KABUL VE ONAY

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında, Prof. Dr. Osman Birol ÖZGÜMÜŞ danışmanlığında, Gülşah ALTAN tarafından hazırlanan Klinik Örneklerden İzole Edilen *Karbapenem Dirençli Pseudomonas aeruginosa İzolatlarındaki Antibiyotik Direncinin Moleküler Analizi* adlı bu tez çalışması, / / tarihinde yapılan savunma sınavı sonucunda oy birliği / oy çokluğuyla başarılı bulunarak jürimiz tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	**Unvanı, Adı SOYADI**	**İmza**
Başkan :		
Üye :		
Üye :		
Üye :		
Üye :		

ETİK BEYAN

Tıbbi Mikrobiyoloji Doktora Programından mezun olmak üzere teslim ettiğim "Klinik Örneklerden İzole Edilen Karbapenem Dirençli *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarındaki Antibiyotik Direncinin Moleküler Analizi" adlı tezim, bilim ve araştırma etiği prensiplerine riayet edilerek tarafımdan yazılmıştır.

Tez çalışmamda, başka kaynaklardan aktarılan bütün bilgi ve alıntılar, Enstitünüz Tez Yazım Kılavuzuna uygun olarak açıkça gösterilmiştir. Kaynağı gösterilenler dışında kalan bütün bilgiler uygun araştırma yöntemi kullanılarak tarafımdan edinilmiş ve esere bu şekilde yansıtılmıştır. Şahsıma ait olmayan hiçbir bilgi, kasıt veya kusurlar, şahsıma aitmiş gibi gösterilmemiştir. İnternet kaynakları dâhil, sahibine/kaynağına atıf yapılmaksızın hiçbir bilgi kullanılmamıştır. Aksinin ortaya çıkması halinde doğacak bütün hukuki, idari, akademik ve etik sorumluluk tarafıma ait olacaktır. Eserin tesliminden sonra herhangi bir zamanda, bilim etiğine aykırılık tespit edilmesi ve / veya eserimle ilgili intihal veya intihal şeklinde anlaşılacak bir durumun ortaya çıkması halinde; Üniversiteniz ve eğitim kadronuzun hiçbir şekilde sorumlu tutulmayacağını hür irademle kabul, beyan ve taahhüt ederim.

22.04.2024

Gülşah ALTAN

ÖN SÖZ

Hastane ortamında morbidite ve mortaliteye neden olan *Pseudomonas aeruginosa'*nın neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde zorluğa neden olan karbapenem direncine bağlı olarak direncin yayılmasına neden olan karbapenemaz genleri, integron ve konjugatif plazmit gibi mobil genetik elemanların varlığı ve diğer antibiyotik gruplarındaki direnç oranının araştırılması amaçlandı. Klinik izolatların bazı virülans genleri ve izolatlar arasındaki klonal benzerlikler araştırıldı ve epidemiyolojik açıdan değerlendirildi.

Doktora eğitimim boyunca yoluma ışık tutan, sabır, özveri ve içtenlikle varlığını hissettiren, derin bilgi ve tecrübeleriyle her fırsatta paylaşımlarını esirgemeyen sevgili danışman hocam Prof. Dr. Osman Birol ÖZGÜMÜŞ'e, tez sürecimin en yakın takipçisi olup manevi desteğini ve bilimsel katkılarını cömertlikle ortaya koyan sevgili hocam Prof. Dr. Devrim Dündar'a, tez sürecimde manevi desteği ve değerli bilgileriyle fikir paylaşımında bulunan sevgili hocam Prof. Dr. Fatma Budak'a, dendogram analizinin yapılmasına katkı sağlayan sayın hocam Prof. Dr. Barış Otlu'ya, tez sürecimi yakından takip eden ve varlığını her daim hissettiren sevgili arkadaşım Arş. Gör. Dr. Tuğba Nur Kaya'ya, tezime sundukları katkılardan dolayı Öğr. Gör. Dr. Erva Rakıcı'ya ve Öğr. Gör. Dr. Nebahat Ejder'e teşekkürlerimi sunarım.

Akademik yolculuğuma başladığım günden bu yana büyük bir mutluluk ve heyecanla desteğini benden esirgemeyen, benimle birlikte sabredip yolumu her zaman çiçek bahçesine dönüştüren canım annem Gülser Altan ve canım babam Mustafa Altan'a sonsuz sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım. Tez sürecimle yakından ilgilenen ve güzel temennilerde bulunan tüm dostlarıma, arkadaşlarıma ve yakın çevreme teşekkür ederim.

"Bu çalışma Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü birimince desteklenmiştir. Proje Numarası: TDK-2022-1374" ("This work was supported by the Research Fund of Recep Tayyip Erdogan University. Project Number: TDK-2022-1374")

Gülşah ALTAN

2024/RİZE

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY I
ETİK BEYAN II
ÖN SÖZ III
İÇİNDEKİLER IV
ÖZET VII
ABSTRACT VIII
KISALTMALAR IX
TABLOLAR LİSTESİ XIV
ŞEKİLLER LİSTESİ XV
GİRİŞ 1
1. *Pseudomonas aeruginosa* 2
1.1. Tarihçe 2
1.2. Tanım ve sınıflandırma 3
1.3. Mikrobiyolojik Özellikleri 4
1.4. Biyokimyasal Özellikler 5
1.5. Virülans Faktörleri ve Patogenez 5
1.5.1 Bakteri Hücre Yüzeyi ile İlişkili Virülans Faktörleri 6
1.5.2. Bakteri Hücre Dışına Salgılanan Virülans Faktörleri 7
1.6. Neden Olduğu Enfeksiyonlar ve Tedavide Kullanılan Antibiyotikler 11
2. ANTİBİYOTİKLER 14
2.1. Beta-laktamlar 14
2.1.1. Penisilinler 14
2.1.2. Sefalosporinler 15
2.1.3. Karbapenemler 15
2.1.4. Monobaktamlar 16
2.2. Aminoglikozidler 16
2.3. Kinolonlar 16
2.4. Kolistin 16
2.5. *Pseudomonas aeruginosa* Enfeksiyonlarının Tedavisinde Yeni Kullanıma Giren Antibiyotikler 17
3. *Pseudomonas aeruginosa*'nın KARBAPENEM DİRENCİ 17
3.1. Hedef Hücre İçinde Antibiyotiğin Etkin Konsantrasyona Ulaşamaması 17

3.1.1. Porin Kaybı 17
3.1.2. Aktif Pompa Sistemlerinin İndüklenmesi 17
3.2. Hedef Bölgedeki Penisilin Bağlayıcı Proteinlerde (PBP) Meydana Gelen Değişimler 18
3.3. Beta-laktamazlar ve Karbapenemazlar 18
4. *Pseudomonas aeruginosa*'daki KARBAPENEMAZLARIN DÜNYA GENELİNDEKİ EPİDEMİYOLOJİSİ 19
5. Antibiyotik Direncinin Yayılmasında Rol Oynayan Mobil Genetik Elemanlar 20
6. Antibiyotik Direncinin Yayılmasında Rol Oynayan Gen Aktarım Mekanizmaları 26
7. GEREÇ ve YÖNTEM 29
7.1. Gereç 29
7.1.1. Kullanılan Cihazlar 29
7.1.2. Laboratuvar Suşları ve Standart Suşlar 29
7.1.3. Besiyeriler ve Kimyasallar 30
7.1.3.1. Besiyerilerin ve Antibiyotiklerin Hazırlanışı 30
7.1.3.2. Agaroz Jel Elektroforezi İçin Solüsyonların Hazırlanışı 31
7.1.3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu İçin Kullanılan Solüsyonların Hazırlanışı 32
7.1.3.4. Plazmit DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Solüsyonların Hazırlanışı 32
7.1.3.5. Pulsed Field Gel Elektroforezi İçin Kullanılan Solüsyonlar 33
7.2. Yöntem 33
7.2.1. Bakteriyel İzolatların Toplanması, Tanımlanması ve Saklanması 33
7.2.2. Antibiyotik Duyarlılık Testi 35
7.2.3. İmipenem-EDTA / Meropenem-EDTA Kombine Disk Yöntemi 35
7.2.4. Konjugasyon Deneylerinin Yapılması 35
7.2.5. Transkonjugantların Antibiyotik Duyarlılık Testi 37
7.2.6. Alkali Lizis Yöntemiyle Plazmit DNA İzolasyonu 37
7.2.7. Plazmit DNA'nın Agaroz Jelde Görüntülenmesi 38
7.2.8. Transkonjugantların Pulsed Field Jel Elektroforezi Analizi 38
7.2.9. PZR Deneyleri 40
7.2.9.1. Biyofilm Genlerinin PZR ile Taranması 41
7.2.9.2. Karbapenemaz Genlerinin PZR ile Taranması 41
7.2.9.3. İntegronların PZR ile Taranması 41

7.2.10. ERIC-PZR İle İzolatların Klonal İlişki Analizi 44
8. BULGULAR 45
8.1. Bakteriyel İzolatların İzole Edildiği Klinik Örneklere Ait Bilgiler 45
8.2. Klinik İzolatların Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçları 46
8.3. İmipenem-EDTA / Meropenem-EDTA Kombine Disk Yöntemi Sonuçları 48
8.4. Konjugasyon Deneyleri 48
8.5. Transkonjugantların Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçları 49
8.6. Plazmit DNA'ların Agaroz Jel Elektroforezi 50
8.7. Transkonjugantların Pulsed Field Jel Elektroforezi Analizi 50
8.8. PZR Deneyleri 51
8.8.1. Biyofilm Genleri 51
8.8.2. Karbapenemaz Genleri 51
8.8.3. İntegronlar 52
8.9. ERIC- PZR ile İzolatların Klonal İlişki Analizi 60
9. TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER 62
9.1. Tartışma 62
9.2. Sonuç ve Öneriler 71
KAYNAKÇA 74
ETİK KURUL KARARI 95

