılan bu araştırma, çalışma alanımızdan izole edilen *P. aeruginosa* izolatları arasındaki benzerlik düzeyinin incelenmesi ve tedavide kullanılan antibiyotiklere karşı direnç profillerinin belirlenmesi için oldukça önemli katkılar sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

Pseudomonas genusu *Pseudomonadaceae* familyasına aittir, bu familya aynı zamanda *Azomonas*, *Azotobacter*, *Cellvibrio*, *Mesophilobacter*, *Rhizobacter* ve *Rugamonas* cinslerini içerir (Brenner ve ark., 2007). *Pseudomonas* cinsinin biyolojik kimliği, fenotipik özelliklerini esas alan yapay sınıflandırma ve genotipik özelliklerine göre yapılan revizyonist sınıflandırmalarla son yıllarda önemli ölçüde değişmiştir (Anzai ve ark., 2000). *Pseudomonadaceae* familyası, 16S rRNA gen analizine göre 5 gruba ayrılmaktadır. *Pseudomonas* cinsi rRNA Grup I içerisinde bulunmaktadır ve Proteobacteria gama alt sınıfında yer alır. Tıbbi önemi olan bazı *Pseudomonadaceae* familyasına ait genusların sınıflandırılması Çizelge 2.1’de verilmiştir (Peix ve ark., 2009).

Çizelge 2.1. Tıbbi önemi olan bazı *Pseudomonadaceae* üyesi grupların sınıflandırılması

Cins ve Türler	rRNA Homoloji Grupları ve Alt Grupları
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Grup I
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	
<i>Pseudomonas putida</i>	
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	
<i>Pseudomonas mendocina</i>	
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Grup II
<i>Burkholderia mallei</i>	
<i>Burkholderia cepacia</i>	
<i>Ralstonia pickettii</i>	
<i>Comamonas</i> türleri	Grup III
<i>Acidovarax</i> türleri	
<i>Brevundimonas</i> türleri	Grup IV
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Grup V

Pseudomonas genusunda yer alan bakteriler, yaygın olarak su ve toprakta yaşarlar. Bunun yanı sıra bitkiler, hayvanlar ve insanlar için patojen olan türleri de bulunmaktadır. Organik bileşikler, aromatik bileşikler, karbonhidrat ve hidrokarbonların tümü *Pseudomonas* cinsi tarafından besin olarak kolayca kullanılır (Todar, 2008).

2.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa, fluoresan *Pseudomonas*lar içinde en önemli insan patojenidir ve uzun bir tıbbi geçmişi vardır. *P. aeruginosa* tarihi, 1850 yılında Sedillot'un cerrahi yara bantlarında mavimsi yeşil renkte oluşumu tanımlamasıyla başlar (Gillespie ve Hawkey, 2006). İlerleyen yıllarda önce *Bacillus pyocyaneus* daha sonralarda ise *Pseudomonas pyocyanea* olarak adlandırılmıştır. 1862 yılında Lucke tarafından piyosiyanın izolasyonu yapılmıştır. 1882 yılında Gessard'ın klasik çalışmaları ile saf kültür olarak izole edilmiştir (Şen, 2006).

Günümüzde *P. aeruginosa*, sıklıkla hastane enfeksiyonlarından sorumlu tehlikeli bir fırsatçı patojendir. Çoğalmak için minimal besin maddesine ihtiyaç duyması, sıcaklık dahil bir çok fiziksel şarta uyum göstermesi fırsatçı patojen olmasında oldukça önemlidir (Brooks ve ark., 1998).

2.1.1. Mikrobiyolojik özellikleri

Farklılık göstermekle birlikte, *P. aeruginosa* yaklaşık olarak 1.5-3 µm uzunluğunda ve 0.5 µm genişliğinde, Gram boyama sonrasında çomak şeklinde gözükken Gram-negatif bakteridir. Bir ya da birden fazla kirpiğe sahip oldukları için çok hareketlidir (Baron ve Finegold, 1990; Brady, 2009). Zorunlu aerobtur, fakat bazı durumlarda nitratı son elektron alıcısı olarak kullanarak anaerob ortamlarda üreme yetisine sahiptirler (Gilardi, 1991; Leverstein-Van Hall ve ark., 2002). Laboratuvarlarda rutin kullanılan genel besi yerlerinde 37°C'de kolaylıkla ürerler. 42°C'de üreyebilme özelliği *P. aeruginosa*'yı; *P. putida* ve *P. fluorescens* türlerinden ayırır (Pitt ve Simpson, 2006).

Pseudomonas aeruginosa'nın tanısında önemli rol alan çeşitli pigmentleri vardır. Bu pigmentler oksijenli ortamda oluşurlar ve oda sıcaklığında daha iyi meydana gelirler (Şen, 2006). Pigmentlerde en sık rastlanan piyoverdin (flurosein) ve piyosiyanindir. Piyoverdin pigmenti diğer floresan grubu üyeleri tarafından üretilirken, piyosiyanın pigmenti sadece *P. aeruginosa* tarafından üretilir (Baron ve Finegold, 1990). Suda ve kloroformda çözünabilen piyosiyanın, floresan vermeyen mavi renkte bir kimyasaldır. Piyosiyanın üretimi; *P. aeruginosa*'nın diğer *Pseudomonas*'lardan ayrılmasını sağlar (Wilson ve Sande, 2004). Kloroformda çözünmeyip suda çözünabilen piyoverdin, agara yeşilimsi renk ve floresan verir. Kültür ortamında düşük demir konsantrasyonunda bol

miktarda üretilirler (Işık, 2008). Parlak kırmızı renkte sadece suda çözünebilen piyorubin pigmenti klinik izolatların %2'sinde görülür. Çok sık görülmemesine rağmen bazı *P. aeruginosa* suşları piyomelanin adında; kahverengi-siyah renkli bir pigmentte üretme yetisine sahiptir (Şen, 2006).

Pseudomonas aeruginosa kültürlerde, üzüm benzeri koku oluşturur. Kanlı agarda kenarları düz, β -hemolitik koloniler oluşturur (Jawetz ve ark., 2010). Kültürlerinde 3 farklı koloni görülebilir. Tip I koloni şekli, yuvarlak, ortası kabarık, yüzeyi mat olan 2-3 mm çapındaki kolonilerdir ve daha çok klinik örneklerden izole edilmiş *P. aeruginosa* suşlarında görülür. Tip II koloniler, kabarık düzensiz koliform kolonilere benzer ve çoğunlukla doğal kaynaklardan izole edilen suşlarda görülür. Mukoid kolonilerde denilen Tip III (R) kolonide; polisakkarit alginat üretimi görülür ve sık olarak kistik fibrosis hastalarının solunum yollarından izole edilen *P. aeruginosa*'larda rastlanır (Bilgehan, 2000; Brooks ve ark., 2001).

Pseudomonas aeruginosa içerdiği sitokrom oksidaz enzimi nedeniyle oksidaz testlerinde pozitif sonuç verir. Üre ve jelatine etkileri değişkendir. DNaz, Metil Red, Voges-Proskauer testleri negatiftir, H₂S oluşturmaz ve eskulini hidrolize edemezler. Karbonhidratları fermente edemezler, laktoz ve sukrozu kullanamazlar; fakat başta glikoz olmak üzere şekerleri oksidatif yolla metabolize ederler (Pitt ve Simpson, 2006; Vahaboğlu ve Akhan, 2008). *P. aeruginosa*, oksidaz pozitif olması, 42°C'de üreyebilmesi MHA'da pigment oluşturmaya ve Gram boyama ile identifiye edilebilir (Brooks ve ark., 2007). *Pseudomonas* genusunda yer alan türlerin ayırıcı özellikleri Çizelge 2.2'de verilmektedir (Winn ve ark., 2006; Forbes ve ark., 2007).

Çizelge 2.2. *Pseudomonas* genusunda yer alan bazı türlerin ayırıcı özellikleri

Türler	Hareket	Oksidaz	Katalaz	Jelatinaz	42°C'de üreme	Nitrat redüksiyonu	Piyoverdin üretimi	Maltaz kullanabilme	Mannitol kullanabilme	Asetamid
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	d	+	+	+	d	d	+
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	+	+	+	-	-	+	d	+	-
<i>Pseudomonas mendocina</i>	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
<i>Pseudomonas putida</i>	+	+	+	-	-	-	+	d	d	-
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	+	+	+	-	-	+	-	+	d	-

+: pozitif, -: negatif, d; değişken

2.1.2. Epidemiyoloji ve Patogenez

Pseudomonas aeruginosa çiğ sebze ve meyvelerin yüzeylerinde, su ve toprakla ilişkili ortamlarda bulunmakta olup, çevre koşullarına en iyi uyum sağlayan bakterilerdendir. İlk defa 1882 yılında Gessard tarafından yeşil cerahat içinde bulunduğu patojen olarak bildirilmiştir. Besleyici maddelerin çok az bulunduğu ortamlarda, farklı fiziksel şartlarda bile üreyebilmesi çeşitli ekolojik ortamlara uyum sağlamasını arttırmıştır. Normal şartlarda insan florasının elemanı olarak belirtilmesi de; fekal, oral ve cilt taşıyıcılığına rastlanabilir. İnsanlarda özellikle perine, aksilla, nazal mukoza, koltuk altı, kulak gibi nemli bölgelerde kolonize olabilir, sağlıklı insanlarda %5-30 gibi kolonizasyon oranlarında olsa da az sıklıkta baskın mikroorganizma olur (Brady, 2009).

Hastanede tedavi gören, solunum cihazına bağlı hastalarda solunum yollarında, kemoterapi alan hastalarda, yanıklı hastaların derilerinde ve antibiyotik alan hastalarda taşıyıcılık oranları yüksektir. Nemli bölgelerde kolaylıkla üreyebilmesi hastane ortamına uyum sağlamasına neden olmaktadır. Hastanelerde sıklıkla musluk, lavabo, kalıp sabunlar, solunum cihazları, endoskoplara ve endoskop yıkayıcıları, hidroterapi havuzları, temizlik aletleri gibi ortamlarda bulunabilirler (Kerr ve Snelling, 2009).

Birçok antibiyotiğe ve dezenfektanlara dirençlidir. Laboratuvar çalışmalarında suda 300 günden fazla, kuru filtre kağıdında 150 gün, kurumuş balgamda en az on beş gün canlı kaldığı belirtilmiştir (Hanberger ve ark., 1999). *P. aeruginosa*'nın neden olduğu hastane enfeksiyonlarının değerlendirildiği çalışmada; pnömonilerin %16'sına, idrar yolu enfeksiyonlarının %12'sine ve bakteriyemilerin %10'una neden olduğu belirtilmiştir (Van Delden ve Iglewski, 1998).

Pseudomonas aeruginosa sağlıklı insanlarda saprofit olarak bulunur ve nadiren hastalığa neden olur. Yanık, HIV enfeksiyonu, savunma mekanizmasının zarar görmüş olması, uzun süre geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı gibi durumlarda enfeksiyona neden olurlar. Bu durum "oportunistik aderans" olarak tanımlanır (Koh ve ark., 2005). *P. aeruginosa* enfeksiyonu kolonizasyon, invazyon ve sistematik yayılım olarak üç aşamada gerçekleşir. Enfeksiyon, kolonizasyon aşamasında da kalabilir ya da sistematik enfeksiyona ilerleyebilir. Bunda bakterinin virülans faktörleri ve konağın bağışıklık sistemi etkilidir (Bergagne, 2004).

2.1.3. Virölans Faktörleri

Pseudomonas aeruginosa; toksin, enzimler ve adhezinler gibi birçok virölans faktörüne sahiptir. Çok sayıda virölans faktörüne sahip olmasına karşın, yapılan çalışmalarda enfeksiyon oluşturabilmesi için birçok faktörün bir arada bulunması gerektiği belirtilmiştir (Murray ve ark., 2008).

Adhezinler; yüzeyde bulunan farklı moleküller aracılığıyla enfeksiyon oluşumunda konak hücreye yapışmada görev alırlar. *P. aeruginosa*'nın yüzeyinde bulunan flagella, filamentöz bir uzantıdır ve yüzme şeklindeki hareketinden sorumludur (Feldman ve ark., 1998). Pili, 15-18 kDa ağırlığında pilin proteinin polimerlerinden oluşmuş iplikçiklerdir ve mukoza hücrelere yapışmayı sağlarlar. Pili, immün sistemi baskılanmış hastalarda kolonizasyonda önemlidir. Enfeksiyon ilk olarak pili sayesinde epitelyum yüzeydeki reseptörleri tanıması ve yapışması ile başlar (Doig ve ark., 1989; Kipnis ve ark., 2006).

Lipopolisakkarit; bakteriyi konak savunmasından korur. Fosfolipid ikili katman içinde yer alan lipid A ve buna bağlı kor polisakkaridi ile O-polisakkaridi bulunduran hidrofilik kuyruktan oluşur. Kistik fibrozis ve kronik akciğer hastalıklarında bakterinin kolonizasyonunu kolaylaştırır (Pier ve Ramphal, 2009). Aljinat; bakteri tarafından oluşturulan slaym tabakasının ana yapısını oluşturur. Tekrarlayan mannuronik asit ve glukoronik asitlerin sonlarında bulunur. Aşırı miktarda üretimi biyofilm yapımıyla ilişkilidir. Aljinat bakteriyi bölgesel bağışıklık cevaptan, fagositoz ve antibiyotik tedavisinden korur (Leid ve ark., 2005).

Pseudomonas aeruginosa bir yada daha fazla pigment oluşturur. Bunlardan en sık bulunanları yeşil renkli piyoverdin (floresein) ve *P. aeruginosa* dışında başka bir bakteride bulunmayan piyosiyanindir. Piyoverdin, metabolizma için gerekli demiri sağlar. Piyosiyanin, serbest oksijen radikallerinin üretimini katalize eder. Akciğer doku hasarlarından ve solunum yollarında siliyer aktivitesinin engellenmesinden sorumludur (Bergagne, 2004).

Ekzotoksin A; hücre dışı bir enzimdir ve konak hücrenin protein sentezini inhibe eder. *P. aeruginosa* virölans faktörleri arasındaki en toksik olanıdır. Kronik pulmoner enfeksiyonlarındaki doku hasarlarına, oküler enfeksiyonlardaki korneal hasarlara neden olur. Ayrıca immün sisteminde baskılanmasına sebep olur (Murray ve ark., 2008). Fosfolipaz C ve ramnolipid; *P. aeruginosa*'nın hemolizinleridir. Ramnolipid, ramnoz ve beta-hidroksidekanoid asitten oluşur, deterjan etkisine sahiptir. Fosfolipaz C, ksitik

fibrozisli hastalarda solunum yolu kolonizasyonunda etkilidir. İkisi birlikte fosfolipidler üzerinde çözücü etki gösterirler ve akciğer yüzey gerilimini inaktive ederler (Delden ve Iglewski, 1998). Alkali proteaz ve elastaz; jelatini, kazaini ve immünoglobulinleri parçalarlar. Elastaz, alkali proteazdan farklı olarak albümin, fibrin ve elastini de parçalar. İnsan periferik kan nötrofillerinin kemotaksisini baskırlar buda *P. aeruginosa*'nın konağın savunma hattından kaçışında önemlidir (Yağcı ve ark., 2002).

Biyofilm; mikroorganizmanın içine gömülü olarak bulunduğu ekstraselüler polimerik maddeden oluşan bir matrikstir. Yüzeyle yada birbirlerine yapışmalarını sağlar. Biyofilm içerisindeki bakteri hem fenotipik hem de metabolik değişimlere uğradığı için besin eksikliğine, pH değişimlerine, dezenfektanlara ve antibiyotiklere karşı dirençlidir (Sadovskaya ve ark., 2010). Biyofilm oluşumu, Quorum-sensing olarak adlandırılan sinyal sistemi ile kontrol edilir. Bu sistemde açıl homoserin lakton molekülleri (AHLs) üretir. *P. aeruginosa*'da *las* sistemi ve *rhl* sistemi olarak adlandırılan iki farklı sistem vardır. AHLs ksitik fibrozisli hastaların akciğerlerinde saptanmıştır (Pitt ve Simpson, 2006).

2.2. *P. aeruginosa* Tanısında Kullanılan Metotlar

Bakterilerin tanımlanmasında genotipik ve fenotipik olmak üzere iki temel yöntem kullanılır. Fenotipik identifikasyon, bakterilerin gözlenebilen fiziksel ve metabolik özelliklerine göre yapılır. Genotipik identifikasyon ise moleküler teknikler ile bakterinin plazmit ve kromozomal DNA/RNA analizi, protein profillerine bağlı olarak tür teşhisinde uygulanır (Engleberg, 1994).

2.2.1. Fenotipik Metotlar

Biyotiplendirme yöntemleri arasında sık kullanılanlar, bakterinin farklı çevre şartlarına adaptasyonu, seçici besi yeri ortamında gelişimi, biyokimyasal ve antijenik profili, faj duyarlılık kalıpları, antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesidir. Sınıflandırmada temel olarak bu teknik kullanılmaktadır ve günümüzde laboratuvarlarda ticari identifikasyon sistemleri yer almaktadır. Fenotipleme ile genel gruplara ayırım yapılabilse de ileri tanımlama için ayırım gücü zayıftır (Struelens Marc ve ark., 1998).

Pseudomonas'ların patojen türlerinin bulunması, gıdalarda bozulmalara neden olması, kolay uygulanabilecek izolasyon yöntemlerinin yetersiz olmasından dolayı pek

çok araştırmacı tarafından *Pseudomonas*'ların izolasyon ve sayımına yönelik araştırmalara ağırlık verilmiştir.

King ve ark. (1954)'nın yaptıkları çalışmada, *P. aeruginosa*'nın piyosiyanın üretimini artırıcı King A ve piyoverdin üretimini artırıcı King B besiyerlerini geliştirmişlerdir (Brown ve Lowbury, 1965). Rose ve ark. (1970), diatiminin *Enterobacter*'lerin gelişimi üzerine etkisini ve *Pseudomonas*'ların izolasyonu için selektif bir ajan olarak kullanılabilirliğini araştırmışlardır. Diatimin *E. coli*, *Proteus* spp. ve *Salmonella enteritidis*'in saf kültürleri için bakterisidal etki gösterirken, *P. aeruginosa*'nın gelişiminde sadece 1-2 saatlik bir gecikme yaptığını belirtmişlerdir.

Pseudomonas F Agar ve *Pseudomonas* P Agar, King ve arkadaşları tarafından 1954 yılında geliştirilen King A ve King B besi yerlerinin modifikasyonlarıdır. *Pseudomonas* F Agar içerisindeki kazein peptonu, *Pseudomonas*'ların floresin üretimini sağlar. *Pseudomonas* P Agar içindeki jelatin peptonu aminoasit ve diğer esansiyel azot kaynaklarını oluşturur. *P. aeruginosa*, *Pseudomonas* P Agar besi yerinde piyosiyanın üretimine bağlı olarak koloni etrafında mavi-yeşil zon ya da piyorubin üretimine bağlı olarak kırmızı-kahverengi zon oluşturur. *Pseudomonas* F Agar besi yerinde ise floresin üretimine bağlı olarak koloni etrafında sarı-yeşil zon oluşturarak gelişir (Anonim, 2006).

Pseudomonas aeruginosa'nın epidemiyolojik açıdan incelenmesi için pyosin tiplendirmesinden de yararlanılmaktadır. Enfeksiyonlarda izole edilen suşların tiplendirilmesi ile hastaların aynı suş ile enfekte olup olmadığı ve enfeksiyonun kaynağı belirlenerek hastane enfeksiyonları önlenabilmektedir (Tümbay, 1981). Önay ve Derbentli (1996)'nin yaptıkları tiplendirme çalışmasında, 150 *P. aeruginosa* suşunun 68'i pyosin tip A-3, 17'si pyosin tip 10, 12'si pyosin tip 37, 10 tanesi pyosin tip A-2 ve 7'si pyosin tip 1 olarak bulduklarını bildirmişlerdir.

Biyotiplendirmenin diğer bir yöntemi de antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesidir. *P. aeruginosa* pek çok antibiyotiğe karşı doğal direnç sahiptir ve çeşitli direnç mekanizmalarıyla antibiyotiklere direnç geliştirebilmektedir. Kromozomal ve plazmid kaynaklı betalaktamazların üretimi, antibiyotik hedeflerinde değişiklik, porin proteinlerindeki değişiklik sonucu dış membran geçirgenliğinin azalması, eflüks pompa sistemi ile antibiyotiğin dışarı atılması, integronlar ile taşınan direnç genlerinin horizontal kazanım yolu gibi başlıca yollarla direnç geliştirebilme yeteneğine sahiptir (Hancock, 1998). Günümüzde geniş spektrumlu antibiyotiklerin yaygın kullanılmasından dolayı *P. aeruginosa*'da antibiyotik direnci önemli bir sorun haline

gelmiştir. Tedavilerde yaygın olarak kullanılan bir çok antibiyotiğe karşı direnç gelişimi enfeksiyonların tedavisinde zorluklara sebebiyet vermektedir (Dündar ve Tamer, 2009). Antipsödomonal penisilinler, sefalosporinler, kinolonlar, karbapenemler *P. aeruginosa* tedavisinde sık kullanılan antibiyotiklerdir. Bu antibiyotikler daha çok aminoglikozitler ile kombine edilerek kullanılır. Aminoglikozit grubunda yer alan amikasin, enzimlerden daha az etkilenmesinden dolayı tedavilerde grubun diğer üyelerine karşı daha etkilidir (Tunçoğlu ve ark., 2009).

Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection (MYSTIC) 2006 yılında Avrupa’da gerçekleştirdikleri çalışmada *P. aeruginosa*’nın meropenem direncini %22, amikasin %23 ve siprofloksasin direncini %33 olarak bildirmişlerdir (Turner, 2008). Latin Amerika ülkelerini de içine alan geniş kapsamlı bir çalışmada, 5 yıllık süre içinde antipseudomonal ajanlara karşın direncin yıldan yıla artış gösterdiği ve direncin %40’a ulaştığı bildirilmiştir (Andrade ve ark., 2003).

Fenotipik metotlar, genetik özellikleri yansıtır ve oldukça spesifiktir. Belirli bir fenotip bir patojende ender olarak bulunuyorsa, bu fenotipik özellik kökenin yayılma yolu hakkında fikir verebilir. Ancak her zaman görülebilen fenotipik özellikler olduğunda alt tiplendirme yapılmalıdır. Fenotipik yöntemler temelde kullanılsalar da duyarlılıklarını azaltan çeşitli nedenler vardır. Bunlar mikroorganizmaların antijen yapısının değişik olması, çevresel seçici baskılardan etkilenme, direnç modellerinin antibiyotik tedavisinde yüksek oranda etkilenmesi, fenotipik özelliklerin her zaman eksprese olmayan genlerde kodlanabilmesidir (Derbentli, 2002).

2.2.2. Genotipik Metotlar

Morfolojik, fizyolojik, metabolik, biyokimyasal özellikler, faj tiplendirmeleri ve antimikrobiyal duyarlılık profilleri fenotipik yöntemler içerisinde yer almakta ve rutin olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemler kullanışlı olmakla birlikte, türler arası varyasyonlar ve tekrarlanabilirliğinin zayıf olması gibi dezavantajları da vardır. Bu dezavantajlar araştırmacıları yeni yöntemler bulmaya sevk etmiştir (Khaled ve ark., 1997). Bakteri plazmidlerinin veya kromozomal DNA’nın genotiplendirilmesi, fenotiplendirme yöntemlerindeki dezavantajları ortadan kaldırmış ve epidemiyoloji çalışmalarında daha güvenilir veriler elde edilmesi sağlamıştır (Derbentli, 2002). DNA temelli yöntemler, kullanılan tekniğin tipine bağlı olarak mikroorganizmaların cins düzeyinden suş seviyesine kadar identifikasyonunu sağlayabilir. Ayrıca, kuvvetli bir

ayırım gücüne sahip olmaları tekrarlanabilir olmaları, uygulamasının kolay olması ve sonuçların kolay yorumlanabilmesi gibi avantajlardan dolayı son yıllarda sıklıkla tercih edilen yöntemlerdir (Bush ve Nitschko, 1999; Foxman ve Riley, 2001).

Bakterilerin tiplendirilmesinde kullanılan moleküler yöntemler içerisinde plazmid profil analizleri (Derbentli, 2002), ribotiplendirme (Berezin ve Towner, 1996), pulsed field gel electrophoresis (PFGE) (Olive ve Bean, 1999; Durmaz, 2005), rastgele arttırılmış polimorfik DNA (RAPD-PCR) (Welsh ve Mc Clelland, 1990; Avşar ve Berber, 2014), çoğaltılan fragmentlerin uzunluk polimorfizmi (Amplified Restriction Fragment Length Polymorphism: AFLP) (Mueller ve Wolfenbarger, 1999; Jureen ve ark., 2004), polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) analizi (Olive ve Bean, 1999), toplam hücre içi ve hücre dışı proteinlerin SDS-PAGE ve Native-PAGE (Berber ve ark., 2003; Berber ve ark., 2010) ile analizi gibi yöntemler yer almaktadır.

