

ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YANIK TEDAVİSİ GÖREN HASTALARDA *PSEUDOMONAS*
AERUGINOSA'NIN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TESPİTİ-IRAK THİ-QAR
EYALETİ NASİRİYAH EĞİTİM HASTANESİ ÖRNEĞİ

Ruaa Mohsin Jumaah JUMAAH

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2023

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Ruaa Mohsin Jumaah JUMAAH tarafından hazırlanan “**Yanık Tedavisi Gören Hastalarda *Pseudomonas Aeruginosa*'nın Moleküler Yöntemlerle Tespiti-Irak Thi-Qar Eyaleti Nasiriyah Eğitim Hastanesi Örneği**” adlı tez çalışması 27/07/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Oral DÜZDEMİR

Eş Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Amran Mezher LAWAS

Jüri Üyeleri :

Başkan : Doç. Dr. Atilla ÇAKIR
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı
Bingöl Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Oral DÜZDEMİR
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Mehmet SEZGİN
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Hamit ALYAR

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum “**Yanık Tedavisi Gören Hastalarda *Pseudomonas Aeruginosa*'nın Moleküler Yöntemlerle Tespiti-Irak Thi-Qar Eyaleti Nasiriyah Eğitim Hastanesi Örneği**” konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan “Bilimsel İntihal Tespit Programı”yla tarandığını, “intihal içermediğini” beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim (27/07/2023).

Ruaa Mohsin Jumaah JUMAAH

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

YANIK TEDAVİSİ GÖREN HASTALARDA *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*'NIN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TESPİTİ-IRAK THİ-QAR EYALETİ NASİRİYAH EĞİTİM HASTANESİ ÖRNEĞİ

Ruaa Mohsin Jumaah JUMAAH

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Oral DÜZDEMİR
Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Amran Mezher LAWAS

15 Nisan-15 Haziran 2022 tarihleri arasında Dhi Qar vilayeti Nasiriyah Eğitim Hastanesi'nden yüz elli yanık sürüntüsü örneği toplanmıştır. Bu çalışmanın amacı, Irak, Dhi Qar'daki yanık yaralarından *P. aeruginosa*'nın bulunması ve teşhis edilmesidir. Tanımlamayı doğrulamak için VITEK 2 kompakt sistemden alınan gram negatif bakteri tanımlama kartları (ID gNB) kullanılmıştır. *P. aeruginosa*'yı diğer türlerden ayırt etmek için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi kullanılarak 16S rDNA geni (956 bp) tanınmış olup, virülans geni (*lasB*) polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi kullanılarak taranmış ve elde edilen sonuçlara göre: 48 (%96) izolat, *lasB* için PCR pozitif olmuştur. Antibiyotiklere gelince, tüm izolatlar -laktam grubundan sefalosporinlere ve penisilinlere dirençli çıkmıştır. Bulgular, test edilen tüm izolatların ampiciline (%100) dirençli olduğunu göstermiştir. Çalışmanın amacı, biyokimyasal testler kullanılarak *Pseudomonas aeruginosa*'nın yanık yaralanmasından izolasyonu, tanımlanması ve Vitek 2 sistemi kullanılarak doğrulanması, *P.aeruginosa*'nın farklı antibiyotiklere dirençli izolatlarının tespit edilmesi ve ayrıca *P.aeruginosa* izolatlarında 16SrDNA geni ve *lasB*, virülans faktör geni Polimeraz Zincir Reaksiyonu kullanılarak değerlendirilmesidir.

2023, 64 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: *P. aeruginosa*, 16SrDNA, *LasB* geni, PCR

ABSTRACT

Master of Science Thesis

DETERMINATION OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* BY MOLECULAR METHODS IN PATIENTS REVIEWING BURNS-IRAQ THI-QAR PROVINCE NASIRIYAH TRAINING HOSPITAL EXAMPLE

Ruaa Mohsin Jumaah JUMAAH

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

Advisor: Prof. Dr. Oral DÜZDEMİR
Co-Advisor: Asst. Prof. Dr. Amran Mezher LAWAS

One hundred fifty samples of burn swabs were collected from Nasiriyah Teaching Hospital province of Dhi Qar between 15 April 2022 - 15 June 2022. This study's goal was to find, and diagnose *P. aeruginosa* from burn wounds in Dhi Qar, Iraq. Gram-negative bacteria identification cards (ID gNB) from the VITEK 2 compact system were used to verify the identification. To distinguish *P. aeruginosa* from other species, the 16S rDNA gene (956 bp) was recognized using the polymerase chain reaction (PCR) method, and the virulence gene (lasB) was screened using the polymerase chain reaction method, and the results indicated that 48 (96%) isolates were PCR positive for lasB. As for antibiotics, all isolates were resistant to cephalosporins and penicillins from the -lactam group. The findings indicated that all isolates tested were resistant to ampicillin (100%). The aims of the study are the isolation, and identification of *P. aeruginosa* from burn injury by using biochemical tests and confirming it using the Vitek 2 system. Detection of the resistant isolates of *P. aeruginosa* for different antibiotics. In addition, assessment of the 16SrDNA gene, and lasB, virulence factor gene in *P.aeruginosa* isolates by using Polymerase Chain Reaction.

2023, 64 pages

Keywords: *P. aeruginosa*, 16SrDNA, LasB gene, PCR

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tez danışmanım Prof. Dr. Oral DÜZDEMİR 'e sabrı, yol göstericiliği ve anlayışı için teşekkür ederiz. Eş danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Amran Mezher LAWAS. Bu araştırmanın tamamlanmasında büyük katkıları olan aileme teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

Ruaa Mohsin Jumaah JUMAAH

Çankırı, Temmuz 2023



İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER DİZİNİ	vii
KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	3
2.1 Yanıklar	3
2.1.1 Yanık türleri.....	3
2.1.2 Cilt katmanları.....	4
2.1.3 Yanma hızının belirlenmesi	5
2.2 Yanık Enfeksiyonunun Patofizyolojisi.....	6
2.2.1 Yanık hastalarının bakteriyel enfeksiyonları.....	7
2.2.2 Nozokomiyal enfeksiyonlar	7
2.3 <i>Pseudomonas</i> Cinsi.....	8
2.3.1 <i>Pseudomonas</i> türlerinin tarihçesi ve taksonomik sınıflandırması	8
2.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
2.4.1 <i>Pseudomonas</i> türlerinin doğal habitatı	10
2.4.2 Hastane kaynaklı <i>P. aeruginosa</i> enfeksiyonları	10
2.4.3 Topluluk ortamında immün yetmezliği olan hastalar.....	12
2.4.4 Toplum ortamında bağışıklığı baskılanmış hastalar	12
2.5 <i>P. aeruginosa</i> 'nın Virulans Faktörleri.....	13
2.6 Biyofilm Oluşumu	15
2.7 Antibiyotiklere <i>P. aeruginosa</i> Direnci	15
2.8 Mutasyonlar.....	17
2.8.1 Mutasyon türleri	18
2.9 Bakterilerin Moleküler Yöntemlerle Tespiti ve Genotiplenmesi.....	18

2.9.1 Nükleik asit amplifikasyon teknolojisi.....	19
2.9.2 Gerçek zamanlı amplifikasyon	19
2.9.3 Mikroorganizma moleküler tipleme.....	20
2.10 Kütle Spektrometresi.....	20
3. MATERYAL VE METOT	21
3.1 İzolasyon ve Tanımlama Çalışmaları.....	21
3.1.1 Besiyeri ortamının hazırlanması	21
3.1.2 Solüsyonların ve reaktiflerin hazırlanması	23
3.1.3 Tanımlama	26
3.1.4 Biyokimyasal testler.....	26
3.2 VITEK 2 ile İzolatların Tanımlanması.....	29
3.2.1 Vitek® 2 sistemi	29
3.2.2 Vitek 2 kompakt sisteminin tanımı	29
3.2.3 Örnek hazırlama.....	29
3.2.4 Bakteri süspansiyonunun VITEK kartlarına yüklenmesi	30
3.2.5 Kart izolasyonu ve inkübasyonu	30
3.2.6 Optik sistem.....	30
3.2.7 Test reaksiyonu	30
3.3 Antibiyotik Duyarlılık Testleri	31
3.4 Astarların Hazırlanması.....	31
3.4.1 PCR karışımının hazırlanması	31
3.4.2 PCR termo döngü koşulları	32
3.4.3 Bakteri ekstraksiyonu (DNA)	33
3.5 Agarozun Hazırlanması.....	34
3.6 Jel Elektrophorezi	34
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	35
4.1 İzolasyon ve Tanımlama.....	36
4.1.1 Bakteri teşhisi.....	36
4.1.2 Biyokimyasal testlerle teşhis	38
4.1.3 Vitek2 sisteminin sonuçları.....	40
4.2 Bakteri Antibiyotik Duyarlılık Testi	41
4.3 Genetik Çalışma	43

4.3.1 Gen 16s rDNA'sının saptanması	43
4.3.2 <i>P. aeruginosa</i> virölans geninin saptanması	44
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	46
KAYNAKLAR	47
EKLER.....	59
ÖZGEÇMİŞ.....	64



SİMGELER DİZİNİ

β	Beta
L	Litre
μ L	Mikrolitre
mL	Mililitre
MM	Milimetre
NM	Nanometre
N	Normal
Sec	Saniye
$^{\circ}$ C	Santigrat derece
Ver	Sürümü
%	Yüzde

KISALTMALAR DİZİNİ

AST	Aspartat aminotransferaz
DW	Damıtılmış su
DNA	Deoksiribonükleik asit
WHO	Dünya sağlık örgütü
AIDS	Edinilmiş bağışıklık yetmezliği sendromu
PCR	Polimeraz zincirleme reaksiyonu
UV	Ultraviyole



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Tıbbi bir görüntüleme yanık bölgeleri. Santral nekrozu çevreleyen staz ve hiperemi bölgeleri (Hettiaratchy and Dziewulski 2004)	4
Şekil 2.2 Derinin Yapısı (Lawton 2019)	5
Şekil 2.3 Şekil, farklı vücut bölümlerine bağlı olarak vücudun yanıktan etkilenen alanını belirlemek için Wallace 's tahmini oranlarının kullanımını göstermektedir (Hettiaratchy and Dziewulski 2004).....	6
Şekil 2.4 <i>P. aeruginosa</i> 'nın insan vücudundaki enfeksiyonları (Ryan and Ray 2004)...	11
Şekil 2.5 Biyofilm oluşumunda yer alan başlıca adımlar (Köse and Yapar 2017).....	15
Şekil 4.1 Yanık hastalarının cinsiyete göre dağılımı	35
Şekil 4.2 Yanık hastalarının yaşa göre dağılımı	35
Şekil 4.3 (A) Streamide agar (B) Kanlı agar (C) MacConcy agar'da <i>Pseudomonas aeruginosa</i> kolonisi	37
Şekil 4.4 <i>P. aeruginosa</i> için IMVIC testi.....	39
Şekil 4.5 <i>P. aeruginosa</i> için antibiyotik inhibisyon çapları	42
Şekil 4.6 PCR ürününü tanımlamak için agaroz jel %0,8 üzerinde 70 V'ta bir saat boyunca jel elektroforezi. 16S rDNA gen 956 bp . şerit M: 100 bp DNA merdiveni, şerit 1-12 ise <i>P. aeruginosa</i> 'yı temsil etmektedir	43
Şekil 4.7 Standart PCR kullanılarak ürün boyutu (300bp) ile <i>P. aeruginosa</i> lasB geni için amplifiye edilmiş jel elektroforezi. 30 dakika boyunca 70 V/cm'de %0,8 agaroz. DNA merdiveni Yolu (E) (100).....	44

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Bakteri izolatlarının genotipik tespiti için kullanılan PCR primerleri	31
Çizelge 3.2 PCR tekniğinin bileşeni	32
Çizelge 3.3 Gene 16Sr için termal döngü programı.....	32
Çizelge 3.4 Las B primerleri ile termocycler PCR'de kullanılan amplifikasyon programı	32
Çizelge 4.1 Hastaların sosyo-demografik özelliklerine ilişkin gözlemlenen frekanslar ve yüzdeler.....	36
Çizelge 4.2 <i>P. aeruginosa</i> 'nın tanımlanması için biyokimyasal testler	39
Çizelge 4.3 <i>P. aeruginosa</i> izolatlarının antibiyotik direnci	41

1. GİRİŞ

Elektrik çarpması, radyoaktif radyasyon, yüksek sıcaklıklar ve kimyasal maddeler yanıkların potansiyel nedenlerindendir. Yanıklar, önemli bir küresel sağlık yükünü temsil etmektedir (Mabrouk *et al.* 2016). Cilt, enfeksiyona karşı ilk ve son koruma hattı olduğu için yanıktan sonra ilk gözden geçirilmesi gereken şeylerden biridir. Bir sağlık sorunu olarak eradikasyonun imkânsız olması ve enfeksiyondan korunmak için yakından takip edilmesi gerektiğinden, bu durum son yıllarda birçok çalışmanın odak noktası olmuştur (Rowan *et al.* 2015). Hastaneye 72 saat sonra gelen yanık hastalarında nozokomiyal enfeksiyonlarla ilişkili enfeksiyonlar gelişme olasılığı daha yüksektir, daha uzun süre hayatta kalan ilaca dirençli bakterilerin neden olduğu bir enfeksiyon daha tehlikeli olmaktadır. Gram boyama, hastanın yatışının başında bulunan mikroorganizmalar için pozitif, sonunda bulunan mikroorganizmalar için negatif sonuçlar vermektedir (Lachiewicz *et al.* 2017).

Yanık, bağışıklık sisteminin işlev bozukluğun yol açar. Böylece hasta, derinin doğal bariyerinin kaybına veya inflamatuvar yanıtın bir sonucu olarak sinyal göndermekten sorumlu sinirlerin bozulmasına bağlı olabilecek şekilde hastalığa yatkın hale gelir. Bu da, doğal ve kazanılmış bağışıklık yanıtında bozulmalar meydana getirebilmektedir (Neely *et al.* 2014). Gram boyamada negatif sonuçlar veren bakteriler, antibiyotiklere dirençli, uluslararası düzeyde en yaygın bakterilerden biri olmaktadır. Geniş spektrumlu tedavilerin kullanımının artması geniş çapta tanıtılmalarını artırmaktadır (Johnson *et al.* 2017). Enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılan antibiyotiklerin göreceli eksikliği sonucu gram negatif bakteriler hastanın hayatını olumsuz etkileyen inflamasyona neden olur ve etkileri, hastanın hastanede uzun süre kalması, ilaca dirençli bakterilerle enfeksiyona karşı o kadar duyarlı olma olasılığını artırmaktadır. *Pseudomonas aeruginosa* su, toprak ve nemli ortamlarda bulunduğu farklı çevre koşullarına uyum sağlama yeteneği nedeniyle yanık yaralarında bulunan patojenik bakterilerden biridir (Singh *et al.* 2010). Hasarlı dokularda hızla yayılarak, ciddi hastalıklara, kronik ve akut enfeksiyonlara neden olması nedeniyle yanık yaralarının önemli bir kolonisidir. Bu nedenle de e hastanelerde ve özel bakım salonlarında yaygın olarak görülmektedir. İdrar

yolu enfeksiyonları, cilt enfeksiyonları ve pnömoni, bu bakterinin sıklıkla neden olduğu birçok hastane kaynaklı hastalık türlerinden sadece birkaçıdır (Markou and Apidianakis 2014).

P. aeruginosa'da son zamanlarda görülen antibiyotik direncindeki artış, tüm dünyada büyük bir endişeye neden olmaktadır. Çoklu ilaca dirençli (ÇİD) suşlar, büyük olasılıkla yanık servislerinde ve yoğun bakım ünitelerinde (YBÜ) geniş spektrumlu antibiyotiklerin kötüye kullanılması sonucu ortaya çıkmış ve bakteriler üzerinde seçim baskısı oluşmuştur. *P. aeruginosa* MDR şu anda dünya çapındaki nozokomiyal enfeksiyonların %40 ila %60'ını oluşturmaktadır (Ghanbari *et al.* 2016). *P. aeruginosa*, çeşitli antibiyotik sınıflarına direnç için çeşitli yollara sahiptir. Genişletilmiş spektrumlu beta-laktamazlar ve metallo- β -laktamazlar dahil olmak üzere çeşitli enzimlerin sentezi, birincil direnç mekanizmalarından birinde beta-laktamları ve karbapenemleri devre dışı bırakmaktadır (Hassuna *et al.* 2015).

P. aeruginosa ayrıca çeşitli enerji kaynaklarını kullanma, çeşitli yüzeylere tutunma ve bakteri hücrelerinin birleşerek biyofilmlere dönüşen biyokütle ürettiği düşük besinli ortamlarda hayatta kalma yeteneğine sahiptir (Ghanbari *et al.* 2016). Bu zarlar, antimikrobiyal ajanların bakterilere ulaşmasını sınırlamak için çalışır ve onları hem insan bağışıklık sisteminden hem de antibiyotiklerden korumaktadır (Mulcahy *et al.* 2014). Tüm bu nedenlerin bir sonucu olarak bakteriler her türlü antibiyotiğe karşı giderek daha dirençli hale gelmektedir.

Bu çalışmanın amacını, yanık yaralarından izole edilen *P. aeruginosa*'nın suşlarının biyokimyasal testler kullanılarak ve Vitek 2 sistemiyle tanımlanması ve farklı antibiyotiklere dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının tespitiyle, *P. aeruginosa* izolatlarında 16SrDNA geni ve lasB virülans faktör geninin geninin kullanılarak değerlendirilmesi oluşturmaktadır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Yanıklar

Hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde yanık yaralanmalarında halk sağlığına öncelik verilmelidir. Kontraktürler, ciddi yara izleri ve etkilenen vücut kısmında işlevsel bozulma gibi çok sayıda olumsuz yan etkisi vardır (Agbenorku 2013). Cilt, yanık hasarından önemli ölçüde etkilenmektedir (Norman and Judkins 2004). Yanıklara sıcak sıvılar, ısı, radyasyon, açık alev, elektrik ve sıcak su şişeleri neden olabilmektedir (Jabir *et al.* 2013). Dünya çapında yanık prevalansı hem gelişmekte olan hem de gelişmiş ülkelerde sosyoekonomik ve kültürel değişkenlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Poulos *et al.* 2009).

2.1.1 Yanık türleri

Yanık şiddeti seviyeleri, yanık yaralanmalarını (1. 2. ve 3. derece yanıklar) kategorize etmek için kullanılmaktadır. Genellikle yanık olarak bilinen inhalasyon yaralanmaları, birisi duman veya ısıtılmış buharlar aldığı anda meydana gelmektedir (Wise and Levine 2015).