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Anabilim Dalı : Tıbbi Mikrobiyoloji
Tez Türü : Doktora Tezi
Danışman : Prof. Dr. Osman Birol ÖZGÜMÜŞ
Hazırlayan : Gülşah ALTAN
Yıl : 2024
Sayfa Sayısı :

ÖZET

KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN KARBAPENEM DİRENÇLİ *Pseudomonas aeruginosa* İZOLATLARINDAKİ ANTİBİYOTİK DİRENCİNİN MOLEKÜLER ANALİZİ

Riskli hasta gruplarında morbitide ve mortaliteye neden olan *Pseudomonas aeruginosa* fırsatçı bir patojendir. Bu suşlarının arasında karbapenemazların yayılması neden olduğu enfeksiyon hastalıklarının tedavisini zorlaştırmaktadır. Bu tez çalışmasında, Ekim 2021 ile Mart 2023 tarihleri arasında Kocaeli Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Merkez Laboratuvarı Bakteriyoloji Birimi'nde çeşitli klinik örneklerden izole edilen 47 adet karbapeneme dirençli *P. aeruginosa* (KDPA) izolatının moleküler epidemiyolojisinin araştırılması amaçlanmıştır. İzolatlarının identifikasyonu ve bazı antibiyotiklere (imipenem, meropenem, aztreonam, amikasin, netilmisin, tobramisin, piperasilin, piperasilin/tazobaktam, seftazidim, sefepim, siprofloksasin ve levofloksasin) karşı duyarlılık testleri VITEK® 2 Compact otomatize sistemle yapılmıştır. İmipenem/meropenem-EDTA kombine disk yöntemi ile izolatların metallo-beta-laktamaz (MBL) üretimi araştırılmıştır. Sıvıda çiftleştirme yöntemi ile konjugasyon deneyleri yapılmıştır. Alkali lizis yöntemi ile plazmit DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Disk difüzyon yöntemi ile transkonjugantlardaki ko-transfer edilen antibiyotik dirençler belirlenmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile karbapenemaz genleri (*bla*$_{IMP}$, *bla*$_{VIM}$, *bla*$_{NDM}$, *bla*$_{KPC}$ ve *bla*$_{OXA-48}$), integron gen kasetleri (sınıf 1 ve sınıf 2) ve virülans genleri (*lasR* ve *rhlR*) araştırılmıştır. İzolatların klonal ilişkileri ERIC (Enterobacterial Intergenic Repetitive Consensus)-PZR'dan elde edilen DNA parmak izi analizlerinin değerlendirilmesiyle araştırılmıştır. Karbapeneme dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının en dirençli olduğu antibiyotik levofloksasin olarak belirlenmiştir. En düşük direnç oranı tobramisin, gentamisin ve amikasine karşı gözlenmiştir. Yirmi beş (%53,2) izolatta MBL üretimi tespit edilmiştir. Konjugasyon deneylerinde 12 (%25,5) izolatta konjugatif direnç plazmiti belirlenmiştir. İzolatların %90'ında PZR ile *lasR* ve *rhlR* biyofilm genleri tespit edilmiştir. Altı (%12,8) izolatta *bla*$_{VIM}$ geni, beş (%10,6) izolatta *bla*$_{NDM}$ geni, üç (%6,4) izolatta *bla*$_{OXA-48}$ geni saptanmıştır. *bla*$_{KPC}$ ve *bla*$_{IMP}$ genleri tespit edilmemiştir. İntegron-spesifik PZR'larda 39 (%82,9) izolatta *intI1* geni pozitifken, 24 (%51)' ünün sınıf 1 integron gen kaseti taşıdığı belirlenmiştir. Konjugatif plazmit içeren izolatların altısının sınıf 1 integron gen kaseti taşıdığı saptanmıştır. KDPA izolatlarında sınıf 2 integronlara rastlanmamıştır. ERIC-PZR paternlerinin dendogram analizinde KDPA izolatları arasında klonal benzerlik olmadığı ve izolatların çapraz bulaş ile yayılmadığı belirlenmiştir. Sonuç olarak, KDPA izolatlarının çoğunun karbapenemler haricinde diğer antibiyotik gruplarına da yüksek oranda direnç gösterdiği ve bazı dirençleri (seftazidim, sefepim, siprofloksasin, levofloksasin, piperasilin-tazobaktam) konjugatif direnç plazmitleriyle ko-transfer edebildiği görülmüştür. Klinik arenada salgına neden olabilecek potansiyeldeki bu suşların direnç gen rezervuarlarında moleküler epidemiyolojik olarak takip edilmesinin yararlı olacağı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: *Pseudomonas aeruginosa*, Karbapenem Direnci, Konjugatif Plazmit, İntegron, Virülans Geni

Recep Tayyip Erdogan University Institute of Graduate Studies
Department : Medical Microbiology
Thesis Type : Ph.D. Thesis
Supervisor : Prof. Dr. Osman Birol ÖZGÜMÜŞ
Author : Gülşah ALTAN
Year : 2024
Pages :

ABSTRACT

MOLECULAR ANALYSIS OF ANTIBIOTIC RESISTANCE IN CARBAPENEM-RESISTANT *Pseudomonas aeruginosa* ISOLATS ISOLATED FROM CLINICAL SAMPLES

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen that causes morbidity and mortality in risky patient groups. The spread of carbapenemases among these strains causes difficulties to treat infectious diseases. In this thesis study, it was aimed to investigate the molecular epidemiology of 47 carbapenem-resistant *P. aeruginosa* (CRPA) isolates isolated from various clinical samples at Kocaeli University Research and Application Hospital Central Laboratory Bacteriology Unit between October 2021 and March 2023. Identification of isolates and sensitivity tests against some antibiotics (imipenem, meropenem, aztreonam, amikacin, netilmicin, tobramycin, piperacillin, piperacillin/tazobactam, ceftazidime, cefepime, ciprofloxacin and levofloxacin) were performed with the VITEK® 2 Compact automated system. Metallo-beta-lactamase (MBL) production of isolates was investigated by the imipenem/meropenem-EDTA combined disk method. Conjugation experiments were carried out using the 'broth mating' method. Plasmid DNA isolation was performed by alkaline lysis method. Co-transferred antibiotic resistances in transconjugants were determined by the disk diffusion method. Carbapenemase genes (bla_{IMP}, bla_{VIM}, bla_{NDM}, bla_{KPC} and bla_{OXA-48}), integron gene cassettes (class 1 and class 2) and virulence genes (*lasR* and *rhlR*) were investigated by polymerase chain reaction (PCR). Clonal relationships of the isolates were investigated by evaluating DNA fingerprint analyzes obtained from ERIC (Enterobacterial Intergenic Repetitive Consensus)-PCR. The most resistant antibiotic among CRPA isolates was determined to be levofloxacin. The lowest resistance rate was observed against tobramycin, gentamicin and amikacin. MBL production was detected in twenty-five (53.2%) isolates. In conjugation experiments, conjugative resistance plasmids were detected in 12 (25.5%) isolates. Biofilm genes *lasR* and *rhlR* were detected by PCR in 90% of the isolates. The bla_{VIM} gene was detected in six (12.8%) isolates, the bla_{NDM} gene was detected in five (10.6%) isolates, and the bla_{OXA-48} gene was detected in three (6.4%) isolates. bla_{KPC} and bla_{IMP} genes were not detected. In integron-specific PCR, 39 (82.9%) isolates were positive for the *intI1* gene, while 24 (51%) were determined to carry a class 1 integron gene cassette. Six of the isolates containing conjugative plasmids were found to carry the class 1 integron gene cassette. Class 2 integrons were not found in CRPA isolates. Dendrogram analysis of ERIC-PCR patterns determined that there was no clonal similarity between CRPA isolates and that the isolates did not spread by cross-contamination. As a result, it was observed that most of the CRPA isolates showed high resistance to other antibiotic groups other than carbapenems and could co-transfer some resistances (ceftazidime, cefepime, ciprofloxacin, levofloxacin, piperacillin-tazobactam) with conjugative resistance plasmids. It is thought that it would be useful to follow molecular epidemiology in the resistance gene reservoirs of these strains, which have the potential to cause epidemics in the clinical arena.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, Carbapenem Resistance, Conjugative Plasmid, Integron, Virulence Gene

KISALTMALAR

ABD	:	Amerika Birleşik Devletleri
AD	:	Ana Bilim Dalı
ADP	:	Adenozin Difosfat
AIM	:	Australian Imipenemase
AMK	:	Amikasin
ATCC	:	Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu
ATM	:	Aztroenam
atm	:	Atmosfer Basıncı Birimi
BAL	:	Bronkoalveolar Lavaj
bç	:	Baz Çifti
BHI	:	Brain Heart Infusion
CAM	:	Central Alberta Metallo-Beta-Lactamase
CAZ	:	Seftazidim
CDC	:	Hastalık Kontrol ve Koruma Merkezi
cfu	:	Colony Forming Unit
CIP	:	Siprofloksasin
cm	:	Santimetre
CN	:	Gentamisin
CRPA	:	Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*
CS	:	Korunmuş Bölge
ÇİD	:	Çoklu İlaç Dirençli
dATP	:	Deoksi adenin trifosfat
dCTP	:	Deoksi sitozin trifosfat

dGTP	:	Deoksi guanin trifosfat
DIM	:	Dutch Imipenemase
dk	:	Dakika
DNA	:	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	:	Deoksi nükleotit trifosfat
DSÖ	:	Dünya Sağlık Örgütü
dTTP	:	Deoksi timin trifosfat
EDTA	:	Etilen Diamintetra Asetik Asit
EMB	:	Eozin Metilen Blue Agar
ERIC	:	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus
EtBr	:	Etidyum Bromür
EtOH	:	Etil Alkol
EUCAST	:	Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi
Exo	:	Ekzotoksin
FEP	:	Sefepim
FIM	:	Florance Imipenemase
g	:	Gravity
GES	:	Guiana Extended Spectrum
GIM	:	German Imipenemase
gr	:	Gram
GSBL	:	Geniş Spektrumlu Beta-Laktamaz
Hfr	:	High Frequency of Recombination
HLS	:	Hücre Liziz Tamponu
HMB	:	Hamburg Metallo-Beta-Lactamase
HST	:	Hücre Süspansiyon Tamponu
IMP	:	İmipenem