2.2.2.1. Protein Profillerine Dayalı Metotlar

Bakteriyel tanımlama ve taksonomi çalışmalarında protein profillerinin kullanılması uzun zamandır araştırılmaktadır. Bu konuda ilk çalışmalar toplam protein profillerin tespit edilmesi üzerine kurulmuştur (Houwink, 1953). Proteinler denatüre (SDS) jelde moleküler büyüklerine ve doğal (Native) jelde ise denatüre edici maddeler kullanılmadan biyolojik ve enzimatik özelliklerini kaybetmeden molekül büyüklüğü biçimi ve yüküne göre ayrılırlar. Yaygın olarak kullanılan sodyum dodesil sülfat (SDS) poliakrilamit jel elektroforezinde, proteinler bir deterjan olan SDS ile denatüre edilirler. Proteinler katlanmış hallerini kaybederek negatif yüklü deterjan molekülleri ile kaplanırlar. Elektrik alan içerisinde deterjan kaplı proteinler boyları ile ters orantılı bir hızla hareket ederek büyüklüklerine göre ayrışırlar. Denatürasyonsuz elektroforezde proteinler SDS ile denatüre edilmeden jel içerisinde ayrışabilirler. Üzerlerindeki yük boyları ile orantılı olmaz hareket hızları hem kütlelere hem taşıdıkları elektrik yüküne bağlı olur (Perez ve ark., 2000). Klasik tanı testlerine oranla, protein çalışmalarını hızlı ve güvenilir sonuçlar vermesi kullanımda tercih edilmesini ön plana çıkarmaktadır (Picon ve ark., 2005).

Gatti ve ark. (1997), hücre duvarı proteinlerini izole ederek SDS-PAGE ile ayrımını sağlamışlardır. Bu yöntem ile çok sayıda türün hızlı ve güvenli bir şekilde karakterize edildiği bildirilmektedir. Kunert ve ark. (2007)'nın insan patojeni *P. aeruginosa*'nın SDS-PAGE ile proteinleri ayırarak Western blot tekniği ile analizini

gerçekleştirmişlerdir ve plazminojen bağlayıcı protein ve H faktörlerini araştırmışlardır. Uçan ve ark. (2003), Konya illindeki Mastitis tanısı konmuş ineklerin sütlerinden izole edilen *E. coli* suşlarının plazmit ve protein profillerinin tiplendirmesini gerçekleştirmişler ve toplam hücre protein profillerinin daha iyi bir ayırım sağladığını bildirmişlerdir.

2.2.2.2. Plazmid Profillerine Dayalı Metotlar

Plazmidler, ekstrakromozomal, replike olabilen, küçük, halkasal çift iplikli DNA molekülleridir. Plazmidlerin büyüklüğü 1-2 milyon daltondan 150 megadaltona kadar değişmektedir. Plazmidlerin esas olarak birer genom olmaları nedeniyle içinde bulundukları bakterilerde bazı özellikleri yönetmeleri ve bazı fenotipik değişikliklere yol açmaları doğal bir olgudur. Plazmidlerin hepsinde kendi replikasyonlarını sağlayan genlerle bir takım fenotipik karakteristiği yöneten genler bulunur. Bazı plazmidlerde ise bakteriden bakteriye kendi transferini sağlayan transfer genleri bulunur. Bunlara konjugatif genler adı verilmektedir. Klinikte daha çok plazmidlere bağlı direnç görülmektedir. Bir hücrede 10-40 kadar plazmid bulunabilir. R-plazmidi adı verilen direnç plazmidleri, farklı antibiyotiklere karşı direnç genleri taşımaktadır. Bulaşıcı tipteki bu direnç, daha çok antibiyotiği inaktive eden enzimlerle olmaktadır (Gülay, 1999; Gür, 2002). Alkali lizis prosedürlerini kullanan geleneksel plazmid izolasyonu ve çok sayıda türetilmiş yöntemlerin kullanımı, plazmid izolasyonu ve analizlerini mikrobiyoloji ve moleküler biyoloji laboratuvarlarında düzenli olarak kullanılan teknikler haline getirmiştir. Bu yüzden, plazmid profilleri bakteriyel tiplendirme için yardımcı analizler olarak kullanılmaktadır.

Bir bakteride bulunan plazmidlerin sayısı büyüklüğü ve nitelikleri uzun süre aynı kalır ve yavru hücrelere aynen aktarılır. Yavru hücrelere aynen aktarılan plazmid şablonunun epidemiyolojik araştırmalarda büyük önemi bulunmaktadır. Kültüre alınan bakteri hücrelerinin deterjanlarla muamele edilerek eritilmesi neticesinde DNA'lar açığa çıkar. Açığa çıkan DNA molekülleri lizat ve agaroz jel elektroforezinde işlem görünce plazmid DNA'lari molekül büyüklüklerine göre ayrılırlar. Bu DNA molekülleri özel boyalarla boyanıp incelendiklerinde bakterilerin yapısında bulunan plazmidler özel bir görünüm verirler. Plazmid parmak izi adı verilen bu görünümün birbirleri ile karşılaştırılması sonucunda aynı kökenden gelen bakteriler tespit edilebilir ki bu olgunun özellikle epidemiyolojik çalışmalarda önemi büyüktür (Bilgehan, 1996).

Knothe ve ark. (1983), sefalosporin dirençliliğinin plazmid kökenli olduğunu ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarından izole edilen plazmidin, sefotaksim, sefuroksim diğer sefalosporinler, penisilinler ve gentamisin dirençliliğini hassas suşlara aktarabildiğini bildirmişlerdir. Sefotaksim ve diğer son kuşak beta-laktam antibiyotik dirençliliklerinin *E. coli* bakterisine çok kolay aktarabildiğini belirtmişlerdir.

Aslım ve Beyatlı (2004), Türkiye'deki farklı köy ve kasabalardan toplanan yoğurt örneklerinden 34 izolatu *Streptococcus thermophilus* olarak teşhis etmiş ve antibiyotik dirençlilikleri ve plazmid içeriklerini incelemişlerdir. Birçok suşun gentamisin (%79) ve penisilin G'ye (%64) karşı dirençlilik gösterdiğini belirlemişler. Plazmid DNA analizlerinde ise 7 suşun plazmid DNA içermediğini, plazmid DNA'sı içeren suşlarda ise sayısının 1 ve 5 arasında, moleküler ağırlıklarının ise 1.88-19.89 kb arasında olduğunu tespit etmişlerdir. Bir veya hiç plazmide sahip olmayan suşların birçok antibiyotiğe duyarlı olduğunu belirlemişlerdir. Beş adet plazmid içeren 3 suşun ise birçok antibiyotiğe dirençli olduğunu da bildirmektedirler.

Shahcheraghi ve ark. (2003), Tahran'da iki hastanede tedavi gören yanık hastalarından izole ettikleri *P. aeruginosa* suşlarının antibiyotik dirençlilik ve plazmid profillerini inceledikleri çalışmalarında tüm suşların tetrasiklin, kabenisilin, amikasin seftazidim, kanamisin, sefotaksim ve gentamisine çoklu dirençli olduğunu saptamışlardır ve analizi yapılan suşların %95'inde iki adet megaplazmid bulunduğu göstermişlerdir. Ayrıca suşların kendi plazmidlerini kaybettikten sonra ilaç duyarlılık profillerinde ve laktamaz üretiminde değişiklikler olduğunu belirtmişlerdir.

2.2.2.3. DNA ve RNA Profillerine Dayalı Metotlar

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), 50-2000 baz çiftli DNA veya RNA'nın tek zincirinin yarı otomatik sistem içerisinde primerler kullanarak birkaç saat içinde bir milyondan fazla kat çoğalmasını sağlayan üç reaksiyonun (denatürasyon, birleşme, DNA sentezi) döngü halinde tekrarlanmasıdır. PCR temelli yöntemlerin tür seviyesinde yüksek ayırım gücüne sahip olmasından dolayı bu teknikler daha çok tercih edilmektedir (Derbentli, 2002).

Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi polimeraz zincir reaksiyonu (RFLP-PCR): hızlı bir yöntemdir. Genomdaki hedef bölgeler, spesifik primerlerin kullanımıyla çoğaltılmakta ve daha sonra restriksiyon enzimiyle kesilmektedirler. Restriksiyon enzimi hedef bölgenin bilinen kompozisyonuna dayanarak seçilmektedir. Elde edilen

restriksiyon fragmentleri, agaroz jel elektroforezi neticesinde ayrılmakta ve karşılaştırılmaktadır (Kabadjova ve ark., 2002).

Çoğaltılmış fragment uzunluk polimorfizmi (AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism); moleküler markör teknikleri içerisinde genetik karakterizasyon çalışmaları için geliştirilmiş çoklu lokus parmak izi analizi tekniklerinden biridir. Genellikle birbirine yakın türlerin karakter analizlerinde kullanılan AFLP sonuçları günümüzde bakteriyel taksonomiye açıklamakta ve sonuçları DNA-DNA hibridizasyonu gibi teknikler ile desteklenmektedir. Yöntem, uygun koşullarda amplifiye edilecek olan kalıp DNA'yı yaratmak için DNA fragmanlarının uçlarına eklenmiş olan çift zincir DNA adaptörlerini tanıyan primerlerle seçici amplifikasyonu gerekli kıldığından elde edilen sonuçlar tekrarlanabilir özellik sergilemektedir. Genomik DNA'nın restriksiyon enzimi ile kesimi sonucu oluşan DNA parçalarının selektif amplifikasyonu gerçekleştirilir. Amplifiye edilen ürünler işaretlenir ve daha sonra akrilamid jel elektroforezi ile ayrıştırılır. Bu yöntemde 60-500 kilobazlık DNA segmentleri ayırt edilebilir (Mueller ve Wolfenbarger, 1999; Jureen ve ark., 2004).

Dalgalı alan jel elektroforezi (PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis): yüksek tekrarlanabilirlik özelliğine sahip olduğundan birçok araştırmacı tarafından moleküler tiplendirme yöntemlerinin en başarılısı olarak kabul edilmektedir. Bakteriler, eritilmiş agaroz karıştırılır, deterjan enzim ile parçalanması sağlanır ve restriksiyon enzimleri ile kesilir. Daha sonra agaroz jelde belirli aralıklarla yönü değiştirilen elektrik akımına tabi tutulur. PFGE'de bozulmamış DNA gerekli olduğundan DNA'da kırılmalara yol açabilen geleneksel DNA izolasyonu uygun değildir. Bu yöntem 10-800 kilobazlık DNA segmentlerinin ayırt edilmesine olanak sağlar. Ayrım gücü yüksek olan bir yöntem olmasının yanı sıra, diğer yöntemlere göre zaman alıcı olması laboratuvarlar arası standardizasyon oranının düşük olması gibi noktalara dikkat edilmelidir (Bush ve Nitschko, 1999).

Tekrarlanan palindromlara dayalı PCR (Rep-PCR: Repetitive Extragenic Palindrome PCR): Bu yöntemde çoğu bakterinin genomu boyunca dağılım gösteren tekrarlayan DNA dizilimlerine komplementer olan kısa primerler kullanılarak tekrarlar arasında kalan bölgeler amplifiye edilir. Rep-PCR bir çok *Enterobacteriaceae* üyesi, *Burkholderia cepacia*, *L. pneumophila*, *H. pylori*, *Neisseria* spp., ve *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının alt tiplendirilmesinde başarıyla kullanılmıştır. Rep-PCR, AFLP gibi moleküler tiplendirme yoluyla suşlar arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmada en sık

kullanılan PCR temelli tiplleme yöntemlerindendir (Olive ve Bean, 1999; Hiatt ve Seal, 2009).

Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA-PCR (RAPD: Randomly Amplified Polymorphic): Williams ve ark. (1990)'nın rastgele bir primer kullanarak, özgün nükleotid dizisini bilmeden PCR amplifikasyonu yapmışlardır ve yönteme RAPD adını vermişlerdir. RAPD markörleri, küçük (10 baz), %50'den çok Guanin ve Sitozin'den meydana gelmiş, rastgele seçilmiş primerler tarafından PCR ile çoğaltılmış nispeten daha kısa DNA fragmentlerinden (yaklaşık 200–2000 baz çifti uzunluğunda) oluşmaktadır. Bu yöntemde bilinen özgül bir DNA bölgesini çoğaltmak yerine, rastgele seçilen bir veya daha fazla primerle DNA'daki birçok bölgenin çoğaltılması gerçekleştirilmektedir. Uygulanma kolaylığı ve kısa sürede sonuç verebilme açısından geniş kullanım alanı bulan bu yöntem diğer moleküler yöntemlere göre daha hızlı ve daha ucuzdur. Kullanılan primer sayısı arttıkça ayırım gücü artmaktadır (Welsh ve McClelland, 1990; Ehrmann ve Vogel, 2005).

Çarıkçı ve ark. (2008)'nin kozmetik ürünlerde bakteriyel ve fungal kompozisyonun klasik yöntemler ve PCR kullanarak araştırdıkları çalışmada, bakteri kontaminasyonunu PCR yöntemi ile 30 saatte saptanırken, klasik yöntemlerle 6-8 günde saptandığını bildirmekte, direk PCR yöntemi ile mikrobiyal kontaminasyonu saptamada DNA ekstraksiyonu ve purifikasyona, presipitasyona ve santrifüjlemeye gerek kalmadığını belirtmektedirler. Bu şekilde kozmetik ve farmasötik mikrobiyoloji laboratuvarlarında geniş hacimli örnek hacimlerinde bu yöntemin kullanılabileceğini rapor etmişlerdir. Altundağ (2009), *P. aeruginosa* ve *S. aureus* üzerine yaptığı yüksek lisans tezinde PCR yönteminin, herhangi bir biyolojik sıvıdan DNA izolasyonu yapmadan direk kullanabilirliğine imkan sağladığını ve enhancer kombinasyonları oluşturmaya gerek kalmadığını belirtmiştir.

Küçükbasmacı ve ark. (2009), *P. aeruginosa* izolatlarının VIM ve IMP tipi metallo-beta-laktamaz genlerinin hızlı saptanması üzerine yaptıkları çalışmada, multipleks PCR yöntemini kullanmışlar ve metallo-beta-laktamazları (MBL) ekspres eden kökenleri başarıyla saptadıklarını belirtmişlerdir. Ayrıca multipleks PCR protokolü ile IMP ve VIM tipi MBL'in yayılımlarını incelemek amacıyla kolaylıkla kullanılabilecek bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir.

Atila ve ark. (2012)'nin hastane kaynaklı *P. aeruginosa* izolatlarında PER-1 tipi beta-laktamaz sıklığını ve antibiyotik direnç oranlarını araştırdıkları çalışmalarında çalışılan suşların %56.4'ünde PCR ile PER-1 pozitifliği saptamışlardır. Ayrıca, standart

PCR'ye dayalı yöntemlerin beta-laktamaz genlerinin tanımlanmasında güvenilir olduğunu, izoelektrik odaklama diğer yöntemlerin sadece kazanılmış beta-laktamaz varlığını gösterebildiğini belirtmişlerdir.

Bu çalışmada, Sinop ve çevre illerdeki bazı kliniklerden izole edilen *P. aeruginosa* suşlarının izolasyonu, fenotipik karakterizasyonu, antibiyotik duyarlılıkları, toplam hücre ve hücre dışı profilleri, plazmid DNA içeriklerine göre karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

2.3. *Pseudomonas aeruginosa* Enfeksiyonları

Pseudomonas aeruginosa yüzeysel deri enfeksiyonlarından sepsise kadar oldukça geniş çeşitlilikte görülmektedir. Bazı *P. aeruginosa* enfeksiyonları baskın olarak toplumda görülse de çoğunluğu özellikle immün sistemi baskılanmış ve hastane ortamında özellikle enfeksiyona açık hastaların bulunduğu yoğun bakım ünitelerinde ortaya çıkmaktadır. Yüksek morbidite ve mortalite ile ilişkili olmasının yanı sıra, antimikrobiyal direncin gün geçtikçe artmasıyla tedavi seçenekleri de gittikçe kısıtlanmaktadır (Kerr ve Snelling, 2009).

Avrupa ülkelerini kapsayan bir çalışmada alt solunum yolu enfeksiyonlarında en sık %44 *P. aeruginosa*, yine üniter sistem enfeksiyonlarında en sık %27 *P. aeruginosa* izole edilmiştir (Raymond ve Aujard, 2000).

Gram-negatif basillere bağlı gelişen bakteriyemide mortalite için risk faktörlerinin tespit edildiği bir çalışmada *P. aeruginosa* en sık görülen ikinci patojen bulunmuştur ve bakteriyemi kaynakları olarak pnömoni, katater ilişkili kan dolaşım yolu enfeksiyonu ve üriner sistem enfeksiyonları da bildirilmiştir (Karakoç ve ark., 2013).

Pnömoni; *P. aeruginosa*'nın neden olduğu pnömoni genellikle hastane kökenli olup yoğun bakımda yatan hastalarda görülür. Nadir olarak toplum kökenli pnömonilere neden olur. Bunlardan sıklıkla kanser, kistik fibroz, kronik akciğer hastalığı gibi altta yatan hastalığı olan kişilerde görülür (Garau ve Gomez, 2003). Kistik fibrozlu hastaların solunum yollarında kolonizasyona yol açan mikroorganizmalar arasında *P. aeruginosa* ilk sırayı alır. Bu hastaların %80'inde çoğu 15-20 yaşına kadar *P. aeruginosa*'ya bağlı akciğer enfeksiyonu geçirir. İzole edilen mukoid *P. aeruginosa* suşlarının çoğunda polisakkarit kapsül mevcuttur (Pier ve Ramphal, 2005). Salgıladıkları alginat ile biyofilm oluşturarak antibiyotiklerden korunmak için ortam oluşturlar ve fagositozdan

korunurlar. İnsanlarda alginat üreten *P. aeruginosa* suşları kistik fibrozisli hastaların hava yollarını kapatarak ölümlere sebep olur (Stapper ve ark., 2004).

Bakteriyemi; *P. aeruginosa*'ya bağlı bakteriyemilerde ölüm oranı %70'e kadar çıkabilmektedir. Gram-negatif bakteriyemiler içerisinde dördüncü sıradadır. Bu mikroorganizma genellikle immün yetmezlikli, nötropenik, geniş yanıklı ve diyabetli hastalarda daha sık bakteriyemiye sebep olur. Ektima gangrenozum denilen deri lezyonları *Pseudomonas* bakteriyemisinde önemlidir. Bu lezyonlar veziküler şekilde başlar ve daha sonra hemoraji, nekroz ve ülserasyon gelişimi gösterir. Sıklıkla perinede, kalçada ve ekstremitelerde görülür (Gransden ve ark., 1995). Yapılan bir çalışmada, nozokimyasal *P. aeruginosa* bakteriyemilerinde mortalite oranı %36 olarak belirlenmiştir (Akalin, 2007).

Merkezi sinir sistemi enfeksiyonları; *P. aeruginosa*'nın neden olduğu menenjit ve beyin apsesi; kafa travması sonucunda, kulak ve sinüsteki enfeksiyonun yayılması ile, üriner sistem ve solunum sistemi gibi uzak enfeksiyon merkezlerinde gelişen bakteriyemi yoluyla gelişir. Kanseri hastalarda ikinci sıklıkta menejit ve apseye neden olur (Vahaboğlu ve Akhan, 2008). *P. aeruginosa* özellikle AIDS'li hastaların ileri evrelerinde enfeksiyon nedenidir. Bu enfeksiyonlar bakteriyemik ve bakteriyemik olmayan fırsatçı *P. aeruginosa* enfeksiyonlarıdır. Her iki enfeksiyonda AIDS'li hastalarının yaşamını tehdit ederek ölümcül olabilir. Uzun süre tedavi edilseler dahi tekrarlama oranları yüksektir ve çoğu enfeksiyon kronikleşir (Pollack, 2002).

Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları; *P. aeruginosa*, apse, yanık yaraları, ektima gangrenozum, püstüller veya makülopapüler lezyonlar, endokardit gibi enfeksiyonların başlıca sebebidir (Giamarellou, 2002). Deri enfeksiyonları arasında neden olduğu önemli enfeksiyon yanık yaralarıdır. Ciddi yanığı olan hastalarda kolonize olurlar, ancak kolonizasyon invaziv enfeksiyonun ön aşamasıdır. Yanık yüzeylerin nemli oluşu, nötrofillerin yaraya girişinin yeterli olmaması, hastaları bu enfeksiyona dirençsiz hale getirir. Ayrıca yanık yüzeyine uygulanan hidroterapide yanık alanların ve diğer bölgelerin kolonizasyonuna yol açar (Maejima ve ark., 1984; Murray ve ark., 2008). Yanık hastalarında kemik iliği baskılanır, nötrofillerin *Pseudomonas*'ları öldürmesi bozulur. *P. aeruginosa*, yara yerinin iyileşmesini engelleyen, fibrinin parçalanmasına neden olan eksojen plasminojen aktivatör salgılar (Maejima ve ark., 1984).

Üriner sistem enfeksiyonları; anatomik bozukluklar dışında toplum kökenli *P. aeruginosa* enfeksiyonları nadir görülür. *P. aeruginosa*'nın neden olduğu üriner sistem

enfeksiyonlarının büyük çoğunluğu hastane kaynaklıdır. Üriner sistem girişimleri, böbrek transplantasyonu gibi cerrahi işlemler, üriner sistem taş hastalıkları, kronik prostatik *P. aeruginosa* enfeksiyonuna zemin hazırlayan önemli risk faktörleridir (Ohl ve Matthew, 2004).

Göz enfeksiyonları; keratit, *P. aeruginosa*'nın çok sık neden olduğu göz enfeksiyonudur. Kontakt lens kullanımı, keratit enfeksiyona neden olmaktadır ve uygun olmayan koşullarda dezenfeksiyon, sağlıklı olmayan lenslerin kullanımında görülmektedir. Daha ağır seyreden endoftalmit ise endojen kaynaklıdır ve gözün kaybına neden olabilir (Kıska ve Gilligan, 2003).

2.4. *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında Antibiyotik Dirençliliği

Pseudomonas aeruginosa, ampisilin, amoksisilin, 1. ve 2. kuşak sefalosporinler, seftriakson, nalidiksik asit ve trimetoprim karşı doğal dirençlidir (Blondell-Hill ve ark., 2007). Kinolonlar, aminoglikozidler (gentamisin, amikasin, tobramisin) karbapenemler (meropenem, imipenem), antipseudomonal penisilinler 3. kuşak sefalosporinler, monobaktamlar *P. aeruginosa* tedavisinde kullanılan antibiyotiklerdir (Pitt ve Simpson, 2006).

Beta laktam antibiyotikler, günümüzde en sık kullanılan antibiyotiklerdir. Bunlar, peptidoglikan sentezinde görev alan transpeptidaz ve karboksipeptidazları inhibe ederler ve böylece hücre duvar sentezini durdururlar. Bakteri hücre duvar sentezinin seçici inhibitörleri olmalarından dolayı üreme fazındaki bakteriye karşı etkilidirler. İlacın PBP (penisilin bağlayıcı protein) olarak adlandırılan hücre reseptörlerine bağlanmasıyla ilk etkileşim gerçekleşir. PBP'ler kromozomların kontrolü altındadır ve mutasyonlar ile PBP'lerin sayıları veya ilaçlara afiniteleri değişebilir. Enzimatik ve enzimatik olmayan mekanizmalar beta-laktam ilaçlara direnç göstermelerine neden olur (Güven ve ark., 2008).

Penisilinler içerisinde, karbenisilin, tikorsilin, azlosilin, mezlosilin, beta-laktam inhibitörlü penisilinler ve piperasilin *Pseudomonas* 'lara karşı en etkili penisilinlerdir (Jawetz ve ark., 2010). Penisilin G, penisilin V gibi doğal penisilinler, ampisilin gibi geniş spektrumlu penisilinler *Pseudomonas* 'lara etkili değildir. Ampisilin ve amoksisiline direnç; indüklenabilir kromozomal AmpC- β -laktamazlar ve bazı artım pompa sistemleri ile oluşur. *P. aeruginosa*'nın β -laktam direncinin %30'undan sorumludur. Gültepe ve ark. (2014)'nın, klinik örneklerden izole ettikleri *P.*

aeruginosa 'lar üzerine yaptıkları çalışmada piperasiline %51, piperasilin-tazobaktama %51 oranında direnç saptanmışlardır. Gözütok ve ark. (2014)'ın dahiliye yoğun bakım ünitesinde yaptıkları çalışmada *P. aeruginosa* 'nın piperasilin-tazobaktama karşı direnci %50 olarak bildirmişlerdir.

Sefalosporinlerde, penisilinler gibi PBP'ye bağlanıp hücre duvar sentezini bozarak etki gösterirler. Sefalosporinler antibakteriyal aktivitelerinin genel özelliklerine göre 4 kuşakta sınıflandırılır. Birinci kuşak (sefolotin, sefazolin) ve 2. kuşak (sefuroksim, sefaklor) sefalosporinler *Pseudomonas* türlerine etki etmezler. Seftazidim, sefoperazonları içeren 3. kuşak sefalosporinler *P. aeruginosa* 'ya karşı oldukça etkilidir. Beta-laktamazlara dayanıklı olmaları ve hücre duvarından rahatça geçebilmeleri sayesinde etki gösterirler (Gilardi, 1991; Jawetz ve ark., 2010). Yolbaş ve ark. (2013)'nın yanık enfeksiyonları üzerine yaptıkları çalışmada sefepimeye %53, seftazidime karşı %55 direnç tespit etmişlerdir. Shah ve ark. (2013)'nın Pakistan'da solunum sistemi hastalıklarında etken olan gram negatif mikroorganizmaları inceledikleri çalışmada *P. aeruginosa* 'nın seftazidime %91.5 oranında duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. İnce ve ark. (2014)'nın 2011 ve 2013 yıllarını kapsayan çalışmalarında, seftazidime 2011 yılında %27, 2012 yılında %35 ve 2013 yılında %31 oranında direnç bildirirlerken, sefepime ise yıllara göre sırayla %52, %59 ve %53 oranında direnç bulmuşlardır.