Birinci derece (yüzeysel) yanıklarda cildin sadece en dış tabakası yaralanarak renk değişikliği (siyahlarda koyulaşma, beyazlarda kızarıklık), ödem, rahatsızlık ve kuruluk oluşmaktadır. Çoğu insan da bu yanıklar üçle altı gün içinde iyilemektedir. Ağrı, kabarma, şişlik ve cildin üst ve alt katmanlarında hasar, ikinci derece yanıkları (kısmi kalınlık) karakterize etmektedir. Bu yanıklar tipik olarak iki ila üç hafta içinde iyileşmekte, ancak bazıları daha uzun sürebilmektedir. Genellikle üçüncü derece yanık olarak bilinen tam kat yanıklar, tüm epidermisi etkiler. Tendonlar, kemikler, hayati organlar ve kan damarları ciddi şekilde zarar görebilmektedir. Sinir yaralanması sonucu üçüncü derece yanıklarda ağrı hissedilmeyebilir. Kömürleşmiş, koyu kahverengi, mumsu, yükseltilmiş ve kösele gibi yanık bölgenin olası tanımlarıdır (Şekil 2.1) (Janet and Torpy 2009).



Şekil 2.1 Tıbbi bir görüntüleme yanık bölgeleri. Santral nekrozu çevreleyen staz ve hiperemi bölgeleri (Hettiaratchy and Dziewulski 2004)

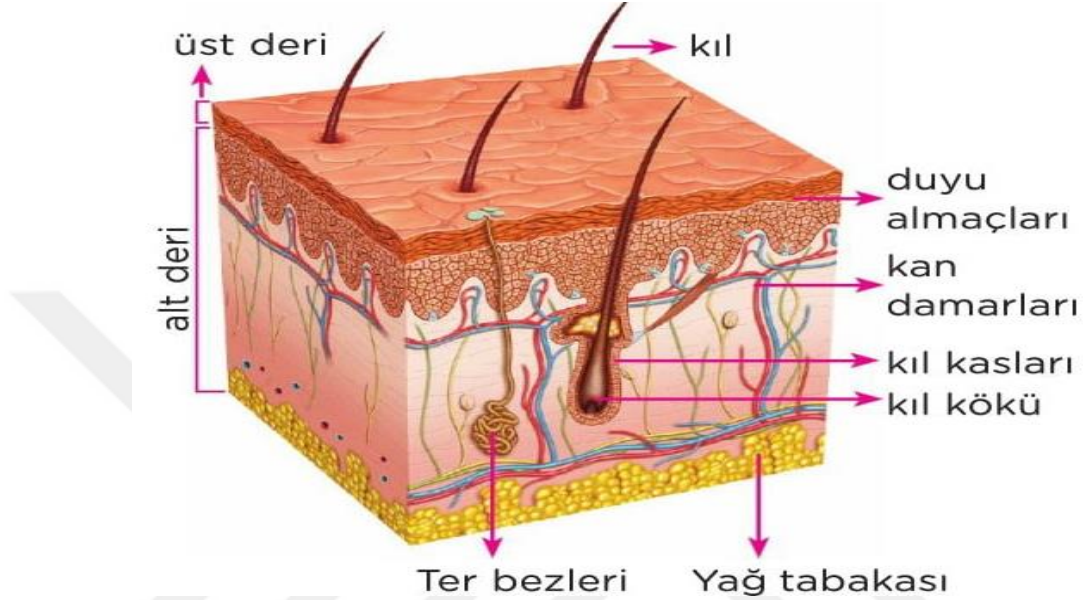
2.1.2 Cilt katmanları

Deri, yetişkin bir insanda toplam vücut ağırlığının yaklaşık %15'ini oluşturmaktadır ve bu da onu vücuttaki en büyük organ haline getirmektedir. Cilt, vücuttan aşırı su kaybını önlemek, dış fiziksel, kimyasal ve biyolojik tehditlere karşı korunmak, termoregülasyona yardımcı olmak gibi çok çeşitli kritik görevleri yerine getirmektedir. Vücut derisinin yüzeyini kaplayan mukoza zarları sabit kalmaktadır (Kanitakis 2002).

Epidermis, dermis ve deri altı doku (bazen yağ tabakası olarak da bilinir), cildi oluşturan ve dışarıdan uzanan üç katmandır (Şekil 2.2). (Kanitakis 2002). Epidermisin temel görevi; dış dünya için fiziksel ve biyolojik bir bariyer görevi görerek tahriş edici faktörlerle alerjenleri dışarıda tutmak ve iç dengeyi korurken su kaybını en aza indirmektir (Rippa *et al.* 2019).

Dermisin başlıca görevleri epidermisi beslemek ve korunmasına yardımcı olmaktır. Ayrıca yara iyileşmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Epidermal uzantılar sıklıkla

dermiste veya deri altı zarlarda bulunur ancak derinin yüzeyiyle etkileşime girmektedirler (Rippa *et al.* 2019). Sinirler ve kan damarları ile iç içe olan hipoderm (yağ tabakası), cildin birincil yapısal desteği olarak işlev görür, vücudu soğuğa karşı yalıtır ve şok emilimine yardımcı olur (Lawton 2019).

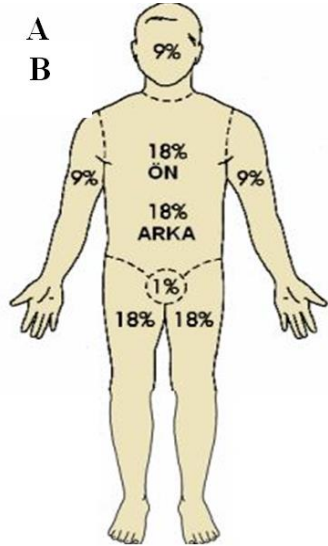


Şekil 2.2 Derinin Yapısı (Lawton 2019)

2.1.3 Yanma hızının belirlenmesi

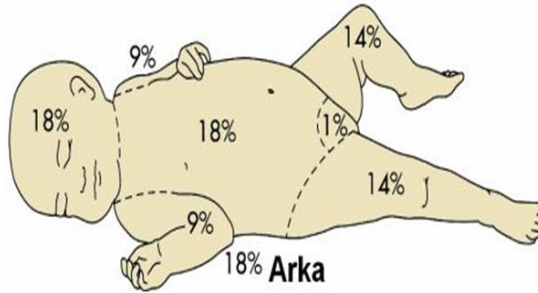
Yanık oranı, hastanın vücudunda meydana gelen yanık alanı olarak tanımlanmaktadır. Yanık hastalarının toplam vücut yüzey alanını (TBSA) belirlemek için acil servis sağlayıcıları tarafından sağlanan Wallace'ın Dokuzlar Kuralına (Dokuzlar Kuralı) (Şekil 2.3) dayanmaktadır. Yanık yüzey alanının belirlenmesi, hastanın cilt kırılması nedeniyle kaybettiği sıvının resüsitasyon gereksinimlerini karşılaması açısından çok önemlidir. Dokuz nokta kuralı yalnızca sırasıyla (kısmi kalınlık ve toplam kalınlık yanıkları) olarak da adlandırılan ikinci ve üçüncü derece yanıklar için de kullanılmaktadır. Bu kuraldan, hızlı bir değerlendirme yapmak ve hastanın sıvı ihtiyacını belirlemek amacıyla yararlanılmaktadır. Ayrıca bu kural, birçok çalışmada yanma oranını belirlemek için doktorlar ve hemşireler tarafından en sık kullanılan algoritmadır (Cheah *et al.* 2018). Yanma yüzdesi, yanan bölgenin vücudun bölümlerine bölünmesiyle belirlenmektedir.

Buna göre de baş % 9, boyun % 9, sağ kol % 9, sol kol % 9, sırt bölgesi % 18, genital bölge % 1, karın bölgesi % 18, tam sol ayak % 18, tam sağ ayak % 18'dir (Ali *et al.* 2016).



Erişkinlerde kullanılan Dokuzlar Kuralı:

- % 9 tüm baş ve boyun
- % 18 gövdenin ön yüzü
- % 18 gövdenin arka yüzü
- % 9 sağ kol
- % 9 sol kol
- % 18 Sağ bacak
- % 18 sol bacak,
- % 1 perine



Çocuklarda kullanılan Dokuzlar Kuralı:

- Yeni doğan ve bebekte ise baş büyük % 18
- alt ekstremitelerin her biri % 14
- kolların her biri % 9
- genital bölge % 1 kabul edilir

Şekil 2.3 Farklı vücut bölgelerine göre vücudun yanık bölgesini belirlemek için tahmini Wallace oranlarını gösterir. (A) YetiÇkinde dokuzlar kuralı (B) Çocuklarda dokuzlar kuralı (Hettiaratchy and Dziewulski 2004)

2.2 Yanık Enfeksiyonunun Patofizyolojisi

Yanık bölgelerini kolonize ve enfekte edebilen bakterilerin çok çeşitli olması şaşırtıcı bir durumdur. Yanığa maruz kalan cilt kademeli olarak granülasyon dokusu ile değiştirildiğinden, yanık bölgesinde bakteri kolonizasyonu için ideal olan protein açısından zengin, avasküler bir ortam oluşmaktadır. Bu septik süreç, bağışıklık hücrelerinin migrasyonunun bozulmasıyla da şiddetlenmektedir (Bayram *et al.* 2013).

Ciddi şekilde yanmış bireylerdeki bulaşıcı problemler çoğunlukla lokal ve sistemik konakçı hücrel ve hümorale immün yanıtların baskılanmasına bağlanabilir (Ghai *et al.* 2015). Yanık yarası enfeksiyonu, uzun süreli hastanede kalış, doku nekrozu, bağışıklığın baskılanması, deride yüksek mikrop konsantrasyonu, bağırsaktan bakteri göçü ve koğuşun aşırı kalabalık olması gibi bir dizi faktör tarafından şiddetlenmektedir (Baird and Shivananda 1997). Yara enfeksiyonu, immünsupresyona, yara lokal ortamına ve enfeksiyonun seyrine bağlı olarak patojenin virülansına bağlıdır. (Otta *et al.* 2015). Yanığın yüzeyi mikroplar tarafından kolonize edildikten sonra, invazivliklerine, lokal yara değişkenlerine ve hastadaki mevcut immünsupresyon seviyesine bağlı olarak canlı dokuya nüfuz etmeye başlayabilirler. Ölü deri (eschar) altı doku da enfekte olduğunda sistemik enfeksiyon olasılığı artmaktadır (Srinivasan *et al.* 2009).

2.2.1 Yanık hastalarının bakteriyel enfeksiyonları

Derinin yüzeylerini kolonize edebilen çeşitli mikroorganizmalar vardır. Hasta antibiyotik tedavisi almazsa cilt 5-7 gün sonra hastane ortamından ve hastanın solunumundan alınan gram pozitif ve gram negatif bakterilerle mikroorganizmalar dahil olmak üzere mikropların kolonizasyon ortamı haline gelmektedir (Rennie *et al.* 2013). Gram-negatif bakteriler, antibiyotik direncine katkıda bulunan virulent faktörler nedeniyle yanık yaralarının invazyonunda ve enfeksiyona katılımlarında ana role sahiptir. Gram-pozitif bakteriler deriyi normal floradan ve dışarıdan kolonize ederken, Gram-negatif bakteriler hastanın gastrointestinal florasından deriyi kolonize etmektedirler (Altıparlak *et al.* 2004). Bu bakterilerin patojenitesinin önemli bir kısmına yol açan çeşitli mekanizmalar kullanılarak birçok antibiyotiğe karşı daha dirençli oldukları gösterilmiştir (Dall'Aglio *et al.* 2003).

2.2.2 Nozokomiyal enfeksiyonlar

Yanıklara maruz kalan cilt nedeniyle, yanık hastalarında sıklıkla nozokomiyal enfeksiyonlar veya hastaneden edinilen enfeksiyonlar (HAI) gelişmektedir. Vücudun spesifik ve spesifik olmayan immün yanıtlarındaki bir değişiklik, cansızlaşmış ve vaskülarize dokunun varlığı, invaziv tanı ve tedavi prosedürleri, uzun süreli hastanede

kalma dahil olmak üzere, bir hastanın nozokomiyal bir enfeksiyona yakalanmasına birçok şey katkıda bulunabilmektedir (Öncül *et al.* 2009). Bir yanık sonrası açıkta kalan deri, bakteri ve diğer patojenler için bir iyi üreme alanı oluşturmakta ve bu da onu diğer yanık kurbanları için uzun vadeli bir enfeksiyona potansiyel bir neden haline getirmektedir (Falk *et al.* 2000).

Yanıklara maruz kalan insanlara sistemik antibiyotik verilmesi tartışılan bir durumdur. Smaill and Grivell (2014) araştırmalarına dayanarak, sistemik antibiyotik profilaksisinin (SAP) yanık yarası sepsisini önlemediği ancak yanık yaralarında *Pseudomonas* gelişimini desteklediği sonucuna varmışlardır. Hastane enfeksiyonlarını tedavi etme rejimleri arasında topikal antibiyotik kullanımı, yara debridmanı ve uygun çevre temizliği yer almaktadır (Smaill and Grivell 2014). İnvaziv tıbbi prosedürler ve tıbbi cihazların kullanımı HAI'nin yaygın nedenleridir (Peleg and Hooper 2010). *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ve *Acinetobacter baumannii* gibi nozokomiyal enfeksiyonların, bir yanık hastanesinde oldukça yaygın oldukları Leseva *et al.* (2013) tarafından bildirilmektedir.

2.3 *Pseudomonas* Cinsi

Pseudomonas, neredeyse tamamen doğal ortamlarda bulunabilen küresel bir mikroorganizmadır. İnsanlıkta, *Pseudomonas*'ın kistik fibroz (CF) hastalarının akciğerlerinde, AIDS hastalarında, yanık kurbanlarında ve göz enfeksiyonlarında bulunabilen fırsatçı patojen olduğu bilinmektedir. Patojenite, konakçının bağışıklık sisteminin zayıflamasına neden olan çok sayıda toksin salgılanmasına bağlanmaktadır. Bu da bakterilerin daha uzun süre hayatta kalma yeteneğine yol açmaktadır (Bodey *et al.* 1983).

2.3.1 *Pseudomonas* türlerinin tarihçesi ve taksonomik sınıflandırması

Pseudomonas türleri ilk olarak Gessard tarafından 1982 yılına tanımlanmış; *Pseudomonadaceae* ailesinin bir üyesidir. *Pseudomonas*, Yunanca "yanlış, sözde"

kelimesinden ve Latince “bir” anlamına gelen monas kelimesinden gelmektedir (Fatima *et al.* 2014). Yukarıda belirtilen sınıfın, 16S ribozomal ribonükleik asit (rRNA) gen dizisi gibi makromolekülleri koruduğu da bilinmektedir. *Pseudomonas* türleri daha önce Pseudomonad filumunun oldukça büyük bir bölümünü oluşturmaktadır.

2.4 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa insanlar, hayvanlar ve bitkiler arasında yaygın olarak bulunması nedeniyle önemli bir bakteri türüdür. Az miktarda insan ve hayvanlarda, hastane gibi nemli ortamlarda ve sağlıklı bireylerin derilerinde de bulunabilmektedir (Hassuna *et al.* 2015). Temel büyüme faktörleriyle bile gelişebilir ve çoğalabilir, bu da hastane enfeksiyonlarını yaymak için yüzeylerde ve tıbbi ekipman üzerinde uzun süre kalmasına izin vermektedir. Yaralardan ve yanıklardan irin lekeleyebilen mavimsi yeşil bir boya olan Pyocyanin ve UV ışığı altında parlayan sarı-yeşil bir boya olan Pyoverdinin (Fluorescein), üretilen ve laboratuvar teşhislerinde çok önemli olan iki boyadır (Forbes *et al.* 2007).

Deri doğal olarak vücudun dokularını korur, ancak bir yanık veya yara meydana geldiğinde, yanıkları ve yaraları olan birçok hasta için tehlike olarak görülen *Pseudomonas* spp. gibi bakteriler de dahil olmak üzere mikropların gelişimini ve çoğalmasını desteklemektedir. Lösemili ve bağışıklık yetersizliği olan hastalar, bu bakterilerin dolaşıma girme yeteneğinden etkilenerek bakteriyemiye ve nihayetinde sepsisemiye neden olabilir (Hassuna *et al.* 2015).

P. aeruginosa, MacConkey agar besiyerinde laboratuvar ortamında gelişebilir ve laktoz şekerini sindiremedikleri için de kolonileri soluk olup fermente üzüm gibi kokmaktadır. Kanlı agarda kolonilerin siyah bir tonu ve etraflarında yarı saydam bir bölge vardır, bu da hemolizin üreterek kanı (tip β -Hemolitik) hemolize edebildiklerini göstermektedir. Bu bakteriler 42 °C sıcaklıkta da büyüebilmekte ve dermatit, göz ve kulak enfeksiyonu, solunum yolu enfeksiyonu, idrar ve gastrointestinal enfeksiyonlar, endokardit, pnömoni gibi birçok hastalığa neden olabilmektedirler (Morin *et al.* 2021).

2.4.1 *Pseudomonas* türlerinin doğal habitatı

Pseudomonas türleri, bazı farklı çevrelerde bulunur, genellikle bitki örtüsünde, suda ve toprakta yaşar, ayrıca fiziksel olarak iyi durumdaki insanlardan dışkı, boğaz, deriden izole edilebilmektedir. *Pseudomonas* türleri, solunum ekipmanında ve hastane gıdalarında, lavabolarda, musluklarda ve paspaslarda sıklıkla kolonize olmaktadır. Kirli su ve yiyeceklerin sindirilmesi ve/veya fomitlerle temas yoluyla bir hastadan diğerine yayılmaktadırlar. Çeşitli bakteri türleri bitkileri, hayvanları ve insanları rahatsız eden fırsatçı patojenlerdir (Ryan and Ray 2004).