Inc	:	Incompatibility
Int	:	İntegraz
IS	:	İnsersiyon Sekansı
KDPA	:	Karbapenem Dirençli *Pseudomonas aeruginosa*
KF	:	Kistik Fibrozis
kg	:	Kilogram
KOH	:	Potasyum Hidroksit
KOÜ	:	Kocaeli Üniversitesi
KPC	:	*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemases
KUP	:	Kocaeli Üniversitesi Pseudomonas
L	:	Litre
LB	:	Luria Bertani
LEV	:	Levofloksasin
LPS	:	Lipopolisakkarit
LTR	:	Long Terminal Repeat
MBL	:	Metallo-Beta-Laktamaz
MEM	:	Meropenem
mg	:	Miligram
$MgCl_2$	:	Magnezyum Klorür
MHT	:	Modifiye Hodge Testi
mL	:	Mililitre
mm	:	Milimetre
mM	:	Milimolar
mW	:	Megawatt
MWM	:	Moleküler Ağırlık Standardı
NaCl	:	Sodyum Klorid

Na_2HPO4	:	Di-Sodyum Hidrojen Fosfat
NaOH	:	Sodyum Hidroksit
NH_4Cl	:	Amonyum Klorid
NDM	:	New Delhi Metallo-Beta-Lactamase
NET	:	Netilmisin
nm	:	Nanometre
nmol	:	Nanomol
Opr	:	Operon
OriV	:	Vejetatif Orijin
OXA	:	Oxacillinases
p	:	Plazmit
PBP	:	Penisilin Bağlayıcı Protein
PCR	:	Polymerase Chain Reaction
PFGE	:	Pulsed Field Jel Elektroforezi
PIP	:	Piperasillin
pmol	:	Pikomol
PQS	:	Pseudomonas Kinolon Sistem
PZR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	:	Ribo Nükleik Asit
rRNA	:	Ribozomal RNA
rpm	:	Revolutions Per Minute
RTEÜ	:	Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi
SDS	:	Sodyum Dodesilsülfat
sn	:	Saniye
SPM	:	Sao Paulo Metallo-Beta-Lactamase
QS	:	Quorum Sensing

TA	:	Trakeal Aspirat
TAE	:	Tris Asetik asit EDTA
TBE	:	Tris Borik asit EDTA
TE	:	Tris EDTA
TIR	:	Terminal Inverted Repeat
TISS	:	Tip I Salgılama Sistemi
Tn	:	Transpozon
Tnp	:	Transpozaz
TOB	:	Tobramisin
TZP	:	Piperasillin-Tazobaktam
µg	:	Mikrogram
µL	:	Mikrolitre
µm	:	Mikrometre
µM	:	Mikromolar
U	:	Ünite
UV	:	Ultraviyole
V	:	Volt
vb	:	ve benzeri
VIM	:	Verona Integron Mediated Metallo-Beta-Lactamase
YBÜ	:	Yoğun Bakım Ünitesi
%	:	Yüzde
&	:	ve
ºC	:	Santigrat Derece
β	:	Beta

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. *Pseudomonas'*ların sınıflandırılması 3
Tablo 2. Karbapenem dirençli *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının epidemiyolojik özellikleri 34
Tablo 3. Kullanılan oligonükleotit primerlerin özellikleri 42
Tablo 4. Polimeraz zincir reaksiyonlarının siklus parametreleri 43
Tablo 5. Klinik örnek türünün hastane ünitesine göre dağılımı 45
Tablo 6. Klinik örneklerin gönderildiği birimlerin dağılımı 45
Tablo 7. *Pseudomonas aeruginosa* klinik izolatların antibiyotik duyarlılık test sonuçları 46
Tablo 8. Transkonjugantların direnç fenotipleri, ko-transfer edilen direnç ve konjugasyon etkinliği 49
Tablo 9. Karbapenem dirençli *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının epidemiyolojik özellikleri 54

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Karbapenem dirençli *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının antibiyotiklere duyarlılık oranları 48
Şekil 2. İmipenem/meropenem-EDTA kombine disk yöntemine ait plak görüntüsü. 48
Şekil 3. Plazmit DNA preperatlarının agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü..... 50
Şekil 4. *Pseudomonas aeruginosa* PU21 transkonjugantlarının PFGE görüntüsü.... 51
Şekil 5. Karbapenemaz ve biyofilm genlerine spesifik PZR ürünleri 52
Şekil 6. *IntI1* integraz geni ve bazı seçilmiş sınıf 1 integronun değişken bölgesinin PZR gen ürünleri..... 53
Şekil 7. Karbapenem dirençli 47 *Pseudomonas aeruginosa* KUP izolatlarının ERIC-PZR paternlerinin dendogram analizi ve epidemiyolojik verileri 60

GİRİŞ

Pseudomonas aeruginosa, sağlıklı bireylerin normal florasında bulunan invaziv girişim, travma, hastanede yatış gibi durumlarda, immunsupresif hastalarda ve yaşlı bireylerde fırsatçı enfeksiyonlara neden olan Gram negatif zorunlu aerop patojendir. Geniş yelpazede hastane ile ilişkili ve toplum kökenli enfeksiyonlara neden olmaktadır. Yumuşak doku enfeksiyonu, idrar yolu enfeksiyonu, solunum yolu enfeksiyonu, bakteriyemi gibi enfeksiyonlara yol açan *P. aeruginosa* riskli hasta gruplarında hayatı tehdit edici düzeyde olmakta, morbitide ve mortaliteyi arttırmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü *P. aeruginosa*'yı hastane ile ilişkili enfeksiyonlara ve salgınlara yol açan öncelikli altı mikroorganizmadan biri olarak değerlendirmektedir. *Pseudomonas aeruginosa* tedavide sıklıkla kullanılan birinci ve ikinci kuşak sefalosporinlere, sefotaksim, seftriakson gibi bazı üçüncü kuşak sefalosporinlere, antistafilokokal penisilinlere, amoksisilin-klavulanat, ampisilin-sulbaktam, trimetoprim-sülfametoksazol gibi kombine edilmiş antibiyotik gruplarına karşı intresenk dirençlidir. Çeşitli direnç mekanizmalarını kullanma ve hızlı direnç geliştirme yeteneğine bağlı olarak antimikrobiyal ajanlar açısından enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde zorluklar yaşanmaktadır (Çeken vd., 2021).

Pseudomonas aeruginosa kromozomal mutasyonlar ve mobil genetik elemanlar vasıtasıyla olağanüstü bir antimikrobiyal direnç geliştirme kapasitesine sahiptir. Beta-laktamazları, özellikle karbapenemazları kodlayan direnç genlerinin edinilmesi ve diğer direnç mekanizmalarının varlığı çoklu ilaca dirençli (ÇİD) suşlarda bir artış meydana gelmiştir (Lopez-Garcia vd., 2018). Kromozomal mutasyonlar nedeniyle indüklenebilir AmpC beta-laktamazın üretiminde ve effluks pompalama sistemlerinin ekspresyonunda artış ve membran geçirgenliğinde azalma meydana gelmekte ve direnç gelişmektedir.

İntegron, transpozon ve plazmit gibi mobil genetik elemanların yatay gen transferi yolunu kullanarak direnç genlerini aktarması da direnç mekanizmaları arasında yer almaktadır. *Pseudomonas aeruginosa* izolatları karbapenemaz enzimi üreterek karbapenem direncinin gelişmesine neden olmaktadır. Bu mekanizma ile imipenem, seftazidim, sefepim, piperasilin-tazobaktam dahil olmak üzere yaygın olarak kullanılan antipsödomonal ajanların yanı sıra seftolozan-tazobaktam,

imipenem-relebaktam, seftazidim-avibaktam gibi piyasaya yeni sürülen beta-laktam/beta-laktamaz inhibitör kombinasyonlarının etkililiğini önemli ölçüde değiştirmektedir. *Pseudomonas aeruginosa* tarafından taşınan karbapenem direnç genleri genellikle IncP tipinde kendi kendine bulaşan (konjugatif) plazmitler, bla_{VIM} genini taşıyan sınıf I integronlar ve mikroorganizmanın çoklu türler arasında direnci yayma yeteneğini arttıran ortak bir bölgeye sahip insersiyon sekansı gibi mobil genetik elemanlar üzerinde bulunmaktadır. Plazmitler tarafından kodlanan genler genellikle geniş bir antibiyotik yelpazesine, ağır metallere ve dezenfektan olarak kullanılan kuaterner amonyum bileşiklerine karşı direnci kodlar ve plazmitlerin etkili bir şekilde çoğalmalarını, konjugatif transfer yoluyla yeni bir konakçıya geçmelerini ve bakteri hücrelerinde stabil bir şekilde muhafaza edilmelerini sağlayan modüller taşır. Karbapenem dirençli *P. aeruginosa* (KDPA) izolatları aynı zamanda florokinolon ve aminoglikozidlerin klinik faydasını azaltan ek direnç belirleyicileri taşımaktadır. Bu nedenle KDPA izolatları terapotik ajanların çoğuna direnç göstermektedir (Popowska ve Balska, 2013; Kamruzzaman vd., 2019; van der Zee vd., 2018; Tenover vd., 2022).