İlk karbapenem antibiyotiği tienamisindir. İlk olarak 1976 yılında *Streptomyces cattleya* tarafından doğal olarak üretilen tiamisin bileşiğinin amino ve hidroksil gruplarında değişiklikler yapılarak elde edilmiştir. Meropenem ve imipenem tienamisinin sentetik türevleridir (Bonfiglio ve ark., 2002). β -laktam antibiyotikleri içerisinde en geniş spektrumlu antibiyotik grubu karbapenemlerdir. İmipenem ve meropenem *P. aeruginosa* 'ya etki ederken, ertapenem etkisizdir (Demir, 2006). Essawi ve ark. (2013)'nın Filistin'de yaptıkları çalışmada *P. aeruginosa* suşlarının imipenem ve meropeneme %10.2 oranında dirençli olduklarını bildirmişlerdir. Aşık ve ark. (2014)'ı yaptıkları çalışmada, genel olarak karbapeneme bakmışlar ve %27.1 oranında direnç bildirmişlerdir.

Bilinen en önemli üyesi aztreonam'dır. Diğer β -laktam antibiyotiklerinden yapısında beta-laktam halkasına ekli başka bir yapı olmamasıyla ayrılır. Sadece aerobik Gram-negatif mikroorganizmalara etki eder. Bu bakterilerin PBP-3 (penisilin bağlayıcı protein-3)'üne bağlanarak hücre duvar sentezini durdurur (Oie ve ark., 2009). Yılmaz ve ark. (2013)'nın iki yıllık dönemde kan kültürlerinde izole ettikleri

mikroorganizmaların antibiyotik duyarlılıklarını değerlendirdikleri çalışmalarında, izole edilen 77 *P. aeruginosa* suşunun %40.2'sinin aztreonama dirençli olduğunu rapor etmişlerdir.

Aminoglikozitler dar spektrumlu antibiyotiklerdir. Aminoglikozitlere en duyarlı bakteri grubu Gram-negatif aerobik basillerdir. Bakteri ribozomlarının 30S alt birimine geri dönüşümsüz bağlanarak genetik kodun yanlış okunmasına neden olurlar (Jawetz ve ark., 2010). *P. aeruginosa*'ya etki eden aminoglikozitler gentamisin, tobramisin, netilmisin ve amikasin'dir. Güçlü ve ark. (2013)'nın karbapenem dirençli izolatlar üzerinde yaptıkları çalışmada, amikasine %12.1 gentamisine %79.3 oranında direnç bildirmişlerdir. Gültekin ve ark. (2014)'nin yaptıkları çalışmada, izole edilen 70 *P. aeruginosa* suşunun amikasine %14.3 , tobramisine %11.4 oranında direnç gösterdiğini saptamışlardır.

Kinolonlar sentez yoluyla elde edilen kinolein türevi antibiyotiklerdir. DNA giraz enzimini inhibe ederek bakterisid etki gösterirler. *P. aeruginosa*'ya karşı en etkili kinolon, üçüncü kuşak kinolonlar (fluorokinolonlar) grubunda yer alan siprofloksasindir, ikinci olarak ise ofloksasindir (Gilbert ve ark., 2001). Bozkurt Güzel ve ark. (2013)'nin kistik fibrozisli hastalarda izole ettikleri *P. aeruginosa* suşlarının %24 oranında siprofloksasine dirençli olduğunu rapor etmişlerdir. Alikhani ve ark. (2014)'nin İran'da yaptıkları çalışmada siprofloksasine %4.7 ve ofloksasine %29.2 oranında direnç saptamışlardır.

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Materyal

Çalışma kapsamında kullanılan *Pseudomonas aeruginosa* suşları, Ocak-2014 ve Haziran-2014 tarihleri arasında Sinop Atatürk Devlet Hastanesi, Kastamonu Dr. Münif İslamoğlu Devlet Hastanesi ve Karabük Devlet Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gelen çeşitli klinik örneklerden izole edildi. Kastamonu ve Karabük illerinden alınan örnekler, soğuk zincir çanta ile bekletilmeden Sinop'a getirildi. Hastaların birden fazla kültür örneklerinden izole edilen *P. aeruginosa* izolatlarından sadece bir tanesi çalışmaya dahil edildi. Araştırmamızda 1 referans ve 54 lokal olmak üzere toplam 55 *P. aeruginosa* izolatı incelendi. Çalışmada referans olarak kullanılan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 suşu İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Mikroorganizma Kültür Koleksiyonları Enstitüsü (KÜKENS)'nden temin edildi. Bu suş bütün testlerde pozitif kontrol olarak kullanıldı. Bu araştırma, Sinop Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Moleküler Biyoloji Laboratuvarında gerçekleştirildi.

3.2. Metod

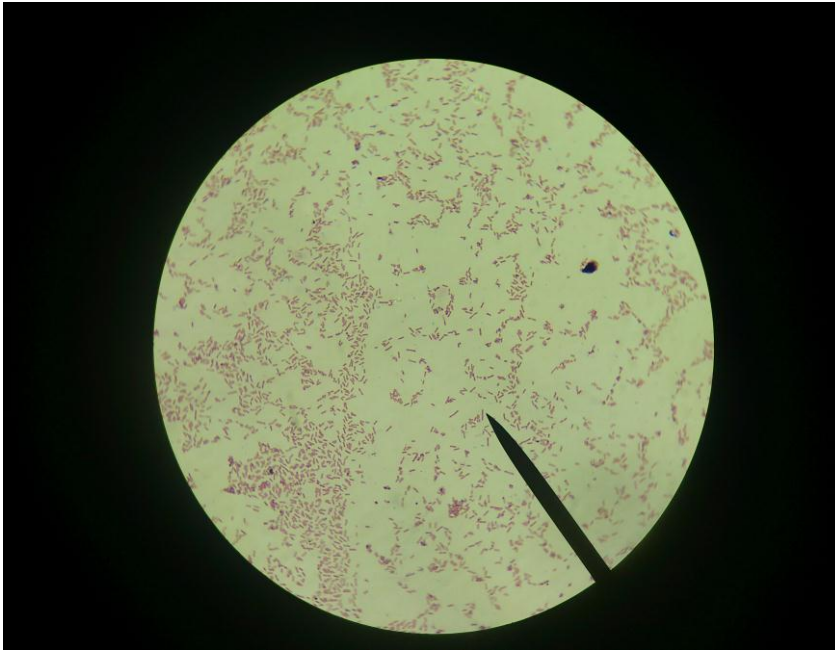
Hastalardan alınan örnekler hastane laboratuvarlarına geldikten sonra bekletilmeden kanlı agara ve Eosin Metilen Blue (EMB) agara ekimler yapıldı ve 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Koloni morfolojileri, pigmentasyon ve kanlı agardaki hemoliz oluşturma özellikleri belirlendi. Sinop Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Moleküler Biyoloji Laboratuvarına getirilen örnekler önceden hazırlanmış Mueller Hinton Agar (Merck) besiyerine pasajlanarak 37°C'de 24 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında Gram boyama ve biyokimyasal testler ile izolatların teşhisi yapıldı.

3.2.1. Morfolojik ve Biyokimyasal Testler

Pseudomonas aeruginosa izolatlarının fenotipik özelliklerini belirleme amacıyla aşağıdaki biyokimyasal testler uygulandı. İzolatların teşhisinde kullanılan besi yerleri EK-1'de, solüsyon ve boyalar EK-2'de verildi.

3.2.1.1. Gram Boyama

Gram boyama, bakterileri hücre duvarlarının özelliklerine göre ayırmak için kullanılan temel yöntemdir. Sıvı besi yerindeki taze kültürden 1 öze dolusu alınan örnek temiz bir lam üzerine aktarıldı ve lam üzerinde ince bir tabaka halinde yayılması sağlandı. Havada kurutulan preparat 3 defa alevden geçirilerek fiziksel tespit yapıldı. Daha sonra kristal viyole ile 1 dk boyandı ve deiyonize su ile yıkanarak kristal viyole uzaklaştırıldı. Preparata lügol solüsyonuyla 1 dk muamele edildikten sonra %95'lik etil alkol ile yıkama işlemi yapıldı. Daha sonra bazik fuksin boyası ile 15-30 sn boyandı ve kurutuldu. Kuruyan preparatlar immersiye yağı damlatılarak mikroskopta incelendi.



Şekil 3.1. *Pseudomonas aeruginosa*'nın mikroskop görüntüsü (100X)

3.2.1.2. Jelatin Hidrolizasyon Testi

Bazı mikroorganizmalar jelatini hidrolize eden jelatinaz enzimine sahiptirler. Jelatin; kollagen hidrolizasyonundan elde edilen protein karakterli bir maddedir. Yüksek sıcaklıklarda katı özelliğini kaybederek sıvılaşır. Bu test ile mikroorganizmaların jelatinaz enzimi sentez yeteneğine bakılır.

Jelatin hidrolizasyonunu saptamak için içinde %10 oranında jelatin bulunan broth besi yeri kullanıldı. Taze kültürlerle değdirilmiş olan iğne öze dik olarak jelatinli

besi yerine ekim yapıldı. Tüpler 37°C’de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında tüpler buzdolabına alındı, 1 gün sonra değerlendirme yapıldı. Jelatinli besi yerin sıvı halde olması pozitif, katı halde olması ise negatif olarak değerlendirildi.

3.2.1.3. Tuz Tolerans Testi

Organizmaların; sodyum klorürün (NaCl) değişik konsantrasyonlarında üreyebilme yetenekleri pek çok bakterinin tanımlanmasında kullanılan bir özelliktir. %6 ve %8.5 oranında NaCl eklenen Nutrient Broth besi yerlerine taze kültürlerden alınan örneklerin ile ekimi yapıldı. 37°C’de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. Bulanıklık gösteren tüpler, pozitif olarak değerlendirildi.

3.2.1.4. Katalaz Testi

Katalaz pek çok aerobik ve fakültatif mikroorganizma tarafından üretilen hidrojen peroksiti (H_2O_2) su (H_2O) ve oksijene (O_2) parçalayan bir enzimdir. Bu enzimin varlığını belirlemek amacıyla yapılan testtir. Katı besi yerinde 37°C’de 24 saat inkübe edilmiş kültür üzerine %3’lük hidrojen peroksit damlatıldı. İşlemin hemen sonrasında, kabarcık oluşumu pozitif olarak, kabarcık oluşmaması negatif olarak değerlendirildi.

3.2.1.5. 42°C ve 46°C Sıcaklıkta Üreme

Pseudomonas aeruginosa optimal olarak 30-37°C’de kolayca üreyebilme yeteneğine sahiptir. Buna karşın, 42°C’de üreme yeteneği ile diğer psikrofil *Pseudomonas*lardan olan *P. putida* ve *P. fluorescens*’den kolayca ayrılırlar. Müller Hinton Agar (MHA) besi yerine ekilen örnekler 42°C ve 46°C’de 24 saat inkübasyona bırakıldı ve üreme olup olmadığı kontrol edildi.

3.2.1.6. Nitrat Redüksiyonu

Bakterilerin nitratı (NO_3^-) nitrite (NO_2^-) indirgeyebilmeleri önemli bir özelliktir. Nitrat redüksiyonu, redüktaz enzimlerinin katalitik etkisiyle gerçekleşir. Bu test mikroorganizmaların identifikasyonuna yardımcı olur.

İçerisinde Durham tüpü bulunan Nitrat besi yerine inoküle edilen örnekler bir gece 37°C’de inkübe edildi. Durham tüpleri içerisinde gaz oluşumu dikkate alındı, gaz varlığı nitrojen gazı oluşumunu gösterdi. Daha sonra tüpler içerisine Griess-Illosvay (A+B) ayraçlarından 5’er damla eklendi ve tüpler hafifçe çalkalandı. Pembe kırmızı renk oluşumu pozitif olarak değerlendirildi.

3.2.1.7. Oksidaz Testi

Bu test, mikroorganizmalar tarafından sentezlenen oksidaz enziminin (sitokrom c) varlığını tespit etmek için kullanılır. Sitokrom c, demir içeren bir hemoproteindir. Sitokrom sistemi sadece aerob organizmalarda mevcuttur. Oksidaz testi özellikle Gram-negatif bakterilerin ilk tanımlama basamağında yararlıdır.

Katı besi yerine ekimi yapılan mikroorganizmalar 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Üreyen koloniler üzerine %1’lik Kovac’s oksidaz ayırıcı damlatıldı. Bir iki dakika içerisinde koloninin mavi renk alması pozitif sonuç olarak, renk değişiminin olmaması negatif olarak değerlendirildi.

3.2.1.8. Hareket Testi

Bakterilerin besi yerindeki hareketliliğini incelemek amacıyla yarı katı olarak hazırlanan SIM besi yeri kullanıldı. Taze sıvı kültüründen alınan örnek, iğne öze ile besi yere batırılarak tek bir hat üzerinde ekim yapıldı ve 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında, inokülasyon hattının yanlarına doğru yayılan bulanıklık oluşması bakterinin hareketli, sadece inokülasyon hattında üreme olması hareketsiz bir bakteri olduğunu gösterdi.

3.2.1.9. DNaz Testi

DNaz agar üzerine bakteri kültürlerinden ekim yapıldı ve 37°C’de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında koloniler üzerine 1 N HCl damlatıldı ve asidin penetre olması sağlandı. Koloniler çevresinde şeffaf zon oluşması pozitif olarak değerlendirildi.

3.2.1.10. İndol Testi

İndol testi, triptofan enziminin varlığını tespit etmek için kullanılır. Bu enzime sahip bakteriler triptofan içeren besi yerlerinde ürerken triptofanı hidrolize eder ve indol açığa çıkar. Açığa çıkan indol, bazı aldehitlerle birleştiğinde kırmızı renkli bir bileşik meydana getirir. 24 saat boyunca 37°C’de indol besi yerinde inkübasyona tabi tutulan örnekler üzerine 0.5 ml Kovak’s reaktifi eklendi. Besi yerinin üst kısmında kırmızı renk oluşumu indol pozitif, sarı renk oluşumu indol negatif olarak değerlendirildi.

3.2.1.11. Metil Red Testi

Metil red testi, bir bakterinin glikoz fermantasyonu sonucu asit son ürünler meydana getirip getirmediğini saptamak için kullanılır. Fermantasyon sonucunda organik asitler oluşarak ortamın pH’ı 4.4’ün altına düşer. Testin indikatörü metil kırmızısıdır. pH<5.0 kırmızı, pH>5.8 sarı renk oluşur. Tüplerde hazırlanmış MR/VP besi yeri içerisine taze kültürlerden ekim yapıldı ve 37°C’de 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında tüpler içerisine metil kırmızısı solüsyonundan 4-5 damla damlatıldı. Kırmızı renk oluşumu pozitif, sarı renk oluşumu negatif olarak değerlendirildi.

3.2.1.12. Voges-Proskauer Testi

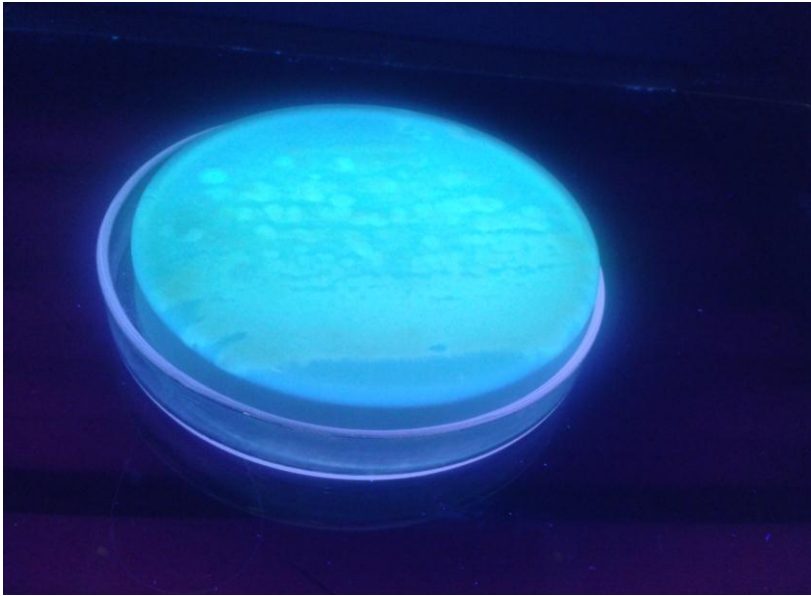
Bazı bakteriler glikoz fermantasyonu sonucunda nötral son ürünler meydana getirirler bu nötral son ürünler ortam pH’ını yükseltirler. Nötral son ürün olan asetoin (asetil metil karbinol), güçlü bir alkali olan potasyum hidroksit (KOH) ile oksitlenerek diasetil meydana getirir. Bu ürün alfa naftol ile reaksiyona girerek kırmızı bir kompleks oluşturur. Her bir tüp içerisinde 5 ml olacak şekilde hazırlanmış MR/VP besi yerine ekim yapıldı ve 37°C’de 2-7 gün inkübe edildi. Kültür üzerine 6 damla alfa naftol daha sonra 2 damla %40 KOH damlatıldı ve oksijen temasını artırmak amacıyla çalkalandı. 30 dakika içerisinde sonuçlar kaydedildi. Kırmızı renk oluşumu pozitif, renk oluşmaması negatif olarak değerlendirildi.

3.2.1.13. Sitrat Testi

Sitrat testi, bakterilerin sitratı kullanma yeteneklerinin değerlendirilmesi amacıyla yapılır. Sitratı tek karbon kaynağı olarak kullanan organizmalar inorganik amonyum tuzlarını da tek nitrojen kaynağı olarak kullanabildiklerinden, metabolizma alkali ürünlerin (amonyak) artışı ile sonuçlanır ($\text{pH} > 7.6$). Ortamda bulunan indikatör madde bromtimol mavisi olup, pH'ın yükselmesine paralel olarak besiyerinin rengi yeşilden koyu-maviye döner. Tüplerde yatık agar olarak hazırlanmış Simmon's Sitrat Agar besiyeri yerine taze kültürlerden öze kullanılarak yüzeye aşılama yapıldı. 37°C'de 48 saat sonunda besiyerinin rengi incelendi. Besiyeri renginin koyu maviye dönüşmesi pozitif, orijinal yeşil renkte kalması negatif sonuç olarak değerlendirildi.

3.2.1.14. King B Agar Testi

King B agar, *P. aeruginosa* analizinde doğrulama için kullanılır. Besiyeri içerisindeki dipotasyum fosfat fosfor konsantrasyonunu artırır ve piyosiyanın üretimini inhibe ederken, floresein üretimini uyarır. Magnezyum sülfat ise floresein üretimi için gerekli katyonlara katkıda bulunur. Diğer karakteristik pigment üreten *Pseudomonas* türlerini baskımlarken *P. aeruginosa*'nın saptanmasında ve ayrımında kullanılır.



Şekil 3.2. King B agarda UV ışık altında *P. aeruginosa* ATCC 27853

3.2.1.15. Karbonhidrat Fermantasyon Testi

Bu test, mikroorganizmaların çeşitli karbonhidratları ayırıştırma yeteneklerini belirlemek amacıyla yapılır. Mikroorganizmalar sentezledikleri hidrolaz enzimleri sayesinde karbonhidratları parçalayabilirler. Bu yetenek türler arasında oldukça değişiklik gösterebildiği gibi, aynı tür ait bireyler arasında da farklı fermantasyon özelliği gösteren varyant suşlar da meydana çıkmaktadır. Besi yeri içerisine sadece incelenecek olan karbonhidrat eklenip inkübasyona tabi tutulduğunda, eğer mikroorganizma o şekeri fermente edip asit oluşturmuşsa ortamın pH derecesi 5.5'in altına düşecektir. Burada önemli olan nokta, tek bir şeker kullanarak mikroorganizmayı o şekeri kullanmaya zorlamaktır.

Karbonhidrat fermantasyon testinde; fruktoz, galaktoz, glukoz, mannitol, ksiloz, laktoz, maltoz, sükroz, trealoz, arabinoz kullanıldı. Son konsantrasyonları %5 olacak şekilde karbonhidrat solüsyonları ilave edildi. İndikatör olarak Fenol red (%0.01) kullanıldı. Hazırlanan besiyeri yerine taze kültürlerden 0.1 ml ilave edilip 37°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. Besiyeri renginin kırmızıdan sarıya dönmesi pozitif, renk değişiminin gözlemlenmemesi negatif olarak değerlendirildi.

3.2.1.16. Antibiyogram

Antimikrobiyal denemelerde kullanılacak bakteri kültürlerini hazırlamak için taze kültürlerden 5 ml MHB besiyeri yerine ekim yapılarak 37°C'de 24 saat geliştirildi. Daha sonra gelişen kültürlerden 0.5 McFarland skalası esas alınarak mililitresinde $1-2 \times 10^8$ (CFU/ml) hücre olacak şekilde bakteri stok solüsyonları hazırlandı. İncelenecek mikroorganizmaların McFarland 0.5 skalasına denk gelen süspansiyonlarından MHB besiyeri yerine 100 µl aşılama yapıldı ve steril cam baget ile besiyeri yüzeyine yayıldıktan sonra 15-20 dk kurumaya bırakıldı. Daha sonra ampisilin/sulbaktam (SAM 10/10 µg), amikacin (AK 30 µg), seftazidim (CAZ 30 µg), imipenem (IPM 10 µg), gentamisin (CN 10 µg), meropenem (MEM 10 µg), tazobaktam/piperasilin (TZP 100/10 µg), siprofloksasin (CIP 5 µg), sulfametoksazol/trimetoprim (SXT 23.75/1.25 µg), sefotaksim (CTX 30 µg), piperasilin (PRL 100 µg), sefepime (FEP 30 µg), kolistin (CT 10 µg) ve aztreonam (ATM 30 µg) diskleri besiyeri yerlerine uygun aralıklar bırakılarak yerleştirildi. Bu şekilde hazırlanmış besiyeri yerleri 24 saat 37°C'de geliştirildikten sonra oluşan inhibisyon zonları cetvel yardımı ile ölçüldü. Her bir antibiyotik duyarlılık

zonları farklı olduğu için Klinik ve Laboratuvar Standartlar Enstitüsü (CLSI) kriterleri doğrultusunda etkili ve etkisiz olan antibiyotikler belirlendi (CLSI, 2014).

3.2.1.17. Elektroforez İçin Protein Örneklerinin Hazırlanışı

Toplam hücre proteinlerinin ekstraksiyonu için Laemmli (1970)'nin modifiye yöntemi kullanıldı. İzole edilen *P. aeruginosa* suşları, 37°C' de 24 saat süreyle 5'er ml MHB besi yeri içeren tüplere aşılama yapılarak aktive edildi. Gelişen örneklerden 1.5 ml temiz bir ependorf tüpüne alınarak 12.000 rpm'de 5 dk santrifüj (Hanil Science Industrial, HM-150 IV, Japan) edildi. Süpernatant atılarak pellet, 100 µl serum fizyolojik ile 3 kez yıkandı. Daha sonra pellet üzerine 20 µl sample buffer ilave edildi ve 80°C'de 5 dk kaynatılarak çözünür proteinler elde edildi. Örnekler -20°C'de saklandı.

Hücre dışı proteinlerin ekstraksiyonu için Wessel ve Flugge (1984)'nin yöntemi kullanıldı. Gelişen kültürlerden uygun miktarlarda alınarak 12.000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant kısmından 500 µl alınıp 0.45 µm çaplı membran filtreden (Sartorius) geçirilerek steril ependorf tüplerine alındı. Süpernatant üzerine 400 µl metanol, 200 µl kloroform ve 300 µl distile su ilave edilip 5 dk 10.700 rpm'de santrifüj edildi. Örnekler 1-2 gün buzdolabında bekletildi. Daha sonra üst faz atılıp 300 µl metanol eklenerek tekrar santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak çökelmiş proteinler kurutuldu. Örneklerin üzerine 25 µl örnek tamponu ilave edildi ve 80°C'de 5 dk kaynatılarak hücre dışı proteinler ekstrakte edildi.