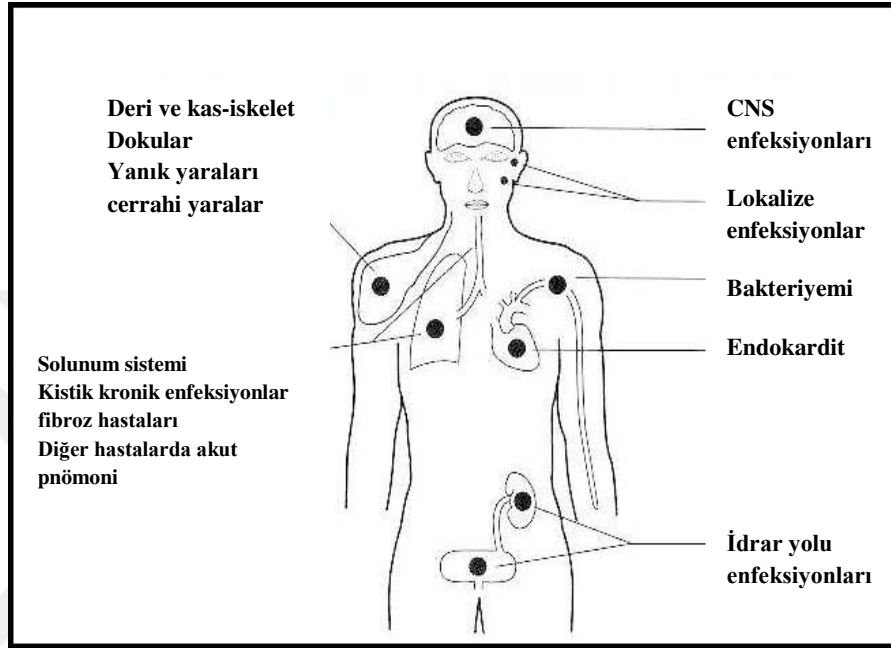
2.4.2 Hastane kaynaklı *P. aeruginosa* enfeksiyonları

Şekil 2.4'te gösterildiği gibi *P. aeruginosa*, belirli yerlerde çeşitli hastalıklara yol açmaktadır. Bir yanık veya ameliyattan sonra meydana gelen lokalize enfeksiyonlar genellikle sık ve yaygın ölümcül bakteriyemiye yol açmaktadır (Ryan ve Ray 2004). Bunlara ilaveten, kistik fibrozlu hastaların neredeyse tamamı sürekli olarak *P. aeruginosa* tarafından kolonize edilmektedir. Dikkate değer bir şekilde, kistik fibrozisli hastalar, muhtemelen dolaşımdaki *P. aeruginosa* antikorlarının artan evrelerinden dolayı, *P. aeruginosa* ve bakteriyemi neredeyse hiç görülmemektedir. Bununla birlikte, kistik fibrozlu hastaların neredeyse tamamı, sonunda lokalize *P. aeruginosa* enfeksiyonu nedeniyle ölmektedir (Alvi *et al.* 2020).

Nekrotizan *P. aeruginosa* pnömonisi, kirli solunum cihazı kullanımına bağlı olarak farklı insan türlerinde bulunabilmektedir. *P. aeruginosa*, bir göz yaralanması veya ameliyatından sonra kornea enfeksiyonuna neden olabilir. Kirli kültürlerde, özellikle orta kulak enfeksiyonu olan yavrularda bulunabilir. Nadiren lomber endokardit sonrası menenjit ve kalp ameliyatı sonrası yaraya yol açar. Aynı zamanda birkaç ishali hastalık epizoduyla da ilişkilidir (Wright and Romano 2006, Fujitani *et al.* 2017).

Organizma, ilk kez 1980'de bildirildiğinden bu yana bakteriyemi ile aşamalı olarak bağlantılıdır ve şu anda Gram-negatif bakteriyemi ile vakaların % 15'inden fazlasını

oluşturmaktadır. Yaklaşık % 50 ölüm oranı *P. aeruginosa* ve bakteriyemiyle ilişkilidir. Kulak ve göz gibi enfeksiyonlar lokalize olmakta; sepsis, yanık ve yara enfeksiyonları, lenfoma ve lösemi hastalarında enfeksiyonlar vb. yaygın olmaktadır. Bu tür farklılıklar doğrudan konakçı bağışıklık sisteminden etkilenmektedir (Bachta *et al.* 2020).



Şekil 2.4 *P. aeruginosa*'nın insan vücudundaki enfeksiyonları (Ryan and Ray 2004)

P. aeruginosa'dan kaynaklanan en büyük üç insan hastalığı, kömür madencilerinde, uzun süreli kontakt lens kullanan operatörlerde ve çiftçilerde şiddetli ülseratif keratit; akut yanık kurbanlarında kistik fibroz ve bakteriyemi hastalarında kronik akciğer enfeksiyonlarıdır. *P. aeruginosa* ayrıca idrar yolu ve osteomiyelit enfeksiyonlarına neden olabilmektedir. Bu tür bir patojen, konakçının müsinlerine ve hücrelerine yapışmayı uyaran, dokulara zarar veren, savunma mekanizmalarını bozan ve enflamasyonu ortaya çıkaran çeşitli özellikler sunmaktadır. Bu bakterilerin virülans faktörlerinin incelenmesi, hücresel ve moleküler seviyelerde *P. aeruginosa* patogenezi hakkında kapsamlı bir fikir vermektedir (Ryan and Ray 2004).

2.4.3 Topluluk ortamında immün yetmezliği olan hastalar

Hem bağıışıklığı yeterli hem de bağıışıklığı baskılanmış kişilerde *P. aeruginosa* çok geniş bir hastalık yelpazesine neden olabilmektedir. Organizmanın, bağıışıklığı yeterli kişilerde enfeksiyon oluşturabilmesi için, genellikle deri yaralanması veya idrar sondası takılması gibi konak savunmasını düşüren işlemlere ihtiyaç olmaktadır. Önceden sağlıklı olan insanlarda *P. aeruginosa* enfeksiyonunun tipik olarak tek alanları deri ve yumuşak dokulardır. Folikülitin bilinen nedeni, kadın idrar yolu enfeksiyonlarıyla da bağlantılı olan kirli jakuzilere, küvetlere ve yüzme havuzlarına maruz kalmaktır (Stryjewski and Sexton 2003). Kirlenmiş bir lif kabağı süngerinin kullanılmasının ardından, bir çalışmada *P. aeruginosa* folikülit ortaya çıkmıştır (Bottone and Perez 1993). Ek olarak, bacak epilasyonuna bağılı olarak da folikülit bildirilmiştir (Stryjewski and Sexton 2003). *P. aeruginosa*, kirli su ile temas sonrasında otitis eksternaya (yüzücü kulağı) neden olabilmektedir. Üst solunum yolu sıklıkla kolonize olmasına rağmen, daha önce sağlıklı olan kişilerde bunun sonucu olarak nadiren klinik hastalık gelişmektedir (Kiska and Gilligan 2003).

Herhangi bir travmayı takiben, *P. aeruginosa* bağılı yara enfeksiyonları sıkça görülmektedir. Damar içi uyuşturucu kullananlarda endokardit bildirilmiş ve kontakt lens kullanımına bağılı kornea ülserleri ve travmayı takiben diğerk oküler enfeksiyonlar da yaygın olarak görülmektedir (Kiska and Gilligan 2003). Çocukların kalkanöz osteomiyeliti, *P. aeruginosa* kolonize ayakkabılardan kaynaklanan delici yaralarla ilişkilendirilmiştir (Stryjewski and Sexton 2003). Toplulukta *P. aeruginosa* enfeksiyonlarındaki belirgin artışın kesin nedeni bilinmemekle birlikte, makul bir hipotez, exou gibi yeni virölans genlerinin yatay yayılması nedeniyle çevresel suşların daha öldürücü hale geldiğı bildirilmektedir (Seigel 2008).

2.4.4 Toplum ortamında bağıışıklığı baskılanmış hastalar

Yanıklar, *Diabetes mellitus* veya kanser ya da HIV gibi daha ciddi bağıışıklığı baskılanmış hastalıkları olanlar gibi bağıışıklığı baskılanmış kişiler sıklıkla *P. aeruginosa* enfeksiyonlarına yakalanır. Bu gibi durumlarda toplum içinde maruziyet ve

nozokomiyal edinimler hastalığa neden olabilir. *P. aeruginosa*, ABD'de *Staphylococcus aureus*'tan daha fazla yanık enfeksiyonuna neden olmaktadır (Stryjewski and Sexton 2003).

2.5 *P. aeruginosa*'nın Virulans Faktörleri

P. aeruginosa, nozokomiyal enfeksiyona neden olabilir ve çoğu ciddi toksijenik enfeksiyona neden olabilir. Enfeksiyon ve istilayı başlatmak için, bağışıklık sistemi savunmalarını bastırmaları ve ardından patogenezi yaymaya başlamaları, hayatta kalmaları ve bağışıklık sisteminden kaçmaları gerekir. Virülans faktörleri, *P. aeruginosa*'nın yüzeyinde belirir veya onun tarafından atılır; bunların bir kısmı, konağın epitel hücrelerine bağlanmasını sağlayan ve ekzoenzim S'yi üreten pili ve flagella gibi akut enfeksiyonlarda yer almaktadır. Bağlanmada rol oynar, ancak kronik enfeksiyonlarda yer alan başkaları da vardır, bunlar arasında siderofor pigmentleri vardır. Nan1 geni tarafından kodlanan nöraminidazlara Sialidazlar da denir. *P. aeruginosa*'nın virülansı iki kısma ayrılır: hücre dışı faktörler ve somatik antijenler (Alhazmi 2015).

P. aeruginosa, ekzoenzimler (Elastaz, ExoS, ExoT, ExoU, ExoY), pigmentler ve toksinler (Ekzotoksin A) gibi çok çeşitli hücre dışı faktörlere sahiptir. Alkalın proteaz akut enfeksiyona yol açar, akut akciğer enfeksiyonları ile de ilişkilidir. Özellikle yanık yaralardaki enfeksiyonlarda büyük miktarlarda Elastaz üretilmektedir. LasB çinko metaloproteaz (elastaz), LasA metalloendopeptidaz ve proteaz alkali içermektedir (Bielecki *et al.* 2008).). Hücre dışı protein ekzotoksin, renal tübüler nekroza, kanamaya ve karaciğer nekrozuna neden olabileceğinden *P. aeruginosa*'daki en önemli öldürücü ajanlardan biridir (Sabharwal *et al.* 2014).

Ekzotoksin, inhibisyon proteininin sentezi yoluyla kolonizasyon, dokuların parçalanması ve hücrelerin ölümü üzerinde çalışmaktadır. *Pseudomonas aeruginosa*, pyoverdın (sarımsı-yeşil) gibi suda çözünürlüğü olan birçok boya üretir, bu pigment, bakterilerin büyümesi için önemli olan demirin yokluğunda bakterilerin büyümesini sağlar ve birçok kalıcı enfeksiyona neden olmalarına yardımcı olur (Moreau -Marquis *et*

al. 2008). Piyosiyanin deri hücrelerinin büyümesini önleyen bir pigmenttir (Wilson *et al.* 1988) ve diğer pigmentler pyorubrin (kırmızı), bu boya bakterileri serbest radikallerin saldırısından kaynaklanan oksidatif stres ve pyomelanin (kahverengi) tarafından yok edilmekten korur (Ravel and Cornelis 2003). Mikroplardaki bu pigment, melanin çevresel strese karşı koruyucu bir madde görevi görür, örneğin melanin bakterileri antibiyotiklere dirençli hale getirir (Martínez *et al.* 2019). Elastaz ayrıca elastin, kollajeni degrade eder ve kan damarlarına müdahale eder (Azghani *et al.* 2000). KF hastasının balgam örneklerinde hem LasA hem de LasB tespit edilmiştir (Hollsing *et al.* 1987). Ayrıca *P. aeruginosa* salgıladığı ExoS, ExoU ve ExoT yanık dokuları işgal ettiğinde kanda adenosin difosfat ve fagosit hücrelerinin ribozilasyonuna sahiptir (Barbieri and Sun 2004). ExoU, epitelial ve makrofaj hücre sitotoksitesinde rol oynamaktadır (Sato and Frank 2004).

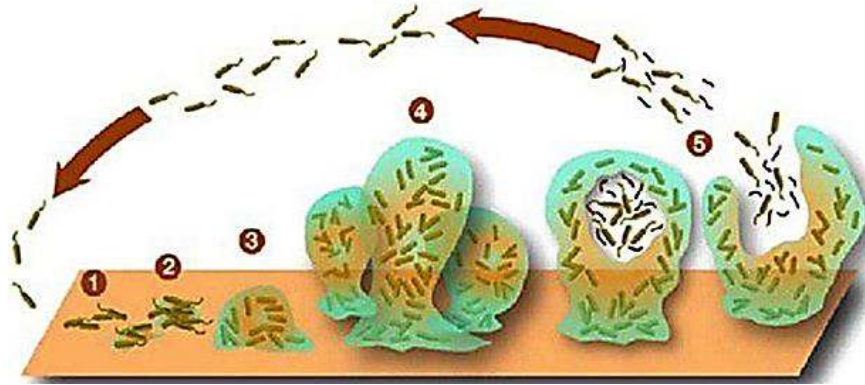
Somatik antijenler arasında Lipopolisakkarit (LPS), Ekzopolisakarit, Pili ve Flagellum bulunur. LPS, patogeneizde önemli rol oynayan ve konağın bağışıklık tepkisini bozan ve yüksek ölüm oranlarına yol açan gram negatif bakterilerin dış zarının ana bileşenidir, bakterilerin konak hücre yüzeylerine bağlanmasına yardımcı olmakta, yanık hastalarında nozokomiyal hastalığa, kronik hastalığa ve akut enfeksiyona katkıda bulunmaktadır (Rice and Wereszczynski 2018). LPS, lipid A (endotoksin), o-polisakkarit (O-antijen) ve oligosakaritten oluşmaktadır (Nikaido 2003). Ayrıca bakterileri toksinlere, fagositoza ve çevresel koşullara karşı korumak için aljinat geliştirir ve bağışıklık direncinde rol oynar (Leid *et al.* 2005).

Tip IV Pili ve flagellum, mikrobiyal yüzeylerdeki harekette yüzme motilitesi ile ilgilidir. Araştırmalar, flagellar proteinlerin dahil edilmesinin, konağın epitel hücrelerine bağlanmayı indükleyerek, hareketi önleyerek, Lasquorum algılama sistemlerini etkinleştirerek ve ardından biyofilm oluşturmak için hücreleri yaklaşık 10 µm kalınlığında kümeleyerek Rhl çekirdek algılaması sistemini etkinleştirilerek yapışma ve kolonizasyonda önemli bir rol oynadığını bulmuştur (Barken *et al.* 2008).

2.6 Biyofilm Oluşumu

Biyofilm, aljinat adı verilen *P. aeruginosa* tarafından üretilen harici bir polisakarit kalıbı içine gömülmüş bir dizi mikro koloniden oluşmaktadır. Sıvı maddeler biyofilmin temel malzemesi aracılığıyla moleküler difüzyonla iletilirken biyofilme giren bir su kanal ağı da vardır (Alhazmi 2015).

P.aeruginosa'nın biyofilm oluşumu birkaç aşamadan geçer, Şekil 2.5, bakterinin flagellum, pili tip 4, ekzoenzim S fimbria ve polisakkarit ile hedef hücrenin yüzeyine bağlandığı için yüzeye bağlanma aşaması olan Şekil 2.5, bakteriler biriktikten sonra Quorum-Sensing sisteminin aşaması başlar. Bu sistem, bakteri hücrelerinin bu zar içinde birbirleriyle iletişim kurmasına yardımcı olur ve ardından biyofilm kalıbının oluşum aşaması başlar, proteinler, nükleik asitler ve polisakkaritlerden oluşan Hücre Dışı Polimerler Maddesini (EPS) üretir, ardından alt popülasyon etkileşim aşaması ve daha sonra küçük veya tek koloniler olarak başka bir yerde biyofilm oluşturmak için göç ederler (Köse and Yapar 2017).



Şekil 2.5 Biyofilm oluşumunda yer alan başlıca adımlar (Köse and Yapar 2017)

2.7 Antibiyotiklere *P. aeruginosa* Direnci

Antibiyotikler, diğer organizmaların büyümesini engelleme potansiyeline sahip olan ve bir mikroorganizma tarafından belirli konsantrasyonlarda üretilen doğal organik maddeler olarak tanımlanmaktadır (Al-khafaji 2008).

P. aeruginosa'nın büyümesini veya öldürülmesini engelleyen birçok mekanizmaya sahip olan bu antibiyotiklerin bir grubu, penisilinleri (Piperacillin, Tazobactam Piperacilli, Ticarcillin, Ticarcillin Clavulanic asit), sefalosporinleri (Seftazidime, Cefepime) ve Karbapenemler (Imipenem, Meropenem) hem de Monobaktam grubunu (Aztreonam) içermektedir. Bu gruplar, Penisilin Bağlayıcı Proteinlere (PBP'ler) bağlanarak bakteri hücre duvarının sentezini inhibe etmektedirler. Peptidoglikan tabakasına (Transpeptidas) peptid köprülerinin oluşumunda rol oynayan enzimin etkisini inhibe ederler (Shuwaikh 2016).

Bakteriler üzerinde öldürücü etkiye sahip antimikrobiyal grup Aminoglikozitler, ribozomal üniteye müdahalesi ve bağlanması (30'lar) yoluyla protein sentezini inhibe ederek mRNA'nın yanlış okunmasına yol açarlar (Morita *et al.* 2014). Bakteri kromozomunun süper-sarılmasından sorumlu enzim giraz DNA'sının aktivitesini inhibe eden ve daha sonra ölüme yol açan, bakterileri öldüren kinolon antagonistleri grubudur (Lambert 2002).

P. aeruginosa'nın neden olduğu enfeksiyonları tedavi etmek için ayırım gözetmeyen ve yaygın antibiyotik kullanımı nedeniyle, halk sağlığı için ciddi bir tehdit oluşturan antibiyotiğe dirençli birkaç bakteri türü ortaya çıkmıştır. Yüksek miktarda tedaviye ve uzun süreye yol açması nedeniyle sağlık merkezlerinde ekonomik kayba neden olan, özellikle hastanelerdeki hastalarda temel sorunlardan olmuştur (Yusuf *et al.* 2017).

P. aeruginosa bakterisinin direnci internisc-dirençtir ve bakterinin dış duvarının geçirimsizliği ve antibiyotikleri hücre dışına taşıma yeteneği nedeniyle düşük etkili antibiyotik olan genetik özelliklerden sorumlu olan bakterilerin doğal direncinin bir göstergesi olarak adlandırılmıştır. Önceden hassas olan bakteri türlerinin dirençli suşlarının belirli antibiyotiklere maruz kaldıktan sonra ortaya çıkmasıyla oluşan kazanılmış direnç, transpozon, kromozomal mutasyonlar, resist plazmit (RP1) veya efflux pompalardan kaynaklanabilir (Ekizoğlu *et al.* 2016).