Karbapenem direncinin, enfeksiyonların tedavi başarısında ciddi bir tehdit haline geldiği günümüzde, direncin altında yatan moleküler biyolojik mekanizmaları aydınlatmak direncin önlenmesine yönelik çalışmalara bilgi zemini hazırlamak açısından büyük önem taşımaktadır. Mobil genetik elemanlar çok ilaca dirençle ilişkilidir ve karbapenemler dahil çoğu beta-laktama karşı direnç sağlayan genlerinin küresel boyutta yayılmasını sağlamaktadır (Roy vd., 2020). Bu tez çalışmasında poliklinik, servis ve yoğun bakım ünitelerinden izole edilen *P. aeruginosa*' da karbapenem direncine neden olan karbapenemaz genlerinin araştırılması, diğer antibiyotik gruplarındaki direncin fenotipik yöntemlerle araştırılması, integron ve konjugatif plazmitlerin moleküler analizleri ve izolatlar arasındaki klonal benzerliğin araştırılması amaçlanmıştır.

1. *Pseudomonas aeruginosa*

1.1. Tarihçe

Modern klinik mikrobiyolojiden önce olan *P. aeruginosa*'nın cerrahi yara enfeksiyonlarına neden olduğu Doggett tarafından bildirilmiştir. Pansumanda mavi-

yeşil bir cerahatin varlığı 1850'de Sedillot tarafından belirlenmiştir. Mikroskopik yöntemle mavi-yeşil irinde çomak şeklindeki mikroorganizmaların varlığı 1862'de Luke tarafından ortaya konmuştur. Gessard tarafından 1882'de enfeksiyon bölgesinden izole edilen bakteri *Bacillus pyocyaneus* olarak isimlendirilmiştir. Etken ilk kez 1894'de Migula tarafından *Pseudomonas* cinsi olarak tanımlanmıştır (Henry ve Speert, 2011). Hasarlı dokularda sekonder ve fırsatçı enfeksiyonlara neden olan *Pseudomonas*' lar 1960'lı yıllarda kistik fibrozlu hastalar ve immunsupresif bireylerde enfeksiyonlara neden olmasıyla dikkat çekmiştir. Sağlık hizmeti ile ilişkili enfeksiyonlara neden olan *P. aeruginosa* yanık yaraları, idrar, kan ve alt solunum yolu örneklerinden izole edilen mortalite ve morbitideye neden olan önemli bir patojendir (Pier ve Ramphal, 2010).

1.2. Tanım ve sınıflandırma

Pseudomonas cinsinin homolojik olarak beş gruptan oluştuğu, 1970'lerin başında geliştirilen ribozomal RNA-DNA hibridizasyon çalışmaları sayesinde belirlenmiştir. *Pseudomonas* Proteobacteria'ların gamma alt sınıfında ve rRNA homoloji grup 1 de yer almaktadır. rRNA homoloji grup I'dir (Henry ve Speert, 2011). *Pseudomonas*'ların sınıflandırılması Tablo 1'de gösterilmektedir (Brooks vd., 2014).

Tablo 1. *Pseudomonas*'ların sınıflandırılması

rRNA Homoloji Grubu ve Alt Grubu		Cins ve Tür
I	Fluoresan Gubu	*Pseudomonas aeruginosa* *Pseudomonas fluorescens* *Pseudomonas putida*
	Nonfluoresan Gubu	*Pseudomonas stutzeri* *Pseudomonas mendocina*
II		*Burkholderia pseudomallei* *Burkholderia mallei* *Burkholderia cepacia* *Ralstonia pickettii*
III		*Comamonas* türleri *Acidovorax* türleri
IV		*Brevundimonas* türleri
V		*Stenotrophomonas maltophilia*

Günümüzde 160 *Pseudomonas* türü mevcuttur. Fakat 12 tür klinik öneme sahiptir: *P. fluorescens, P. putida, P. veronii, P. monteilii, P. mosseilii, P. stutzeri, P. mendocina, P. alcaligenes, P. pseudoalcaligenes, P. luteola, P. oryzihabitans* ve *P. aeruginosa*. Filogenetik olarak *Azomonas, Azobacter, Cellvibrio, Chrysomonas* ve *Flavimonas* cinsleri ile benzerlik göstermektedir. Pyoverdin olarak isimlendirilen sarı-yeşil ya da sarı-kahverengi, suda çözünen, kısa dalga boyu ultraviyole (UV) ışığında floresan pigment üreten *Pseudomonas* cinsi üyeleri floresan gubunda yer almaktadır. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının çoğu piyosiyanin adı verilen mavi renkli pigment üretmektedir. Piyoverdin, piyosiyanin pigmenti ile birleşince karakteristik parlak yeşil renkli koloni görüntüsü meydana gelmektedir. Bazı suşlar kırmızı renkli piyorubrin ve kahverengi-siyah renkli piyomelanin pigmentlerini üretebilme yeteneğine sahiptir. Bakterinin ürettiği pigmentler boya içermeyen besiyerlerinde daha kolay görülmektedir (Henry ve Speert, 2011). *Pseudomonas aeruginosa*'nın 6.3 Mbp büyüklüğündeki genomu tüm genom sekanslama yöntemiyle Stover ve arkadaşları tarafından belirlenmiştir. Kompleks genetiğe sahip olan *P. aeruginosa* evrimsel adaptasyon mekanizmasıyla farklı koşullarda gelişimini sürdürebilmektedir (Stover vd., 2010).

1.3. Mikrobiyolojik Özellikleri

Pseudomonas aeruginosa Gammaproteobacteria sınıfı, *Pseudomonadales* takımında bulunan 0,5-0,8 μm genişliğinde ve 1,5-3,0 μm uzunluğunda düz veya hafif kıvrık, hareketli, spor oluşturmayan, kapsülsüz non fermentatif Gram negatif basildir (Erdem, 1999; Bilgehan, 2000). İlk kez Gessard tarafından 1882 yılında enfeksiyon bölgelerinde mavi- yeşil püy etkeni olarak tarif edilen bu mikroorganizmalar 1894'te Migula tarafından tanımlanmıştır (Erdem, 1999).

Yüksek düzeyde sitokrom oksidaz aktivitesine sahip olup zorunlu aeroptur. Nitrat ve arjinini elektron alıcısı olarak kullanmaktadır. En iyi 37 °C'de üreyebilmekle birlikte 42 °C' de üreme yeteneğine sahiptir (Bilgehan, 2000). Tek azot ve karbon kaynağı olarak amonyak ve karbondioksit gibi basit molekülleri kullandığından üremek için zenginleştirilmiş besiyerine ihtiyaç duymaz. Yüksek tuz

içeriği de dahil olmak üzere hemen hemen her türlü ortamda üremektedir. İnce ve saçaklı kenarlara sahip koloniler çift çift yada kısa zincirler halinde bulunabilir (Ryan vd., 2019).

Kanlı agarda β-hemoliz yaparlar. Eozin Metilen Blue (EMB) ve MacConkey agarlarda renksiz koloniler oluştururlar. Pigmentasyon özelliklerine göre Mueller-Hinton agarda piyosiyanin üretimi ile yeşil, piyoverdin üretimi ile sarı-yeşil, pyorubin üretimi ile kırmızı, pyomelanin üretimi ile kahverengi-siyah koloniler oluştururlar (Levinson, 2008).

Flagellumları polar monotrik özelliktedir. Yüzme (swimming), kayma (swarming) ve titreme (twitching) hareketleriyle hareket edebilmektedir. Birden fazla tip IV pili içermektedir (Rashid ve Kornberg, 2000).

Sıvı besiyeri ortamında ürediklerinde homojen görünümlü zar tabakası oluşur. Alkali ortamlarda gelişir. Zar tabakasının hemen altında mavi-yeşil pigment oluşumu ile ayırt edilebilmektedir. Katı besiyerinde üreme gözlendiğinde mavi-yeşil pigment oluşturan ve tüm besiyerini kaplayan mat koloniler, mukoid koloniler ve küçük R (rough) koloniler meydana gelmektedir. *Pseudomonas aeruginosa*'ya ait koloniler ekşimsi, üzümsü kokusuyla (triptofan 2-aminoasetofenon üretimine bağlı) karakteristiktir (Wilson ve Miles, 1964; Davis vd.,1968; Ilgaz, 1999; Aydın, 2001).

1.4. Biyokimyasal Özellikler

Oksidaz ve katalaz testi pozitif olan *P. aeruginosa* oksidasyon yolağını kullanarak glukoz ve bazı karbonhidratları parçalar ve asit oluşturur. Laktoz ve sakkaroza etkisi yoktur. İndol ve ve hidrojen sülfür (H_2S) meydana getirmezler. Metil kırmızısı, Voges-Proskauer, lizin dekarboksilaz ve ornitin dekarboksilaz testleri negatiftir. Nitratı nitrite indirgeyebilirler. L-arjinin dihidrolaz testi pozitiftir. Potasyum siyanüre (KCN) dirençlidir. DNA'daki G+C oranı %67 mol'dür (Bilgehan, 2000).

1.5. Virülans Faktörleri ve Patogenez

En büyük bakteri genomlarından birine sahip olan *P. aeruginosa* genomu 5567 gen kodlar ve bunlardan 468'i düzenleyici gendir. Toksin ve enzimler dahil olmak üzere çok sayıda yapısal bileşen virülans faktörüdür. Sekresyon sistemleri

patogenezinde önemli rol oynamaktadır (Murray vd., 2016). Tip 3 sekresyon sistemi toksinlerin konağa verilmesiyle ilgili olup tanımlanmış altı tip sekresyon sistemine sahiptir (de Sousa vd., 2021; Qin vd., 2022a).

Bakterinin hayatta kalma yeteneği çevresel ve fizyolojik koşullara bağlı olarak gelişmektedir. Bakteriler metabolik yolları kullanarak antibiyotiklerin etkisini nötralize ederler. İçerdikleri virülans faktörleri patogeneze katkı sağlamaktadır (Murray vd., 2016). Kolonizasyon, invazyon ve sistematik yayılım yoluyla enfeksiyonlara neden olmaktadır (Procop vd., 2017). İmmunsupresif hastalarda ya da immun sistemin zayıfladığı durumlarda fırsatçı enfeksiyonlara neden olmaktadır ve dokulara bağlanarak kolonize olmaktadır. Virülans faktörleri patojenite adaları olarak adlandırılan genomik adalar tarafından kodlanmaktadır (Woods, 2004; Harvey vd., 2013; Sırıken ve Öz, 2017).