3.2.1.18. SDS-PAGE'in Yapılışı

Ekstrakte edilen toplam hücre proteinleri 1 mm kalınlığında (%4'lük topayıcı ve %10'luk ayırıcı), hücre dışı proteinler ise (%4'lük topayıcı ve %12'lik ayırıcı) jelde yürütüldü. Yürütme işlemi dikey elektroforez tankında (Hoefer SE400-USA) topayıcı jel boyunca 20 mA ve ayırıcı jel boyunca 30 mA'lık sabit akım uygulanarak gerçekleştirildi. Yürütme işlemi bitimini takiben jeller Comassie Brilliant Blue (R-250) ile boyandı. Daha sonra jellerin boyası giderilerek bantlat görünür hale getirildi. Jellerin fotoğrafları (HP Scan-jet G2410) çekilerek bilgisayar ortamına aktarıldı. Proteinlerin moleküler ağırlıkları marker (PageRuler™ Unstained Protein Ladder, Fermentas, SM0661) kullanılarak hesaplandı. Jeller %7'lik Aestik asit solüsyonunda bekletildi. Poliakrlamid jel elektrofezde kullanılan çözeltiler EK-3'de verilmiştir

3.2.1.19. Plazmid DNA İzolasyonu

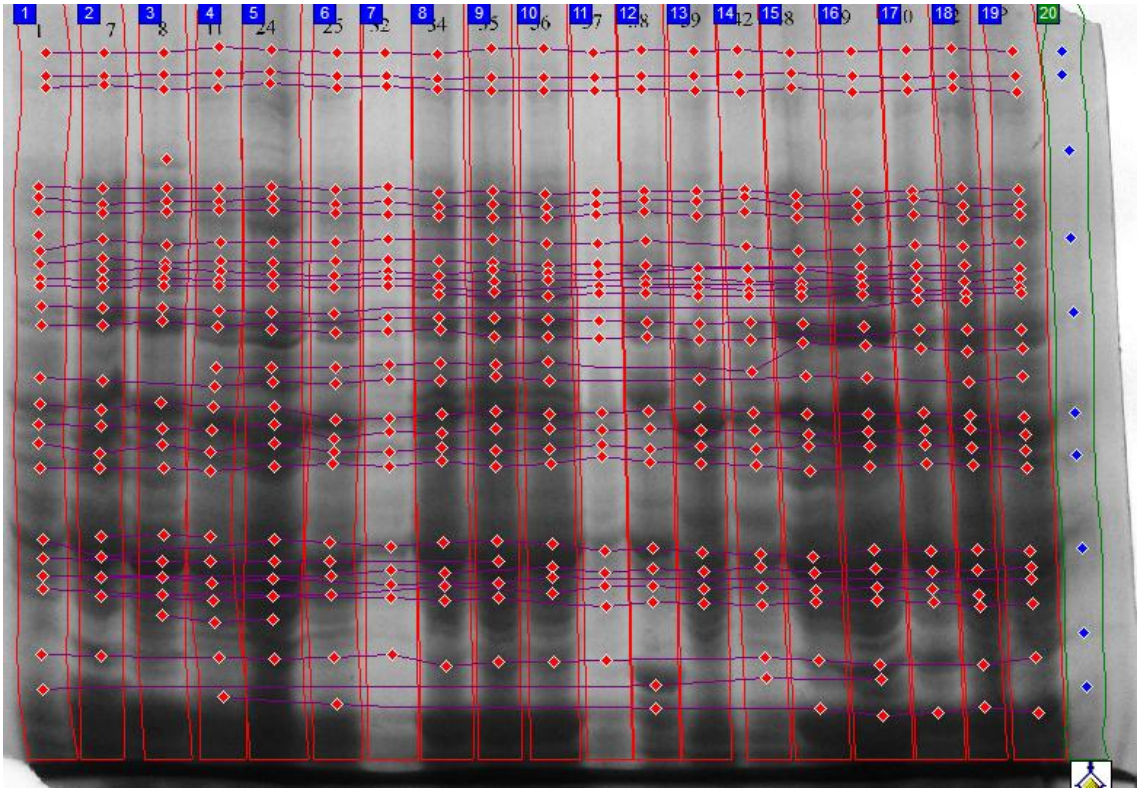
Plazmid DNA izolasyonu için, Sambrook ve ark. (1989)'nın yöntemi kullanıldı. *P. aeruginosa* örneklerinden 5 ml MHB besi yerine ekim yapıldı ve 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Kültürden 1.5 ml eppendorf tüpüne alındı ve mikrosantrifüjde (Hanil Science Industrial, HM 150IV) 3000 rpm'de 10 dk santrifüjlendi. Süpernatant atılarak pellet üzerine 567 µl TE (Tris-EDTA) eklenerek mikropipet yardımıyla çözüldü. Çözelti üzerine 30 µl SDS (%10) ve 3 µl proteinaz K çözeltileri eklenerek karıştırıldı ve 37°C'de 1 saat bekletildi. Daha sonra 100 µl 5M NaCl eklenip karıştırıldı ve sonrasında 80 µl CTAB/NaCl çözeltisi eklenip karıştırılarak 65°C'de 10 dk bekletildi. Üzerine eşit hacimde kloroform/izoamil alkol eklenip karıştırılarak 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant temiz bir mikrosantrifüj tüpüne alınarak eşit hacimde fenol/kloroform/izoamil alkol (25:24:1) eklenip karıştırıldı ve 10.000 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Süpernatant dikkatli bir şekilde steril eppendorf tüpüne alınarak üzerine 600 µl izopropanol eklendi. DNA iplikçikler halinde çökünceye kadar alt üst edilerek karıştırıldı. DNA'yı çöktürmek için 15.000 rpm'de 10 dk santrifüjlendi. Pellet üzerine 50 µl %70'lik etilalkol eklenerek DNA yıkandı ve tüp ters çevrilerek alkolün uzaklaştırılması sağlandı. Tüp ağzı açık şekilde oda sıcaklığında alkol kokusu gidene kadar bekletildi. Çökelti üzerine 50 µl TE eklendi ve DNA'nın çözülmesi sağlandı. İzole edilen DNA örnekleri -20°'de saklandı. Plazmid izolasyonunda kullanılan çözeltiler EK-4'de verilmiştir.

3.2.1.20. Agaroz Jel Elektroforez

İzole edilen plazmid DNA %0.7'lik agaroz jelde 1X TBE bufferde yürütüldü. 1X TBE solüsyonu, Tris Borat EDTA 5X solüsyonundan hazırlandı. Agar mikrodalga fırında eritildikten sonra 45°C'ye kadar soğutuldu ve içerisine 5 µl Etidyum bromid (Sigma) eklenip elektroforez plağına döküldü. Agar donduktan sonra, taraklar çıkarıldı ve kuyucuklara yükleme tamponu ile muamele edilen örnekler yüklendi. Plazmid DNA örnekleri yüklendikten sonra jel elektroforez cihazına (Thermo Scientific-MS1509112955, UK) bağlandı. Örnekler yürütme tamponu ile 80 voltluk sabit akımda yaklaşık 3 saat yürütüldü. Yürütme işlemi sonucunda jellerin fotoğrafları UV transillüminatör (Cleaver-MicroDOC, UK) ile çekildi ve bilgisayar ortamına aktarıldı.

3.2.1.21. İstatistiksel Analiz

Protein profillerinin istatistiksel analizinde; jeller yüksek çözünürlükte bir tarayıcı (HP Scanjet, G2410) kullanılarak taranıp bilgisayar ortamına aktarıldı. Ayrıca plazmid DNA jellerinin fotoğrafları UV transillüminatör (Cleaver-MicroDOC, UK) altında çekildi ve bilgisayar ortamına aktarıldı. Her bir bandın moleküler ağırlığı Total Lab 1D Manual R11.1, UK programı kullanılarak hesaplandı. Jel görüntüleri programa yüklendikten sonra bantlar piksel pozisyonlarına göre belirlendi. Bunu takiben, bantlar işaretlendi ve moleküler ağırlıkları marker'a göre belirlendi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Phoretix 1D programında, manuel band ve moleküler ağırlık belirleme profilleri

Kümeleme analizi için veriler Phoretix 1D-Pro (TotalLab, UK) programı kullanılarak Jaccard'ın benzerlik katsayısı temeline dayanan unweighted pair-group metod using arithmetic averages (UPGMA) metoduyla hesaplanarak dendogramlar oluşturuldu.

4. BULGULAR

Çalışmamızda, Ocak 2014 - Haziran 2014 tarihleri arasında Sinop ve çevre illerdeki kliniklerden izole edilen 54 adet *P. aeruginosa* izolatının Gram boyama, oksidaz, katalaz, nitrat redüksiyonu, farklı sıcaklıklarda üreyebilme yetenekleri, King B agarda ısıma özellikleri, karbonhidrat fermentasyon testleri gibi biyokimyasal testler, plazmid DNA analizi ve SDS-PAGE yöntemi ile hücre içi ve hücre dışı protein profillerinin belirlenmesi ile moleküler karakterizasyonu ve antibiyotik dirençliliğinin belirlenmesi gerçekleştirildi.

4.1. Epidemiyolojik Bulgular

Suşların izole edildiği klinik örneklerle göre dağılımı, hastaların yaşı ve cinsiyetine ait bilgiler Çizelge 4.1’de verildi.

Çizelge 4.1. Farklı kliniklerden toplanan *P. aeruginosa* izolatlarına ait klinik bilgiler

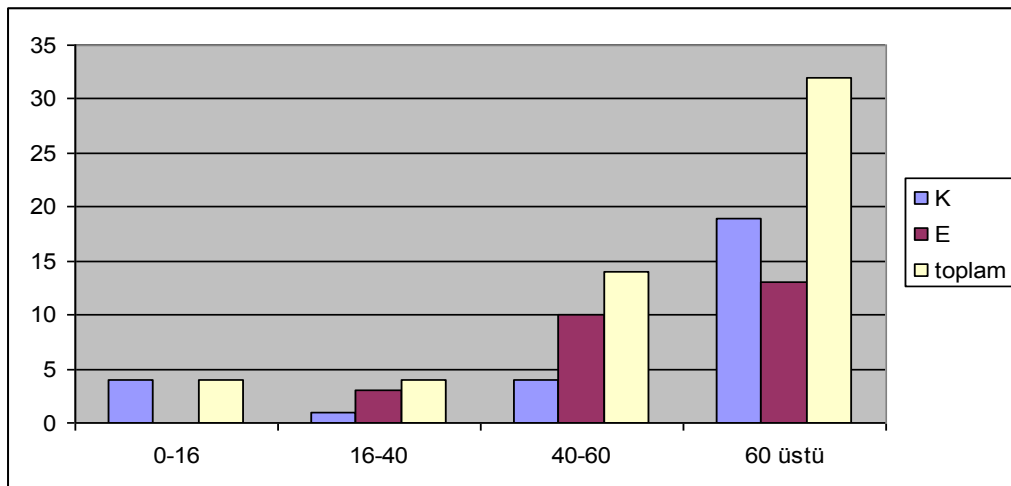
No	İl	Yaş	Cinsiyet	Örnek Yeri
1	Kr	64	E	İdrar
2	Kr	55	E	Kan
3	Kr	46	K	İdrar
4	Kr	87	K	Apse
5	Kr	56	E	Balgam
6	Kr	58	E	ETA
7	Kr	71	E	Yara
8	Kr	74	E	İdrar
9	Kr	73	E	İdrar
10	Kr	52	E	Yara
11	Kr	71	K	Sol.sekresyonu
12	Kr	71	K	Balgam
13	Ks	85	K	Yara
14	Kr	27	E	Pleural efüzyon
15	Kr	85	K	Sol.sekresyonu
16	Kr	24	E	Steril mayi
17	Kr	34	K	Yara
18	Kr	59	E	Balgam
19	Kr	60	E	Balgam
20	Kr	81	K	İdrar
21	Kr	71	K	Balgam
22	Kr	80	E	Sol.sekresyonu
23	Kr	84	K	Sol.sekresyonu
24	Kr	81	E	İdrar
25	Ks	68	E	Kan
26	Ks	78	K	Sol.sekresyonu
27	Ks	71	K	Balgam

Çizelge 4.1'in devamı

No	İl	Yaş	Cinsiyet	Örnek Yeri
28	Ks	40	E	İdrar
29	Ks	80	K	Kan
30	Ks	71	K	Yara
31	Ks	67	E	Balgam
32	Ks	43	E	Kan
33	S	67	K	İdrar
34	S	67	K	Aspirat
35	S	80	K	Aspirat
36	S	84	K	Aspirat
37	S	7 ay	K	İdrar
38	S	6	K	İdrar
39	S	69	K	Yara
40	S	2	K	İdrar
41	S	14 ay	K	İdrar
42	S	88	E	İdrar
43	S	54	E	İdrar
44	S	76	E	Yara
45	S	48	E	Kan
46	S	29	E	Kan
47	S	53	E	Kan
48	S	91	E	Balgam
49	S	49	K	İdrar
50	S	59	K	İdrar
51	S	71	E	İdrar
52	S	41	K	Balgam
53	S	74	K	İdrar
54	S	61	K	Yara

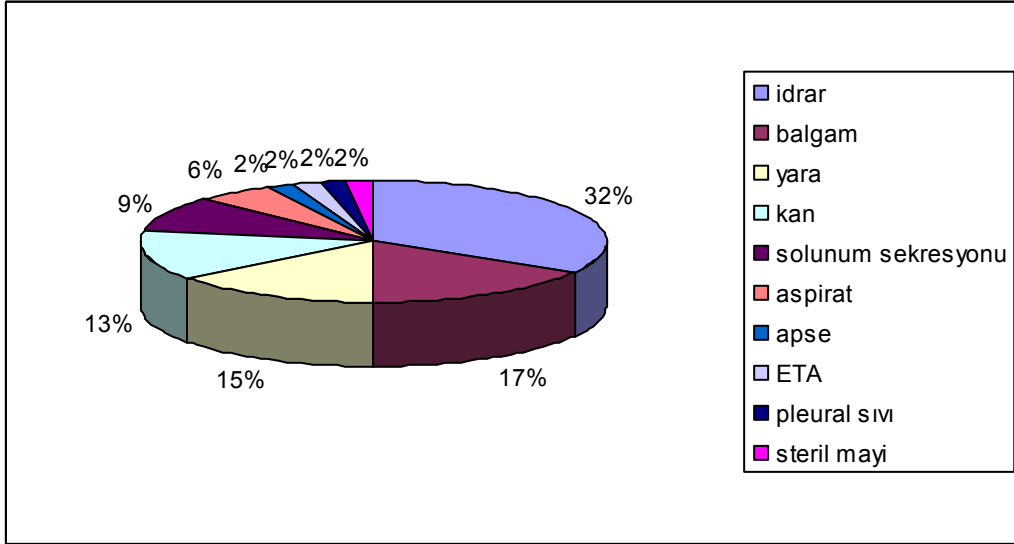
Kr; Karabük, Ks; Kastamonu, S; Sinop, E; Erkek, K; Kadın

Çalışma kapsamına dahil edilen 54 hastanın 28'i kadın, 26'sı erkektir. Ayrıca 54 hastanın %7.4'ü 0-16 yaş, %7.4'ü 16-40 yaş, %25.9'u 40-60 yaş, %59.3'ü 60 ve üzeri yaş aralığındadır.



Şekil 4.1. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının izole edildiği hastaların yaş aralığı

Toplam 54 tane klinik numunenin; 18 tanesi (%32) idrar, 9 tanesi (%17) balgam, 8 tanesi (%15) yara, 7 tanesi (%13) kan, 5 tanesi (%9) solunum sekresyonu, 3 tanesi (%6) aspirat, 1 tanesi (%2) apse, 1 tanesi (%2) endotrekeal aspirat (ETA), 1 tanesi (%2) pleural sıvı ve 1 tanesi (%2) steril seminal sıvı örneklerinden izole edilmiştir.



Şekil 4.2. İzole edilen suşların kökenlerine göre dağılımı

4.2. İzolatların Biyokimyasal Test Sonuçlarına İlişkin Bulgular

Çalışmada, 54 lokal ve 1 referans olmak üzere toplam, 55 adet *P. aeruginosa* izolatının fenotipik özelliklerini belirlemek için gerekli biyokimyasal testler yapıldı. İzolatlara ait test sonuçları Çizelge 4.2’de verildi. İzolatların hepsinin Gram-negatif, aerobik, sporsuz ve hareketli oldukları tespit edildi.

Ayrıca, tüm izolatlar; katalaz, oksidaz, sitrat, 42°C’de üreyebilme ve nitrat redüksiyon testlerinde pozitif sonuç verilmesine karşın; DNaz, İndol, Metil Red, Voges-Proskaur, %8.5 NaCl’de üreyebilme ve 46°C’de üreyebilme özelliklerinin negatif olduğu belirlendi. Bununla birlikte 54 yerel izolatın 22 tanesi jelatini hidrolize ederken, referans suş dahil olmak üzere diğer 23 izolatın jelatini parçalayamadıkları belirlendi.

Çizelge 4.2. *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının biyokimyasal test sonuçları

Suşlar	Gram boyama	Hareket	Katalaz	Oksidaz	Jelatinaz	% 6 NaCl	% 8.5 NaCl	DNaz	Sitrat	İndol	Metil red	Voges - Proskaur	42°C'de üreme	46°C'de üreme	Nitrat redüksiyonu
1	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
2	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
3	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
4	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
5	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
6	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
7	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
8	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
9	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
10	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
11	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
12	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
13	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
14	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
15	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
16	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
17	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
18	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
19	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
20	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
21	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
22	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
23	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
24	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
25	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
26	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
27	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
28	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
29	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
30	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
31	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
32	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
33	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
34	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
35	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
36	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
37	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
38	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
39	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
40	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
41	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
42	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
43	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
44	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
45	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
46	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
47	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
48	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
49	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
50	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
51	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
52	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
53	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
54	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
P	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+

(-); olumsuz, (+); olumlu, P; *P. aeruginosa* ATCC 27853

Çizelge 4.3. *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının karbonhidrat fermentasyon sonuçları

Suşlar	Glukoz	Fruktoz	Mannitol	Galaktoz	Ksiloz	Laktoz	Maltoz	Sükroz	Treloz	Arabinoz
1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
3	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
4	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
5	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
6	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
7	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
8	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
9	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
10	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
11	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
12	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
13	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
14	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
15	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
16	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
17	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
18	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
19	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
20	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
21	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
22	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
23	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
24	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
25	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
26	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
27	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
28	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
29	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
30	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
31	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
32	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
33	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
34	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
35	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
36	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
37	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
38	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
39	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
40	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
41	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
42	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
43	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
44	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
45	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
46	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
47	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
48	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
49	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
50	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
51	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
52	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
53	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
54	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
P	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

(-); olumsuz, (+); olumlu, P; *P. aeruginosa* ATCC 27853

Karbonhidrat fermentasyon sonuçları Çizelge 4.3.'te verildi. Sonuçlara göre; izolatların hepsinin glikoz, mannitol ve fruktozu fermente edebilirken, ksiloz, laktoz, maltoz, sükroz, trealoz ve arabinozu fermente edemedikleri belirlendi. Ayrıca, galaktoz 39 izoalt tarafından fermente edilirken diğer 15 izolat ve referans suşunun bu şekeri fermente edemediği saptandı.

4.3. Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçlarına İlişkin Bulgular

Araştırmamızda toplam 55 adet *P. aeruginosa* suşunun 19 farklı antibiyotiğe karşı duyarlılıkları Klinik ve Laboratuvar Standartlar Enstitüsü (CLSI) kriterleri doğrultusunda Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılarak belirlendi. Şuşlara karşı belirlenen zon çapları yine CLSI tarafından önerilen zon çapları dikkate alınarak değerlendirildi (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. İzolatların test edilen antibiyotiklere karşı direnç oranları (%)

Test edilen antibiyotikler	S	I	R
Amikasin (AK)	85.2	9.3	5.5
Aztreonam (ATM)	-	87	13
Tazobaktam/piperasilin (TZP)	81.5	-	18.5
Piperasilin (PRL)	79.6	-	20.4
Seftazidim (CAZ)	78	-	22
Meropenem (MEM)	57.40	20.4	22.2
İmipenem (IPM)	63	3.7	33.3
Sefepime (FEP)	61	-	39
Gentamisin (CN)	59.3	-	40.7
Oflofloksasin (OFX)	11.1	42.6	46.3
Siprofloksasin (CIP)	39	5.5	55.5
Ampisilin/sulbaktam (SAM)	38.9	-	61.1
Kolistin (CT)	29.6	-	70.4
Sefotaksim (CTX)	1.9	-	98.1
Sulfametoksazol/trimetoprim (SXT)	-	-	100
Penisilin G (P)	-	-	100
Klindamisin (DA)	-	-	100
Tetrasiklin (TE)	-	-	100
Kloramfenikol (C)	-	-	100

R; Dirençli, I; Orta derecede dirençli, S; Duyarlı

Test edilen bütün suşların, sulfametoksazol/trimetoprim, tetrasiklin, kloramfenikol, penisilin G ve klindamisin antibiyotiklerine karşı dirençli oldukları tespit edildi. Ampisilin/sulbaktam, kolistin ve sefotaksime ise yüksek oranda dirençli oldukları tespit edilirken; aztreonam, meropenem siprofloksasin ve oflofloksasin antibiyotiklerine karşı orta derecede dirençlilik bulundu. En yüksek duyarlılık amikasin (%85.2) karşı bulundu. Amikasinden sonra en yüksek duyarlılığın; tazobaktam/piperasilin (%81.5), piperasilin (79.6), seftazidime (%78), imipenem (%63), sefepime (%61) ve gentamisine (%59.3) karşı olduğu saptandı (Çizelge 4.5.).

Çizelge 4.5. İzolatların test edilen antibiyotiklere karşı duyarlılıkları

Suşlar	AK	ATM	TZP	PRL	CAZ	MEM	IPM	FEP	CM	OFX	CIP	SAM	CT	CTX	SXT	P	DA	TE	C
1	S	I	S	S	R	I	S	S	S	I	S	S	R	R	R	R	R	R	R
2	S	R	R	S	R	R	R	R	S	I	S	R	R	R	R	R	R	R	R
3	R	I	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	R	I	R	R	R	R	R
4	I	I	S	S	S	R	R	R	S	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R
5	I	I	S	S	R	S	S	S	S	I	S	R	R	R	R	R	R	R	R
6	S	I	S	S	S	S	S	S	S	I	S	R	R	R	R	R	R	R	R
7	S	I	S	S	S	S	S	S	S	I	R	S	S	R	R	R	R	R	R
8	S	R	R	R	R	S	S	R	S	I	R	S	S	R	R	R	R	R	R
9	S	I	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	R	R	R	R	R	R	R
10	S	I	S	S	S	S	S	S	S	I	R	S	R	R	R	R	R	R	R
11	S	I	S	S	S	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R
12	S	I	S	S	S	S	S	S	S	I	R	S	S	R	R	R	R	R	R
13	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R
14	S	I	S	S	S	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
15	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
16	S	I	S	S	S	I	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
17	S	I	S	S	R	S	S	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R
18	S	I	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R
19	S	I	S	S	S	S	S	S	S	I	S	R	R	R	R	R	R	R	R
20	S	I	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
21	S	I	S	S	S	I	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
22	S	I	S	S	S	S	S	S	S	I	I	S	R	R	R	R	R	R	R
23	S	I	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
24	S	I	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	R	R	R	R	R	R
25	S	I	S	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
26	S	I	S	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
27	S	I	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
28	S	I	S	S	S	S	S	S	S	I	R	S	R	R	R	R	R	R	R
29	S	R	S	S	S	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R
30	S	I	S	S	S	S	S	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R
31	S	I	S	S	S	I	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
32	S	I	S	S	S	I	R	S	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R
33	S	I	S	S	S	S	S	R	R	I	S	R	S	R	R	R	R	R	R
34	I	I	R	R	S	S	S	R	R	I	I	S	R	R	R	R	R	R	R
35	R	R	R	R	R	I	R	R	R	I	R	S	S	R	R	R	R	R	R
36	S	I	S	S	S	S	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	R	R	R
37	S	I	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	R	R	R	R	R	R

R; Dirençli, I; Orta dirençli, S; Duyarlı, P; *P. aeruginosa* ATCC 27853

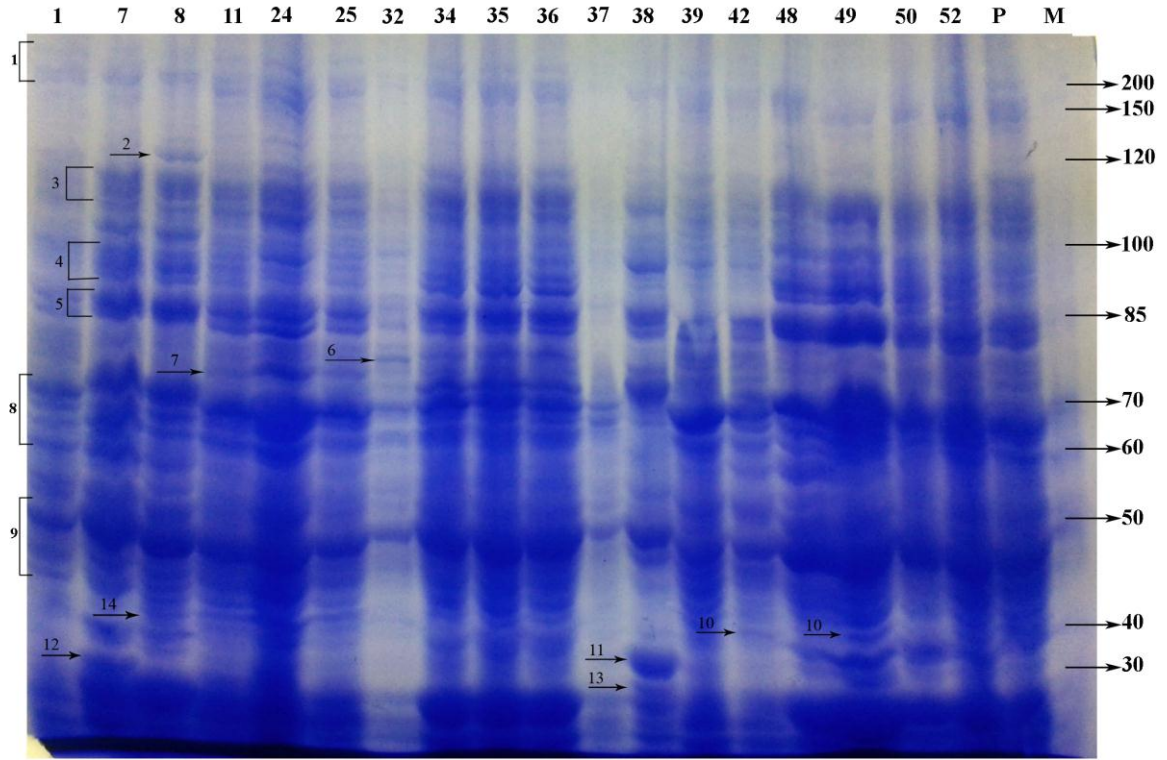
Çizelge 4.5'ün devamı

Suşlar	AK	ATM	TZP	PRL	CAZ	MEM	IPM	FEP	CM	OFX	CIP	SAM	CT	CTX	SXT	P	DA	TE	C
38	S	I	S	S	S	S	S	S	R	I	I	S	S	R	R	R	R	R	R
39	S	I	R	S	S	I	I	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
40	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R
41	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R
42	R	I	S	S	S	S	I	R	R	I	S	R	R	R	R	R	R	R	R
43	I	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
44	S	I	S	S	S	S	S	R	S	I	R	S	R	R	R	R	R	R	R
45	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R
46	S	I	S	S	R	I	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
47	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
48	S	R	R	R	R	I	S	R	S	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R
49	S	I	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R
50	I	I	S	S	S	I	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R
51	S	I	S	R	S	I	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R
52	S	I	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R
53	S	I	S	S	S	S	S	R	S	I	S	R	R	R	R	R	R	R	R
54	S	I	S	S	S	S	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R
P	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R