P. aeruginosa'nın çok sayıda antibiyotiğe direnmek için sahip olduğu mekanizmalardan biri, oprD tipi porin adı verilen protein açıklıklarını içeren bakterinin dış zarının

geçirgenliğindeki bir değişikliktir ve bu açıklıkların yerlerindeki herhangi bir değişiklik antibiyotik direncine yol açmaktadır (Cox *et al.* 2015). Penisilinler ve sefalosporinler gibi enzimler olan β -laktamaz üretimi yoluyla başka bir direnç mekanizması vardır. Bu enzimler, antibiyotiği etkisiz hale getirmek için bileşimindeki beta-laktam halkasını kırar. Bu antibiyotiklerin yaygın ve gelişigüzel kullanımı, birçok yolla bu bakterilere karşı direncin artmasında, yani Genişletilmiş Spektrumlu beta-laktamazların (ESBL'ler) üretilmesinde rol oynamıştır (Thakuria and Lahon 2013).

Kinolonlar, Trimetoprim, Tetrasiklin ve Makrolidler gibi beta-laktamazları hücre dışına pompalayarak direnmeye çalışan *P.aeruginosa*'nın sahip olduğu başka bir mekanizma (Mex AB-oprM) akış sistemleridir (Brooun *et al.* 2000). MexXY –oprM ile temsil edilen dışa akış sistemi, bu bakterilerin aminoglikozitlere karşı direncinden sorumludur; *P.aeruginosa*'nın antibiyotik aminoglikozit grubuna sürekli maruz kaldığında, bu sistem aracılığıyla direnç uyarılmaktadır (Morita *et al.* 2014).

Antibiyotik etki için hedef bölgedeki değişiklik, *P.aeruginosa*'nın beta-laktamaz direnç mekanizmalarından biridir. PBP'ler, beta-laktam antibiyotik ile birleşme bölgesini temsil ettiğinden ve bundan sorumlu genlerde herhangi bir genetik mutasyonun meydana gelmesi, bu bölgede bir değişikliğe yol açar ve böylece bakteri hücresinde hedef bölgenin tanınmamasına neden olmaktadır (Barbieri and Sun 2004). *P.aeruginosa*'nın anti-kinolonlara direnci, DNA giraz enzimindeki kromozomal mutasyonlardan kaynaklanmaktadır (Morita *et al.* 2014).

2.8 Mutasyonlar

Bir mutasyon, DNA'daki nükleotidlerin miktarında veya dizisinde, yeni nükleotit dizileri üreten ve daha sonra kromozom sayısında belirli özelliklerle yapı üzerinde bir etkiye sahip olan bir değişiklik olarak tanımlanır. Bu değişiklikler, genin görüntüsünün değişmesine veya başka bir duruma dönüşmesine yol açabileceği gibi, belirli bir enzim veya hormonun üretimi gibi belirli bir işlem için genin çalışmasının durmasına veya belirli bir faaliyetin üretiminin artması gibi tehlikeli olabilir (Brown 2002).

2.8.1 Mutasyon türleri

Mutasyonlar iki tipe ayrılır, birincisi gen mutasyonları (Bir nükleotit çiftinin değişimini içeren ve tek bir kromozom içindeki genlerin sayısında ve yapısında değişikliğe yol açan mikrolezyonlar veya nokta mutasyonları, kromozom yapısında değişiklikler) ve kromozom sayısındaki değişiklikleri içeren Makrovizyon adı verilen kromozom mutasyonlarıdır. Mutasyonlar, oluşum nedenlerine göre, organizma bilinen bir mutajene maruz kalmadığında ortaya çıkan spontan mutasyonlar olarak ikiye ayrılabilir. Oluşmalarının nedeni, organizmanın doğada radyasyona maruz kalması, hücre içinde meydana gelen biyokimyasal reaksiyonlar, doğal ısı değişimleri ve bazı kimyasal veya fiziksel maddelere maruz kalma sonucu oluşan yeni mutasyonlar olabilir (Brown 2002).

Nokta mutasyonları, tek bir nükleotidi veya birkaçını etkileyen, bunlarda geri dönüş meydana gelebilen mutasyonlardır ve bunların mutasyona uğramış iki türü vardır. Bir baz çiftini etkileyen ve onun başka bir baz çifti ikamesi ile yer değiştirmesine neden olan ve nitrojen bazları geçiş veya transformasyon ile yer değiştirir ve geçiş, pürinlerin yerine diğer pürinler veya pirimidinler ile yer değiştirmesinden kaynaklanan bir mutasyonu temsil eder pirimidinler, mutasyon transversiyonu (burada pürinin yerine pirimidin veya pirimidinin yerini pürin alır (Najafi and Pezeshki 2013).

Çerçeve kayması mutasyonlarına gelince, bunlar düşük bir baz çiftinin silinmesini veya eklenmesini içerir, çünkü bu mutasyonlar genetik materyalin küçük bir bölümünü etkiler, mRNA'nın üç bazdan oluşan genetik birimler tarafından bir proteine çevrildiğini ve her birimin kodon adı verilen mutasyon, bir bazın gende ve ardından mRNA'da sıkışması veya silinmesi durumunda gerçekleşir (Lmhof and Schlotterer 2001).

2.9 Bakterilerin Moleküler Yöntemlerle Tespiti ve Genotiplenmesi

Bakterilerin tanımlanması ve genotiplenmesi için 1983'ten beri çok sayıda moleküler teknik oluşturulmuştur. Bulaşıcı hastalıkların patofizyolojisi ve epidemiyolojisi ile ilgili

alışmalar bu tekniklerden büyük ölçüde yararlanmıştır. Tanısal mikrobiyolojide kullanılan birçok moleküler teknik řu gruplara ayrılabilir: enzimatik nükleik asit sindirimi, amplifikasyon ve moleküler yöntemler kullanılarak dizileme nükleik asit hibridizasyonu teknikleri. 1960'ların başlarında, DNA problemleri ile hibridizasyon deneyleri kurulmuştur. Basit virüsler, bakteriler, parazitler ve diğerk hastalıkların tümü, DNA problemleri kullanılarak başarıyla tanımlanmıştır. Doğrudan teşhis için nükleik asit prob hibridizasyonunun kullanımı basit ve hızlıdır. Hedef amplifikasyon teknikleri kullanılırken ortaya çıkacak kontaminasyon ve inhibisyondan çoğunlukla yoksundur.

Enfekte olan bir organizmanın antimikrobiyal duyarlılığını, önce onu izole edip büyütmeden doğrudan test etmek için, belirli antibiyotik direnç genlerini hedeflemek üzere özel gen problemleri da tasarlanmıştır. Artık çeşitli bakteri ve virüsler için DNA problemleri içeren ticari kitler bulunmaktadır (Almyroudis *et al.* 2007).

2.9.1 Nükleik asit amplifikasyon teknolojisi

Polimeraz zincir reaksiyonu, hedef nükleik asit amplifikasyonu (PCR) için en yaygın kullanılan yöntemdir. Bir nükleik asidin tek bir kopyası, bu teknik kullanılarak hızla 107'den fazla kopyalanabilmektedir. 25 ila 50 yinelemeli döngü sırasında, termostabil bir DNA polimeraz ve iki farklı oligonükleotid primeri, belirli nükleik asit bölgelerini çoğaltmaktadır (Almyroudis *et al.* 2007).

2.9.2 Gerçek zamanlı amplifikasyon

Geleneksel PCR tabanlı prosedürlerin oğ için çok sayıda modifikasyon gereklidir ve PCR ürünlerini tanımlamak için ayrı bir jel elektroforez ekipmanı kullanılmaktadır. Gerçek zamanlı PCR, geleneksel PCR'den daha hızlıdır ve kontaminasyona daha az eğilimlidir. Melezler geliştikçe, floresan etiketli problemler kullanarak güçlendirilmiş hedefi saptar (yani, amplikonun gerçek zamanlı saptanması). Üretilen sinyal, her döngünün sonunda mevcut olan amplikon miktarı ile orantılıdır ve amplikon miktarı gittikçe artmaktadır (Cai *et al.* 2003).

2.9.3 Mikroorganizma moleküler tiplemesi

Enfeksiyöz salgınlar sırasındaki epidemiyolojik bağlantıların araştırılması, enfeksiyon yollarının ve kaynaklarının tanımlanması, bulaşıcı hastalıkların epidemiyolojik sürveyansı, mikroorganizmaların moleküler karakterizasyonu ile mümkün olmaktadır. Epidemiyolojik araştırmalarda, klinik izolatların tanımlanması ve bazı bakteriyel izolatların göreceli öneminin belirlenmesi için moleküler parmak izi tekniklerinin kullanımı artmaktadır (Gönüllü 2015).

2.10 Kütle Spektrometresi

Büyük bir özgüllüğe sahip bir analitik yöntem olan kütle spektrometresinin kullanımı, numunelerin elementel bileşiminin analizinin yanı sıra parçacık ve molekül kütlelerinin ölçülmesine, moleküler kimyasal yapıların netleştirilmesine olanak tanır. Örneğin, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında MALDI-TOF MS bir teknik olarak, giderek daha fazla kullanılmaktadır (Meng *et al.* 2013).

3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışma için 15 Nisan 2022 ile 15 Haziran 2022 tarihleri arasında Dhi Qar ili Nasiriyah Eğitim Hastanesine başvuran farklı yaş gruplarındaki kadın ve erkek hastalardan 150 klinik sürüntü örneği toplanmıştır. Örnek alma esnasında tüm hastalarla ilgili bilgiler amaca (Cinsiyet, Yaş, İş, Medeni hal ve Eğitim geçmişi) yönelik olarak oluşturulmuş bir forma kaydedilmiş ve örnekler daha sonra doğrudan laboratuvara gönderilmiştir.

3.1 İzolasyon ve Tanımlama Çalışmaları

Uzman hekim kontrolünde örnekler alınmış ve bu örnekler, laboratuvarında steril koşullarda Kanlı Agar, MacConkey Agar gibi besiyerlerine kültür alınarak bakteriler izole edilmiştir.

3.1.1 Besiyeri ortamının hazırlanması

Araştırmada kullanılan besiyerlerinin hazırlanışına ilişkin bilgiler aşağıda sunulmuştur.

3.1.1.1 Kanlı agar

Kanlı agar, hazır besiyeri prepatından 40 gramı (g) 1000 mililitre (mL) D.W. içinde çözülerek hazırlanmıştır. Daha sonra ortam, 45 °C dereceye kadar soğutulmadan önce 121 °C derecede sterilizasyon için 15 dakika otoklavlanmış ve % 5 taze insan kanı eklenmiştir. Bu ortamda bazı bakteri türleri zenginleştirilmiştir (MacFaddin 2000).

3.1.1.2 Beyin-kalp infüzyon suyu

Beyin-kalp infüzyon suyu, 37 g'ın 1 litre D.W. içinde çözülmesi, karışımın 121 °C'de 15 dakika otoklavlanmış ve bakteriyel reaktivasyon için su kullanılmasıyla hazırlanmıştır (MacFaddin 2000).

3.1.1.3 Beyin-kalp infüzyon suyu - gliserol ortamı

Bu besiyeri, 20 mL gliserol ile 80 mL beyin-kalp infüzyon suyu karıştırılarak ve ardından 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak hazırlanmıştır. Bakteri izolatlarını uzun süre stokta tutmak için kullanılmıştır (MacFaddin 2000).

3.1.1.4 Mr-vp ortamı

Bu ortam, 17 g ortam 1000 mL damıtılmış suda çözülmesi, karışımın 121°C'de 20 dakika sterilize edilmesi ve elde edilen ortam MR-VP'nin glikoz miktarını ve tam hidrolizi ölçmek için kullanılmasıyla hazırlanmıştır. (MacFaddin 2000).

3.1.1.5 Simmon sitrat agar

24.28 g ortam 1000 mL D.W içinde çözülmüş, daha sonra sterilize etmek için 121 °C'de 20 dakika otoklavlanmıştır. Bu ortam, bakterilerin sitratı karbon kaynağı olarak kullanma yetenekleri, kullanılarak araştırılmıştır (MacFaddin 2000).

3.1.1.6 Mueller hinton agar

Ortam (38 g) bir litre damıtılmış suda karıştırılarak ısıtılmış ve tamamen eritmek için 1 dakika kaynatılmıştır. Sonra 121 °C'de 15 dakika otoklavlanmıştır. Eşit derinlik sağlamak için soğutulmuş Mueller Hinton agarı düz bir yüzey üzerinde sterilize edilmiş petrilere dökülerek, oda sıcaklığına soğutulmuştur. 25 °C'de nihai pH ($7,3 \pm 0,1$) için kontrol edilmiş, kaplar 2-8°C'de saklanmıştır (MacFaddin 2000).

3.1.1.7 MacConkey agarı

Bu besiyeri, 40 g agarın 1000 mL distile suda çözülmesi ve ardından 121°C'de 20 dakika otoklavlanmasıyla hazırlanmıştır. Bu tür ortamlar, seçici gram-negatif ortamlar olarak kullanılmıştır (MacFaddin 2000).

3.1.1.8 Kligler demir agarı

Bu besi yerini hazırlamak için 57.52 g besi yeri 1000 mL distile suda eritilmiş ve ardından 121 °C'de 20 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir (Kligler 1918).

3.1.1.9 Pepton

Bu besi yerini hazırlamak için 8 g pepton 1000 mL distile suda eritilmiştir. Sonrasında da bu karışım 121 °C'de 20 dakika otoklavlanmıştır. Bakteriyel amino asit triptofanı, indol ürününden ne kadar ayırabildiğini göstermek için kullanılmıştır (MacFaddin 2000).

Besin agarı:

Hazırlanması için 13 g besi suyu tozu 1000 mL distile su ile iyice karıştırılmış ve bu karışım son kaplara dökülerek ardından 121 °C'de 20 dakika otoklava koyulmuştur (MacFaddin 2000).

Besin suyu:

13 g besi suyu tozu 1000 mL distile su içinde çözülünceye kadar karıştırılmış, sonrada kaplara dökülerek, 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak hazırlanmıştır (MacFaddin 2000).

Etidyum bromür (%0,5):

Etidyum bromür (0.01 mg), 2 mL distile suda çözülerek hazırlanmış, daha sonra koyu renkli bir şişeye yerleştirilerek -40°C'de saklanmıştır (Sambrook and Russel 2001). Belirli bir DNA olarak elektroforez için kullanılmıştır.

3.1.2 Solüsyonların ve reaktiflerin hazırlanması

Solüsyonların ve reaktiflerin hazırlanması aşağıda açıklanmıştır.

3.1.2.1 Gram boyama

Gram boya, bakterilerin Gram reaksiyonunu belirlemek için kullanılmıştır. Gram boyama işlemi basamakları aşağıda verilmiştir.

- İyot çözeltisi/Gram iyot; kristal viyole (ana boya) (kristal viyoleyi hücre duvarına sabitleyen mordan).
- Boya sökücü (örn. etanol)
- Safranin (ikincil boya)
- Su (tercihen bir sprey şişesinde)

3.1.2.2 Katalaz reaktifi

50 mL steril damıtılmış suya (%70) 21 mL H_2O_2 eklenerek toplam da 100 mL hacime getirilerek % 3 konsantrasyonda bir hidrojen peroksit (H_2O_2) reaktifi üretilmiştir. Bu reaktif daha sonra steril bir şişede tutulmuştur. Katalaz enzimini yapmaktan sorumlu mikroorganizmalara ilişkin görüşler bu ortamdan derlenmiştir (MacFaddin 2000).

3.1.2.3 Oksidaz reaktifi

Bu reaktifi hazırlamak için 0.1 g tetra-metil-para-fenilen diamin hidrojen klorür 10 mL steril damıtılmış suda eritilerek şeffaf bir şişede saklanmıştır. Bu madde, bakterilerin oksidaz enzimleri üretilip üretilmeyeceğini belirlemek için oksidaz reaksiyonunda test edilmiştir (MacFaddin 2000).

3.1.2.4 Kovac reaktifi

5 gram p-dimetilamin benziladehit 75 mL amil alkolde çözüldükten sonra karışıma 35 mL saf HCL asit eklenmiştir. Burada primer amaç, indol üretiminin ilerlemesini izlemektir (Macfaddin 2000).

3.1.2.5 Metil kırmızı reaktif

Reaktif, 0,1 g metil kırmızısı boyanın %95 etil alkol içeren 300 mL etil alkol içinde çözülmesi ve hacmin distile su ile 500 mL'ye getirilmesiyle hazırlanmıştır. Bu reaktif, şekerlerin tamamen çözülüp çözülmediğini belirlemek için kullanılmıştır (MacFaddin 2000).

3.1.2.6 Voges-proskauer testi

Voges-proskauer testinde kullanılmak üzere Macfaddin'e (2000) göre, A ve B olmak üzere iki çözeltihazırlanmıştır: A. Naftol, 5 gram 1-naftol ile 100 mililitre %100 etil alkolün birleştirilmesiyle hazırlanmıştır. B. Glikozun kısmi hidrolizini belirlemek için kullanılan potasyum hidroksit (KOH) çözeltisi 40 g KOH 100 mL D.W içinde çözülmek suretiyle hazırlanmıştır.

3.1.2.7 Frazier reaktifi

Bu reaktif, 20 mL konsantre %98 saflıktaki HCL asidin 100 mL su ile karıştırılması ve içinde 15 g cıva klorürün ($HgCl_2$) çözülmesiyle hazırlanmıştır. Bu reaktif bakterilerin jelatini sıvılaştırma yeteneğini test etmek için kullanılmıştır (Collee *et al.* 1996).

3.1.2.8 McFarland çözümü

A ve B olmak üzere iki solüsyondan oluşmaktadır ve Baron *et al.*(1994) göre hazırlanmıştır. A solüsyonunun hazırlanması için 100 mL D.W. içinde, 1.175 g baryum klorürü ($BaCl_2 \cdot 2H_2O$) çözüldürülmüştür. B solüsyonu da 100 mL DW'nin 1 mL derişik sülfürik asit (H_2SO_4) ile karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. Daha sonra 99,5 mL B solüsyonuna 0,5 mL A solüsyonu eklenmiştir. Bu solüsyon kullanarak, bir bakteri süspansiyonunun bulanıklığını karşılaştırmak ve mililitrede yaklaşık $1,5 \times 10^8$ hücre içerdiğini bulmak mümkün olmuştur.

3.1.3 Tanımlama

Koloni morfolojisi:

Besleyici agar ve MullerHinton agar üzerinde yayılan koloniler, yayılabilir pigmentler ve tatlı üzüm kokusu üreterek karakterize edildi ve *P. aeruginosa* için ileri teşhis testleri için seçildi (MacFadden 2000). Kültürel özellikler arasında; koloni morfolojisi (düz mukoid), üzüm kokusu, Muller-Hinton agarda dağılabilir pigmentler (mavimsi yeşil veya sarımsı yeşil) (Collee *et al.* 1996).