Logaritmik fazda üreyen *P. aeruginosa* çeşitli virülans faktörleri salgılamaktadır. Virülans faktörleri; hücre ile ilişkili virülans faktörleri ve hücre dışına salınan virülans faktörleri olmak üzere iki grupta toplanmaktadır (Woods, 2004).

1.5.1 Bakteri Hücre Yüzeyi ile İlişkili Virülans Faktörleri

Bakterinin kolonize olmasında önemli paya sahip olan hücre yüzeyi ile ilişkili virülans faktörleri kirpik, kamçı (flagella), pilus (fimbria), lipopolisakkarit (LPS) ve aljinattır.

Kamçı (flagella), sitoplazmadan köken almaktadır ve bakterinin yüzme (swimming) ve kayma (swarming) hareketinden sorumludur. Bakterinin konak epitel hücrelerine adhezyonu ile kolonizasyon gerçekleşmektedir (Singh vd., 2002).

Pilus (Fimbria), *P. aeruginosa*'nın yer değiştirme ve seğirme-titreme (twitching) hareketinden sorumlu olan ince, kısa, filamentöz, ekstraselüler yüzey çıkıntılarıdır. Konak hücrenin yüzey reseptörlerine bağlanarak kolonizasyon aşamasında ve patogenezde önemli rol oynamaktadır. (Kipnis vd., 2006).

Lipopolisakkarit (LPS), hücre duvarının dış yüzeyinde bulumaktadır ve lipit A, kor polisakkarit ve O özgül polisakkaritten meydana gelmektedir. İkili fosfolipid tabaka içerisinde yer alan ve endotoksik özellikte olan Lipit A bileşeni aynı zamanda

pro-inflamatuar yolaklar aracılığıyla kistik fibrozisli (KF) hastaların akciğerinde doku hasarına neden olmaktadır. Polisakkarit yapılı hidrofilik kuyruk yapısındaki O özgül polisakkarit bakteriyi fagositoza karşı korumakla birlikte serotiplendirmede oldukça önemlidir ve bakteriyel keratitten sorumludur (King vd., 2009).

Aljinat, glukuronik asit ve mannuronik asidin tekrarlayan polimerlerinden oluşan mukoid yapıda bir ekzopolisakkarittir. Ekzopolisakkarit olmasına rağmen hücre ile ilişkili olduğundan hücre yüzeyi ile ilişkili virülans faktörleri arasında yer almaktadır. Kolonizasyona katkı sağlayarak bakterinin konak epitel hücresine tutunmasını sağlamaktadır. Özellikle KF'li hastaların akciğerinde aşırı üretildiği için mukoid yapıda fenotip gelişmektedir (Salyers ve Whitt, 1994; Jain ve Ohman, 2005; Karatuna ve Yağcı, 2008; Blanco-Cabra vd., 2020). Aşırı aljinat üretimi bakteriyel virülansa katkı sağlayarak bakterinin fagositozdan ve konak immun yanıtından kaçmasına ve antibiyotiklerden korunmasına neden olmaktadır (Karatuna ve Yağcı, 2008).

1.5.2. Bakteri Hücre Dışına Salgılanan Virülans Faktörleri

Psaudomonas aeruginosa'nın sahip olduğu virülans faktörlerini hücre dışına salgılaması sahip olduğu salgı sistemleri aracılığı ile gerçekleşmektedir. Bu durum bakterinin çevresel adaptasyon ve kolonizasyonuna, konak hücrede doku hasarına ve sistemik yayılıma olanak sağlamaktadır (Wiener-Kronish ve Pittet, 2011).

Elastaz, insan akciğerinde %30 oranında bulunan ve akciğerlerin daralıp genişlemesinden sorumlu majör protein olan elastini parçalayan ve konağın doğal bariyer bütünlüğünü bozup dokulara invaze olmasını sağlayan bir enzimdir. Las A proteaz ve Las B elastaz *P. aeruginosa*' nın elastolitik etkisinden sorumlu olan ve birlikte sinerjistik etki gösteren iki enzimdir. Elastini yıpratıcı etkisi olan ve serin metalloproteinaz yapısında olan LasA proteaz tek başına elastini parçalayamaz fakat kendisinden 10 kat daha fazla proteaz etkisi bulunan ve çinko metalloproteaz yapısında olan LasB elastaz ile birlikte aktivite gösterdiğinde elastazın parçalayıcı etkisini arttırmaktadır. Bu enzimler *lasA* ve *lasB* genleri tarafından kodlanmaktadır (Salyers ve Whitt, 1994; Maçin 2014; Islamieh vd., 2019; Hassuna vd., 2020).

Alkali proteaz, en iyi alkali ortamda aktivite gösteren, apr geni tarafından kodlanan yüksek proteolitik etkiye sahip bir enzimdir. Fibrinoliz etkisi olup *P.*

aeruginosa'nın tip I salgılama sistemi (TISS) tarafından salgılanmaktadır. Akut akciğer hasarına neden olmaktadır ve kornea enfeksiyonlarının patogenezinde rol oynamaktadır (Alcorn ve Wright, 2004).

Piyosiyanin, *P. aeruginosa* dışında herhangi bir bakteride bulunmayan mavi pigmentli bir metabolittir. Quorum sensing (çoğunluğu algılama) sistemi tarafından düzenlenen bu virülans faktörü hidrojen peroksit ve süperoksit gibi serbest radikal salınımına neden olup toksik etki göstererek hücresel solunumu inhibe eder (Lau vd., 2004).

Piyoverdin, *P. aeruginosa*'nın metabolizmasında kullanmak üzere çevresel ortamdan demir şelatlayan siderefor özellikte bir pigmenttir. Ekzotoksin A ve endoproteaz gibi virülans faktörlerinin salgılanmasına katkı sağlamaktadır (Lamont vd., 2002).

Proteaz IV, en iyi alkali ortamda aktivite göstermektedir. Keratit enfeksiyonlarının patogenezinde rol almaktadır. Sürfaktan proteinlerin yıkımına neden olup akciğer enfeksiyonlarında etkisi olduğu düşünülmektedir (Malloy vd., 2005).

Fosfolipaz C, Tip II salgı sistemi tarafından salgılanan, ekstraselüler boşlukta enzim görevini yerine getiren, protein yapıda ve ısıya duyarlı bir hemolizindir. Hemolitik etkisine göre iki guba ayrılmaktadır. Fosfatidilkolin ve sfingomyelin hemolitik yapılı fosfolipaz C tarafından hidrolize edilirken, fosfatidilkolin ve fosfatidilserin hemolitik olmayan fosfolipaz C tarafından hidrolize edilmektedir. Fosfolipaz C, ökaryotik hücre zarındaki fosfolipidleri hedef aldığından akut akciğer hasarına neden olmaktadır (Wiener-Kronish vd., 1993).

Ramnolipid, ramnoz içeren glikolipid sayesinde sürfaktan etki gösteren ve hemolitik aktivitesi olan hemolizindir. Sürfaktan akciğerlerdeki fosfolipidlere zarar verir ve fosfolipaz C'nin etkisini arttırır. Fosfolipaz C ile birlikte sinerjistik etki göstererek lipit ve lesitini parçalamaktadır. Siliyer fonksiyonu inhibe etmekte ve bakterinin biyofilm oluşturmasına katkı sağlamaktadır (Kipnis vd., 2006; Karatuna ve Yağcı, 2008; Soberón-Chávez vd., 2020).

Ekzotoksin A (ExoA), Tip II salgı sistemi tarafından salgılanan, *P. aeruginosa'*nın en toksik virülans faktörüdür. Düşük dozda bile ölümcül etkiye

neden olmaktadır. ExoA, elongasyon faktörü 2 (EF-2)'yi inhibe etmekte ve buna bağlı olarak protein sentezi engellenmekte ve hücre ölümü meydan gelmektedir. Yanık yaraları ve kronikleşen akciğer enfeksiyonlarında doku hasarına, T ve B lenfositlerde immünsupresyona neden olmaktadır (Lederberg, 2000).

Sitotoksin (Lökosidin), toksik yapıda olup lökosidin olarak adlandırılır ve lökositlere karşı sitopatik etkiye neden olan bir proteindir. Nötrofillerin inhibisyonuna ve lenfositlerin fonksiyonel olarak bozulmasına neden olur. Yetişkin solunum stresi sendromu olarak adlandırılan akciğer rahatsızlığına neden olmaktadır (Vasil ve Ochsner, 1999; Kim vd., 2005).

Tip III sekresyon sistemi, ökaryot hücrelere bakteriyel toksinlerin direkt enjekte olmasını sağlamaktadır. Hücre iskeletindeki aktin proteinlerinin ve protein sentezininin inhibisyonuna neden olmaktadır. Hedef ökaryotik hücrenin epitel hücrelerinde hasar, doku invazyonu ve nekroz meydana gelmektedir. Meydana gelen sitotoksik etki aktin proteinlerinin yeniden regülasyonu ile gerçekleşmektedir. Çok sayıda çevresel ve genetik faktör Tip III sekresyon sisteminin ekspresyonunu regüle etmektedir. Ekzoenzim (Ekzoenzim) S, Exo T, Exo U ve Exo Y sistemde rol oynayan majör efektör proteinlerdir (Pier ve Ramphal, 2010; Hauser vd., 2011).