R; Dirençli, I; Orta dirençli, S; Duyarlı, P; *P. aeruginosa* ATCC 27853

4.4. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforez (PAGE) Bulguları

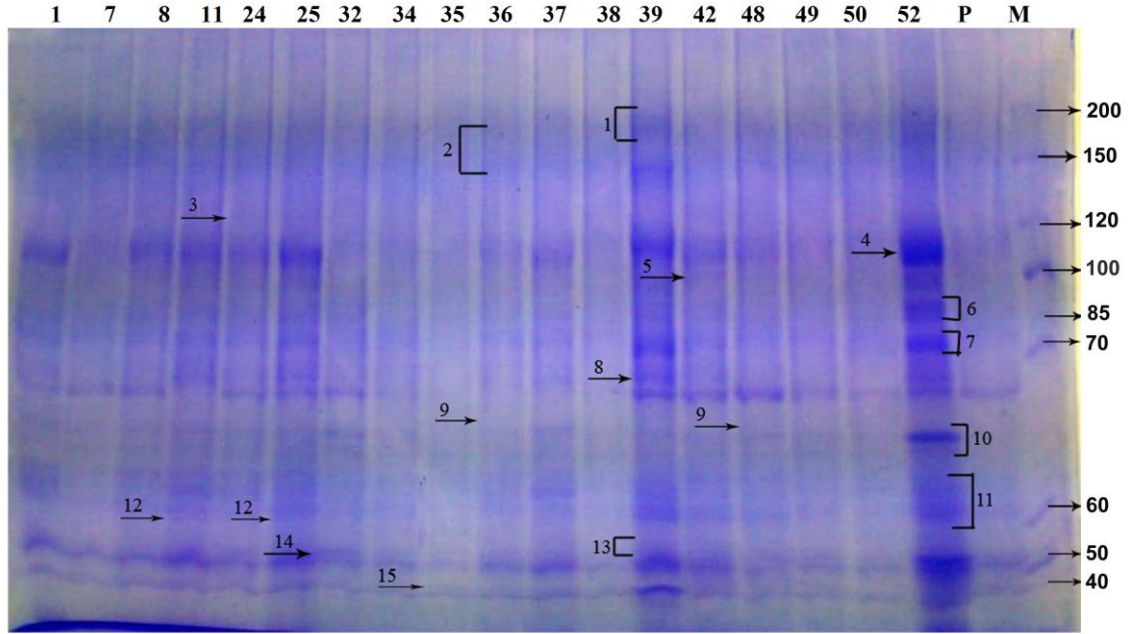
Çalışmamızda biyokimyasal test sonuçları ve antibiyogram bulguları esas alınarak belirlenen 18 adet lokal izolat ve referans suş olmak üzere 19 ırkın toplam hücresel protein profilleri sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) yöntemi kullanılarak belirlendi. İncelenen suşlara ait toplam hücre protein profilleri Şekil 4.3'de verildi.



Şekil 4.3. 19 adet *P. aeruginosa* suşunun SDS-PAGE ile elde edilen toplam hücre protein profilleri P; *P. aeruginosa* ATCC 27853, M; Marker

Test edilen 19 suşun toplam hücre protein profilleri arasında majör (200-70 kDa) ve minör (60-30 kDa) molekül ağırlığındaki protein desenleri yönünden yüksek oranda benzerlik olduğu gözlemlendi. Yüksek molekül ağırlıklı 1 (207.3-130.5 kDa), 3 (115.3-108.4 kDa), 4 (100.8-89.1 kDa), 5 (85.8-83.3 kDa), 8 (71.7-62.6 kDa) ve düşük molekül ağırlıklı 9 (57.6-47.5 kDa) ile gösterilen dominant proteinlerin tüm suşlarda ortak olduğu saptandı. Bununla birlikte, suşlar arasında bazı bant farklılıkları da tespit edildi. 2 (117.4 kDa) ile işaretlenen bant sadece 8 numaralı suşta, 10 (41.8 kDa) ile gösterilen bant 42 ve 49 numaralı suşlarda, 11 (30.4 kDa) ile işaretlenen bant sadece 38 numaralı suşta, 13 (26.8 kDa) ile işaretlenen bant 1, 11, 25, 38 numaralı suşlarda tespit edildi. Ayrıca, 6 (77.9 kDa) ile gösterilen bant 7, 8, 37, 38, 50 numaralı suşlar hariç tüm suşlarda gözlemlendi. Bununla birlikte, 7 (74.9 kDa) ile işaretlenen protein bandı 8, 37, 38, 42, 50 numaralı suşlar hariç tüm suşlarda görüldü. 12 (31.3 kDa) ile işaretlenen düşük molekül ağırlığına sahip protein bandı, 7, 11, 24, 25, 48, 49, 52 numaralı suşlarda gözlenirken, 14 (42.6 kDa) ile işaretlenen bant 1, 7, 32, 37, 38, 48, 50 numaralı suşlar haricinde tüm suşlarda belirlendi.

Test edilen suşlar arasındaki benzerlikler toplam hücre dışı protein profillerine göre de incelendi. SDS-PAGE yöntemi kullanılarak elde edilen hücre dışı protein profili Şekil 4.4’de verilmiştir.



Şekil 4.4. 19 adet *P. aeruginosa* suşunun SDS-PAGE ile elde edilen toplam hücre dışı protein profilleri P; *P. aeruginosa* ATCC 27853, M; Marker

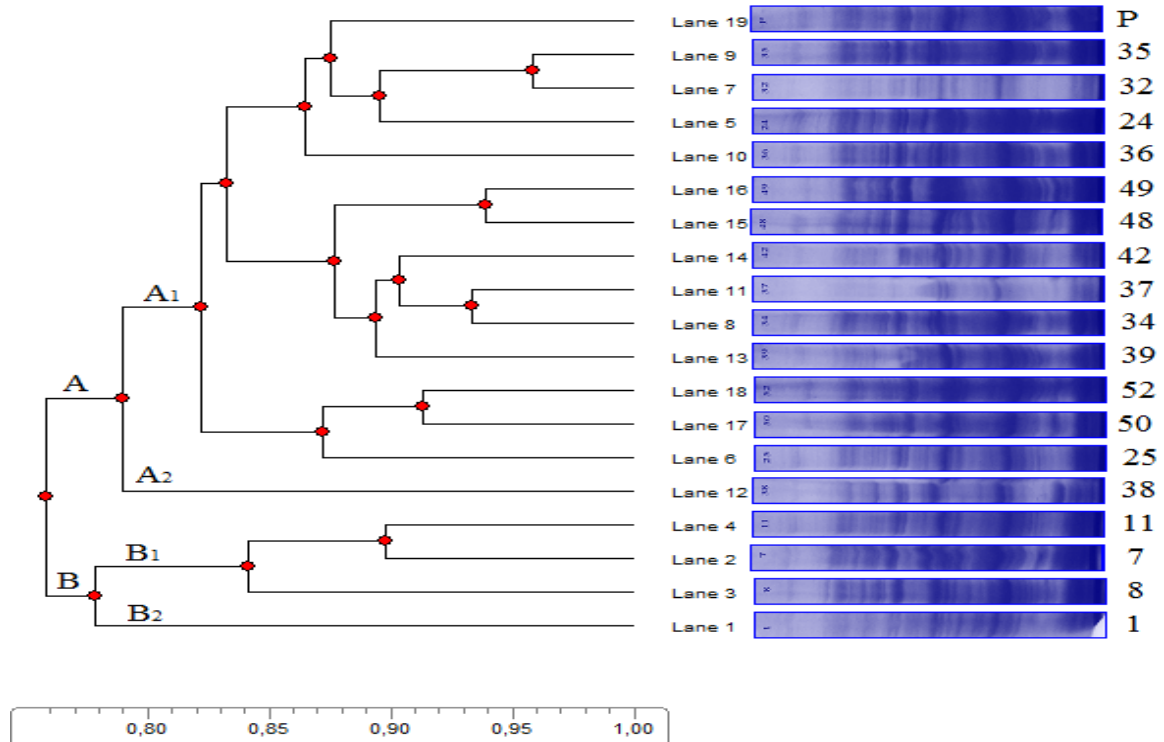
Test edilen suşlar için toplam hücre dışı protein profilleri arasında da yüksek düzeyde benzer band profilleri görüldü. Yüksek molekül ağırlıklı 1 (197.4-173.9 kDa), 2 (159.6-137.5 kDa), 6 (90.2-83.3 kDa), 7 (76.4-71.4 kDa), 10 (65.2-63.4 kDa) ve düşük molekül ağırlıklı 11 (61.9-59.5 kDa), 13 (55.8-54.7 kDa) ile işaretlenen protein bantlarının tüm suşlarda ortak olduğu belirlendi. Toplam hücre protein profillerine kıyasla hücre dışı protein profillerinde suşlar arasında daha fazla farklılıklar olduğu tespit edildi. 3 (121.7 kDa) ile işaretlenmiş protein bandı 24, 25, 32, 36, 38, 42 ve referans suşlarında, 4 (114.1 kDa) ile işaretlenmiş bant 1, 8, 11, 24, 32, 34, 36, 37, 42, 52 ve referans suşlarında görüldü. 5 (100.3 kDa) ile belirlenmiş bandın 1, 11, 25, 37, 42, 52 numaralı suşlarda, 8 (68.1 kDa) ile işaretlenmiş bandın 1, 11, 24, 25, 32, 37, 39, 42, 52 ve referans suşlarında olduğu ve 9 (66.3 kDa) numaralı bandın sadece 36 ve 48 numaralı suşlarda olduğu belirlendi. Ayrıca, düşük molekül ağırlığına sahip 12 (56.3 kDa) ile işaretlenmiş bant sadece 11 ve 25 numaralı suşlarda gözlemlenirken, 14 (51.1 kDa) ile işaretlenmiş bandın 24, 32, 34, 35, 36, 49, 52 ve referans suşlarında ve 15 (38.7

kDa) ile işaretlenmiş bandın 32, 35, 36, 37, 49, 52 numaralı izolatlarda olduğu tespit edildi.

4.5. İzolatlara Ait Kümeleme Analiz Bulguları

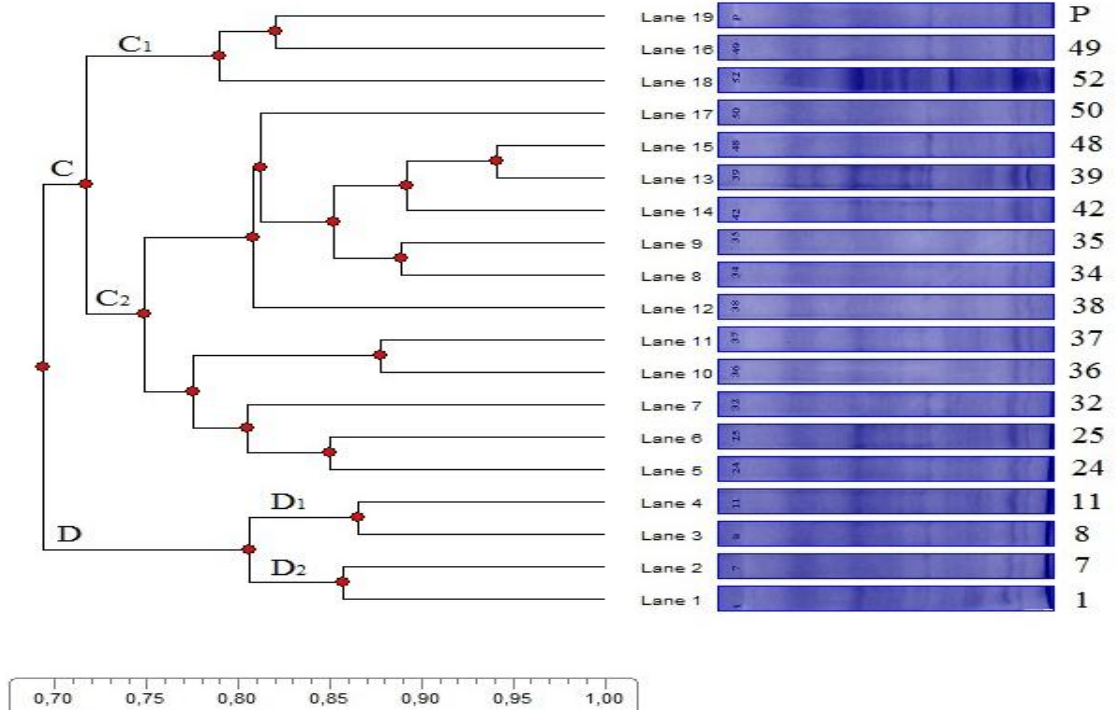
Çalışmamızda, seçilen 19 adet suşun SDS-PAGE ile elde edilen toplam hücre ve hücre dışı protein profilleri esas alınarak Phoretix 1D-pro (TotalLab-UK) programında Jaccard'a göre unweighted paired group method of arithmetic average (UPGMA) metodu kullanılarak kümeleme analizi yapıldı (Şekil 4.5; Şekil 4.6).

Toplam hücre protein profilleri esas alınarak yapılan nümerik analiz; suşların benzerlik düzeyinin %76 ve üzerinde 2 büyük gruba (A ve B) ayrıldığını ortaya koydu (Şekil 4.5). Grup A referans suş ve 14 adet yerel izolatu, Grup B ise 4 adet yerel izolatu içermektedir.



Şekil 4.5. Toplam hücre protein profilleri esas alınarak Jaccard'a göre UPGMA metodu kullanılarak oluşturulan dendrogram

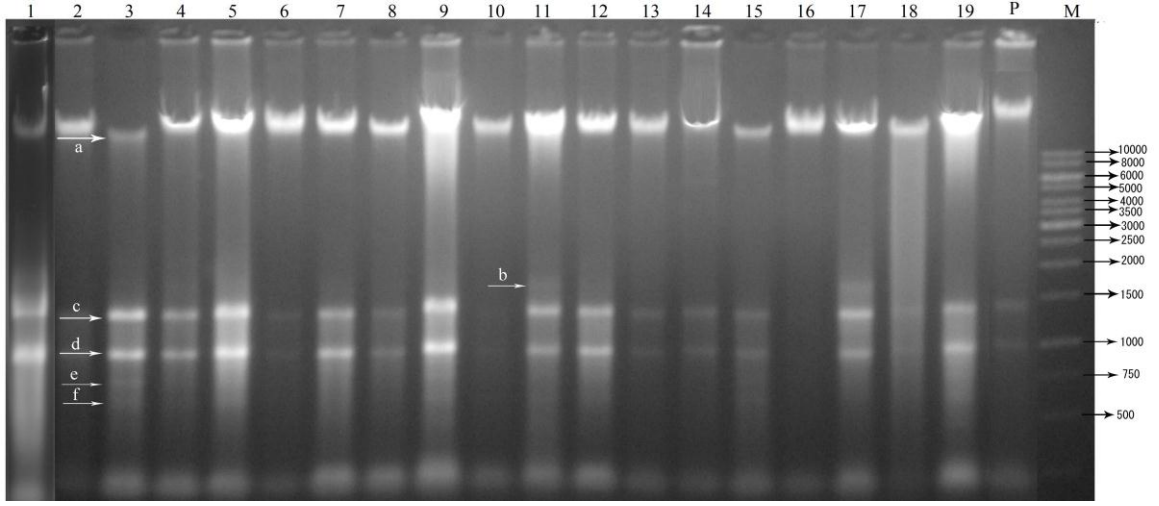
Toplam hücre dışı protein profilleri esas alınarak yapılan nümerik analiz; suşların benzerlik düzeyini %69 ve üzerinde 2 büyük Gruba (C ve D) ayrıldığını gösterdi (Şekil 4.6). Grup C, referans suş ile 14 lokal izolat dahil 15 suşu içerirken, Grup D ise 4 adet yerel izolatu kapsadığı belirlendi.



Şekil 4.6. Toplam hücre dışı protein profilleri esas alınarak Jaccard'a göre UPGMA metodu kullanılarak oluşturulan dendrogram

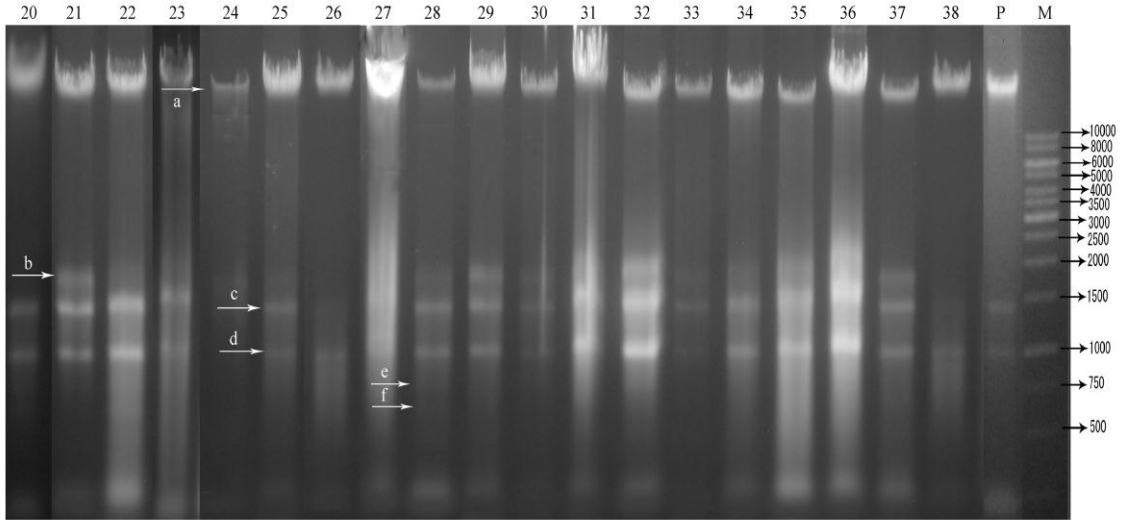
4.6. Plazmid DNA Analiz Sonuçlarına İlişkin Bulgular

Araştırmamızda, farklı kliniklerden izole edilen 54 yerel ve 1 adet referans olmak üzere toplam 55 suşun plazmid DNA profilleri incelendi. Belirlenen plazmid DNA profilleri Şekil 4.7, Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da verildi.



Şekil 4.7. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının plazmid DNA profilleri P; *P. aeruginosa* ATCC 27853, M; Marker

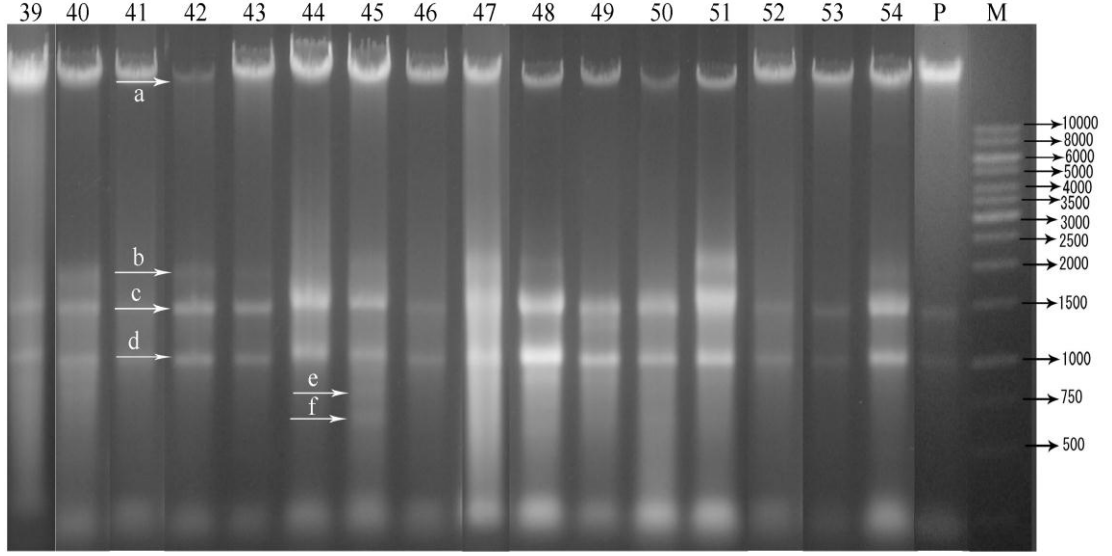
Agaroz jel elektroforez sonuçlarına göre, a (14.500 bp) ile işaretlenmiş plazmidin tüm suşlarda ortak olduğu görüldü. Buna karşın b (1.796 bp) ile işaretlenmiş plazmidin 11 ve 17 numaralı suşlarda ortak olduğu gözlemlendi. Ayrıca, c (1.392 bp) ve d (983 bp) ile işaretlenmiş plazmidlerin tüm suşlarda ortak olduğu belirlendi. Bunun yanı sıra, e (742 bp) ve f (618 bp) ile işaretlenmiş plazmidlerin 3, 4, 5, 9, 12, 15 ve 19 numaralı suşlarda olduğu tespit edildi (Şekil 4.7).



Şekil 4.8. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının plazmid DNA profilleri P; *P. aeruginosa* ATCC 27853, M; Marker

Plazmid DNA analizlerine göre, a (14.500 bp), c (1.392 bp) ve d (983 bp) ile işaretlenmiş plazmidlerin tüm suşlarda yer aldığı gözlemlendi. Ayrıca, b (1.796 bp) ile işaretlenmiş plazmidin 20, 26, 38 ve referans suş haricinde tüm izolatlarda ortak

olduğunu ortaya koydu. Bununla birlikte, e (742 bp) ve f (618 bp) ile işaretlenmiş plazmidler ise 22, 28 ve 37 numaralı suşlarda bulunduğu belirlendi (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının plazmid DNA profilleri P; *P. aeruginosa* ATCC 27853, M; Marker

Diğer taraftan, a (14.500 bp), c (1.392 bp) ve d (983 bp) ile işaretlenmiş plazmidlerin tüm suşlarda ortak olduğu saptandı. Öte yandan, b (1.796 bp) ile işaretlenmiş plazmidin 39, 40, 42, 43, 44, 45, 47, 48, 51 ve 54 numaralı izolatlarda varlığı tespit edilirken, e (742 bp) ve f (618 bp) ile işaretlenmiş plazmidlerin 445 ve 48 numaraları izolatlarda bulunduğu gözlemlendi.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, Ocak-2014 ve Haziran-2014 tarihleri arasında Sinop Atatürk Devlet Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Kastamonu Dr. Münif İslamoğlu Devlet Hastanesi Laboratuvarı ve Karabük Devlet Hastanesi Laboratuvarı'na gelen çeşitli klinik örneklerden izole edilen 54 adet *P. aeruginosa* izolatının fenotipik karakterizasyonu, antibiyotik dirençlilikleri, plazmid DNA içerikleri ve toplam hücre ve hücre dışı protein profillerine göre karakterizasyonu gerçekleştirildi.

Günümüzde tedavi giderlerinin ve mortalitenin artmasına neden olan hastane enfeksiyonları antibiyotik tedavisini zorlaştırmaktadır. Geniş spektrumlu antibiyotiklerin ampirik tedavide kullanılması, hastanelerde birden fazla antibiyotiğe dirençli suşların ortaya çıkmasına neden olduğundan dolayı etkin bir tedavi için yeni antibiyotiklere de ihtiyacı artırmaktadır.