Besin agarı: Büyüyen koloniler pigmentlere ve koku oluşumuna (üzüm benzeri koku) göre tanımlandı, kanlı agarda çoğu izolatin büyüyen kolonileri hemoliz tipine, oğul hareketine ve metalik parlak yanardönerlik görünümüne göre tanımlandı. Büyüyen koloniler MacConkey agar ve laktozu fermente etme yeteneklerine göre belirlendi (Macfaddin 2004).

3.1.4 Biyokimyasal testler

Araştırmada yer alan biyokimyasal testler hakkında aşağıda kısaca bilgiler verilmiştir.

3.1.4.1 Oksidaz testi

İncelenecek koloninin küçük bir kısmı alınarak birkaç damla yeni hazırlanmış % 1 oksidaz reaktifi ile ıslatılmış bir filtre kağıdına sürülmüştür Testin başarılı olduğuna dair gösterge 30 saniye içinde rengin mavi veya mor renge dönmesidir (Baron *et al.* 1994).

3.1.4.2 Katalaz testi

Temiz bir koloninin bir kısmına temiz, kuru bir lam üzerine birkaç damla %3 H₂O₂ serpilir ve gaz kabarcıklarının gelişimi testin başarılı olduğuna dair gösterge olarak kabul edilmektedir (Baron *et al.* 1994).

3.1.4.3 Kan hemoliz testi

Kanlı agar besiyerine saf bir bakteri kolonisi ekilerek, burada 37°C'de 24-48 saat üretilmiştir. Koloniyi çevreleyen temiz bir bölge β -hemolizi gösterirken, yeşil lekelenmenin varlığı α -hemolizi göstermiştir (Baron *et al.* 1994).

3.1.4.4 Jelatin sıvılaştırma testi

Jelatin agar besiyeri, test edilen organizmanın kolonisiyle inoküle miştir.ve ardından 24 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra plakalar, 5-10 dakika boyunca Frazier reaktifi çözeltisi ile sulanmıştır. Jelatin-sıvılaştırma, test edilen koloninin etrafındaki temiz bölgenin varlığıyla tanımlanmıştır (Collee *et al.* 1996).

3.1.4.5 Motilite testi

Motilite besiyeri tüpleri, bir aşılama iğnesi ile ortasından bir kez delindikten sonra 24-48 saat boyunca 35°C'de inkübe edilmiştir. Aşılama hattından hareketli bakteriler dağılmıştır (Baron *et al.* 1994).

3.1.4.6 Sitrat kullanım testi

İncelenen bakteriler, Simmon's Sitrata Slant Medium'un yüzeyi üzerine aşılansmış ve karışım daha sonra 37°C'de 1-3 gün kültüre alınmıştır. Kültür ortamı renginin yeşilden maviye değişmesi, sitratın tek karbon kaynağı olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir (Macfaddin 2000).

3.1.4.7 H₂S üretimi için Kligler demir agar testi

Yalnızca MacConkey agarında üretilmiş koloniler, tüpün tabanını delerek ve yüzeyi düz bir telle sıyırarak besiyerine enjekte edilmiştir. Bu arada indikatör fenol kırmızısı fermentasyonun olduğunun östergesi olarak sarı renge dönüşmüştür. 18 ila 24 saat

inkübasyondan sonra, besiyerinin tabanındaki ve eğimindeki pH değişiklikleri not edilmiştir.. Tipik olarak, gaz üretimi, agarda oluşturulan gazın besi yerinde meydana getirdiği kabarcıklar olarak görülmüştür. H₂S üretimi, siyah çökeltinin aşağıdan yukarıya reaksiyonu ile gösterilmektedir (Baron *et al.* 1994).

3.1.4.8 42°C'de gelişme

P. aeruginosa'nın sonraki alt kültürlerde 42°C'de büyüme kapasitesi ayırt edici bir özelliktir. Seçilen koloniler, besin sıvısı içeren tüplere enjekte edildi ve tüpler daha sonra 42°C'de 24 saat kültürlendi. *P. aeruginosa*, 42 °C'de karakteristik olarak yüksek bir büyüme kapasitesine sahipti (Macfaddin 2000).

3.1.4.9 Indol testi

Aşı olarak test edilen bakteri kolonisi ile 37°C'de 48 saat inkübe edildikten sonra, tüplere pepton su ilave edilmiş ve broth ortamına yavaşça birkaç damla kovac's reaktifi eklenmiştir. Sıvı ortamın yüzeyinde kırmızı bir halka oluşması başarı olarak kabul edilmiştir (Sharmin *et al.* 2009).

Metil kırmızı testi:

MR-VP suyu içeren tüpler, test edilen bakteri kolonisi ile aşılansarak 37°C'de 48 saat süreyle inkübe edilmiştir. Kültür ortamını asitliğinin test etmek için 0.5 mL metil kırmızısı reaktif eklenmiş ve pozitif sonuç kırmızı rengin ortaya çıkması ile tespit edilmiştir (Baron *et al.* 1994).

Voges – proskauer testi:

MR-VP ortamı inoküle edilerek test edilen bakteri kolonisiyle 37°C'de 48 saat inkübasyona tabii tutulduktan sonra, buna 0,06 mL -naftol reaktifi ve 0,2 mL % 40

KOH solüsyonu eklenmiştir. Ortamda 15 dakika sonra kırmızı rengin ortaya çıkması asetonun (asetil metil karbinol) varlığını gösteren işaret olmaktadır (Baron *et al.* 1994).

Lipaz testi:

Lipolitik agar ortamı, test edilen organizmanın kolonisi ile aşıl原因arak 24 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Pozitif lipoliz, koloniyi çevreleyen çökelti halesinin varlığı ile temsil edilmektedir (Symth and Alford 1984).

3.2 VITEK 2 ile İzolatların Tanımlanması

İzolatlar aşağıda VITEK 2 kullanılarak tanımlanmıştır.

3.2.1 Vitek® 2 sistemi

VITEK sistemi, VITEK 2 GN Kiti (Biomérieux/ Fransa) ile gram negatif bakterileri tanımlamak için kullanılan yakın zamanda otomatikleştirilmiş bir cihazdır.

3.2.2 Vitek 2 kompakt sisteminin tanımı

Tüm bakterileri tanımlamak için VITEK 2 kompakt sistemi kullanılış ve izolatu bulmak için VITEK 2 kompakt sisteminden yararlanılmıştır.. VITEK kartlarını kullanan bir dizi biyokimyasal test, VITEK 2 tanımlama sisteminin temelini oluşturur. Her kartta, test bakterisini tanımlamak için kullanılan biyokimyasal testlere ve metabolik süreçlere karşılık gelen 64 kuyucuk vardır. Bakteri süspansiyonu VITEK kartlarına yüklenip bilgisayar ortamına aktarıldıktan sonra veriler VITEK yazılımıyla kayıt altına alınmıştır.

3.2.3 Örnek hazırlama

Uygun sayıda saf kültür kolonisi, steril bir fırça kullanılarak aktarılır ve ardından mikroorganizma, 12 x 75 mm şeffaf plastik tüp (polistiren) testinde 3,0 mL steril salin

(% 0,45-0,50 NaCl, pH 4,5-7,0) içinde süspanse edilir. Densi Chek TM adlı bir bulanıklık ölçer kullanılarak bulanıklık uygun şekilde ayarlanır ve ölçülür. Bulanıklığın süspanسیونunu belirlemek için kullanılan McFarland Bulanıklık Aralığı 0,48-0,56 dır.

3.2.4 Bakteri süspanسیونunun VITEK kartlarına yüklenmesi

VITEK kartlarını bakteri süspanسیونu tüplerinde saklamak için özel raflar kullanılmaktadır. VITEK sistemi ile donatılmış bir makine rafları taramaktadır. Bilgisayar her raf için barkodu ve erişim numarasını kaydetmektedir (Ling *et al.* 2001).

3.2.5 Kart izolasyonu ve inkübasyonu

Raflar döner inkübatöre aktarılmıştır. Sonrasında transfer tüpleri kesilerek kapatılmış ve $35.5 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 'de yaklaşık 15 dakika inkübe edilmiş, kart reaksiyon için döner inkübatörden alınmış, optik sisteme yerleştirilmiştir (Funke and Funke-Kissling 2004).

3.2.6 Optik sistem

Geçirgenlik optiği kullanan sistemler, çeşitli görünür spektrum dalga boylarını kullanan test reaksiyonlarının yorumlanmasını sağlamaktadır. Her 15 dakikada bir, her bir test yanıtı, substrat metabolizmasının bulanıklığını veya renkli yan ürününü ölçmek için zamanlanmıştır. Ek olarak, küçük baloncukların neden olduğu olası hatalı okumaları ortadan kaldırmak için benzersiz bir algoritma kullanılmıştır (Guo *et al.* 2014).

3.2.7 Test reaksiyonu

Beş altı saat süren biyokimyasal testler ve metabolik reaksiyon sırasında tüm sonuçlar negatif ise (-), pozitif ise (+) ile işaretlenmektedir. Tüm bu sonuçlar bilgisayarda ortaya çıkmaktave yazılım analizinden sonra yazdırılmaktadır (Guo *et al.* 2014).

3.3 Antibiyotik Duyarlılık Testleri

P. aeruginosa izolatlarının çeşitli antibiyotiklere duyarlılığı, gösterilen antimikrobiyal diskler kullanılarak belirlenmiştir. Süspansiyon için kullanılan 12 x 75 mm şeffaf plastik, 3 mL steril salin (%0,45 ila %0,5 NaCl, pH 4,5 ila 7) test tüpü (polistiren) içerisine uygun miktarda saf kültür kolonisi aktararak mikrop uzaklaştırılmaktadır. Bulanıklığı ölçmek ve buna göre değiştirmek için DensiChek™ adlı bir bulanıklık ölçer kullanılmıştır.

Bulanıklıkların (0.48-0.56) süspansiyonunu belirlemek için McFarland Bulanıklık Aralığı değerleri dikkate alınmıştır. Antibiyotik tabletler Müller-Hinton agar besiyerine steril olarak yayılmış ve besi yeri daha sonra 24 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Diskleri çevreleyen büyüme engelleme bölgesinin çevresi ölçülerek sonuçlar oluşturulan normatif tablolarla karşılaştırılmıştır (Guo *et al.* 2014).

3.4 Astarların Hazırlanması

Primerler (Alpha DNA, Canada) liyofilize formda sağlanmıştır. Bu primerler deiyonize distile suda çözülerek 100 pikomol/L son konsantrasyon elde edilmişve kullanılabilecek kadar da derin dondurucuda (-20°C) saklanmıştır. Bu çalışmada kullanılan primerler Çizelge 3.1'de gösterilmektedir.

Çizelge 3.1 Bakteri izolatlarının genotipik tespiti için kullanılan PCR primerleri

Gen	Astar Dizisi		Ürün boyutu (bp)	kaynaklar
16s rDNA	F	5-GGGGGATCTTCGGACCTCA-3	956	(Spilker <i>et al.</i> 2004)
	R	5-TCCTTAGAGTGCCCAACCG-3		
Las B	F	5-GGAATGAACGAGGCGTTCTC-3	300	(Lanotte <i>et al.</i> 2004)
	R	5-GGTCCAGTAGTAGCGTTGG-3		

3.4.1 PCR karışımının hazırlanması

Bu çalışmada yer alan PCR reaksiyonunun bileşeni Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2 PCR tekniğinin bileşeni

Bileşen	Hacim (µL)
Reaksiyon Karışımı	10 µL
ileri astar	1 µL
Ters astar	1 µL
DNA şablonu	5 µL
Nükleaz içermeyen su	8 µL
Toplam	25

3.4.2 PCR termo döngü koşulları

Uygun PCR döngü programı parametreleri için koşullar, Çizelge 3.3'te gösterildiği gibi elde edilmiştir. 16S rDNA primerleri için termocycler PCR prosedürü Spilker *et al.* (2004), (Las B) primerleri için termocycler PCR protokolü Lanotte *et al.* (2004)'e göre yürütülmüştür. Aşağıda Çizelge 3.4'de programın aşamalarını kısaca listelenmiştir.

Çizelge 3.3 Gene 16Sr için termal döngü programı

Adım	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü
denatürasyon	94	4 dakika.	1
denatürasyon	94	30 saniye	35
tavlama	60	30 saniye	
sentezi	72	2 dakika	
son uzatma	72	5 dakika	1

Çizelge 3.4 Las B primerleri ile termocycler PCR'de kullanılan amplifikasyon programı

Adım	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü
denatürasyon	95	5 dakika.	1
denatürasyon	94	30 saniye	35
tavlama	58	30 saniye	
sentezi	72	1 dakika	
son uzatma	72	5 dakika	1
Tutma	4		1

3.4.3 Bakteri ekstraksiyonu (DNA)

Bir DNA ekstraksiyon kiti (Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit, Geneaid-Tayvan) kullanılarak ve üreticinin talimatları izlenerek, 50 izolattan DNA elde edilmiştir.

3.4.3.1 Protokol

Gece boyunca kültürlenmiş bakteri hücrelerinin 1 mL'sini içeren 1,5 mL'lik bir mikro santrifüj tüpü, bir dakika boyunca 14–16.000 x g hızında döndürülen örnekle doldurulmuş ve süpernatant daha sonra atılmıştır. Buna, 180 uL GT Tamponu eklendikten sonra, hücre peletini yeniden süspanse etmek için bir vortex kullanılmıştır. Karışıma (önceki ddH₂O'yu süspanse eden) Proteinaz K (20 uL) eklenmiştir. Karışım içeren tüpler 10 dakika boyunca 60 °C'de bir su banyosunda ısıtılmıştır. Numune 200 µL GB Tampon ile karıştırılarak, 10 saniye karıştırıcı da tutulmuştur. Numune lizatının berrak olduğundan emin olmak için karışım 70 °C'de bir su banyosunda 10 dakika inkübe edilmiştir. Karışıma hemen 200 uL saf etanol eklenerek birleştirmek için şiddetle çalkalanmıştır. Karışım GD kolonuna aktarıldıktan sonra 14–16.000 x g'de iki dakika santrifüjlenmiştir. GD kolonu 2 mL'lik yeni bir toplama tüpüne yerleştirdikten sonra, akışı içeren 2 mL'lik toplama tüpü atılmıştır.. GD sütununa 400 uL W1 Tamponu eklenerek, 14–16.000 x g'de 30 saniye santrifüjlenmiş ve akış atılmıştır. GD kolonuna yıkama tamponu (600 uL) eklenerek, 14-16.000 xg'de 30 saniye santrifüjlenmiş ardından da hava atılmıştır. Kolon matrisini kurutmak için karışım bir kez daha 14–16.000 xg'de üç dakika santrifüjlenmiştir.. Kolon matrisinin merkezine 100 uL önceden ısıtılmış Elüsyon Tamponu eklenmiş ve Kolon matrisi, elüsyon tamponunun tamamen emilmesini sağlamak için 3 dakika bekletilmiştir. Saf DNA'yı ayrıştırmak için 14–16.000 x g'de 30 saniye santrifüjlenerek, Ekstre edilen DNA -20°C'de saklanmıştır.

3.5 Agarozun Hazırlanması

0,3 gram agaroz tozu, çözünmesi için 30 mL (1X) trisborat-etilendiamintetraasetik asit (TBE) tamponuyla birleştirildi. Karışım daha sonra yaklaşık 5-10 saniye mikrodalgada kaynatılarak ısıtılmıştır. Daha sonra solüsyonun 45 °C'ye kadar soğuması beklendikten sonra görünürlük sağlamak için 5 µL etidyum bromür solüsyonu eklenmiştir.

Hazırlanan agaroz solüsyonu, içinde tarak bulunan jel ızgaraya dökülerek, agarozun iki kenarı kapatıldıktan sonra oda sıcaklığında katılaşmaya bırakılmıştır. Daha sonra tarak nazikçe çıkarılarak, jel üzerinde oyuklar bırakılmıştır. PCR için her kuyucuğa 10 µL numune yüklenirken, ekstrakte edilen DNA numunesi kuyucuklara 7 µL ila 3 µL oranında eklenmiştir. Boyut belirteci olarak, her elektroforezle eş zamanlı olarak gerçekleştirilen 100 bp'lik bir DNA merdiveni kullanılmıştır.

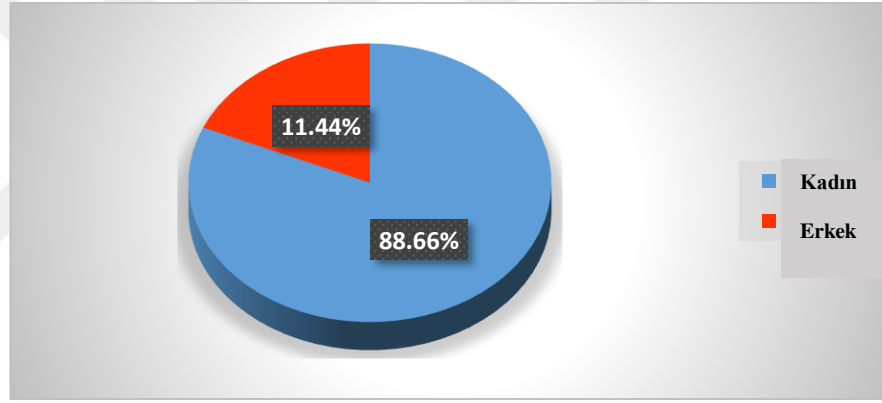
3.6 Jel Elektroforezi

Jel kuyucuğuna 10 uL PCR ürünü eklendikten sonra, elektroforez prosedürü için bir belirteç olarak 5 uL DNA merdiveni (100 bp) eklenmiştir. Jel, jel elektroforez cihazının 1X TBE tamponu ile doldurulmuş jel haznesine yerleştirilmiştir. Daha sonra hazne kapatılarak 135 volta 30-40 dakika elektroforez yapılmıştır. Agaroz jel daha sonra hazneden çıkarılmış ve gen bantları bir UV transillüminatör kullanılarak görülmüş ve fotoğraflanmıştır.

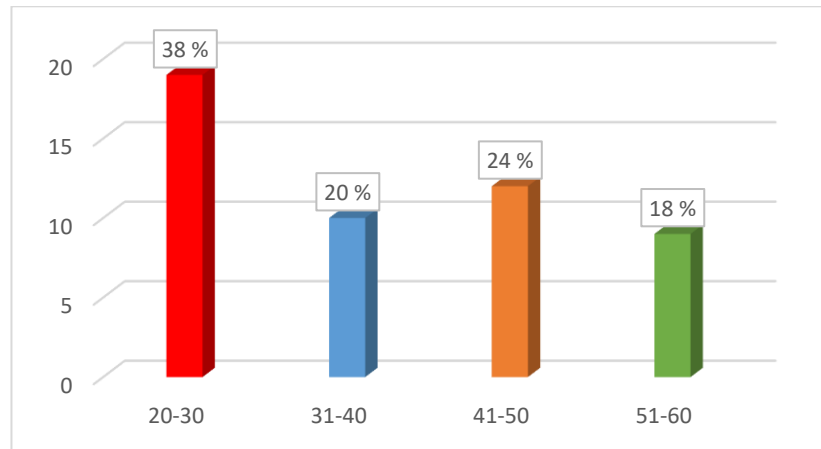
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada 15 Nisan 2022 ile 15 Haziran 2022 tarihleri arasında Nasiriyah Eğitim Hastanesine başvuran farklı yaş gruplarındaki kadın ve erkek hastalardan 150 klinik sürüntü örneği toplandı. Şekil 4.1'te gösterildiği gibi, bu çalışmada 133 kadın (% 88) ve 17 erkek (% 11) yer almıştır.