Çok sayıda enzimatik ve kimyasal özelliklere sahip olan Ekzo S ve T adenozin difosfat (ADP) ribozil transferaz aktivitesine sahiptir. **Exo S,** Ras ailesinden düşük molekül ağırlıklı G proteininin inaktivasyonuna bağlı DNA sentez inhibisyonuna ve hücresel morfolojide değişimlere neden olarak apoptozu tetiklemektedir (Pier ve Ramphal, 2010). Buna bağlı olarak akciğer enfeksiyonlarında doku hasarı meydana gelir ve bakteriyel yayılım kolaylaşır (Shaver ve Hauser, 2004).

Hücresel adezyon ve fagositoz aktivitesini etkileyen **Ekzo T,** *P. aeruginosa*'yı makrofajlara karşı korur. Yara iyileşmesini inhibe edici özelliği olduğu bilinmektedir (Shaver ve Hauser, 2004; Pier ve Ramphal, 2010).

Fosfolipaz olarak tanımlanan ve güçlü bir sitotoksin olan **Ekzo U,** fosfolipaz A2 benzeri aktivite göstererek hedef hücreleri parçalamaktadır. Akut pnömoni ve göz enfeksiyonlarına neden olan suşların bu enzimi ürettikleri gözlenmiştir (Shaver ve Hauser, 2004; Pier ve Ramphal, 2010).

Bordetella pertusis ve *Bacillus anthracis*'in hücre dışı adenil siklazına benzer aktiviteye sahip olan protein **Exo Y'** dir (Pier ve Ramphal, 2010).

Biyofilm, canlı ve cansız yüzeylere yapışabilme özelliğinde olan ekzopolisakkarit yapıda proteinler, metabolitler ve hücre dışı polimerik maddelerden oluşan matrikse gömülü mikroorganizma topluluğudur (Das vd., 2013; Donlan, 2002). *Pseudomonas aeruginosa*' nın virülans faktörü olan aljinat biyofilm oluşumunda majör role sahiptir. Abiyotik yüzeylerde ve özellikle KF hastalarının akciğerlerinde biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olan konak yanıtından kaçabilmektedir. Biyofilm içinde bulunan bakteriyel toplulukların kompozisyonunda fenotipik ve metabolik değişimler meydana gelmekte ve böylelikle antibiyotiğe dirençli bakteriler ortaya çıkmaktadır (Donlan ve Costerton, 2002; Moreau-Marquisa vd., 2008).

Quorum sensing (QS) sistemi, çoğunluğu algılama olarak adlandırılmaktadır. Bu sistem, mikroorganizmanın ürettiği moleküllerin yoğunluğunu belirleyerek çevredeki mikroorganizmaların miktarını tespit etmekte ve mikroorganizmaların birbiriyle etkili bir şekilde iletişimini sağlamaktadır. Bakteriyel yoğunluk kritik seviyelere ulaştığında düşük moleküler ağırlıklı mediatörler salınmaktadır ve birçok genin regülasyonu gerçekleşerek uyaranlara karşı yanıt oluşmaktadır. *las*, *rhl* ve Pseudomonas kinolon sistem (PQS) *P. aeruginosa*'nın QS ile ilişkili olarak tanımlanmış üç majör sistemidir (Lyczak vd., 2002; Pier ve Ramphal, 2010). Biyofilm oluşumunu indükleyen bu sistemler virülans faktörlerinin salınımını regüle etmektedir. QS sistemleri birlikte etki göstermektedir ve bakterinin çevresel yanıtını kendileri düzenledikleri için oto indükleyici (AIs) olarak tanımlanmaktadır. Las QS sisteminin AI ajanı, bir açil-homoserin lakton olan N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserin lakton (C12- HSL)'dur. Rhl sisteminin AI ajanı N-butiril-L-homoserin laktondur (C4-HSL). PQS sistemi ise sinyalizasyon için 2-heptil-3-hidroksi-4-kinolon kullanır (Pesci vd., 1999; Soukarieh vd., 2018).

***las* QS sistemi,** QS sistemleri içinde ilk tanımlanan ve daha çok Gram negatif bakterilerde görülen sistemdir. Gram negatif bakteriler arasında yaygındır. *lasI* geni oto uyaran sentez genidir ve gen ürünü *lasR* geni oluşmaktadır. Popülasyonun artmasına bağlı olarak *lasI* geni mediatörlerin ortama salınımını

indüklemekte ve *lasR* geni mediatörlerin bakteriler tarafından algılanmasını regüle etmektedir. *lasB* geninin ifadesini düzenleyen bu sistem ve *lasA*, elastaz ve exoA' nın sentezi için gereklidir (Telford vd, 1998).

***rhl* QS sistemi,** ramnolipid sentezi için ramnoziltransferazı kodlayarak rhlAB operonunun ifadesini regüle etmektedir. Belirli yoğunluğa ulaşan sinyal molekülleri belirli bir yoğunluğa ulaştığında *rhlI* ve *rhlR* genlerinin transkripsiyonunu indükleyerek hedef genlerin aktivasyonunu sağlamaktadır. Bu sistem *P. aureginosa* için önemli olan piyosiyanin üretimi, yüzme, kayma ve titreme hareketleri gibi virülans faktörlerini indüklemektedir (Parsek vd., 2005).

Kinolon sinyal sistemi (PQS), transkripsiyonel olarak *rhl* sistemini aktive etmektedir ve *lasR* geni tarafından regüle edilmektedir. las sistemi mediatörlerin oluşumunu indükledikten sonra pqs sistemi devreye girmekte ve buna bağlı olarak rhl sisteminin aktivasyonu gerçekleşmektedir (Gera ve Srivastava, 2006; Rasmussen ve Givskov 2006).

1.6. Neden Olduğu Enfeksiyonlar ve Tedavide Kullanılan Antibiyotikler

Fırsatçı patojen olan *P. aeruginosa* hastane ile ilişkili enfeksiyonların kaynağı olup insanlarda çoklu enfeksiyonlara neden olmaktadır. Hastane enfeksiyonlarında son yıllarda artış gözlenmekle birlikte dirençli suşlarda da artış olmuştur (Brooks vd., 2014). Nemli ortamlarda üremeye eğilimli olan *P. aeuginosa* vücudun hemen hemen her bölgesinde kolonize olabilmekte ve hem lokalize hem sistemik enfeksiyonlara neden olmaktadır (Harvey vd., 2013; Morita vd., 2014; Procop vd., 2017).

İntravenöz ilaç kullanımına bağlı olarak *P. aeruginosa* kalp kapaklarında enfektif endokardite neden olmaktadır. Enfeksiyon genellikle triküspit kapakta meydana gelmektedir (Murray vd., 2016).

Pseudomonas aeruginosa' nın neden olduğu bakteriyemi Gram negatif bakteriyemiler arasında dördüncü sırada yer alır ve hastane ile ilişkili kan dolaşım enfeksiyonlarının %2-4' ünden sorumludur (Vahaboğlu ve Akhan, 2008; Babich vd., 2020). Bakteriyemi kaynaklı mortalite oranı kanserli hastalarda %33- 38 arasındadır. Primer enfeksiyon bölgeleri solunum sistemi, üriner sistem, deri ve yumuşak dokular, kan damarları ve çevresidir. Deri lezyonlarında meydana gelen ektima gangenosum, *P. aeruginosa* bakteriyemisine özgü klinik tablodur (Vahaboğlu ve

Akhan, 2008). Perine, kalça ve ekstremitelerde görülen bu lezyonlar veziküler düzeyde başlangıç gösterip ileri evrede hemorajik ve nekrotik ülsere dönüşmektedir (Vahaboğlu ve Akhan 2008; Brooks vd.; 2014 Murray vd., 2016).

Hem alt hem üst solunum yolu enfeksiyonuna neden olan *P. aeruginosa* alt solunum yolunda asemptomatik kolonizasyon ve trakeabronşitten ciddi nekrotizan bronkopnömoniye kadar değişen klinik tablolara yol açmaktadır. Mekanik ventilasyona bağlı hastalarda, trakeostomi ve kateter takılı hastalarda, immunsupresif hastalarda, KF' li hastalarda, nötropenik hastalarda ve kronik akciğer enfeksiyonu olan hastalarda *P. aeruginosa*'nın neden olduğu enfeksiyona maruz kalmak sağlıklı bireylere göre oldukça yüksektir ve daha ciddi klinik tablolar meydana gelmektedir. Özellikle mukoid formdaki suşlar KF hastalarında görülmektedir (Lister vd., 2009; Procop vd., 2017; Murray vd., 2016). Bu formların eradikasyonu oldukça zor olmakla birlikte KF hastalarında kronik *P. aeruginosa* enfeksiyonu erken mortaliteye neden olmaktadır (Murphy, 2009).

Beyinde abseye ve menenjite neden olan *P. aeruginosa* menenjit etkeni olarak kanserli hastalarda *Listeria monocytogenes*'den sonra, beyin apsesi etkeni olarak *Escherichia coli*'den sonra ikinci sırada yer almaktadır (Vahaboğlu ve Akhan 2008; Brooks vd; 2014; Murray vd., 2016).

Pseudomonas aeruginosa sağlıklı insanlarda nadir olmakla birlikte yüzücülerde enflamasyon, yaralanma ve nemin varlığına bağlı olarak dış kulak enfeksiyonuna sebep olabilmektedir (Vahaboğlu vd., 2008., Brooks vd., 2014; Murray vd., 2016). Yaşlı bireylerde, diyabetik hastalarda ve damar rahatsızlığı olan hastalarda hayatı tehdit edecek düzeyde kraniyal sinirlere ve kemiklere hasar verebilen malign eksternal otite neden olmaktadır (Vahaboğlu vd., 2008; Murray vd., 2016).