Pseudomonas aeruginosa hastane enfeksiyonları içerisinde en çok öneme sahip ve en sık izole edilen mikroorganizmadır (NNIS, 2004). *P. aeruginosa*, hastane enfeksiyonlarının %10-25'inden sorumlu tutulmaktadır (Gül ve ark., 2004). Avrupa'da 17 ülkenin katıldığı European Prevalence Infection in Intensive Care (EPIC) sonuç raporlarında, *Enterobacteriaceae* ailesi en sık izole edilen nozokomiyal enfeksiyon etkeni olarak bildirilirken, *Staphylococcus aureus* ikinci, *P. aeruginosa* ise sık izole edilen üçüncü mikroorganizma olarak belirtilmiştir (Vincent ve ark., 1995). EPIC (2009)'de 75 ülkede yapılan benzer çalışmada, sonuçların bir önceki çalışmayla uyumluluk gösterdiği teyit edilmiştir (Vincent ve ark., 2009).

Amerika Birleşik Devletleri'nde çocuk yoğun bakım ünitelerinde yapılan çalışmada, pnömonilere en sık *P. aeruginosa*'nın neden olduğu bildirilmiştir (Urrea ve ark., 2003). Karakoç ve ark. (2013), bakteriyemide mortalite için risk faktörlerinin tespit edildiği bir çalışmada, *P. aeruginosa*'nın en sık izole edilen ikinci patojen olduğunu tespit etmişlerdir. Bakteriyemi kaynakları olarak pnömoni, katater ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonları ve üriner sistem enfeksiyonları olduğunu bildirmişlerdir.

Pseudomonas aeruginosa'nın birçok antibiyotiğe doğal dirençli olması, mutasyonlar ile çoğu antibiyotiğe dirençli hale gelmesi hastane enfeksiyonlarında önemli bakterilerden biri olmasına neden olmaktadır (Coggan ve Wolfgang, 2012). Gün geçtikçe artan antibiyotiklere dirençli suşlar tedavileri zorlaştırarak başarısızlığa yol açmaktadır. Bizim çalışmamızda, önceden yapılan çalışmalar ışığında Sinop ve çevre illerden toplanan *P. aeruginosa* izolatlarının antibiyotik dirençliliği incelenmiştir.

Çalışılan 54 klinik izolat, en sık idrar (%32) örneklerinden, ikinci ve üçüncü sıklıkta ise sırasıyla balgam (%17) ve yara (%15) örneklerinden izole edilmiştir. Turgut ve ark. (2002), tarafından yapılan çalışmada %39.5 ile en sık idrardan, %37.2 ile ikinci sıklıkta trakeal aspirattan ve üçüncü sıklıkta ise %20.6 ile yara örneklerinden izole ettiklerini bildirmişlerdir. Duman ve ark. (2012)'nin 1 yıllık süreçte izole ettikleri *P. aeruginosa* suşları ise en sık idrar (%26.4), trakeal aspirat (%21.8) ve balgam (%16.6) örneklerinden elde edilmiştir. Gültepe ve ark. (2014)'nin yaptıkları çalışmada örneklerin, diğer çalışmalardan farklı olarak en sık balgam (%36), yara (%36) ve kan (%14) örneklerinden izole edildiğini rapor etmişlerdir.

Bu çalışmada incelenen *P. aeruginosa* suşlarının tamamı Gram-negatif, hareketli, aerobik, sporsuz, katalaz, sitrat ve King B agarda ışıma pozitif; DNaz, İndol, Metil-Red, Voges Proskauer testleri negatif ve nitratı nitrite indirgeme yeteneklerinin pozitif olduğu tespit edildi. Ayrıca enterik bakterilerden ayırt edilmesini sağlayan en önemli test olan oksidaz testi ve *P. aeruginosa*'yı diğer *Pseudomonas*'lardan ayıran 42°C'de üreme testi pozitif sonuç verdi. Biyokimyasal testlerden sadece jelatinaz testi incelenen suşlar arasında değişkenlik gösterdi (Çizelge 4.2). Karbonhidrat fermantasyon sonuçlarına göre, izolatların tümünün glikoz, mannitol ve fruktozu kullanabildiği; ksiloz, laktoz, maltoz, sükroz, trehaloz ve arabinozu kullanamadığı belirlendi. Galaktozu ise 54 izolatın 39 tanesinin kullanabildiği tespit edildi (Çizelge 4.3).

Yapılan çeşitli çalışmalarda bazı biyokimyasal testler (katalaz, oksidaz, hareket, DNaz, indol, metil red, voges proskauer, sitrat, nitrat, karbonhidrat fermantasyon vb.) *P. aeruginosa* tanısında kullanılmıştır (Malçok ve ark., 2006; Duman ve ark., 2012; Alikhani ve ark., 2014). Çeşitli gıda ürünlerinden izole edilen *Pseudomonas* türlerinin incelendiği bir çalışmada türlerin tanımlanmasında biyokimyasal testler kullanılmıştır (Aydın, 2010). Bizim çalışmamızda incelenen izolatlarla ait biyokimyasal test sonuçları yapılan diğer çalışmalarla paralellik göstermektedir. The Prokaryotes (2006) ve Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2005)'de *P. aeruginosa* için belirttiği kriterler, bizim çalışmamızdaki sonuçlar ile uygunluk göstermiştir.

Biyokimyasal testlerin ardından, izolasyonu gerçekleştirilen 54 yerel izolatın 19 farklı antibiyotiğe karşı hassasiyetleri belirlendi. Sefalosporinler, antipseudomonal penisilinler, karbapenemler, kinolonlar *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında sık kullanılan antibiyotiklerdir. Bu antibiyotiklerin tedavilerde aminoglikozitler ile kombine edilerek kullanımları yaygındır (Tunçoğlu ve ark., 2009).

Çalışmamızdaki direnç oranlarına bakıldığında; tüm izolatların penislin G, klindamisin ve trimetoprim/sulfametaksazole %100 direnç gösterdiği saptandı. *P. aeruginosa*'nın tetrasikline doğal dirençli olduğu bilinse de Özer ve ark. (2006)'nın yoğun bakım ünitesinde hastane enfeksiyonları üzerine yaptıkları bir çalışmada tetrasikline %96 oranında direnç bulduklarını belirtmelerinden dolayı tetrasiklin antibiyotiğini çalışmamıza dahil ettik ve %100 direnç tespit edildi.

Çalışmamızda kullanılan β -laktam grubu antibiyotiklerden karbapenem grubuna dahil meropenem ve imipenem direnci sırasıyla %22.2 ve %33.3 olarak belirlendi. Çiftci ve ark. (2005), yaptıkları çalışmada, meropenem %14, imipenem %15 oranında direnç gözlemlemişlerdir. Yoğun bakım ünitesindeki hastaların çeşitli klinik materyallerinden izole ettikleri 89 *P. aeruginosa* suşunu inceleyen Gayyurhan ve ark. (2008), meropenem direncini %21.34 imipenem direncini ise %20.22 olarak bulmuşlardır. Nozokomiyal kökenli *P. aeruginosa* izolatları üzerinde imipenem dirençliliğini %60 olarak bildiren Bektaş ve ark. (2011)'ları meropenemi çalışmalarına dahil etmemişlerdir. 2012 ve 2013 yıllarında izole ettikleri 636 *P. aeruginosa* suşunu %29'unun meropeneme, %33'ünün imipeneme dirençli olduğunu Gültepe ve ark. (2014)'ları tespit etmişlerdir. Farklı çalışmalarda incelendiğinde *P. aeruginosa* izolatlarında geçmiş yıllara göre artan karbapenem direnci dikkat çekicidir. Karbapenem grubu antibiyotiklere karşı gelişen direncin farklı sebepleri olabilmektedir. *P. aeruginosa* için karbapenem direnci OprD kaybı, MexAB-OprM aktif dışa pompalama sistemi, permeabilite matasyonları, aşırı miktarda kromozomal AmpC beta-laktamaz üretilmesi ve metallo-beta-laktamaz enzimlerinin üretilmesi şeklinde olabilir (Livermore, 2002).

Çalışmamızda kullanılan bir diğer beta-laktam grubu antibiyotik aztreonamdır. Dokuz aylık süreçte yoğun bakım hastalarından izole edilen *P. aeruginosa* suşlarını inceleyen Özer ve ark. (2006), aztreonam direncini %35 olarak bildirmişlerdir. Karbapeneme dirençli ve duyarlı *P. aeruginosa* izolatları üzerine yaptığı çalışmada Üstün (2010), karbapenem dirençli suşların %100, karbapenem duyarlı suşların %40, tüm suşların ise %70'inin aztreonama dirençli olduğunu saptamıştır. İran'da 106 *P. aeruginosa* izolatının antibiyotik duyarlılıkları incelenen bir çalışmada aztreonam direnci %27.4 olarak belirtilmiştir (Alikhani ve ark., 2014). Bizim çalışmamızda ise aztreonam direnci %13 olarak tespit edilirken, suşların %87'sinin orta duyarlı olduğu görüldü. Bu durumda aztreonamın yanlış ve bilinçsiz kullanımı sonucunda orta duyarlı

olan suşlar tamamen direnç geliştirebilirler. Bu nedenle aztreonam direncinin giderek artması geleceğe yönelik olarak endişe verici olabilir.

Çalışmamızda kullanılan beta-laktam grubunun diğer antibiyotikleri seftazidim, sefepime ve sefotaksimdir. Seftazidim ve sefotaksim üçüncü kuşak sefalosporin iken sefepime 4. kuşak sefalosporindir. Hastane etkeni olan *Pseudomonas* suşlarının incelendiği çalışmada 158 *P. aeruginosa* suşunun seftazidime %64, sefepime %57 ve sefotaksime %17 oranında duyarlı oldukları belirlenmiştir (Özdemir ve ark., 2009). İki yıllık dönemde kan kültürlerinden izole ettikleri mikroorganizmaları ve bunların antibiyotik duyarlılıklarını inceleyen Yılmaz ve ark. (2013), 77 *P. aeruginosa* suşunun sefotaksime %97.4, seftazidime %18.1 oranında dirençli olduğunu rapor etmişlerdir. Hastane enfeksiyonlarının değerlendirildiği bir başka çalışmada seftazidime %25, sefepime %37.5 oranında direnç bildirilirken, sefotaksim çalışmaya dahil edilmemiştir (Gözütok ve ark., 2014). Bizim çalışmamızda ise seftazidime %22, sefepime %39, sefotaksime %98.1 direnç bulunmuştur ve sonuçların diğer çalışmalarla paralellik gösterdiği görülmüştür.

Beta-laktamaz inhibitörleri ile kombine kullanılan penisilinlerde çalışma kapsamına alınmıştır. Yapılan bir çalışmada ampisilin/sulbaktama %82.02, piperasilin/tazobaktama %42.69 direnç bulunmuştur ve piperasilin çalışma kapsamına alınmazken (Gayyurhan ve ark., 2008), başka bir çalışmada piperasiline %56, piperasilin/tazobaktama %44 oranında direnç bildirilmiştir (Özer ve ark., 2009). Karbapenem dirençli *P. aeruginosa* suşlarını inceledikleri çalışmada Güçlü ve ark. (2013), piperasilin/tazobaktama %65.5, piperasiline %65.5 oranında direnç bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada ise Yılmaz ve ark. (2013), piperasilin/tazobaktam dirençliliğini %13.6 olarak rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda izolatların piperasiline %20.4, piperasilin/tazobaktama %18.5 ve ampisilin/sulbaktama %61.1 oranında dirençli oldukları bulunmuştur.

Çalışmamızda kullandığımız bir diğer antibiyotik grubu aminoglikozitlerdir. Aminoglikozitler *Pseudomonas* enfeksiyonlarının tedavisinde tek başına değil daha çok kombine tedavinin bir parçası olarak kullanılmaktadır. Bektaş ve ark. (2011), yapmış oldukları çalışmada, amikasin %9, gentamisin %75 oranında direnç bildirmişlerdir. Bir yıllık süreçte izole ettikleri 307 adet *P. aeruginosa* suşunu inceleyen Duman ve ark. (2012), izolatların %1.3'ünün amikasin, %12.4'ünün gentamisin dirençli olduğunu rapor etmişlerdir. Solunum yolu enfeksiyonu olan hastaların balgam örneklerinden izole ettikleri 105 *P. aeruginosa* izolatını inceledikleri çalışmada Shah ve ark. (2013),

amikasine %90.5 ve gentamisine %86.1 oranında duyarlılık bildirmişlerdir. Üç yıllık süreçte izole edilen toplam 309 *P. aeruginosa* suşunun incelendiği başka bir çalışmada ise amikasine %10, gentamisine %31 direnç bildirilmiştir. Ayrıca yapılan bu çalışmada direnç oranlarının her yıl arttığı da rapor edilmiştir (İnce ve ark., 2014). Bizim çalışmamızda amikasine %5.5 oranında direnç gözlemlendi. Çalışmaya dahil edilen antibiyotikler içerisinde en yüksek duyarlılığa sahip olduğu görüldü. Aminoglikozit grubunda yer alan bir diğer antibiyotik gentamisine ise %40.7 oranında direnç bulunmuştur. Yapılan daha öncekiler çalışmalar bizim çalışmamızla paralellik göstermektedir. Antibiyotiklerin yaygın kullanımı nedeniyle *P. aeruginosa*'da direnç oranlarında artış görülmektedir. Antibiyotik kısıtlama programlarının direnç oranlarını azaltmada etkili olduğu gösterilmiştir. Amikasinin az sayıda aminoglikozid modifiye edici enzimden etkilenmesi nedeniyle *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında diğer aminoglikozidlere oranla daha etkindir (Regal ve ark., 2003). Çalışmamızda amikasine düşük direncin belirlenmesi bölgede gözlenen *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisinde tercih edilebileceğini ortaya koymuştur.

Kinolonlar grubunda yer alan siprofloksasin ve ofloksasin çalışmamıza dahil edildi. Yapılan çalışmalarda, siprofloksasine %28, ofloksasine %52 oranında (Özer ve ark., 2009); siprofloksasine %14.3 oranında direnç (Essawi ve ark., 2013) bildirilmiştir. Klinik örneklerden elde edilen 107 izolatı inceleyen Ağca (2011), siprofloksasine %48 oranında duyarlılık bildirmiştir. Bizim çalışmamızda siprofiloksasin ve ofloksasine sırasıyla %55.5, %46.3 oranında direnç tespit edildi. Ayrıca ofloksasin antibiyotiğine %42.6 oranında yarı duyarlı olduğu gözlemlendi.

Lipopeptit olan kolistin daha önceki yıllarda yapılan çalışmalarda %90-%100 duyarlılık tespit edilmiştir (Özdemir ve ark., 2009; İnce ve ark., 2014). Bizim çalışmamızda ise kolistine %70.4 oranında direnç tespit edildi.

Çalışmaya dahil edilen tüm antibiyotiklerin direnç oranları değerlendirildiğinde yapılan çalışmalarda benzerlik göstermesinin yanı sıra bazı farklılıklarda olduğu görülmüştür. Bu farklılıkların, farklı klinik materyallerden izole edilmiş olması, ilaçlara karşı taşıdıkları plazmidler ile dirençlilik kazanımları nedenleri arasında olabilir (Sadovskaya ve ark., 2010).

Biyokimyasal yöntemlerin fazla işgücü gerektirmesi ve uzun zaman almasından dolayı bakterilerin tiplendirilmesinde daha etkin kullanılabilecek yöntemlere ihtiyaç vardır. Ayrıca, antijen yapısının değişken olması, geri dönüşümü olmayan fenotipik değişiklikler, faj ve plazmidlerin horizontal geçişleri, direnç modellerinin antibiyotik

tedavisinden etkilenmesi fenotipik yöntemlerle değişken sonuçlar elde edilmesine neden olmaktadır (Pitt, 1994; Lambert, 2002).

Mikroorganizmaların moleküler tiplendirmesinde kullanılan ilk yöntem plazmid profillerinin belirlenmesidir. Bakterilerde bulunan plazmidlerin sayı ve molekül ağırlığındaki benzerlikler araştırılmaktadır (Zaidi ve Konstantinou, 2003). Çalışmamızda, test edilen 54 adet *P. aeruginosa* izolatının plazmid DNA'ları alkali lizas yöntemi ile izole edildi. Plazmid analiz sonuçlarına göre, tüm izolatlarda en az 3 adet plazmidin bulunduğu belirlenmiştir. 54 örneğin 20 tanesinde üç, 23 tanesinde dört, 6 tanesinde beş ve 5 tanesinde altı adet plazmid tespit edilmiştir. Nikbin ve ark. (2007), 104 adet *P. aeruginosa* izolatının antibiyotik dirençliliğini ve plazmid profillerini inceledikleri çalışmada, izolatların %29.8'inde plazmid DNA olduğunu ve plazmid içeren izolatların %61.8'inin en az 8 antibiyotiğe dirençli olduğunu bildirmişlerdir.

Radi ve Rahma (2010); yara, yanık ve kulak enfeksiyonlarından izole ettikleri *P. aeruginosa* suşlarının çoklu antibiyotik dirençliliğini ve plazmid profillerini belirledikleri çalışmalarında, izolatların amikasin, neomisin, tetrasiklin, streptomisin, sefalosporinler ve penisilinlere çoklu direnç gösterdiğini belirtirken, molekül ağırlığı düşük iki ve yüksek molekül ağırlığına sahip bir adet plazmid DNA bandı bulundurduklarını tespit etmişlerdir. Smith ve ark. (2012), antibiyotik dirençliliği ve moleküler tiplendirmelerini yaptıkları 20 adet *P. aeruginosa* suşunun 6 tanesinin 12 farklı antibiyotiğe %100 dirençli olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca çalışılan 20 adet suşun %80'inde plazmid belirlenirken; RAPD-PCR ve SDS-PAGE ile incelenen izolatları sırasıyla 5 ve 6 grupta sınıflandırmışlardır. Shahcheraghi ve ark. (2003)'nın antibiyotik dirençliliği ile plazmid profillerini araştırdıkları çalışmalarında, 265 izolatın tamamının tetrasiklin, karbanesillin, amikasin, seftazidim, sulfametaksazol, siprofloksasin, sefotaksim ve gentamisine çoklu direnç gösterdiğini bildirmişlerdir. Plazmid profilleri incelenen suşların %95'inde iki tane büyük molekül ağırlığına sahip plazmid tespit etmişlerdir. İncelenen 4 izolatın, 9.7 bp büyüklüğünde olan plazmidten yoksun bırakıldıktan sonra, gentamisin, amikasin ve seftazidime duyarlı hale geldiklerini rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda 5 adet suşun en fazla plazmid içeriğine sahip olduğu gözlenmiştir. Bunlardan 45 numaralı izolatın çalışılan 19 antibiyotikten 16'sına dirençli olduğu belirlenirken, yine aynı sayıda plazmid içeren 22 numaralı izolatın 7 antibiyotiğe dirençli olduğu saptandı. Ancak 3 adet plazmide sahip 15 numaralı suşun denenen 15 antibiyotiğe dirençli olduğu gözlemlendi. Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda antibiyotik dirençliliğinin plazmid sayısı ile bağlantılı olmadığı

belirlendi. Bu sonuç yapılan daha önceki çalışmalarla uyumluluk göstermemektedir. Açık ve ark. (2001)'nın klinik *P. aeruginosa* izolatlarını inceledikleri çalışmalarında suşların büyük molekül ağırlıklı plazmidler içermediklerini bildirmişlerdir. Ayrıca iki izolatın aynı plazmid profilini taşımasına rağmen antibiyotik duyarlılıklarının benzemediğini, plazmid profilleri ile antibiyotik duyarlılıkları arasında bağlantının olmadığını rapor etmişlerdir. Klinik örneklerden izole ettikleri 35 adet metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) suşunun plazmid DNA profilleri ve farklı antibiyotiklere karşı duyarlılıklarını inceleyen Berber ve ark. (2008), antibiyotiklere karşı dirençlilikte plazmid sayısının önemli olmadığını göstermişlerdir. Bu sonuçlar bulgularımızla paralellik göstermektedir.

SDS-PAGE ile toplam hücre protein profilleri bakterilerde yakın akraba grupların karşılaştırılması ve benzerliklerin ortaya konulmasında kullanılan tekniklerden biridir (Jackman, 1985). Proteinlerin amino asit dizilişleri, serolojik özellikleri ve protein profilleri sistematikte önemli bir yer tutmaktadır. Günümüzde poliakrilamid jel elektroforez (PAGE) tekniği, değişik mikroorganizmaların protein profillerine göre tanımlanması ve sınıflandırılmasında sıklıkla kullanılan bir metottur (Flint ve ark., 1997; Poirier, 2002). Berber ve ark. (2010), yaptıkları çalışmada insan patojeni *Staphylococcus aureus* izolatlarının SDS-PAGE yöntemiyle toplam hücre dışı proteinlerini incelemişler ve yöntemin uygulanması ve protein bantlarının yorumlanması kolay olduğundan hızlı ve ayırım gücü fazla olan bir yöntem olarak önermişlerdir.

Çalışmamızda seçilen 19 adet *P. aeruginosa* suşunun SDS-PAGE yöntemi kullanılarak elde edilen toplam hücre ve hücre dışı protein profillerine göre karşılaştırılması yapıldı. SDS-PAGE analizine göre suşların yüksek düzeyde benzer protein profillerine sahip olmakla birlikte bazı bant farklılıklarının olduğu belirlenmiştir. Toplam hücre protein profillerinde, 117.4; 77.9; 74.9; 41.8; 30.4; 31.3; 26.8 ve 42.6 kDa molekül ağırlığına sahip bantların suşlar arasında farklılıklar gösterdiği tespit edildi. Hücre dışı protein profillerinde ise, 121.7; 114.1; 100.3; 68.1; 66.3; 56.3; 51.1 ve 38.7 kDa molekül ağırlığındaki protein bantlarının suşlar arasında farklılıklar gösterdiği belirlendi.

Çeşitli endüstriyel atık maddelerde bazı mikroorganizmaların yüzey aktif özelliklerini inceleyen Kaya (2008), *P. stutzeri* izolatlarının birbirleriyle ve *P. stutzeri* DSM 6082 suşu ile aralarındaki benzerlikleri, SDS-PAGE yöntemini kullanarak elde edilen toplam hücre protein profilleri karşılaştırmıştır. Sonuçta, *P. stutzeri* izolatlarının

ve referans suşun benzer protein profillerine sahip oldukları bildirilmiştir. Ayrıca, *P. aeruginosa* ATCC 27853, 78 ve 99 suşlarının toplam hücre protein profilleri incelendiğinde protein bantları yönünden benzer profile sahip olduklarını rapor etmiştir. *E. coli* ve *P. aeruginosa* bakterilerinin SDS-PAGE ile protein profillerini inceleyen Durrani ve ark. (2008), *P. aeruginosa* örneklerinin protein bantlarında 85 kDa, 133 kDa, 148 kDa ve 180 kDa molekül ağırlığına sahip önemli proteinlerin benzer olduklarını bildirmişlerdir. Bahrampour ve ark. (2013), manyetik Fe₃O₄ nanopartikülleri ile kaplanmış *P. aeruginosa* (PTSOX4) suşlarında SDS-PAGE yöntemi ile protein profillerindeki değişimi incelemişlerdir ve nanopartiküllerle kaplanmış hücrelerde yeni protein bantlarının ortaya çıktığını bununla birlikte, bir protein bandının kaybolduğunu belirtmişlerdir. İki boyutlu jel elektroforez sonuçları, 30-56 kDa ve 56-65 kDa molekül ağırlığına sahip iki farklı polipeptit gruplarının varlığını vurgulamışlardır. SDS-PAGE tekniği kullanılarak elde edilen toplam hücre protein profillerinin, suşların tiplendirilmesinde yararlı olduğu ve çoğu diğer tipleme metotlarına benzer ya da daha iyi ayırım sağladığı Walia ve ark. (1988)'ları tarafından rapor edilmiştir.

Çalışmamızda, SDS-PAGE metodu ile elde edilen toplam hücre ve hücre dışı protein profilleri dikkate alınarak, benzerlik aritmetik ortalama algoritmasıyla ağırlıksız eşleşme grup metoduna (UPGMA) göre dendogramlar oluşturuldu. *P. aeruginosa* izolatlarının toplam hücre protein profilleri benzerlik düzeyi %76 (Şekil 4.5) ve üzeri olan 2 büyük gruba (A-B) ayrıldı. Birinci grup (A) *P. aeruginosa* ATCC 27853 suşu ile 14 yerel izolatu içermekte ve benzerlik düzeyi %79 ve üzerinde iki alt gruba (A₁-A₂) ayrılmaktadır. Referans suş A₁ grubunda yer almakta ve en yakın suşlar 32 ve 35 numaralı izolatlardır.

Hücre dışı proteinleri esas alınarak yapılan nümerik analizde, suşların benzerlik düzeyi %69 ve üzeri olan 2 gruba (C-D) ayrıldığını gösterdi. İlk grup (C) referans suş ile 14 yerel izolato kapsamakta ve benzerlik oranı %72 ve üzerinde iki alt gruba (C₁-C₂) ayrılmaktadır. Referans suş C₁ grubunda yer almakta ve en yakın suşlar 49 ve 52 numaralı izolatlardır.