Yanık hastalarının yaş grubu 20-63 arasında değişmekte olup, 20-30 yaş grubu en yüksek vaka sayısını kaydederken, 53-63 yaş grubu yaralanma için en düşük yaş aralığını kaydetmektedir (Şekil 4.2). Çalışmadaki diğer özellikler de nüks oranında farklılıklar göstermektedir (Çizelge 4.1).



Şekil 4.1 Yanık hastalarının cinsiyete göre dağılımı



Şekil 4.2 Yanık hastalarının yaşa göre dağılımı

Çizelge 4.1 Hastaların sosyo-demografik özelliklerine ilişkin frekans ve oranları

	Özellikler	Sıklık	Oran
Yaş grupları	20-30	57	38
	31-40	30	20
	41-50	36	24
	51-60	27	18
	Toplam	150	100
Cinsiyet	Kadın	133	88.66
	Erkek	17	11.44
	Toplam	150	100
İş	Memur	35	11.66
	Tüccar	12	8
	Çiftçi	11	7.33
	Öğrenci	20	13.33
	İşsiz	72	48
	Toplam	150	100
Medeni hal	Evli	98	65.33
	Bekar	52	34.66
	Toplam	150	100
Eğitim düzeyi	Okumamış	51	34
	İlkokul	23	15.33
	Ortaokul	22	14.66
	Lise	35	23.33
	Üniversite	19	12.66
	Toplam	150	100

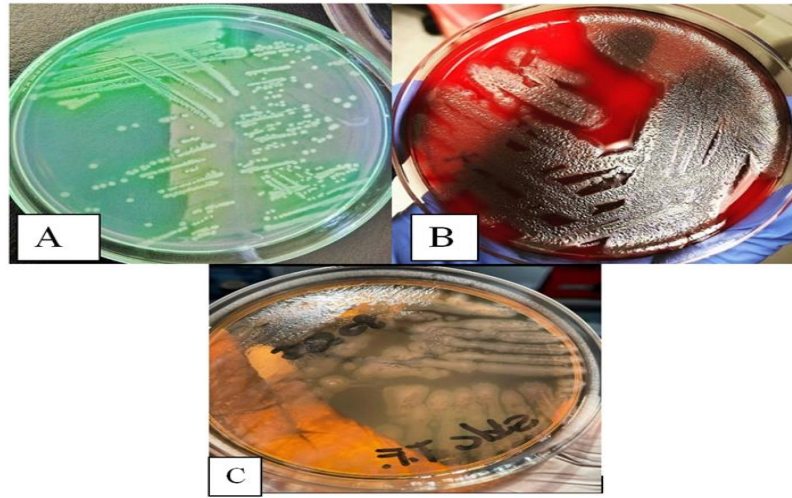
4.1 İzolasyon ve Tanımlama

Örnekler, seçici ve diferansiyel bir besiyerine (Kanlı agar ve MacConkey agar) yetiştirilerek 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. 150 hastanın bulguları, 50 (% 33) hasta *P. aeruginosa* ile 36 (% 24) hasta diğer bakteri formlarıyla enfekte olmuştur. Mortalite oranı 3 (% 6), iyileşen hasta yüzdesi ise 58 (%38) olarak belirlenmiştir.

4.1.1 Bakteri teşhisi

İzolatlar ilk olarak, hücrelerin boyaya boyut, şekil ve topaklanma tepkisini analiz etmek için gram boya ile mikroskopik teşhise dayalı olarak tanımlanmıştır. Bu izolatlar kanlı agar, MacConkey agar ve cetrimide agara yetiştirilmiş olup, izolatların çoğu koloni çevresinde şeffaf bir hale oluşturarak kanı eritme özelliği göstermiş bunun yanı sıra teşhisi doğrulamak için, şekerin fermantasyonunun olmaması nedeniyle kolonilerin üzüm kokusuna benzer bir koku ile soluk renkte görüldüğü MacConkey besiyerine

ekilmiştir. Bu kolonilerin çoğu, yeşilimsi sarı renkli Pyocyanin pigmentini ve her ikisi de cetrimide agar besiyerinde yeşilimsi sarı bakteri kolonileri olarak görünen Pyoverdin boyasını üretmektedir. Bu pigmentlerin suda çözünür doğası nedeniyle, yaralı meyvenin kokusuna benzer eşsiz kokusu ve rengiyle UV ışığına maruz kaldıklarında parlarlar (Sudhakar *et al.* 2015). İzolatlar aynı zamanda, *P.aeruginosa*'nın önemli bir teşhis özelliği olan katı besiyerinde 24°C'de büyüme göstermiştir (Şekil 4.3) (Al-Tikriti 2019).



Şekil 4.3 (A) Streamide agar (B) Kanlı agar (C) MacConcy agar'da *Pseudomonas aeruginosa* kolonisi

Bunun nedeni, *P. aeruginosa*'nın antibiyotik direncine (MDR), nozokomiyal enfeksiyonlara katılımına ve yanık yaralanmaları sonucu hastaların bağışıklık sistemlerinin zayıflamasına bağlanabilir. Diğer bazı araştırmalar da, Güney Afrika'da %14,5 (Coetzee and Kahn 2013), Irak'ta %27 (Othman *et al.* 2014) ve Mısır'da % 19,5 (Hassuna *et al.* 2015) olmak üzere *P. aeruginosa* enfeksiyonu oranının ülkelere göre değişen oranlarda olduğu gösterilmiştir. *P. aeruginosa*, ölümcül olabilen tehlikeli bir sonuç olan nozokomiyal enfeksiyona neden olabilir. Ek olarak, antibiyotik direnci kazanma potansiyelleri açısından hastalar için tehlike oluşturabilmektedir (Mabrouk *et al.* 2016). Antibiyotiklerin keşfinde kaydedilen muazzam ilerlemelere rağmen, yanık hastalarında ilaçlara dirençli bakteri suşları etkili olmaya devam etmektedir.

Dirençli *P. aeruginosa* suşlarının çoğalması konusunda son zamanlarda endişeler ortaya çıkmıştır. Çünkü bu suşların çoğu, kazanılmış direnç mekanizmaları ve içsel özellikleri

nedeniyle antibiyotiklerle tedavi edilmesi güç enfeksiyonlara yol açmaktadırlar (Bekeris *et al.* 2005, Rossolini and Mantengoli 2005). Yanık tedavilerinde dirençli *P. aeruginosa* suşlarının varlığına bağlı olarak ortaya çıkan ölüm oranlarını araştıran bazı çalışmalarda ölüm oranı Pakistan'da %18,9 (Al-Ibran *et al.* 2011), İran'da %30 (Anvarinejad *et al.* 2014) ve Brezilya'da da %51,1 olarak tespit edilmiştir.

Bakteriyel enfeksiyonlara ve buna bağlı etkilere sahip yanık hastalarının sağlıkları için bir tehlike mevcuttur. Termal enfeksiyon, deriye nüfuz ederek bağışıklık sistemini zayıflatmasının yanı sıra savunma mekanizmalarını da bozduğu için en sık görülen yanık enfeksiyonu türü olarak kabul edilmektedir (Bayram *et al.* 2013).

Daha şiddetli yanıklar, cilt bariyerini deler veya kaybederse, hastayı sorunlara ve ölüm riskini artıran, hastanede kalış süresini uzatan mikroorganizmaların kolonizasyonuna karşı daha savunmasız hale getirmektedirler. Ek olarak, yanığın yoğunluğu ve yanan hastanın yaşı, hastanın iyileşme yeteneğini doğrudan etkileyen bakteri kolonizasyonu üzerinde önemli etkiye sahiptirler (Kumar *et al.* 2001, Agnihotri *et al.* 2004).

4.1.2 Biyokimyasal testlerle teşhis

Bu araştırmada yapılan bazı biyokimyasal testlere ait sonuçlar Çizelge 4.2'de verilmiştir. Bu sonuçlar, MacFadden (2000) tarafından raporlanan normatif sonuçlarla karşılaştırılmıştır.

Çizelge 4.2 *P. aeruginosa*'nın tanımlanması için biyokimyasal testler

Test	Sonuç
katalaz	+
oksidaz	+
Jelatin Sıvılaştırma	+
Büyüme 42C'	+
Gram boyama	G- ve
hemoliz	+/-
H ₂ S Üretimi	-
Indole	-
Kligler s Demir agar	K/K
metil-kırmızı	-
Voges Proskauer	-
Pigment üretimi	+
Simmon sitrat	+
Hareketlilik	+

Bu çalışmada, tümü yanık kurbanlarından izole edilmiş elli adet *Pseudomonas aeruginosa* suşu incelenmiştir. İzolatlar başlangıçta, hücrelerin boyaya boyut, şekil ve yığınlara tepkisini gözlemlemek için Gram boyama ile mikroskopik teşhise dayalı olarak tanımlanmıştır.

Tüm izolatlar, safranin kırmızısı ile boyanmaya yatkınlıklarını gösteren Gram negatif çubuklar ve oksidaz, katalaz için pozitif, 42°C'de üreyebilen ve herhangi bir şekeri fermente etmeyen, indol, metil kırmızısı ve voges-proskauer testi için negatiftir, sitrat testi için pozitif tespit edilmişlerdir. (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 *P. aeruginosa* için IMVIC testi

Bu araştırmanın bulguları, izolasyon ve teşhis bulguları, negatif bakterilerin daha bulaşıcı olduğunu ve etkilenen dokularda önemli miktarlarda faktör, cilt dokularına zarar verir ve sepsisemiye katkıda bulunan enzimlerin yanı sıra toksinleri serbest bırakma kapasiteleri nedeniyle yanık vakalarında bulunduğunu belirten Faraj and Jiad (2020) ile uyumludur.

Yine bu çalışmadan elde edilen sonuçlar incelendiğinde *P. aeruginosa*'nın yanık dokuları büyüme ve üreme için önemli, iyi bir ortam olarak bulan fırsatçı bir bakteri olduğu için yanık vakalarında çok yaygın olduğunu belirten Maitra *et al.* (2000) bildirileriyle uyumludur.

Ayrıca *P. aeruginosa* hastane ortamında bulunan en önemli bakterilerden biridir ve kolaylıkla yayılarak, insanlarda yanıkları enfekte etmektedir. Yanıklar, etkilenen vücuttaki bağışıklık sistemini baskılayan ve onu farklı enfeksiyonların neden olduğu çeşitli hastalıklara karşı duyarlı hale getiren doku ölümü ve apoptozun en sık nedeni olmaktadır (Church *et al.* 2006).

4.1.3 Vitek2 sisteminin sonuçları

Yanık hastalarından elde edilen elli izolatta Vitek2 yöntemi kullanılarak *P. aeruginosa* tanımlanmıştır; 50 kişiden 20'sinin *P. aeruginosa* olma olasılığının % 99, 18'inin % 98 ve 12'sinin de % 97 olduğu saptanmıştır. Ayrıca diğer enfeksiyona neden olabilen bakteri türleri ele alındığında da % 99 oranında *Klebsiella pneumonia* spp, % 95 oranında *Enterobacter cloacae* ssp ve % 91 oranında *Citrobacter freundii* olma riskinin olduğu belirlenmiştir.

Vitek2 Compact teşhisine göre *P.aeruginosa* bakterisinin cinsi ve türü için olasılık oranı yüzde 97 ila 99 arasında bulunmuştur. Vitek2 Kompakt teşhis, 24 saatlik bakteri solüsyonu enjekte edilen 47 delikli teşhis kitinin benzersiz yaklaşımı sayesinde, bakteri türlerinin çoğunu teşhis etmek için kullanılmıştır. Mevcut araştırmada, Vitek2 iki izolatu tanımlayamamıştır. Vitek2 sistemi, bakteri türüne ve gram boyama için pozitif veya

negatif test edilip edilmediğine bağlı olarak 96 adede kadar test içerebilen bir biyokimyasal testler topluluğu olduğundan, bunun nedeni kontaminasyon ve birçok bakteri türünün varlığı ile ilgili olabilmektedir.

4.2 Bakteri Antibiyotik Duyarlılık Testi

Çalışmada *P. aeruginosa* izolatları arasında dağılan (12) antibiyotik için değerlendirilmiştir. Antibiyotikleri toplamak için inhibisyon zonunun genişliğinin ölçülmesi esas alınmıştır. Kullanılan tüm bakteri izolatlarında 12 antibiyotik türü için duyarlılık testleri yapılmış ve bu testlerin sonuçları Çizelge 4.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.3 *P. aeruginosa* izolatlarının antibiyotik direnci

Antibiyotik ajanlar	Toplam sayı dirençli izolatların	Rezistans %
Ampisilin	50	100
Sefotaksim	50	100
Piperasilin	13	20.08
Tikarsilin	13	20.08
Gentamicin	34	70.83
Amikasin	19	39.58
siprofloksasin	15	31.25
Norfloksasin	50	100
tetrasiklin	50	100
doksisiklin	50	100
Kloramfenikol	50	100
polimiksin B	29	60.41

P. aeruginosa izolatları üzerine etkileri incelenen ilaçlar arasında Ampisilin, Cefotaxime, Piperacillin, Ticarcillin, Gentamicin, Amikacin, Polymyxin B, Ciprofloxacin, Norfloxacin, Tetracycline, Doxycycline ve Chloramphenicol yer almıştır. Ampisilin, Sefotaksim, Kloramfenikol, Doksisiklin, Tetrasiklin ve Norfloksasin'in tümü *P aeruginosa* izolatlarına karşı oldukça dirençlidir (%100). Bazı izolatlar ise Gentamisin (% 70,83), Amikasin (% 39,58), Polimiksin B (% 60,41), Siprofloksasin (% 31,25), Piperacillin ve Ticarsilin'in her biri için (% 20,08) direnç göstermiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 *P. aeruginosa* için antibiyotik inhibisyon çapları

Tüm izolatlar β -laktam grubu Penisilinler ve Sefalosporinlere dirençli olarak tespit edilmişlerdir. Bu çalışmanın sonuçları, izolatların (%100) tümünün Ampisilin'e dirençli olduğunu göstermiş, yine Reish *et al.* (1993) ve Zhang *et al.* (2002), bu araştırma sonuçlarıyla uyumlu olacak şekilde *P. aeruginosa*'nın tüm izolatlarının Penisilin ve Amoksisilin'e dirençli olduğunu vurgulamışlardır.

Bu araştırmada incelenen izolatların tümü Cefotaxime'a direnç göstermiştir. Bu sonuç, çalışmalarında ele aldıkları izolatların % 95'inin antibiyotiğe dirençli olduğunu söyleyen Onguru *et al.* (2008)'nin bulgularını destekler niteliktedir. *P. aeruginosa* izolatlarının Sefalosporin direnci, β -laktamaz üretmelerinden veya mutasyon sonucu PBP'yi kaybetmelerinden kaynaklanabilir.

Diğer çalışmalarda, *P. aeruginosa* birçok antibiyotiğe, muhtemelen izolatların doğal olarak dirençli olan intrinsik veya kazanılmış direnç nedeniyle direnç göstermektedir. Bu, alışılmadık şekilde sınırlı dış zar geçirgenliği ile kromozomal olarak kodlanmış β -laktamların kombinasyonundan kaynaklanmaktadır. Bu sonuçlar, Hankok and Speert (2000) ve Makedou *et al.* (2005) tarafından belirtilen sonuçlarla uyumludur.. ES β L üreten *P.aeruginosa* izolatlarının oranı % 25.58 olduğundan, mevcut çalışmanın sonuçları, araştırmacı (Alikhan *et al.* 2014) yılında yaptıkları çalışmanın sonuçlarıyla

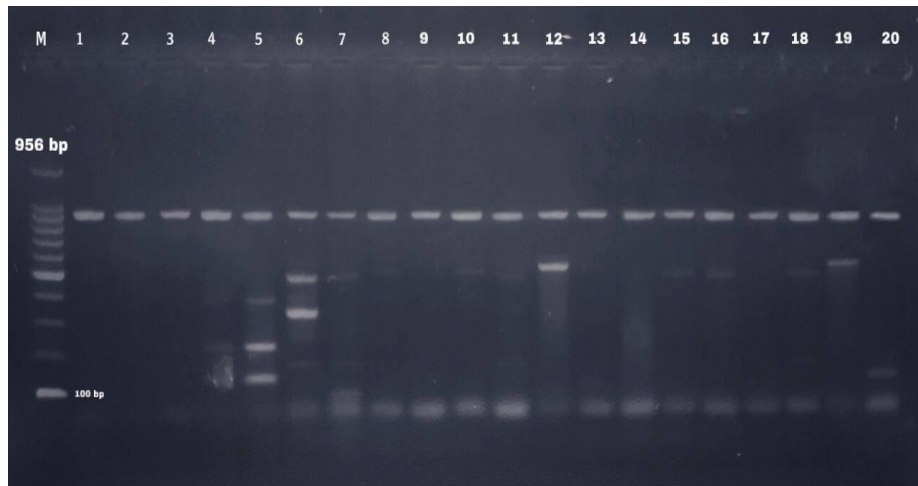
uyumludur. Shiny and arkadaşlarının (2016) yılında enzim üreten *P.aeruginosa* izolatlarının oranının EsβL oranının % 59 olduğu çalışmasıyla uyumluydu.

Mevcut çalışmanın sonuçları, araştırmacı Wassef ve diğerlerinin sonuçlarıyla çelişmektedir. (2015) Mısır'da yaptığı çalışmada, geniş spektrumlu beta-laktamaz enzimleri üreten *P. aeruginosa* izolatlarının yüzdesi %3,5 olarak bulunmuştur. Araştırmacı Ullah *et al.* (2009) tarafından yapılan bir çalışmada backstaff olarak geniş spektrumlu beta-laktamaz enzimlerinin bir ürünüdür. *P.aeruginosa* izolatlarının oranı %85,35'tir. *P. aeruginosa* bakterisinin geniş yayılmasının nedeni, geniş bir beta-laktamaz enzim yelpazesine bağlı olabilir.