Dünya çapında mikrobiyal keratitin önde gelen etkenlerinden olan *P. aeruginosa* kontakt lens kullanımına bağlı enfeksiyonlarda en sık izole edilen bakteridir. (Lakhundi vd, 2017; Procop vd., 2017; Wu vd., 2019; Hilliam vd., 2020). Lenste ve göz yüzeyinde oluşan travma ve yırtılmaya bağlı olarak kontamine suların temasıyla enfeksiyon gelişmektedir (Murray vd, 2016). Keratit olguları kornea ülseri, endoftalmi ve görme kaybına kadar ilerlemektedir (Procop vd., 2017; Hilliam vd.,

2020). Bakterinin ürettiği elastaz, proteaz ve ekzotoksin A keratitin agresif seyrinde etkilidir (Fukuda vd., 2017; Dave vd., 2020)

Cerrahi girişim sonrasında katater ve stent kullanımına bağlı hastane ile ilişkili enfeksiyon etkeni olarak sıklıkla görülmektedir (Brooks vd., 2014). Üriner sistem enfeksiyonları bakteriyemi ve sepsiste primer odaktır (Kitagawa vd., 2019).

Doğrudan kan yoluyla yayılım gösteren, kemik ve eklemlere ulaşan enfeksiyonlarda özellikle ilaç kullanan hastalarda enfeksiyon sık görülmektedir. Cerrahi girişim, travma ve yumuşak doku enfeksiyonları sonucunda sekonder olarak kemik ve eklem enfeksiyonları gelişebilmektedir (Vahaboğlu ve Akhan 2008; Brooks vd, 2014; Murray vd., 2016).

Primer deri enfeksiyon etkeni olan *P. aeruginosa* derin abselere, yanık yaralarına, püstüler lezyonlara, sellülite, ektima gangenozuma yol açmaktadır. Enfeksiyon jakuzi, yüzme havuzu, sıcak su muslukları gibi nemli ortamlarla temas eden bireylerde görülmektedir. Yara yeri örneklerinden izole edilen *P. aeruginosa* izolatlarında pyosiyanin ve pyoverdin üretimine bağlı olarak meydana gelen mavi-yeşil püy sızıntısı sıkça görülmektedir. (Murray vd, 2016; Procop vd., 2017).

Pseudomonas aeruginosa en sık yanık yaralarından izole edilmektedir. Ciddi yanık yaralarında damar harabiyeti, dokularda nekrotik odaklar ve bakteriyemi gelişmektedir. Yanık yaralarında oluşan nem, nötrofillerin dokulara girişini engellemekte ve buna bağlı olarak bakterinin eradikasyonu zorlaşmaktadır (Murray vd., 2016). Eksojen plasminojen aktivatör protein salgılayan bakteri fibrinin parçalanmasını sağlar ve buna bağlı olarak yara yerinin iyileşmesi gecikmektedir (Vahaboğlu ve Akhan, 2008; Brooks vd., 2014; Murray vd., 2016). Akciğer enfeksiyonlarının gelişiminde etkili olan elastaz enzimi yanık yaralarındaki enfeksiyonlarda da rol oynamaktadır (Islamieh, 2019). Diyabetik ayak enfeksiyonlarında sıklıkla izole edilen Gram negatif etkendir (Ertuğrul vd., 2018).

Farinksten rektuma kadar gastrointestinal sistemin tamamında enfeksiyona neden olan *P. aeruginosa* çocuklarda orta şiddette diyareye, bebeklerde mortaliteyle sonuçlanan nekrotik enterokolite yol açmaktadır (Bilgehan 2000; Vahaboğlu ve Akhan 2008; Brooks vd., 2014; Murray vd., 2016).

Son yıllarda dünya çapında ÇİD *P. aeruginosa* izolatlarının ortaya çıkması ve yayılım göstermesiyle birlikte neden olduğu enfeksiyonların tedavisi zorlaşmış ve bu durum küresel bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir. Hastane ile ilişkili enfeksiyonlara neden olan *P. aeruginosa*' nın immunsupresif hastalarda hayatı tehdit edici enfeksiyonlara neden olması, antibiyotiklere karşı gelişen bakteriyel direnç ve direnç aktarımında *P. aeruginosa*' nın yüksek kapasiteye sahip olması antibiyotik direncinin küresel sağlık sorununa dönüşmesine neden olan önemli etmenlerdir (Poole, 2011; Breidenstein vd., 2011). Alternatif antimikrobiyal tedavi seçeneklerinin kısıtlı olması dirençli bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavi edilememesine, morbidite ve mortalitede artışa neden olmaktadır. 2017 yılında Dünya Sağlık Örgütü KDPA' yı "kritik" grupta listelemiş ve acilen yeni antibiyotik gruplarına ihtiyaç olduğunu bildirmiştir (Tacconelli vd., 2018).

Ampisilin, amoksisilin, amoksisilin-klavulanat, sefotaksim ve seftriaksona intrensek direnç gösteren *P. aeruginosa*' nın neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde geniş spektrumlu penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar, aminoglikozidler, karbapenemler, florokinolonlar ve kolistin tercih edilebilmektedir. Fakat bu antibiyotiklere karşı da bakteri direnç gösterebilmektedir (Livermore, 1995; Carmeli 1999).

2. ANTİBİYOTİKLER

2.1. Beta-laktamlar

Yapısında beta-laktam halkası bulunduran beta-laktamlar transpeptidasyon basamağında penisilin bağlayan proteinlere bağlanarak peptidoglikan sentezini inhibe ederek hücre duvar sentezini engellemekte ve bakterisidal etki göstermektedir (Ayaz, 2017).

2.1.1. Penisilinler

Aminopenisilinlerin *P. aeruginosa* üzerinde antibakteriyel etkisi yoktur. Tikarsilin ve karbenisilin karboksipenisilin gubunda yer alan piperasilin, mezlosilin, azlosilin üreidopenisilin gubunda yer almaktadır. Yüksek tuz içeriği ve direnç gelişiminin artması nedeniyle karboksipenisilinler tedavide kullanılmamaktadır. Tazobaktam ve aminoglikozidlerle kombine olarak kullanılan üretiopenisilinler, sinerjik etki göstermektedir (Ayaz, 2017).

2.1.2. Sefalosporinler

Birinci ve ikinci kuşak sefalosporinler *P. aeruginosa*' ya karşı etkisizdir. Üçüncü kuşak sefalosporinlerin (sefoperazon ve seftazidim) Gram negatif etkinliği yüksektir ve P. *aeruginosa'* ya karşı etkilidir. Sefepim ve sefpirom dördüncü kuşak sefalosporin olup *P. aeruginosa*' ya karşı etkilidir ve tedavide parenteral yolla kullanılmaktadır (Leblebicioğlu, 2008).

2.1.3. Karbapenemler

İlk kez 1976 yılında *Streptomyces cattleya* tarafından üretilen tienamasin bileşiğinin türevi olup temel yapısında penisilin gibi beta-laktam halkası bulunmaktadır. Ancak bu yapıda, birinci pozisyondaki sülfür yerine karbon bulunmakta, beş üyeli halkadaki ikinci ve üçüncü karbon atomları arasında doymamış bağlar yer almaktadır (Livermore ve Woodford, 2000; Mouton vd., 2000).

Karbapenemler, beta-laktam sınıfı içerisinde en geniş spektruma sahip *P. aeruginosa* dahil Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı hızlı bakterisidal etki gösteren antibiyotiklerdir (Mouton vd., 2000).

Karbapenemler, ‘‘karbapenemler’’ ve ‘‘penemler’’ olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır. Meropenem, imipenem, ertapenem ve doripenem karbapenem sınıfında, faropenem penem sınıfında yer almaktadır (Şenol 2008; Yao ve Moellering 2009).

Birinci grup karbapenemler içerisinde bulunan ertapenem ve panipenem toplum kaynaklı kazanılan ciddi enfeksiyon tedavilerinde, ikinci grup karbapenemler içerisinde olan meropenem, imipenem, doripenem, biapenem ise hastane kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır (Şenol, 2008).

Tedavide sıklıkla imipenem ve meropenem kullanılmaktadır. *Pseudomonas aeruginosa*' ya karşı en etkili karbapenem doripenemdir. Doripenemin KF hastalarında *P. aeruginosa* izolatlarına karşı antibakteriyel aktivitesinin, meropenem ve imipenem gibi diğer karbapenem antibiyotiklere kıyasla daha etkili olduğu bulunmuştur.

Çoklu ilaca dirençli suşların neden olduğu enfeksiyonlarda kombinasyon tedavileri (karbapenem-aminoglikozid) tercih edilmektedir (Traczewski ve Brown, 2006; Castanheira vd., 2009; Horcajada vd., 2019).

Karbapenemler, bakteri hüce duvar yapısında bulunan penisilin bağlayıcı proteinlere (PBP) bağlanarak bu enzimleri inaktive eder ve hücre duvar sentezini engellemektedir. *P. aeruginosa*'daki operon D (OprD) porin proteinleri karbapenemlerin bakteri hücresinden içeri alınmasını sağlamaktadır. OprD proteinlerinde meydana gelen değişiklikler karbapenem direncinin gelişmesinde önemli rol oynamaktadır (Li vd., 2012).

2.1.4. Monobaktamlar

Tedavide kullanılan tek üyesi aztroenamdır. Yalnızca Gram negatif bakterilere karşı etkilidir. Dar spektrumlu olduğundan nedeni bilinmeyen ve polimikrobiyal enfeksiyonların tedavisinde başka grup bir antibiyotikle kombine edilmelidir (Erol ve Aktaş, 2008).

2.2. Aminoglikozidler

Bakterisidal etki gösteren aminoglikozidler protein sentezini inhibe ederek etki göstermektedir. *Pseudomonas aeruginosa*'nın neden olduğu idrar yolları enfeksiyonlarında tek başına kullanılabilmelerine rağmen ÇİD *P. aeruginosa* suşlarının neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde başka grup bir antibiyotikle kombine edilmelidir (Britt, 2018).

2.3. Kinolonlar

Bakterisidal etki gösteren kinolonlar DNA giraz ve topoizomeraz IV' ün aktivitesini inhibe ederek DNA sentezini engellemektedir. Tedavide yaygın olarak siprofloksasin tercih edilmektedir (Correia, 2017).