Araştırmamızda izole edilen *P. aeruginosa* suşlarının tiplendirilmesi için yapılan biyokimyasal testler ve antibiyotik duyarlılıkları tür seviyesinde identifikasyon için yeterli olmaktadır. Bununla birlikte, SDS-PAGE tekniği kullanılarak elde edilen toplam hücre içi ve hücre dışı protein profilleri tür altı seviyede oldukça faydalı bilgiler vermektedir. Yapılan bazı çalışmalarda; tür altı seviyelerde identifikasyon için, çok az miktarda bile olsa genetik materyali çoğaltabilen, kolaylıkla tanımlayabilen, laboratuvar

tanılarında hız ve kesinlik kazandıran PCR temelli moleküler yöntemlere başvurmanın gerekliliği belirtilmiştir (Van Pelt ve ark., 1999; Açık ve ark., 2001; Çarıkçı ve ark., 2008; Avşar ve Berber, 2014). Sonuç olarak, biyokimyasal testler ve protein profillerine dayalı tekniklerin yetersiz kaldığı durumlarda PCR esaslı tekniklerin kullanılmasının faydalı olabileceği önerilmektedir.

Pseudomonas aeruginosa, birçok antibiyotiğe karşı doğal olarak dirençli olmasının yanında antibiyotiklere karşı geliştirdiği kazanılmış direnç oranları giderek artmakta, böylece tedavisi güçleşen ve hayatı tehdit eden birçok hastalığa neden olmaktadır. Direnç gelişimi özellikle spesifik antibiyotik kullanımı sonrası gelişmekte ve hastadan hastaya dirençli suşların yayılımına neden olmaktadır. Tedavide kullanılan çeşitli antibiyotiklere karşı gelişen dirençlerin bir araya gelmesi ve antibiyotikler arasında çapraz direnç gelişimi, çoklu antibiyotik direnç sorununu ortaya koymaktadır (Aloush ve ark., 2006). Çoklu antibiyotik dirençli ve hastane enfeksiyonu etkeni olan *P. aeruginosa* suşlarının neden olduğu enfeksiyonlar yüksek morbidite ve mortalite ile sonuçlandığından, yüksek maliyet oluşturmaktadır. Bu bağlamda bu suşların belirlenmesi ve yayılımının önlenmesi gerekir. Ülkemizde de bu hızlı yayılımın belirlenebilmesi için çok merkezli çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

Bizim çalışmamızda da hastane enfeksiyonu etkeni olan *P. aeruginosa* suşları ülke genelinde ve tüm dünyada olduğu gibi yüksek düzeyde antimikrobiyal direnç ve çoklu direnç özellikleri göstermektedir. Çalışmamızda izolatların imipenem ve meropenem sırasıyla %33.3 ve %22.2 oranında dirençli olması, imipenemin tercih edildiği tedavilerde başarısızlık oranlarının yüksek olacağını göstermektedir. Çalışmamızda izolatlar en düşük direnci ise amikasin (aminoglikozit) karşı belirlenmiştir. Giderek artan bu direnç profili hastanelerde enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınması gerektiğini ve özellikle yoğun bakım ünitesindeki antibiyotik kullanım politikalarının yeniden gözden geçirilmesi ve düzenlenmesi gerektiğini göstermektedir. Ayrıca enfeksiyon olduğu düşünülen durumlarda ampirik olarak başlanan antibiyotiklerin in-vitro koşullarda duyarlılığının kontrol edilmesi gerektiğini, tedavi süresince bile direnç gelişebileceği göz önünde bulundurularak kültür ve antibiyogram isteklerinin yenilenmesinin gerekliliğini göstermiştir. Plazmidler antimikrobiklere ve ağır metallerle direnç genlerini taşımanın yanı sıra, değişik virülans faktörlerini de taşıyabilirler. Direnç plazmidleri diğer duyarlı bakterilere transdüksiyon, transformasyon ve konjugasyon olaylarıyla geçerek direnç gen paketini aktarır ve böylece direncin yayılmasına neden olabilirler. Antibiyotik dirençliliğinin plazmidlerle bağlantısının

araştırılmasının gerekliliği sonucunda izolatların plazmid profilleri belirlenmiştir. *P. aeruginosa* suşlarının neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde aminoglikozitler halen tercih edilen antibiyotikler olmasına rağmen, bu grup ve diğer grup antibiyotiklerin büyük çoğunluğuna karşı artan direnç oranlarına dikkat edilmelidir. Bu nedenle, rasyonel olmayan ilaç kullanımını önlemek için alınan önlemler dikkatle incelenmeli ve direnç gelişimi düzenli olarak takip edilmelidir. Ayrıca, bu çalışmadan elde edilen bulgular morfolojik ve fizyolojik özelliklerin yanı sıra, SDS-PAGE tekniğiyle elde edilen toplam hücre ve hücre dışı protein profillerinin tür altı seviyede oldukça faydalı bilgiler verdiğini ortaya koydu. Bunun yanı sıra, DNA temelli moleküler yöntemler gelişmekte olan teknoloji ile birlikte farklı amaçlarla yürütülen bilimsel çalışmalarda kullanılmaktadır. Yüksek derecede ayırım gücüne sahip olmaları, uygulamalarının kolay olması, tekrarlanabilir olmaları ve kısa sürede sonuçlar vermeleri bu yöntemlerin kullanımına hız kazandırmıştır.

6. KAYNAKLAR

- Açık, L., Küçükaraarslan, A., Çelebi, A. 2001. Klinik *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları, plazmit profilleri ve RAPD-PCR Analizleri, G.Ü. Fen Bil. Enst. Der., 14(1): 163-169.
- Ağca, H. 2011. Klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. Türk Mikrobiyol. Cem. Derg., 41(3): 107-110.
- Akalın, H. 2007. *Pseudomonas aeruginosa* enfeksiyonları ve tedavisi. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Görükle-Bursa XII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi KLİMİK.
- Alikhani, M.Y., Tabar K.Z., Mihani, F., Kalantar, E., Karami, P., Sadeghi, M., Khosroshahi, S.S., Farajnia, S. 2014. Antimicrobial Resistance Patterns and Prevalence of *blaPER-1* and *blaVEB-1* Genes Among ESBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in West of Iran. Jundishapur J. Microbiol., 7(1): 1-4.
- Aloush, V., Navon Venezia, S., Seigman Igra, Y., Cabili, S., Carmeli, Y. 2006. Multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Risk factors and clinical impact. Antimicrob. Agents Chemother., 50: 43-48.
- Altundağ M. E. 2009. PCR ile *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* mikroorganizmalarının çeşitli biyolojik sıvılardan tanısı. Yüksek lisans tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat, 40 s.
- Andrade, S.S., Jones, R.N., Gales, A.C., Sader, H.S. 2003. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Latin America Medical Centres: 5 year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). J. Antimicrob. Chemother., 52: 140-147.
- Anonim, 2006. Merck Microbiology Manual. 12th Edition. Merck KGaA, Darmstadt, Germany, 688 p.
- Anzai, Y., Kim, H., Park, J.Y., Wakabayashi, H., Oyaizu, H. 2000. Phylogenetic affiliation of the Pseudomonads based on 16 rRNA Sequence. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 50: 1563-1589.
- Aslım, B., Beyatlı, Y. 2004. Antibiotic resistance and plasmid DNA contents of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from Turkish yoghurt. Turkey J. Veter. Ani. Sci., 28: 257-263.

- Aşık, G., Özoğuz, P., Tünay, H., Kaçar Doğruk, S., Bulut, A., Bal, A. 2014. Commonly isolated microorganisms from wounds with their antibiotic resistance patterns. Cerrahi San. Derg., ISSN: 1308-0709.
- Atilla, A., Eroğlu, C., Esen, Ş., Sünbül, M., Leblebicioğlu, H. 2012. Hastane kaynaklı *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında PER-1 tipi beta laktamaz sıklığının ve antibiyotiklere direnç oranlarının araştırılması. Mikrobiyol. Bul., 46(1):1-8.
- Avşar, C., Berber, İ. 2014. The molecular characterization of *Escherichia coli* strains isolated from seawater and mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in Sinop Peninsula, Turkey. Frens. Environ. Bul., 23(10): 2481-2487.
- Aydın, G. 2010. Çeşitli gıda ürünlerinden izole edilen *Pseudomonas* türlerinde siderofor varlığı, serum direnci, genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) üretimi ve antibiyotik direncinin belirlenmesi. Ankara. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Bahrampour, F., Raheb, J., Rabiei, Z. 2013. Alteration in protein profile of *Pseudomonas aeruginosa* (PTSOX4) coated with magnetic Fe₃O₄ nanoparticles. J. Nanostructure in Chemistry, 3: 58.
- Baron, E.J., Finegold, S.M. 1990. Diagnostic Microbiology. St Louis: The C. V. Mosby Company; 148-386 p.
- Bektaş, M., Çıkman, A., Parlak, M., Yaman, G., Güdücüoğlu, H. 2011. Nozokomiyal kökenli *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında antibiyotiklere direnç. Van Tıp Derg. 18(4): 192-196.
- Berber, İ., Cokmus, C., Atalan, E. 2003. Characterization of *Staphylococcus* species by SDS-PAGE of whole-cell and extracellular proteins. Microbiol., 72: 42-47.
- Berber, İ., Alan, N., Önlü, H. 2008. Klinik örneklerden izole edilen metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MDSA) suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. Y. Y. Ü. Fen Bil. Enst. Derg., 13(1): 35-38.
- Berber, İ., Alan, N., Ekin, S., Onlu, H. 2010. Use of the different polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) methods in the characterization of human pathogenic *Staphylococcus aureus* strains. Asian J. Chem., 22(4): 3173-3185.
- Berezin, B.E., Towner, K.J. 1996. *Acinetobacter* spp as nosocomial pathogens. Microbiological, clinical and epidemiological features. Clin. Microbiol. Rev., 9: 148-65.
- Bergagne E. 2004. *Pseudomonas* and miscellaneous Gram negative bacilli, In: Infectious Diseases (2th ed), Colman J, Powerdyly GW (eds), Toronto, (2): 1733-1748.

- Bilgehan, H. 1996. Temel Mikrobiyoloji ve Başışıklık Bilimi. 8. Basım, Fakülteler Kitabevi, Barış Yayınları, İzmir, 592 s.
- Bilgehan, H. 2000. Non-fermentatif Gram olumsuz basiller. Klinik mikrobiyoloji özel bakteriyoloji ve bakteri infeksiyonları. Barış Yayınları, Fakülteler Kitapevi İzmir. 10: 175-197 s.
- Blondell-Hill, E., Henry, D.A., Speert, D.P. 2007. *Pseudomonas*, "Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds). Manual of Clinical Microbiology, ASM Press, Washington, DC, 9(1): 734-48.
- Bonfiglio, G., Russo, G., Nicoletti, G. 2002. Recent developments in carbapenems. Expert. Opin. Investig. Drugs., 11(4): 529–544.
- Bozkurt Güzel, Ç., Erturan, Z., Savage, P.B., Gerçek, A.A. 2013. Katyonik steroid antibiyotik csa-13'ün, kolistin ve çeşitli antibiyotiklerle kombinasyonlarının kistik fibrozlu hastalardan izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarına karşı üçlü sinerjistik etkileri. ANKEM Derg.; 27(4): 196-205.
- Brady MT. 2009. *Pseudomonas* and Related Genera. In: Feigin RD, Demler-Harrison GJ, Cherry JD, Kaplan SL. Feigin&Cherry's Text Book of Pediatric Infectious Diseases. 6th ed. John F. Kennedy, Philadelphia. 1651-1669 p.
- Brenner, D.J., Krieg, N.R., Garrity, G.M., Staley, J.R., Staley, J.T. 2007. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 2: The Proteobacteria, Williams & Wilkins, Baltimore, MS, USA., 323-325 p.
- Brooks, G.F., Butel, J.S., Morse, S.A. 1998. Medical Microbiology. Stamford: Twenty-First Edition; 231-236 p.
- Brooks, G.F., Butel, J.S., Morse, S.A. 2001. *Pseudomonads, Acinetobacters*, uncommon Gram-negative bacteria. In: (eds) Jawetz, Melnick, Adelberg's Medical Microbiology, 22nd edition. Mc Graw Hill. 229-31 p.
- Brooks, G.F., Carroll, K.C., Butel, J.S, Morse, S.A. 2007. *Pseudomonads, Acinetobacters, & Uncommon Gram-Negative Bacteria*. In: Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, ed(s). Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology. 24th ed. USA: The McGraw-Hill Companies: 263-267.
- Brown, V.I., Lowbury, E.J.L. 1965. Use of an improved cetrimide agar medium and of culture methods for *Pseudomonas aeruginosa* J. Clin. Pathol., 18: 752.
- Bush, U., Nitschko, H. 1999. Methods for differentiation of microorganisms, J. Chromatography-B, 722: 263-278.

- Caugant, D.A. 2009. Use of repetitive element palindromic PCR (rep-PCR) for the epidemiologic discrimination of foodborne pathogens In: Molecular Epidemiology of Microorganisms, Methods in Molecular Biology, Kelli L. Hiett and Bruce S. Seal D.A. Caugant (eds), Vol. 551 Humana Press, a part of Springer Science + Business Media, LLC, 49-58 p.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2014. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Twenty-fourth Informational Supplement, CLSI Document M100-S24, CLSI, Wayne PA.
- Coggan, K.A., Wolfgang, M.C. 2012. Global regulatory pathways and cross-talk control *Pseudomonas aeruginosa* environmental lifestyle and virulence phenotype. Curr. Issues Mol. Biol., 14: 47-70.
- Çarıkçı Yavaşal, A.İ., Uçar, F., Yalçın, T.H. 2008. Kozmetik ürünlerde bakteriyel ve fungal kompozisyonun klasik yöntemler ve PCR yöntemi kullanılarak saptanması. Elekt. Mikrobiyol. Derg. TR, 06(01): 1-16.
- Çiftçi, H., Çetinkaya, Z., Aktepe, O.C., Arslan, F., Altındış, M. 2005. Klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları. Türk Mikrobiyol. Cem. Derg., 35: 98-102.
- Çolak, D. 2002. Enfeksiyon hastalıklarının laboratuvar tanısında kullanılan moleküler yöntemler kitabı. Ağaçfıdan, A., Badur, S., Türkoğlu, S. (eds), Türk. Mikrobiyol. Cem. MGG AS Matbaası, İstanbul, 161-171 p.
- Delden, C.U., Iglewski, B.H. 1998. Cell to cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. Emerg. Infect. Dis., 4: 551-560.
- Demir, N. 2006. Gram-negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üretimine katkıda bulunan çeşitli risk faktörlerinin araştırılması, Tıpta Uzmanlık Tezi, İstanbul, 42 s.
- Derbentli, Ş. 2002. Hastane enfeksiyonlarının epidemiyolojisinde moleküler yöntemlerin yeri. Türk Mikrobiyol. Cem. Derg., İstanbul, 6-13.
- Doig, P., Paranchych, W., Sastry, P.A., Irvin, R.T. 1989. Human buccal epithelial cell receptors of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of glycoproteins with pilus binding activity. Can. J. Microbiol., 35: 1141-1145.
- Duman, Y., Kuzucu, Ç., Kaysadu, H., Tekerekoğlu, M.S. 2012. Bir yıllık süreçte izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılığının araştırılması: Kesitsel bir çalışma. İnönü Üniversitesi Sağ. Bil. Derg., 1: 41-45.

- Durmaz, R. 2005. Hastane enfeksiyonu salgınında moleküler biyolojik yöntemler. Hast. İnfeks. Derg., 9: 196-202.
- Durrani, R., Abubakar, M., Arshed, J.M., Saleha, S., Ullah, İ., Ali, Q. 2008. Biological characterization and protein profiles of two model bacteria by SDS-PAGE and FT-IR. J. Agr. Biol. Sci., 3: 6-16.
- Dündar, D., Tamer, G.S. 2009. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antimikrobiyal direnci: Üç yıllık değerlendirme. ANKEM Derg., 23(1): 17-21.
- Ehrmann, M.A., Vogel, R.F. 2005. Molecular taxonomy and genetics of sourdough lactic acid bacteria, Food Sci. and Techn., 20: 1-12.
- Engleberg, N.C. 1994 Molecular methods: Applications for clinical infectious diseases. Ann. Emerg. Med., 24: 490-502.
- Essawi, T., Sabri, I., Farraj, M.A. 2013. Extended Spectrum β -lactamases and antimicrobial susceptibility among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in the West Bank, Paletsine. J. Microbiol. and Infect. Diseases., 3(2):56-60.
- Feldman, M., Bryan, R., Rajan, S., Scheffler, L., Brunnert, S., Tang, H. and Prince, A., 1998. Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection, Infection and Immunity., 66(1): 43-52.
- Flint, S.H., Brooks, J.D., Bremer, P.J. 1997. The influence of cell surface properties of thermophilic streptococci on attachment to stainless steel, J. Appl. Microbiol., 83: 508-517.
- Forbes, B.A., Sahm, D.F., Weissfeld, A.S. 2007. Bailey and Scott's diagnostic microbiology. International 12. edition, Mosby, U.S.A.
- Foxman, B., Riley, L. 2001. Molecular Epidemiology: Focus on Infection. Am. J. Epidemiol., 153(12): 1135-1141.
- Garau, J., Gomez, L. 2003. *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. Curr Opin Infect Dis. 16(2): 135-143.
- Gatti, M., Fornasari, E., Neviani, E. 1997. Cell wall protein profiles of dairy thermophilic lactobacilli. Lett. Appl. Bacteriol., 25: 345-348.
- Gaynes, R., Edwards, J.R. 2005. Overview of nosocomial infections caused by Gram-negative bacilli. Clin. Infect. Dis., 41(6): 848-54.
- Gayyurhan, E., Zer, Y., Mehli, M., Akgün, S. 2008. Yoğun bakım ünitesi hastalarından izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları ve metallo-beta laktamaz oranlarının belirlenmesi. Turk. J. Infect., 22(1): 49-52.

- Giamarellou, H. 2002. Prescribing guidelines for severe *Pseudomonas* infections. J. Antimicrob. Chemother., 49: 229-233.
- Gilardi, G.L. 1991. *Pseudomonas* and Related Genere. In: Manuel of Clinical Microbiology (5th ed), Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ (eds), ASM Press, Washington D.C.: 448-457 p.
- Gilbert, D.N., Kohlhepp, S.J., Slama, A. 2001. Phenotypic resistance of *Staphylococcus aureus*, selected Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* after single and multiple in vitro exposures to ciprofloxacin, levofloxacin and trovafloxacin. Antimicrob. Agents Chemother., 45: 883-92.
- Gillespie, S.H., Hawkey P.M., 2006. Principles and Practice of Clinical Bacteriology. (2nd ed). John Wiley and Sons Ltd, University of Birmingham, UK. 427-443.
- Gözütok, F., Sarıgüzel Mutlu, F., Aydın, B., Güzel Kamalak, D., Kılıç, İ., Gençaslan, S., Çelik, İ. 2014. Kayseri Eğitim ve Araştırma Hastanesi dahiliye yoğun bakım ünitesinde 2013 yılında gelişen hastane infeksiyonlarının değerlendirilmesi. ANKEM Derg., 28(3): 86-93.
- Gransden, W.R., Leibovici, L., Eykyn, S.J, Pitlik, S.D., Sarma, Z., Konigsberger, H.1995. Risk factors and a clinical index for diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. Clin. Microbiol. Infect., 1: 119-123.
- Güçlü Üsküdar, A., Kılıç, A., Bedir, O., Yılmaz, S., Güney, M. 2013. Yoğun bakım ünitelerinden izole edilen karbapenemaz aktivitesi gösteren çoklu ilaç dirençli *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında metallo-beta-laktamaz üretimin araştırılması. Gültepe Tıp Derg., 55: 176-180.
- Gül, M., Şensoy, A., Çetin, B., Korkmaz, F., Seber, E. 2004. Türk hastane enfeksiyonu etkeni *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında seftazidime duyarlılığının E-test ve disk difüzyon yöntemleri ile araştırılması. Mikrobiyol. Cem. Derg., 34: 33-36.
- Gülay, Z. 1999. Antimikrobiyal ilaçlara direnç. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitapevi, 91-101 p.
- Gültekin, E., Uyanık, M.H., Hancı, H., Erdil, Z., Gelen, N.F., Çelebi, S. 2014. Kan kültürlerinden izole edilen non-fermentatif Gram-negatif bakterilerin çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları. ANKEM Derg., 28(3): 79-85.
- Gültepe, B., Iraz, M., Ceylan, A., Doymaz, Z.M. 2014. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotiklere direnci. ANKEM Derg., 28(3): 32-36.

- Gür, D. 2002. Bakterilerde antibiyotiklere karşı direnç. In: İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Edited by Topçu A.W, Söyletir G, Doğanay M. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 182-186.
- Güven, Ö., Ünver, D., Özdemir, S. 2008. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinin antibiyotiklere duyarlılıkları ve beta-laktam direnç fenotipleri. Türk Mikrobiyol. Cem. Derg., 38: 112-116.
- Hanberger, H., Garcia Rodriguez, J.A, Gobernado. M. 1999. Antibiotic susceptibility among aerobic Gram-negative bacilli in intensive care units in 5 European countries. French and Portuguese ICU Study Groups. JAMA. 281:167.
- Hancock, R.E. 1998. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other non-fermentative Gram-negative bacteria. Clin. Infect. Dis., 1: 93- 99.
- Hiett, K.L., Seal, B.S. 2009. Use of repetitive element palindromic PCR (rep-PCR) for the epidemiologic discrimination of foodborne pathogens In: Molecular Epidemiology of Microorganisms, Methods in Molecular Biology (eds), Vol. 551 Humana Press, a part of Springer Science + Business Media, LLC, 49-58 s.
- Houwink, A.L. 1953. A macromolecular monolayer in the cell wall of *Spirillum* spec. Biochim. Biophys. Acta., 10: 360-366.
- Işık, Y. 2008. *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinde kinolon direncinin moleküler olarak saptanması. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 111 s.
- İnce, N., Geyik, F.M., Özdemir, D., Öksüz, Ş., Danış, A. 2014. Hastane infeksiyonu etkeni olan *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının yıllara göre antibiyotik duyarlılıklarının karşılaştırılması. ANKEM Derg., 28(3): 94-99.
- Jackman, P.J.H. 1985. Bacterial taxonomy based on electrophoretic whole-cell protein patterns. Goodfellow, M.; Minnikin, D. E. (Eds.). Chemical methods in bacterial systematics. London: Academic. Pres., 1115-1129 p.
- Jawetz, E., Melnick, J.L., Adelberg, E.A. 2010. Tıbbi Mikrobiyoloji, Prof. Dr. Osman Sadi Yenen (edt), Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 161 s.
- Jureen, R., Harthug, S., Sornes, S., Digranes, A., Willems, R.J., Langeland, N. 2004. Comparative analysis of amplified fragment length polymorphism and pulsed field gel electrophoresis in a hospital outbreak and subsequent endemicity of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium*. FEMS Immunol. Med. Microbiol., 40: 33-9.

- Kabadjova, P., Dousset, X., Le Cam, V., Prevost, H. 2002. Differentiation of closely related *Carnobacterium* food isolates based on 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer region polymorphism. Appl. Environ. Microbiol., 68(11): 5358-5366.
- Karakoç, C., Tekin, R., Yeşilbağ, Z., Çağatay, A. 2013. Risk factors for mortality in patients with Gram-negative rod bacteremia. Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 17: 951-7.
- Kaya, T. 2008. Çeşitli endüstriyel atık maddelerde bazı mikroorganizmaların yüzey aktif özelliklerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Kaya, Y. 2009. Seyhan baraj gölünden izole edilen *Enterobacteriaceae* grubu bakterilerde antibiyotik dirençliliği ve plazmid profillerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Kerr, K.G., Snelling, A.M. 2009. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. J. Hosp. Infect., 73: 338-344.
- Khaled, D.K., Neilan, A.B., Henriksson, A., Conway, P.L. 1997. Identification and phylogenetic analysis of *Lactobacillus* using multiplex RAPD-PCR, FEMS Microbiol. Lett., 153: 191-197.
- Kılıç, A.U. 2012. Hastane enfeksiyonuna neden olan mikroorganizmaların epidemiyolojisi. In: Emine Alp. Enfeksiyon kontrol programı. Kayseri: Erciyes, 15-24 s.
- Kıska, D.L., Gilligan, P.H. 2003. *Pseudomonas* In: Baron JE, Pfaller MA, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover RH. (eds) Manual of Clinical Microbiology 8th edition. ASM Press Washington DC: 719-28 p.
- King, E.O., Ward, M.K., Raney, D.E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. J. Lab. Clin. Med. 44(2): 301-307.
- Kipnis, E., Sawa, T., Wiener-Kronish, J. 2006. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. Médecine et Maladies Infectieuses, 36: 78-91.
- Knothe, P., Shah, P., Kremery, V., Antal, M., Mitsuhashi, S. 1983. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens* infections, 11: 315-317.