4.3 Genetik Çalışma

4.3.1 Gen 16s rDNA'sının saptanması

Çalışmaya dahil edilen izolatlarda 16s rDNA geninin varlığının tespit edilmesinin sonuçlarının tümü genin %100 taşıyıcısıdır, çünkü PCR sonuçları gen 16s rDNA'sı için çoğalma karşılaştırıldığında 956 çift baz hacmine sahiptir. hacimsel kılavuz (DNA Ladder) ile paketler (Şekil 4.6).

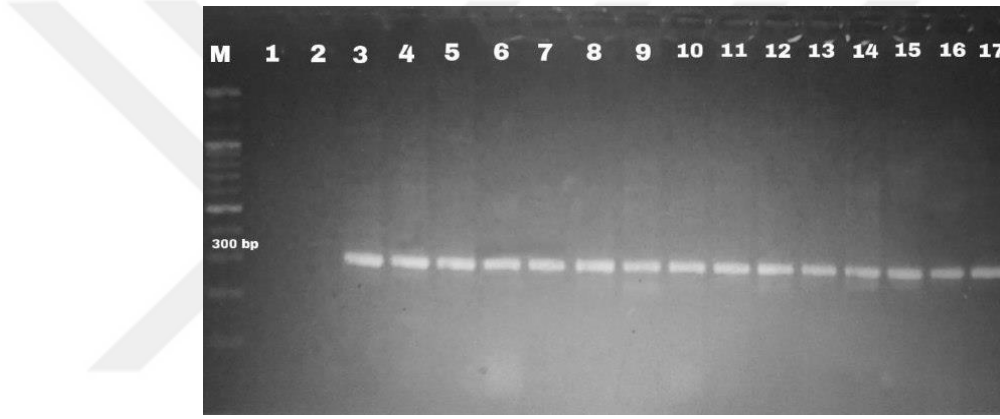


Şekil 4.6 PCR ürününü tanımlamak için agaroz jel %0,8 üzerinde 70 V'ta bir saat boyunca jel elektroforezi. 16S rDNA gen 956 bp şerit M: 100 bp DNA merdiveni, şerit 1-12 ise *P. aeruginosa*'yı temsil etmektedir

Moleküler teşhis bulguları, 16s rDNA genini taşıyan *P. aeruginosa* izolatlarının oranının yüzde 100 Jafar *et al.* (2014) 16s rDNA genine sahip olma sıklığı yüzde 90,7 idi. . Bu gen, mikrobun genetik faktörünün dermisin tanınabileceği ve 16s ribozomal DNA'ya bağlı olan önemli bir gendir (Abdullah ve Mehdi 2016).

4.3.2 *P. aeruginosa* virülans geninin saptanması

Virülans geninin (lasB) polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tanımlaması için elli izole *P. aeruginosa* örneği kullanıldı (Şekil 4.7).



Şekil 4.7 Standart PCR kullanılarak ürün boyutu (300bp) ile *P. aeruginosa* lasB geni için amplifiye edilmiş jel elektroforezi. 30 dakika boyunca 70 V/cm'de %0,8 agaroz. DNA merdiveni Yolu (E) (100)

LasB geni, *Pseudomonas aeruginosa*'nın 50 izolatında saptanmıştır; Şekil 4.7'de gösterildiği gibi, 48 (% 96) izolatta oransal olarak PCR-pozitif iken, 2 (% 4) izolatta negatiftir. Bu bulguların Raoof (2011) tarafından Tikrit (%100) ve Mısır'da (%100) Khattab *et al.* (2015) elde edilen bulgularla tutarlı olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar, izole edilen *P. aeruginosa*'nın % 84,6'sının lasB'ye sahip olduğunu gösteren Wolska ve Szweda (2009)'nın çalışmasında elde edilen sonuçlara benzerdir. Shi *et al.* (2012) *P. aeruginosa*'nın % 80'inde lasB bulunduğunu ve Sabharwal *et al.* (2014), *P. aeruginosa* izolatlarının % 75'inin bu geni verdiğini bulmuştur. Çalışmamızın bulguları, %75'lik bir sonuç bildiren Sabharwal *et al.* (2014) ve İran'da yapılan daha düşük insidanslara sahip olan Nahar *et al.* (2017), % 55,56 ve Das (2016), % 41,5 bulgularıyla uyumlamaktadır.

Dünya genelinde virülans geninin dağılımındaki farklılıklar, *P.aeruginosa*'nın belirli suşları ile ilgili olabilir ve bu suşların enfeksiyon bölgelerine adapte olurken o bölgelerin koşullarından yararlanabilme potansiyelleri ile tanımlanabilir (Lanotte *et al.* 2004). Ayrıca, insan izolatlarının farklı klinik ve fizyolojik durumlara sahip olması da olabilir (Abdeen 2017). Las B Gene, bakterilerin elastik proteini parçalamasına yardımcı olan temel bir virülans faktörü olduğu için, insan kan damarlarının temel bileşenlerinden biri olduğu kadar akciğerin temel bileşenlerinden biridir ve genişleme sürecinden sorumludur. ve akciğerin kasılmasıdır ve dolayısıyla bu enzim, enfeksiyon fazları boyunca temel virülans faktörlerinden biridir (Bai *et al.* 2011).



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Irak Thi-Qar eyaleti Nasiriyah Eğitim hastanesinde yanık tedavisi gören hastalardan izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* örneklerinin moleküler yöntemlerle tespiti amacıyla yürütülen bu çalışmada; yanık hastalarının yaralarından elde edilen örneklerinde *P. aeruginosa* izolatları (% 33) elde edilmiştir. *P. aeruginosa*'nın tanımlanması için Vitek 2, genetik tanıya çok yakın etkinlik oranları gösterse de 16SrDNA geni kullanılarak *P. aeruginosa*' ait alt tür düzeyinde tanımlama ve mutasyon belirlemeleri yapılmıştır. Buna göre de *P. aeruginosa* izolatlarının % 96'sının lasB ürettiği tespit edilmiştir. Antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarına göre, *P. aeruginosa*'ya karşı en aktif bileşiğin Piperacillin olduğu, onu Ticarcillin'in ardından Ciprofloxacin'in izlediği görülmüştür.

Bu çalışma sonuçlarına dayanarak bazı öneriler yapılmıştır. Buna göre, Hastane Operasyon Kontrol Programlarında, *P. aeruginosa*'nın gelişimini izlemek için modern antibiyotikler üzerinde düzenli periyodik çalışmalar;

Ayrıca *P. aeruginosa*'nın virulans faktörleri hakkında moleküler çalışmalar yürütülmeli ve yeni antibiyotik türlerinin geliştirilmesi amacıyla *P. aeruginosa*'nın tedavisi için de çalışmalar;

P. aeruginosa bakterisinin genetik mutasyonları üzerine odaklanan çalışmalar yürütülmeli ve enfeksiyonun bazı immünolojik göstergelerle ilişkisini araştıran çalışmalar yapılmasının uygun olacağı önerilebilir.

KAYNAKLAR

- Abdeen, M. 2017. Detection of Some Virulence Genes of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Different Clinical Specimens by Multiplex PCR, Khartoum, Sudan. *Biochem. Cell*, 5(3): 3931-3935.
- Abdullah, R. M. and Mahdi, A. F. 2016. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* From Clinical Specimen by Using 16S rDNA Gene. *Journal of Biotechnology Research Center*, 10(1): 45-49.
- Agbenorku, P. 2013. Burns functional disabilities among burn survivors: a study in Komfo Anokye Teaching Hospital, Ghana. *International Journal of Burns and Trauma*, 3(2): 78-86.
- Agnihotri, N., Gupta, V. and Joshi, R. M. 2004. Aerobic bacterial isolates from burn wound infections and their antibiograms a five-year study. *Burns*, 30(3): 241-243.
- Alhazmi, A. 2015. *Pseudomonas aeruginosa*-pathogenesis and pathogenic mechanisms. *International Journal of Biology*, 7(2): 44.
- Ali, S. A., Hamiz-ul-Fawwad, S., Al-Ibran, E., Ahmed, G., Saleem, A., Mustafa, D. and Hussain, M. 2016. Clinical and demographic features of burn injuries in Karachi: a six-year experience at the burns Centre, civil hospital, Karachi. *Annals of Burns and Fire Disasters*, 29(1): 4.
- Al-Ibran, E., Rao, M. H., Fatima, K., Irfan, S., Iqbal, M. S. and Khan, M. 2011. Current Bacteriological profile in Fire-burn victims and their associated mortality at the Burns Centre, Karachi-Pakistan. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, 27(4): 789-792.
- Al-Khafaji, Z.M. 2008. Microbial biotechnology. Molecular approaches. Institute of Genetic Engineering and Biotechnology for Postgraduate Studies, University of Baghdad, 6: 736.
- Almyroudīs, N. G., Sutton, D. A., Fothergill, A. W., Rinaldi, M. G. and Kusne, S. 2007. In vitro susceptibilities of 217 clinical isolates of zygomycetes to conventional and new antifungal agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(7): 2587-2590.
- Al-Tikriti, S. 2019. Determination of the Activity of the Green Synthesized Silver Nanoparticles Against Multidrug Resistant Bacteria Isolated from Children with

- Diarrhea under Five Years. International Journal of Medical Sciences, 2(1): 64-65.
- Altoparlak, U., Erol, S., Akcay, M. N., Celebi, F. and Kadanali, A., 2004. The time-related changes of antimicrobial resistance patterns and predominant bacterial profiles of burn wounds and body flora of burned patients. Burns, 30(7): 660-664.
- Alvi, I. A., Asif, M., Tabassum, R., Aslam, R., Abbas, Z. and Rehman, S. U. 2020. RLP, a bacteriophage of the family Podoviridae, rescues mice from bacteremia caused by multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Archives of Virology, 165(6): 1289-1297.
- Anvarinejad, M., Japoni, A., Rafaatpour, N., Mardaneh, J., Abbasi, P., Shahidi, M. A. and Alipour, E. 2014. Burn patients infected with metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: Multidrug-resistant strains. Archives of Trauma Research, 3(2): e18182.
- Azghani, A. O., Miller, E. J. and Peterson, B. T. 2000. Virulence factors from *Pseudomonas aeruginosa* increase lung epithelial permeability. Lung, 178(5): 261-269.
- Bachta, K. E., Allen, J. P., Cheung, B. H., Chiu, C.-H. and Hauser, A. R. 2020. Systemic infection facilitates transmission of *Pseudomonas aeruginosa* in mice. Nature Communications, 11: 1-13.
- Bai, F. , Xu, H., Zhang, Q., Qi, X., Mou, R., Bai, G. and Qiao, M. 2011 . Functional characterization of pfm in protein secretion and lung infection of *Pseudomonas aeruginosa*. Canadian Journal of Microbiology, 57(10): 829-837.
- Bairy, I., Shivananda, P.G. 1997. Aerobic bacterial flora of burn wound infection. Indian Journal Surg, 59: 215-8.
- Barbieri, J.T. and Sun J., 2004. *Pseudomonas aeruginosa* ExoS and ExoT. In Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology, 152: 79- 92.
- Barken, K. B., Pamp, S. J., Yang, L., Gjermansen, M., Bertrand, J. J., Klausen, M. and Tolker-Nielsen, T. 2008. Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Environmental Microbiology, 10(9): 2331-2343.

- Baron, E., Peterson, L. R. and Finegold, S. M. 1994. Bailey and Scoffs. Diagnostic Microbiology, 9: 386-403.
- Bayram, Y., Parlak, M., Aypak, C. and Bayram, İ. 2013. Three-year review of bacteriological profile and antibiogram of burn wound isolates in Van, Turkey. International Journal of Medical Sciences, 10(1): 19.
- Bekeris, L. G., Tworek, J. A., Walsh, M. K., & Valenstein, P. N. 2005. Trends in blood culture contamination: a College of American Pathologists Q-Tracks study of 356 institutions. Archives of Pathology and Laboratory Medicine, 129(10): 1222-1225.
- Bielecki, P., Glik, J., Kawecki, M. and Santos, V. A. M. 2008. Towards understanding *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infections by profiling gene expression. Biotechnology Letters, 30(5): 777-790.
- Bodey, G. P., Bolivar, R., Fainstein, V. and Jadeja, L. 1983. Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Reviews of Infectious Diseases, 5(2): 279-313.
- Bottone, E. J. and A. A. Perez 1993. "Pseudomonas aeruginosa folliculitis acquired through use of a contaminated loofah sponge: an unrecognised potential public health problem. Journal of Clinical Microbiology, 31(3): 480-483.
- Brooun, A., Liu, S. and Lewis, K. 2000. A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 44(3): 640-646.
- Brown, T. A. 2002. Mutation, repair and recombination. In Genomes. 2nd edition. Wiley-Liss. Burn wound infections. Clinical Microbiology Reviews, 19(2): 403-434.
- Cai, H. Y., Archambault, M., Gyles, C. L. and Prescott, J. F. 2003. Molecular genetic methods in the veterinary clinical bacteriology laboratory: current usage and future applications. Animal Health Research Reviews, 4(2): 73-94.
- Cheah, A. K. W., Kangkorn, T., Tan, E. H., Loo, M. L. and Chong, S. J., 2018. The validation study on a three-dimensional burn estimation smart-phone application: accurate, free and fast. Burns and Trauma, 1: 6.
- Church, D., Elsayed, S., Reid, O., Winston, B. and Lindsay, R. 2006. Burn wound infections. Clinical Microbiology Reviews, 19(2): 403-434.

- Coetzee, E., Rode, H. and Kahn, D. 2013. *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infection in a dedicated paediatric burns unit. *South African Journal of Surgery*, 51(2): 50-53.
- Collee, J.G ., Fraser,A.G. , Marmion,B.P. and Simmons,A. 1996. Mackie and Mecartney .*Practical Medical Microbiology*. 14th ed .Churchill Living Stone, pp. 413- 424, USA.
- Cox, D. B. T., Platt, R. J. and Zhang, F. 2015. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nature medicine*, 21(2): 121-131.
- Dalamaga, M., Karmaniolas, K., Chavelas, C., Liatis, S., Matekovits, H. and Migdalis, I. 2003. *Stenotrophomonas maltophilia*: a serious and rare complication in patients suffering from burns. *Burns*, 29(7): 711-713.
- Das, R., Sinha, P. and Kar, D. 2016. Characterization of *lasB* and *plcH* gene from *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Silchar. *Microbiol*, 5: 239.
- Ekizoglu, O., Hocaoglu, E., Inci, E., Can, I. O., Aksoy, S. and Kazimoglu, C. 2016. Forensic age estimation via 3-T magnetic resonance imaging of ossification of the proximal tibial and distal femoral epiphyses: use of a T2-weighted fast spin-echo technique. *Forensic Science International*, 2(6): 102.
- Falk, PS, Winnike, J, Woodmansee, C, Desai, M, Mayhall, CG. 2000. Outbreak of vancomycin-resistant enterococci in a burn unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 21(9):575- 82.
- Faraj, H. J. and Jiad, A. L. 2020. Isolation and Identification Bacteria Species and Study Epidemiological Features to Burns Patients in Al-Yarmook Teaching Hospital. *Indian Journal of Forensic Medicine and Toxicology*, 3: 14.
- Fatima, H., Khan, N., Rehman, A. U. and Hussain, Z. 2014. Production and partial characterization of lipase from *Pseudomonas putida*. *Ferment. Technol*, 2(4): 112.
- Forbes, B. A., Sahm, D. F. and Weissfeld, A. S. 2007. *Diagnostic Microbiology*, 8: 288-302.
- Fujitani, S., Moffett, K. S. and Yu, V. L. 2017. *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobe*, Pittsburgh, PA, 1(5): 219.
- Funke, G. and Funke-Kissling, P. 2004. Evaluation of the new VITEK 2 card for identification of clinically relevant gram-negative rods. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 4067-4071.

- Ghai, S., Sachdeva, A., Mahajan, R., Dogra, S., Soodan, S. and Mahajan, B. 2015. Bacteriological and antibiotic susceptibility profile of aerobic burn wound isolates at a tertiary care institute in Northern India. *Journal Appl Environ Microbiol*, 3(4): 95-100.
- Ghanbari, A., Dehghany, J., Schwebs, T., Müsken, M., Häussler, S. and Meyer-Hermann, M. 2016. Inoculation density and nutrient level determine the formation of mushroom-shaped structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Scientific Reports*, 6(1): 1-12.
- Gönüllü, N. 2015. Molecular techniques for clinical diagnostic bacteriology. *Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji*, 7(2): 146.
- Guo P, Ding S, Zhang H, Zhang X. 2014. A real-time optical tracking and measurement processing system for flying targets. *ScientificWorld Journal*, 9(11): 76590.
- Hankok, R. E. and Speert, D. P. 2000. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanism and impact on treatment drug resistance updates. *Journal Baraz*, 3: 247-255.
- Hassuna, N. A., Mohamed, A. H. I., Abo-Eluoon, S. M. and Rizk, H. A. W. A. 2015. High prevalence of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* recovered from infected burn wounds in children. *Archives of Clinical Microbiology*, 6(4): 3-6.
- Hettiaratchy, S. and Dziewulski, P. 2004. Pathophysiology and types of burns. *British Medical Journal*, 328(7453): 1427-1429.
- Hollsing, A. E., Granström, M., Vasil, M. L., Wretling, B. and Strandvik, B. 1987. Prospective study of serum antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* exoproteins in cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 25(10): 1868-1874.
- Jabir, S., Frew, Q., El-Muttardi, N. and Dziewulski, P. 2013. Burn injuries resulting from hot water bottle use: a retrospective review of cases presenting to a regional burns unit in the United Kingdom. *Plastic surgery international*, 1: 7.
- Jafar, Z., Dhahi, M., Abd, A. and Jaafar, S. 2014. Molecular identification and antibiotics resistance genes profile of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Iraqi patients. *Acad Journal*, 8(21): 2183-92.
- Janet, M. and Torpy, M. D. 2009. Burn injuries. *The Journal of the American Medical Association*, 16: 302.