- Koh, A.Y., Priebe, G.P., Pier, G.B. 2005. Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in a murine model of gastrointestinal colonization and dissemination in neutropenia. *Infect. Immun.*, 73: 2262-2272.
- Kunert, A., Losse, J., Gruszin, C., Hühn, M., Kaendler, K., Mikkat, S., Volke, D., Hoffmann, R., Jokiranta, T.S., Seeberger, H., Moellmann, U., Hellwage, J., Zipfel, P.F. 2007. Immune evasion of the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*: elongation factor Tuf is a factor H and plasminogen binding protein. *J. Immunol.*, 179: 2979-2988.
- Küçükbasmacı, Ö., Midilli, K., Issa, G., Güven, Ö., Gönüllü, N. 2009. VIM ve IMP metallo beta laktamaz genlerinin hızlı saptanması için yeni bir mulpleks PZR metodu. *Türkiye Klinikleri J. Med. Sci.*, 30(4): 1312-1316.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*, 227: 680-685.
- Lambert, P.A. 2002. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J R Soc Med*; 95(S41): 22-26.
- Leid, J.G., Willson, C.J., Shirliff, M.E., Hasset, D.V., Parsek, M.R. 2005. The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN- γ -mediated macrophage killing. *The Journal of Immunology*, 175: 7512-7518.
- Leverstein-van Hall, M.A., Paauw, A., Box, A.T.A, Blok H.E.M., Verhoef, J., Fluit, A.C. 2002. Presence of integron-associated resistance in the communit is widespread and contributes to multidrug resistance in the hospital. *J. Clin. Microbiol.*, 40: 3038-3040.
- Livermore, M.D. 2002. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* : Our worst nightmare. *Clin. Infec. Dise.*, 34: 634-640.
- Maejima, K., Deitch, E.A., Berg, R.D. 1984. Bacterial translocation from the gastrointestinal tracts of rats receiving thermal injury. *Infect. Immun.*, 1:6-10.
- Malçok Kuzucu, H., Uyanık, H.M., Aktaş, O., Ayyıldız, A. 2006. Dış kulak yolu kültür sonuçlarının değerlendirilmesi. *The Eura. J. Med.* 38(3): 85-88.
- Matar, G.M, Chaar, M.H, Araj, G.F, Srour, Z., Jamaledine, G., Hadi, U. 2005. Detection of a highly prevalent and potentially virulent strain of *Pseudomonas aeruginosa* from nosocomial infections in a medical center. *BMC Microbiol.*, 5: 29.

- Mueller, U.G, Wolfenbarger, L.L. 1999. AFLP genotyping and finger-printing. Trends Ecol. Evol., 14: 389-94.
- Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Pfaller. M.A. 2008. Medical Microbiology. 6th ed. Philadelphia, USA: Mosby Elsevier, 333-338 p.
- Nikbin, V.S., Abdi-Ali, A., Feizabadi, M.M., Gharavi, S. 2007. Pulsed field gel electrophoresis ve plasmid profile of *Pseudomonas aeruginosa* at two hospitals in Tehran, Iran. Indian J. Med. Res., 126: 146-151.
- (NNIS). 2004. National Nosocomial Infections Surveillance System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October. Am. J. Infect. Control., 32(8):470-485.
- Oie, S., Fukui, Y., Yamamoto, M., Masuda, Y., Kamiya, A. 2009. In vitro antimicrobial effects of aztreonam, colistin, and the 3-drug combination of aztreonam, ceftazidime and amikacin on metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*, BMC Infect. Dis., 10(9): 123.
- Ohl, C.A., Matthew, P. 2004. *Pseudomonas aeruginosa* and Related Bacteria. In: Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR. eds. Infectious Diseases: 3th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1703-1717 p.
- Olive, D.M, Bean, P. 1999. Principles and applications of methods for DNA based typing of microbial organisms. J. Clin. Microbiol., 37: 1661-1669.
- Önay, S.F., Derbentli, Ş. 1996. Muayene maddelerinden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının pyosin tiplendirimi ve bazı antibiyotiklere duyarlılığı. Klimik Derg., 9(2): 78-81.
- Özdemir, M., Erayman, İ., Türk Dağı, H., Baykan, M., Baysal, B. 2009. Hastane infeksiyonu etkeni *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları. ANKEM Derg., 23(3): 122-126.
- Özer, B., Oktun Tatman, M., Memiş, D., Oktun, M. 2006. Yoğun bakım ünitesinde hastane infeksiyonu etkenleri, antibiyotik duyarlılıkları ve antibiyotik kullanımı. Turk. J. Infect., 20(3): 165-170.
- Özer, B., Oktun Tatman, M., Memiş, D., Oktun, M. 2009. Characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from intensive care unit. Cent. Eur. J. Med., 4(2): 156-163.
- Paterson, D.L. 2006. The epidemiological profile of infections with multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. Clin. Infect. Dis., 43 (Suppl. 2): 43-48.

- Peix, A., Ramirez-Bahena, M.H, Velazquez, E. 2009. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. Infect. Genet. Evol., 9: 1132-1147.
- Perez, G., Cardell, E., Zarate, V. 2000. Protein fingerprinting as a complementary analysis to classical phenotyping for the identification of lactic acid bacteria from Tenerife cheese. Lait., 80: 589-600.
- Picon, A., Mattos, M.J., Postma, P.W. 2005. Reducing the glucose uptake rate in *Escherichia coli* affects growth rate but not protein production. Biotech. Bioeng., 90(2): 191-200.
- Pier, G., Ramphal, R. 2005. *Pseudomonas aeruginosa*. Ed: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th Edition, Elsevier Inc. Philadelphia, Pennsylvania, USA, 2587-2615.
- Pier, G., Ramphal, R. 2009. *Pseudomonas aeruginosa*. Ed: Mandell, G.L, Bennett, J.E, Dolin, R. eds. Principles and Practice of Infectious Diseases. 7th edition, Elsevier, Philadelphia, 2: 2835-60.
- Pitt, T.L. 1994. Bacterial typing systems: the way ahead. J. Med. Microbiol., 4: 1-2.
- Pitt, T.L. Simpson, A.J.H. 2006. *Pseudomonas* and *Burkholderia* spp. Ed: Gillespie SH, Hawkey PM, ed(s). Principles and Practice of Clinical Bacteriology. 2th ed. U.K.: John Wiley and Sons, 427-435 p.
- Poirier, Y. 2002. Polyhydroxyalkanoate synthesis in plants as a tool for biotechnology and basic studies of lipid metabolism, Prog. Lipid Res., 41: 131-155.
- Pollack, M. 2002. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. eds. Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th edition, Elsevier, Philadelphia, 2: 2310-2335.
- Radi, F., Rahma, H. 2010. Study the Effect of Ethidium bromide SDS and Elevated Temperature on Stability of Multiple Antibiotic Resistances plasmid of *Pseudomonas aeruginosa*. Iraqi J. Biotechnol., 9(4): 796-811.
- Raymond, J. Aujard, Y. 2000. Nasocomial infections in pediatric patients: a European, multicenter prospective study. Infect. Control Hosp. Epidemiol., 21: 260-263.
- Regal, R.E., De Petsel, D.D., VandenBussche, H.L. 2003. The effect of an antimicrobial restriction programme on resistance to β -lactams in a large teaching hospital. Pharmacotherapy, 5: 618-624.

- Rose, J.K., Mosteller, R.D., Yanofsky, C. 1970. Tryptophan messenger ribonucleic acid elongation rates and steady-state levels of tryptophan operon enzymes under various growth conditions. *J. Mol. Biol.*, 51(3): 541–550.
- Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Li, J., Hachani, A., Kowalska, A., Filloux, A. 2010. High level antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: the ndvB gene is involved in the production of highly glycerol phosphorylated β -(1→3)-glucans, which bind aminoglycosides. *Glycobiology*, 20(7): 895-904.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, U.S.A., 1102 p.
- Shah, U.M., Mahmood, M., Umsan, J., Kalem, F., Khalid, A. 2013. Gram-negative organisms in community acquired respiratory tract infections. *J. Microbiol. Infec. Dis.*, 3(1): 8-11.
- Shahcheraghi, F., Feizabadi, M.M., Yamin, V., Abiri, R., Abedian, Z. 2003. Serovar determination, drug resistance patterns and plasmid profiles of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients at two hospitals of Tehran (IRAN). *Burns*, 29: 547-551.
- Smith, S., Ganiyu, O., John, R., Fowora, M., Akinsinde, K., Odeigah, P. 2012. Antimicrobial resistance and molecular typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from surgical wounds in Lagos, Nigeria. *Acta. Med. Iran.*, 50(6): 433-438.
- Stapper, A.P., Narasimhan, G., Ohman, D.E., Barakat, J., Hentzer, M., Molin, S., Kharazmi, A., Høiby, N., Mathee, K. 2004. Alginate production affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development and architecture, but is not essential for biofilm formation, *J. Med. Microbiol.*, 53: 679–690.
- Struelens Marc, J., Gheldre, Y.D., Deplano, A. 1998. Comparative and library epidemiological typing systems outbreak investigations versus surveillance systems. *Infec. Cont. Hosp. Epidemiol.*, 19: 565-569.
- Şen A.A., 2006, Çiğ sütte *Pseudomonas aeruginosa* sayılması için yöntem modifikasyonları üzerinde çalışmalar, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği ABD, Ankara, 68 s.
- Teresa, C., Horan, M.A, Margaret, A.D. 2008. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting American. *J. Infec. Cont.*, 36: 309-332.

- Todar, K. 2008. *Pseudomonas aeruginosa*. Todar's Online Textbook of Bacteriology. 1-4.
- Tunçoğlu, E., Yenişehirli, G., Bulut, Y. 2009. Klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci. ANKEM Derg., 23(2): 54-58.
- Turgut, H., Turhanoglu, M., Çetin, C.B., Yalçın, A.N. 2002. Hastane infeksiyonu etkeni *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının bazı antibiyotiklere direnci. İnfek Derg., 16: 63-66.
- Turner, P.J. 2008. Meropenem activity against European isolates: report on the MYSTIC (Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection) 2006 results. Diag. Mic. Infect. Dis., 60(2): 185-192.
- Tümbay, E. 1981. *Pseudomonas aeruginosa*'nın tıbbi ve ekolojik önemi. 2. Ulusal Kürens Kongresi Kitabı; 98 s.
- Uçan, S.U., Açık, L., Çelebi, A., Erganiş, O., Arslan, E. 2003. Plasmids and protein patterns of *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis in Konya, Turkey. Turk. J. Vet. Anim. Sci., 29: 475-480.
- Urrea, M., Pons, M., Serra, M., Latorre, C., Palomeque, A. 2003. Prospective incidence study of nosocomial infections in a pediatric intensive care unit. Pediatric intensive care unit. Pediatr. Infect. Dis. J., 22: 490-493.
- Üstün, C. 2010. Hastane kökenli karbapenem dirençli ve duyarlı *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının çeşitli antibiyotiklere direnç oranları. ANKEM Derg., 24(1): 1-6.
- Vahaboğlu, H., Akhan, S. 2008. *Pseudomonas aeruginosa* ve diğer *Pseudomonas* türleri, In: Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, Topçu A W, Söyletir G, Doganay M, (eds), Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul, 2175-2186 s.
- Van Delden, C., Iglewski, B.H. 1998. Cell-to-Cell Signaling and *Pseudomonas aeruginosa* Infections. Emerg. Infect. Dis., 4(4): 551-60.
- Van Pelt, C., Verduin, C.M., Goessens, W.H.F., Vos, M.C., Tümmler, B., Segand, C., Reubsaet, F., Verbrugh, H., Van Belkum, A. 1999. Identification of *Burkholderis* spp. In the clinical microbiology: comparison of conventional and molecular methods. J. Clin. Microbiol., 2158-2164.
- Vincent, J.L., Bihari, D.J., Suter, P.M., Bruining, H.A., White, J., Nicolas-Chanoini M.H. 1995. The prevalence of nosocomial infections in intensive care units in Europe:

- Results of the European Prevalence Infection in Intensive Care (EPIC) Study. JAMA, 274(8): 639-644.
- Vincent, J.L., Rello, J., Marshall, J., Silva, E., Anzueto, A., Martin, C.D., Moreno, R., Lipman, J., Gomersall, C., Sakr, Y., Reinhart, K. 2009. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. JAMA, 302(21): 2323-2329.
- Walia, T.M., Williamson, T., Kaiser, A., Tewari, R. 1988. Usefulness of protein patterns, serotyping and plasmid DNA Profiles in the epidemiologic fingerprinting of *P. aeruginosa*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 7: 248-255.
- Welsh, J., Mc Clelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nuc. Acids Res., 18: 7213-7218.
- Wessel, D., Flugge, U.I. 1984. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. Annal. Biochem., 138: 141-143.
- Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nuc. Acids Res., 18: 6531-6535.
- Wilson W, Sande M. 2004. Enfeksiyon Hastalıkları Tanı ve Tedavi. Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul, 567-578 s.
- Winn, W.C., Allen, S.D., Janda, W.M., Koneman, E.W., Procop, G.W., Schreckenberger, P.C., Woods, G.L. 2006. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th ed. Philadelphia, USA: Lippincott Williams Wilkins. 317-323 p.
- Yağcı, A., Tunç, Y., Soyletir, G. 2002. Elastase and alkaline protease production by *Pseudomonas aeruginosa* strains: comporasion of two procedures. New Microbiol., 25: 223-229.
- Yılmaz, S., Gümrall, R., Güney, M., Bedir, O., Güçlü Üsküdar, A., Duyan, S., Başustaoğlu, C.A. 2013. İki yıllık dönemde kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilmesi. Gültepe Tıp Derg., 55: 247-252.
- Yolbaş, İ., Tekin, R., Kelekçi, S., Selçuk, T.C., Okur, H.M., Tan, İ., Uluca, Ü. 2013. Common pathogens isolated from burn wouds and their antibiotic resistance patterns. Dicle Tıp Derg., 40(3): 364-368.

- Yücel, M., Yavuz, T., Kaya, D., Behçet, M., Öztürk, C.E., Şahin. İ. 2006. *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının antibiyotiklere direnç oranlarının yıllar içinde değişimlerinin izlenmesi, ANKEM Derg., 20(3): 152-155.
- Zaidi, N., Konstantinou, K. 2003. The role of molecular biology and nucleic acid technology in the study of human infection and epidemiology. Arch. Pathol. Lab. Med., 127: 1098-1105.

7. EKLER

EK-1. Suşların Tanısında Kullanılan Besi Yerleri

1. Mueller Hinton Agar Besi Yeri

Mueller Hinton Agar (MHA) (Merck)	36 g
Damıtık Su	1000 ml
pH	7.0 ± 0.2

Besi yerinde 38 g tartılarak 1 l damıtık suda çözülür, otoklavda 121°C’de 15 dk sterilize edilir ve 50°C’ye soğutulup, petri kaplarına dökülür (15-20 ml), +4°C’de saklanır.

2. Mueller Hinton Broth

Mueller Hinton Broth (Oxoid)	21 g
Damıtık Su	1000 ml
pH	7.0 ± 0.2

Besi yeri damıtık suda çözüldükten sonra eritilir ve tüplere dağıtılarak otoklavda 121°C’de 15 dk sterilize edilir.

3. %6 ve %8.5 Oranında NaCl İçeren Nutrient Broth

Nutrient Broth	13 g
NaCl	60 g – 85 g
Damıtık Su	1000 ml
pH	6.9 ± 0.2

Uygun miktarlarda tartılan besi yeri ve NaCl damıtık su içerisinde çözündürülür ve tüplere dağıtılarak otoklavda 121°C’de 15 dk sterilize edilir.

4. Nitrate Broth (NB)

Nitrate Broth (Acumedia)	23 g
Damıtık Su	1000 ml
pH	7.0

Dehidre besi yeri 23 g olacak şekilde distile su içerisinde çözülür. İçerisinde durham tüpü bulunan tüplere 10'ar ml dağıtılıp otoklavda 121°C'de 15 dk sterilize edilir.

5. SIM Medium

SIM medium (Merck)	30 g
Damıtık Su	1000 ml
pH	7.3 ± 0.2

Besi yerinden 30 g tartılarak damıtık su içinde çözülür. Sonra tüplere dağıtılarak 121°C'de 15 dk sterilize edilip dikey konumda dondurulur.

6. Deoksiribonükleaz (DNaz) Agar

DNaz Agar (Oxoid)	39 g
Damıtık Su	1000 ml
pH	7.3

Besi yerinde 39 g tartılarak damıtık suda çözülür, otoklavda 121°C'de 15 dk sterilize edilir. 50°C'ye soğutulan besi yeri steril petri kaplarına dökülür.

7. Tripton (İndol) Broth Bileşimi

Trypton (Merck)	3 g
Sodyum Klorür (Oxoid)	0.3 g
Damıtık Su	100 ml
pH	7.0

Gerekli miktarlar tartılıp 100 ml damıtık suda eritilir, tüplere dağıtılır ve otoklavda 121°C’de 15 dk sterilize edilir.

8. MR-VP Broth (Merck)

MR-VP (Merck)	17 g
Damıtık Su	1000 ml
pH	7.0

Gerekli miktarlar tartılıp damıtık suda eritilir, tüplere dağıtılır ve otoklavda 121°C’de 15 dk sterilize edilir.

9. Simmon’s Sitrat Agar Bileşimi

Simmon’s Sitrat Agar (Oxoid)	25 g
Damıtık Su	1000 ml
pH	7.0

Gerekli miktarlar tartılıp damıtık suda eritilir. Ağız kapalı tüplere 3 ml dağıtıldıktan sonra otoklavda 121°C’de 15 dk sterilize edilir. Sterilizasyondan sonra tüpler bir pipet üzerine yatık vaziyette konur ve besi yerinin katılaşması sağlanır.

EK-2. Araştırmada Kullanılan Boya ve Diğer Çözeltiler

1. Kristal Viyole

Kristal Viyole	10 g
Etil Alkol (%95'lik)	100 ml

2. Lügol

İyot	1 g
Potasyum İyodür	2 g
Damıtık su	300 ml

3. Bazik Fuksin

Bazik Fuksin	3 g
Etil Alkol (%95'lik)	100 ml

4. Serum Fizyolojik

Sodyum Klorür	8.5 g
Damıtık su	1000 ml

5. İyot Çözeltisi

İyot	1 g
KI	2 g
Damıtık Su	100 ml

KI suda çözündükten sonra iyot ilave edilir ve çözmeye devam edilir. Membran filtreden geçirilip renkli şişede 2-3 hafta bekletilir.

6. Alfa-naftol Çözeltisi

Alfa-naftol	5 g
Etil Alkol	100 ml

7. KOH çözeltisi

Potasyum Hidroksit	10 g
Damıtık Su	100 ml

8. Metil-Red Ayracı

Metil Red	0.050 g
Etil Alkol (%95)	150 ml
Saf Su	100 ml

Metil Red, alkolde eritildikten sonra damıtık su eklenerek çözülür. Oda sıcaklığında saklanır.

9. Kovaks Ayracı

Para-dimetilaminobenzaldehit	5 g
n-Amil alkol	75 ml
Konsantre HCl	25 ml

10. Griess-Ilosvay Ayracı

Alfa naftilamin % 0.5 (A) + sulfanilik asit %0.8 (B).

11. Katalaz Test Ayracı

Hidrojen peroksit (H_2O_2) (%30'luk)'den 3 ml alınarak 97 ml distile su ile iyice karıştırılır.

EK-3. Poliakrilamid Jel Elektroforezinde Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

1. Akrilamid + N,N'-Metilen Bis-akrilamid Monomer Stoğu

Akrilamid (Oxoid)	28.8 g
Bis-akrilamid (Oxoid)	1.2 g

Maddeler gerekli miktarda tartılıp 75 ml damıtık su içersinde çözülerek son hacim 100 ml'ye tamamlanır. Whatman No:1 filtre kağıdından süzülerek renkli cam şişede + 4°C'de saklanır.

2. Ayırma Jel Tamponu (1.5 M Tris-HCL, pH 8.6)

Gerekli miktar trizma bazı tartılarak bir miktar damıtık suda çözöldükten sonra 1N HCl ile pH 8.6'ya ayarlanır. Son hacim tamamlandıktan sonra Whatman No:1 filtre kağıdından süzölür ve + 4°C'de saklanır. SDS-PAGE için %0.4 oranında SDS ilave edilir.

3. Yığma Jel Tamponu (0.5 M Tris-HCL, pH 6.8)

Gerekli miktar trizma bazı tartılarak bir miktar damıtık suda çözöldükten sonra 1N HCl ile pH 6.8'e ayarlanır. Son hacim tamamlandıktan sonra Whatman No:1 filtre kağıdından süzölür ve + 4°C'de saklanır. SDS-PAGE için %0.4 oranında SDS ilave edilir.

4. Tank Buffer

Trizma Bazı (Sigma)	1.21 g
Glisin	5.76 g

Maddeler 1000 ml damıtık suda çözölür. SDS-PAGE için %0.1 oranında SDS ilave edilir.

5. Laemmli Buffer (X4)

0.5 M Tris-HCl pH 6.8	5.12 g
Gliserin (Merck)	8.00 g
Damıtık Su	3.00 ml
SDS	2.00 ml
2-β-Merkaptoetanol	4.00 ml
Bromo Fenol Mavisi (Merck)	0.025 ml

Gerekli miktarlar tartılıp temiz bir deney tüpü içerisinde homojen hale getirilir ve karanlık ortamda saklanır.

6. Boyama Çözeltisi

Coomassie Brilliant Blue (Sigma)	1.5 g
İzopropil Alkol (Merck)	250 ml
Asetik Asit (Merck)	100 ml
Damıtık Su	650 ml

Boya çözündükten sonra Whatman No:1 filtre kâğıdından süzülür ve renkli cam şişede oda sıcaklığında saklanır.

7. Boya Çıkarma Çözeltisi

İzopropil Alkol (Merck)	250 ml
Asetik Asit (Merck)	100 ml
Damıtık Su	650 ml

Gerekli miktarlar tartılarak 650 ml damıtık suda çözündürülür. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında renkli cam şişede saklanır.

8. Jel Saklama Çözeltisi

Jel saklamak amacıyla %7'lik Glasial Asetik Asit çözeltisi kullanılır.

9. %10'luk Amonyum Per Sülfat (APS)

APS	1 g
Damıtık Su	10 ml

Gerekli miktarlar tartılarak damıtık suda çözülür ve + 4°C'de saklanır. Bir haftadan sonra taze hazırlanarak kullanılır.

10. %10'luk SDS-PAGE Ayırma Jel İçeriği

Akrilamid/Bis-akrilamid (Oxoid)	8.78 ml
Damıtık Su	10.84 ml
1.5 M Tris-HCL pH 8.6	6.58 ml
APS (Sigma)	100.00 µl
TEMED (Oxoid)	10.00 µl

Gerekli miktarlar tartılarak kısa sürede süspansiyon hazırlanır. Polimerleşme başlamadan dikey elektroforezin alt kısmına aktarılır.

11. %12'lik SDS-PAGE Ayırma Jel İçeriği

Akrilamid/Bis-akrilamid (Oxoid)	12 ml
Damıtık Su	10.5 ml
1.5 M Tris-HCL pH 8.6	7.8 ml
APS (Sigma)	125.00 µl
TEMED (Oxoid)	10.00 µl

Gerekli miktarlar tartılarak kısa sürede süspansiyon hazırlanır. Polimerleşme başlamadan dikey elektroforezin alt kısmına aktarılır.

12. %4'lük SDS-PAGE Yığma Jel İçeriği

Akrilamid/Bis-akrilamid (Oxoid)	0.81 ml
Damıtık Su	2.95 ml
0.5 M Tris-HCL pH 6.8	1.235 ml
APS (Oxoid)	50.00 µl
TEMED (Oxoid)	6.00 µl

%10'luk SDS-PAGE polimerleştikten sonra, yukarıdaki maddelerden gerekli miktarlar tartılarak kısa sürede süspansiyon hazırlanır. Polimerleşme başlamadan dikey elektroforezde %10'luk SDS-PAGE kısmın üzerine aktarılır. Polimerleşme başlamadan en kısa zamanda hava boşluğu bırakılmadan tarak yerleştirilir.

EK-4. Plazmid Analizinde Kullanılan Çözeltiler

1. Tris-EDTA (TE) Solüsyonu: 10 mM Tris-HCL pH 8.1 mM EDTA

1 ml 1 M Tris-HCL pH 8,0

0.5 ml 1 M EDTA pH 8.0 alınır ve damıtık su ile 100 ml tamamlanır.

2. SDS, %10

10 g SDS alınır ve damıtık su ile 100 ml tamamlanır.

3. 5M NaCl

141.6 g NaCl alınır ve damıtık su ile 500 ml tamamlanır.

4. CTAB/NaCl

NaCl	4.1 g
Damıtık su	90 ml
CTAB	10 g

4.1 g NaCl 90 ml damıtık suda çözülür ve 10 g CTAB yavaşça eklendikten sonra 65°C'ye kadar ısıtılarak karıştırılır.

5. Kloroform/izoamil alkol solüsyonu

24:1 oranına göre karıştırılarak hazırlanır.

6. Fenol/kloroform/izoamil alkol solüsyonu

25:24:1 oranına göre karıştırılarak hazırlanır.

7. Tris-Borat EDTA (TBE) Solüsyonu: 1X, pH 8.0

Trizma Bazı (Sigma)	10.8 g
Asit Borik (Sigma)	5.5 g
0.5 M EDTA, pH 8.0	4 ml
Damıtık Su	1000

8. Yükleme Solüsyonu (Loading Buffer)

Üre (Merck)	4 M
EDTA Merck)	0.025 M
Sükroz (Sigma)	%60
Bromfenol Blue (Sigma)	%0.025
Ksilen (Merck)	%0.025

ÖZGEÇMİŞ

Melike TEKERCİ 1991 yılında İstanbul’da doğdu. İlk, orta, lise öğrenimini İstanbul’da tamamladı. 2007 yılında girdiği Sinop Üniversitesi Biyoloji Bölümü’nden 2011 yılında mezun oldu. 2013 yılı bahar döneminde Sinop Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı ve halen devam etmektedir.