- Johnson, A. P., Muller-Pebody, B., Budd, E., Ashiru-Oredope, D., Ladenheim, D., Hain, D. and Hopkins, S. 2017. Improving feedback of surveillance data on antimicrobial consumption, resistance and stewardship in England: putting the data at your Fingertips. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(4): 953-956.
- Kanitakis, J. 2002. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *European Journal of Dermatology*, 12(4): 390-401.
- Khattab, M. A., Nour, M. S. and ElSheshtawy, N. M. 2015. Genetic identification of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes among different isolates. *Journal Microb Biochem Technol*, 7(5): 274-7.
- Kiska, D. L. and P. H. Gilligan. 2003. *Pseudomonas*. The Manual of Clinical Microbiology. P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller and R. H. Tenover. Washington, 1: 719-728.
- Köse, H. and Yapar, N. 2017. The comparison of various disinfectants' efficacy on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm layers. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 47(4): 1287-1294.
- Kumar, V., Bhatnagar S.K., Singh A.K., Kumar S., Mishra R.K. 2001. Burn Wound Infection: A study of 50 cases with special reference to antibiotic resistance. *Indian Journal of Bio Research*, 46: 66-69.
- Lachiewicz, A. M., Hauck, C. G., Weber, D. J., Cairns, B. A. and van Duin, D. 2017. Bacterial infections after burn injuries: impact of multidrug resistance. *Clinical Infectious Diseases*, 65(12): 2130-2136.
- Lambert, P. 2002. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 95(41): 22.
- Lanotte, P., Watt, S., Mereghetti, L., Dartiguelongue, N., Rastegar-Lari, A., Goudeau, A. and Quentin, R. 2004. Genetic features of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients compared with those of isolates from other origins. *Journal of Medical Microbiology*, 53(1): 73-81.
- Lawton, S. 2019. Skin 1: the structure and functions of the skin. *Nursing Times*, 1(2): 30-33.
- Lee, K. C., Joory, K. and Moiemmen, N. S. 2014. History of burns: The past, present and the future. *Burns and Trauma*, 2(4): 2321-3868.

- Leid, J. G., Willson, C. J., Shirtliff, M. E., Hassett, D. J., Parsek, M. R. and Jeffers, A. K., 2005. The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN- γ -mediated macrophage killing. *The Journal of Immunology*, 175(11): 7512-7518.
- Leseva, M., Arguirova, M., Nashev, D., Zamfirova, E. and Hadzhyiski, O. 2013. Nosocomial infections in burn patients: etiology, antimicrobial resistance, means to control. *Annals of Burns and Fire Disasters*, 26(1): 5.
- Ling, T. K., Tam, P., Liu, Z. and Cheng, A. F. 2001. Evaluation of VITEK 2 rapid identification and susceptibility testing system against gram-negative clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 2964-2966.
- Lnhof, M. and Schlotterer, C. 2001. Fitness effects of Proceedings of advantageous mutation in evolving *Escherichia coli* pulations. *proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98 (3): 1112-1128.
- Mabrouk, M. I., El-Hendawy, H. H., Basha, A. M. and Saleh, N. M. 2016. Prevalence, antibiotic and oil resistance pattern of some bacterial isolates from burns. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6(06): 123-130.
- Macfaddin ,J . F. 2000. *Biochemical tests for Identification of Medical Bacteria* 3rd ed ,pp. 689-691, USA.
- MacFaddin, J. F. 2004. *Biochemical tests for Identification of Medical Bacteria*. 4th ed., Waverly press, Inc., Baltimore, U.S.A, 5: 76.
- Maitra , A., kumar , V., Contran, R. S. Watkins, L. H. A., Rogers, R. D., Lawrence, A. D., Sahakian, B. J., Rosser, A. E. and Robbins, T. W. 2000. Impaired planning but intact decision making in early Huntington's disease: implications for specific fronto-striatal pathology. *Neuropsychologia*, 38(8): 1112-1125.
- Makedou, K. G., Tsiakiri, E. P., Bisiklis, A. G., Chatzidimitriou, M., Halvantzis, A. A., Ntoutsou, K. and Alexiou-Daniel, S. 2005. Changes in antibiotic resistance of the most common Gram-negative bacteria isolated in intensive care units. *Journal of Hospital Infection*, 60(3): 245-248.
- Markou, P. and Apidianakis, Y. 2014. Pathogenesis of intestinal *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cancer. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3: 115.

- Martínez, L. M., Martinez, A. and Gosset, G. 2019. Production of melanins with recombinant microorganisms. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7: 285.
- Meng, Q. H. 2013. Mass spectrometry applications in clinical diagnostics. *Journal Clin Exp Pathol*, 6: e001.
- Moreau-Marquis, S., Stanton, B. A. and O'Toole, G. A. 2008. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation in the cystic fibrosis airway. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*, 21(4): 595-599.
- Morin, C. D., Déziel, E., Gauthier, J., Levesque, R. C. and Lau, G. W. 2021. An organ system-based synopsis of *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Virulence*, 12(1): 1469-1507.
- Morita, Y., Tomida, J. and Kawamura, Y. 2014. Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. *Frontiers in Microbiology*, 4: 422.
- Mulcahy, L. R., Isabella, V. M. and Lewis, K. 2014. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. *Microbial Ecology*, 68(1): 1-12.
- Nahar, N., Asad, S., Ahmed, T., Setu, N. I., Kayser, M. S., Islam, M. S. and Rashid, R. B. 2017. In silico assessment of the genotypic distribution of virulence and antibiotic resistance genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7(7): 055-061.
- Najafi, H. M. B. and Pezeshki, P. 2013. Bacterial mutation; tubes mechanisms and mutant detection method. *Review European*, 4: 628-638.
- Neely, C. J., Kartchner, L. B., Mendoza, A. E., Linz, B. M., Frelinger, J. A., Wolfgang, M. C. and Cairns, B. A. 2014. Flagellin treatment prevents increased susceptibility to systemic bacterial infection after injury by inhibiting anti-inflammatory IL-10+ IL-12-neutrophil polarization. *Public Library of Science*, 9(1): 623.
- Nikaido, H. 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4): 593-656.
- Norman, A. T. and Judkins, K. C. 2004. Pain in the patient with burns. *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care and Pain*, 4(2): 57-61.

- Oncul, O., Ulkur, E., Acar, A., Turhan, V., Yeniz, E., Karacaer, Z. and Yildiz, F. 2009. Prospective analysis of nosocomial infections in a burn care unit, Turkey. *Indian Journal of Medical Research*, 130(6): 758-764.
- Onguru, P., Erbay, A., Bodur, H., Baran, G., Akinci, E., Balaban, N. and Cevik, M. A. 2008. Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors for nosocomial infections. *Journal of Korean Medical Science*, 23(6): 982-987.
- Othman, N., Babakir-Mina, M., Noori, C. K. and Rashid, P. Y. 2014. *Pseudomonas aeruginosa* infection in burn patients in Sulaimaniyah, Iraq: risk factors and antibiotic resistance rates. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 8(11): 1498-1502.
- Otta, S., Dash, J. K. and Swain, B. 2015. Aerobic bacteriology of burn wound infections. *Chrismed Journal of Health and Research*, 2(4): 337.
- Peleg, A. Y. and Hooper, D. C. 2010. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *New England Journal of Medicine*, 362(19): 1804-1813.
- Poulos, R.G., Hayen, A., Chong, S.S., Finch, C.F. 2009. "Geographic mapping as a tool for identifying communities at high risk of fire and burn injuries in children. *Burns* 35(3): 417- 24.
- Raof, W. A. M. 2011. Distribution of *algD*, *lasB*, *pilB* and *nan1* genes among MDR clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in respect to site of infection. *Tikrit Medical Journal*, 2: 17.
- Ravel, J. and Cornelis, P. 2003 . Genomics of pyoverdine-mediated iron uptake in *Pseudomonads*. *Trends in Microbiology*, 11(5): 195-200.
- Reish, O., Ashkenazi, S., Naor, N., Samra, Z., & Merlob, P. 1993. An outbreak of multiresistant *Klebsiella* in a neonatal intensive care unit. *Journal of Hospital Infection*, 25(4): 287-291.
- Rennie, R. P., Jones, R. N., Mutnick, A. H. and SENTRY Program Study Group. 2003. Occurrence and antimicrobial susceptibility patterns of pathogens isolated from skin and soft tissue infections: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (United States and Canada, 2000). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 45(4): 287-293.

- Rice, A. and Wereszczynski, J. 2018. Atomistic scale effects of lipopolysaccharide modifications on bacterial outer membrane defenses. *Biophysical Journal*, 114(6): 1389-1399.
- Rippa, A. L., Kalabusheva, E. P. and Vorotelyak, E. A. 2019. Regeneration of dermis: scarring and cells involved. *Cells*, 8(6): 607.
- Rossolini, G.M. and Mantengoli E. 2005. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect*, 11:17-32.
- Rowan, M. P., Cancio, L. C., Elster, E. A., Burmeister, D. M., Rose, L. F., Natesan, S. and Chung, K. K. 2015. Burn wound healing and treatment: review and advancements. *Critical Care*, 19(1): 243.
- Ryan, K. J. and Ray, C. G. 2004. Medical microbiology. McGraw Hill, 4(2): 370.
- Sabharwal, N., Dhall, S., Chhibber, S. and Harjai, K. 2014. Molecular detection of virulence genes as markers in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from urinary tract infections. *International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics*, 5(3): 125.
- Sambrook, J. and Russell, D. W. 2001. *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 854 Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 855, New York.
- Sato, H. and Frank, D. W. 2004 . ExoU is a potent intracellular phospholipase. *Molecular Microbiology*, 53(5): 1279-1290.
- Seigel, R. E. 2008. "Emerging Gram negative antibiotic resistance: Daunting challenges, declining sensitivities, and dire consequences. *Resp Care*, 53: 471-479.
- Sharmin, S., Alamgir, F., Fahmida, M. and Saleh, A. A. 2009. Antimicrobial sensitivity pattern of uropathogens in children. *Bangladesh Journal of Medical Microbiology*, 3(2): 18-22.
- Shi, H., Trinh, Q., Xu, W., Zhai, B., Luo, Y. and Huang, K. 2012 . A universal primer multiplex PCR method for typing of toxinogenic *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal Applied Microbiology*, 95(6): 1579-1587 .
- Shiny, P. A., Rajendran, S. and Sarayu, Y. L. 2016. A study on isolation and antibiotic sensitivity testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with respiratory tract infection with special reference to phenotypic and genotypic

- characterization of Extended Spectrum Beta Lactamases (ESBL). *Open Journal of Medical Microbiology*, 6(2): 80-86.
- Shuwaikh, R. M. 2016. Antibiotics and their uses, Dar Tigris for publication and distribution, pp.112, Amman.
- Singh, G., Wu, B., Baek, M. S., Camargo, A., Nguyen, A., Slusher, N.A. and Lynch, S. V. 2010. Secretion of *Pseudomonas aeruginosa* type III cytotoxins is dependent on *Pseudomonas* quinolone signal concentration. *Microbial Pathogenesis*, 49(4): 196-203.
- Smaill, F. M. and Grivell, R. M. 2014. Antibiotic prophylaxis versus no prophylaxis for preventing infection after cesarean section. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 10: 17.
- Spilker, T., Coenye, T., Vandamme, P. and LiPuma, J. J. 2004. PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(5): 2074-2079.
- Srinivasan, S, Vartak, A.M., Patil, A. Saldanha, J. 2009. Bacteriology of the burn wound at the Bai Jerbai Wadia Hospital for children, Mumbai, India—A 13-year study, Part I- Bacteriological profile. *Indian Journal Plast Surg*, 42(2): 213–218.
- Stryjewski, M. E. and Sexton, D. J. 2003. *Pseudomonas aeruginosa* infections in specific types of patients and clinical settings. In *Severe Infections Caused by Pseudomonas aeruginosa*, pp. 1-15, Boston.
- Sudhakar, T., Karpagam, S. and Premkumar, J. 2015. Biosynthesis, antibacterial activity of pyocyanin pigment produced by *Pseudomonas aeruginosa* SU1. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(3): 921-924.
- Symth, A. and Alford, J.A. 1984. Lipolytic microorganism in compendium of methods for the microbiological examination of foods, *Journal of Food Science*, 42(5):1402-1403 .
- Thakuria, B. and Lahon, K. 2013. The beta lactam antibiotics as an empirical therapy in a developing country: an update on their current status and recommendations to counter the resistance against them. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 7(6): 1207.

- Ullah, F., Malik, S.A. and Ahmed, J. 2009. Antimicrobial susceptibility and ESBL prevalence in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in the north west of Pakistan. *Burns* 35(7): 1020-25.
- Wassef, M., Mahallawy, H. E., Zafer, M. M., Ghaith, D. and Hamid, R. A. 2015. Lab based surveillance of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Cairo University Hospitals. *Egypt Journal Microbiol*, 2: 39-43.
- Wilson, R., Sykes, D. A., Watson, D., Rutman, A., Taylor, G. W. and Cole, P. J. 1988. Measurement of *Pseudomonas aeruginosa* phenazine pigments in sputum and assessment of their contribution to sputum sol toxicity for respiratory epithelium. *Infection and Immunity*, 56(9): 2515- 2517.
- Wise, B. and Levine, Z. 2015. Inhalation injury. *Canadian Family Physician*, 61(1): 47-49.
- Wolska, K. A. T. A. R. Z. Y. N. A. and Szweda, P. I. O. T. R. 2009. Genetic features of clinical *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Journal Microbiol*, 58(3): 255-60.
- Wright, M. L. and Romano, M. J. 2006. Ventilator-associated pneumonia in children. In *Seminars in pediatric infectious diseases*. WB Saunders, 17(2): 58-64.
- Yusuf, E., Herendael, B. V., Verbugghe, W., Leven, M., Goovaerts, E., Bergs, K., Wouters, K., Jorens, ph. G. and Goossens, H. 2017. Emergence of antimicrobial resistance to *Pseudomonas aeruginosa* in the intensive care Unit; association with the duration of antibiotic exposure and mode of administration. *Annals of Intensive Care*, 7(1): 72.
- Zhang, R., Jin, Y. and Han, C. 2002. The isolation of *Pseudomonas aeruginosa* from burn wound and the analysis of its antibiotic resistant spectrum. *Zhonghua Shao Shang za zhi Zhonghua Shaoshang Zazhi*. Chinese Journal of Burns, 18(5): 285-287.

EKLER

EK 1. VITEK 2 kompakt sonuç

EK 2. Bu çalışmada kullanılan antimikrobiyal diskler



EK 1. VITEK 2 kompakt sonuç

Organism Quantity:

Selected Organism : *Pseudomonas aeruginosa*

Source: swab

Collected:

Comments:	

Identification Information	Analysis Time: 4.87 hours	Status: Final
Selected Organism	99% Probability	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
ID Analysis Messages	Bionumber:	0003053103500200

Biochemical Details																	
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	-
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	+	15	OFF	-
17	BGLU	-	18	dMAL	-	19	dMAN	-	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAlap	+
23	ProA	+	26	LIP	+	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	-	34	dTAG	-	35	dTRE	-	36	CIT	+	37	MNT	+	39	5KG	-
40	ILATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	-	48	LDC	-	53	IHIa	-	56	CMT	+	57	BGUR	-
58	O129R	-	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

EK 1. VITEK 2 kompakt sonuç (devam etti)

Organism Quantity:					
Selected Organism : <i>Pseudomonas aeruginosa</i>					
Source: urine	Collected:				
Comments:					
Identification Information					
Analysis Time:	4.87 hours				
Status:	Final				
Selected Organism					
99% Probability:	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				
Bionumber:	0043051003500250				
ID Analysis Messages					
Susceptibility Information					
Analysis Time:	10.47 hours				
Status:	Final				
Antimicrobial	MIC	Interpretation	Antimicrobial	MIC	Interpretation
Ticarcillin	32	S	Amikacin	<= 2	S
Ticarcillin/Clavulanic Acid	32	S	Gentamicin	<= 1	S
Piperacillin	8	S	Tobramycin	<= 1	S
Piperacillin/Tazobactam	8	S	Ciprofloxacin	<= 0.25	S
Ceftazidime	4	S	Perfloracin		
Cefepime	2	S	Minocycline		
Aztreonam			Colistin	<= 0.5	S
Imipenem	1	S	Rifampicin		
Meropenem	<= 0.25	S	Trimethoprim/ Sulfamethoxazole		
AES Findings					
Confidence: Consistent					

EK 1. VITEK 2 kompakt sonuç (devam etti)

Organism Quantity:

Selected Organism : *Pseudomonas aeruginosa*

Source: urine

Collected:

Comments:	

Identification Information	Analysis Time: 5.83 hours	Status: Final
Selected Organism	99% Probability	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
ID Analysis Messages	Bionumber: 0003453103500250	

Susceptibility Information			Analysis Time: 13.15 hours		Status: Final	
Antimicrobial	MIC	Interpretation	Antimicrobial	MIC	Interpretation	
Ticarcillin	>= 128	R	Gentamicin	>= 16	R	
Ticarcillin/Clavulanic Acid	>= 128	R	Tobramycin	>= 16	R	
Piperacillin	>= 128	R	Ciprofloxacin	>= 4	R	
Ceftazidime	>= 64	R	Pefloxacin			
Cefepime	>= 64	R	Minocycline			
Aztreonam			Colistin	2	S	
Imipenem	>= 16	R	Rifampicin			
Meropenem	>= 16	R	Trimethoprim/ Sulfamethoxazole			
Amikacin	>= 64	R				

AES Findings	
Confidence:	Consistent

EK 2. Bu çalışmada kullanılan antimikrobiyal diskler

Antimicrobial agent *	Symbol	Concentration µg/disk	Diameters of inhibition zones (mm)		
			resistant	Intermediate	susceptible
Penicillin	P	10 **	≤11	12-21	≥22
Ampicillin	Am	10	≤11	12-13	≥14
Piperacillin	PRI	100	≤17	-	≥18
Carbencillin	PY	100	≤13	14-16	≥17
Ticarcillin	Tc	75	≤14	-	≥15
Ceftizoxime	ZOX	30	≤14	15-19	≥20
Cefixime	CFM	5	≤15	16-18	≥19
Cefotaxime	CTX	30	≤14	15-22	≥23
Cefepime	FEP	30	≤14	15-17	≥18
Amikacin	AK	30	≤14	15-16	≥17
Gentamicin	CN	10	≤12	13-14	≥15
Tobromycin	TOB	10	≤12	13-14	≥15
Ciprofloxacin	CIP	5	≤15	16-20	≥21
Norfloxacin	NOR	10	≤13	14-16	≥17
Tetracycline	TE	30	≤14	15-18	≥19
Doxycycline	DO	30	≤12	13-15	≥16
Erythromycin	E	15	≤13	14-22	≥23
Azithromycin	AZM	15	≤13	14-17	≥18
Chloramphenicol	C	30	≤12	13-17	≥18
Colistin	CT	10	≤18	9-10	≥11
Rifampin	RA	5	≤16	17-19	≥20
Aztreonam	ATM	30	≤15	16-21	≥22
Co-trimoxazole	SXT	25	≤10	11-15	≥16

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Ruaa Mohsin Jumaah JUMAAH

Eğitim

Yüksek Lisans Çankırı Karatekin Üniversitesi 2020-2023
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Lisans Dhi Qar Üniversitesi 2005-2009
Fen Fakültesi
Biyoloji Bölümü