2.4. Kolistin

Bakterisidal etki gösteren polimiksinler sitoplazmik membrandaki lipopolisakkarit tabaka ile etkileşime girerek membranda por oluşumuna neden olmaktadır. Tedavide polimiksin B ve polimiksin E (kolistin) kullanılmaktadır. ÇİD *P. aeruginosa'* nın neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kolistin başka grup antibiyotikle kombine edilerek kullanılmalıdır (Velkov vd., 2013; Nation vd., 2014).

2.5. *Pseudomonas aeruginosa* Enfeksiyonlarının Tedavisinde Yeni Kullanıma Giren Antibiyotikler

Sefiderokol: Siderefor özellikte bir sefalosporin olup bakterinin demir transport mekanizmasını kullanarak dış membrandan içeri girer. Beta-laktamazların tamamında etkilidir ve çok ilaca dirençli suşlar üzerinde etkinliği gözlenmektedir (Syed, 2021).

Seftolozan-tazobaktam: ÇİD *P. aeruginosa* suşları üzerinde etkili olan bu antibiyotik kombinasyonu en aktif antipseudomonallerdendir. Beta-laktamazlardan KPC ve MBL'ye karşı etkisiz, AmpC' ye karşı etkilidir (Papp-Wallace ve Bonomo, 2016).

Meropenem-vaborbaktam: Siklik boronaik asit bazlı beta-laktamaz inhibitörü olan vaborbaktam siklik boranik serin beta-laktamazları inhibe etmektedir. Sınıf A ve C beta-laktamazlara karşı etkinlik göstermektedir (Patel vd., 2018).

Seftazidim-avibaktam: Avibaktamın seftazidimi AmpC, GSBL ve GES'in neden olduğu enzimatik bozulmalara karşı korumakta ve seftazidimin düşük miktarda minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değerinde olmasını sağlamaktadır. Sınıf A, C ve kısmen de D beta-laktamazlara karşı etkili iken olan avibaktamın MBL üzerinde etkinliği bulunmamaktadır (Abboud vd., 2016; Sy vd., 2017).

3. *Pseudomonas aeruginosa*'nın Karbapenem Direnci

3.1. Hedef Hücre İçinde Antibiyotiğin Etkin Konsantrasyona Ulaşamaması

3.1.1. Porin Kaybı

Pseudomonas aeruginosa suşlarında bulunan ve karbapenemler için özel bir porin olan OprD'nin kaybı direnç gelişimine neden olmaktadır. Özellikle imipenem tedavisi esnasında OprD kaybı meydana gelmektedir (Ghuysen vd., 1994).

3.1.2. Aktif Pompa Sistemlerinin İndüklenmesi

Aktif pompa (effluks) sistemlerini regüle eden genlerde meydana mutasyonlar sonucunda aktif pompalama sistemleri indüklenerek olması gerekenden fazla çalışmakta ve antimikrobiyal maddeler hücreden dışarı atılmaktadır (Ayaz, 2008). *Pseudomonas aeruginosa*' da bulunan Mex-Opr tipi ait akış sistemleri aşırı

ekspresse edilmekte ve antibiyotik konsantrasyonunda azalma meydana gelerek direnç gelişmektedir (İbrahim ve Heydarlou, 2020).

3.2. Hedef Bölgedeki Penisilin Bağlayıcı Proteinlerde (PBP) Meydana Gelen Değişimler

Hücre zarında yer alan ve peptidoglikan sentezinden sorumlu olan PBP' lerden düşük molekül ağırlıklı olanlar karboksipeptidaz, yüksek molekül ağırlıklı olanlar transpeptidaz olarak tanımlanmaktadır. PBP'de meydana gelen değişimler sonucunda direnç gelişmektedir (Henry ve Speert, 2011).

3.3. Beta-laktamazlar ve Karbapenemazlar

Pseudomonas aeruginosa 1980'lerde ilk karbapenem olan imipeneme karşı direnç geliştiren ilk bakteridir (Doi, 2019). Karbapenem direncinin gelişmesinden sorumlu olan mekanizma *P. aeruginosa* tarafından üretilen beta-laktamaz enzimlerinin varlığıdır (Opal vd., 1995; Medeiros, 1997).

Beta-laktamaz enzimi, beta-laktam gubu antibiyotiklerin temel yapısını oluşturan beta-laktam halkasındaki karbonil gubu ile bir ester köprüsü kurarak siklik amid bağını parçalamaktadır (Opal vd., 1995; Medeiros, 1997).

Beta-laktamazlar Bush, Jacoby ve Medeiros sınıflandırmasında substrat profilleri, inhibitör duyarlılıkları, molekül ağırlıkları gibi özelliklerine göre sınıflandırılmıştır. Ambler sınıflandırılmasında ise beta- laktamazlar aminoasit ve nükleotid sekans analizine göre dört sınıfta tanımlanmıştı. A,C,D gubu beta-laktamazların aktif bölgesi serin amino asidi içerirken, B sınıfı MBL' nin aktif bölgesi Zn^{+2} iyonu içermektedir. A sınıfındaki beta-laktamazların temel substratı penisilin olup birinci kuşak sefolosporinleri ve karbapenemleri de parçalayabilmektedir. Bu gruptaki enzimlerin çoğu plazmitle taşınmaktadır (Philippon vd., 1994; Jones vd., 1997; Vrancianu 2020a). B sınıfı beta-laktamazlar çinko iyonuna gereksinim duyan thiol gubu içermektedir. Çoğu karbapenemaz aktivitesi göstermektedir. Penisilin, sefolosporinlerin ve karbapenemleri parçalamaktadır (Hauskey, 1997). Bu gruba ait enzimleri kodlayan genler kromozom yada plazmit, integron, transpozon gibi mobil genetik elemanlar üzerinde bulunmaktadır (Toussaint ve Gallagher, 2015).

Sefolosporinaz aktivitesi gösteren C sınıfı beta-laktamazlar esas olarak sefolosporinaz kromozomal AmpC geni tarafından kodlanmaktadır. Beta-laktam varlığında ekspresyonları artar ve indüklenebilir özelliktedir. Klavulanik asit varlığında inhibe olamazlar. D sınıfı beta-laktamazlar oksasilini hidrolize edici özelliktedir. *Pseudomonas aeruginosa* tarafından aktif olarak üretilen bu enzim aynı zamanda *Acinetobacter baumannii* izolatlarında da tespit edilmiştir (Opal vd., 1995; Medeiros, 1997).

Aztreonam hariç tüm beta-laktamları hidroliz edebilen MBL' ler *P. aeruginosa*' da tanımlanmış karbapenemazların büyük çoğunluğunu oluşturmaktadır. Gram negatif bakterilerin dış membran proteinlerindeki değişiklikler ve buna bağlı meydana gelen porin kaybı sonucunda direnç gelişimi gözlenmektedir. *Pseudomonas aeruginosa*'da OprD olarak bilinen kanal proteinin kaybı sonucunda karbapenemlere karşı direnç meydana gelmektedir. Yapısal özellikte olan aktif dışa atım (effluks) pompalama sistemlerini kontrol eden düzenleyici genlerde meydana gelen mutasyonlar sonucunda antibiyotiğin hücre dışına atılması da direnç gelişiminde rol oynayan diğer mekanizmadır. *Pseudomonas aeruginosa'*da bulunan MexAB-OprM aktif pompalama sistemi sayesinde imipenem hariç tüm beta-laktamlara ve kinolonlara karşı direnç gelişimi gözlenmektedir (Lister vd., 2009).

4. *Pseudomonas aeruginosa*'daki Karbapenemazların Dünya Genelindeki Epidemiyolojisi

Dünya genelinde karbapenem direnç oranları farklılık göstermekle birlikte çoğu ülkede prevalans %10-50' dir. En düşük direnç oranı Kanada' da %3,3, Dominik Cumhuriyeti' nde %8 olarak belirlenmiştir. Avustralya, Kuzey Amerika ve Avrupa' daki bazı ülkeler %10-30 oranında direnç oranına sahiptir. Brezilya, Peru, Kosta Rika, Rusya, Yunanistan, Polonya, İran ve Suudi Arabistan'daki oranlar %50' nin üzerinde olup, direnç oranlarının halk sağlığını tehdit edecek düzeylere ulaşmıştır (Hammoudi-Halat ve Ayoub-Moubareck, 2022).

CDC tarafından 2018 yılında yayınlanan bir raporda KDPA izolatlarının %1,9' unun karbapenemaz üreticisi olduğunu bildirilmiştir (Hammoudi-Halat ve Ayoub-Moubareck, 2022).

Dünya çapında, karbapenemazların dağılımı büyük ölçüde değişkendir. En baskın olan karbapenemazlar metalo-betalaktamazlardır ve bu grupta ilk sırada VIM grubu, ardından IMP ve NDM yer almaktadır. Brezilya, İsviçre, Birleşik Krallık, Çin ve Hindistan'da SPM, Polonya'da DIM, Almanya'da GIM, Çin'de SIM, Almanya ve Amerika Birleşik Devletleri'nde HMB, Kanada'da CAM, Avustralya'da AIM ve İtalya'da FIM, KPC ve GES üreten *P. aeruginosa* klonları Avrupa ve Asya' da tanımlanmışken, en az OXA tipi tanımlanmış ve İspanya, Hindistan, Birleşik Krallık ve Belçika' da rapor edilmiştir (Hammoudi-Halat ve Ayoub-Moubareck, 2022).

5. Antibiyotik Direncinin Yayılmasında Rol Oynayan Mobil Genetik Elemanlar

Plazmitler: Kromozomdan bağımsız olarak kendi kendine replike olabilen ekstra kromozomal DNA fragmanlarıdır. Genellikle çift sarmallı ve sirküler yapıdadır. Fakat *Borrelia* ve *Streptomyces*'te lineer plazmitlere rastlanmıştır (Pitout ve Laupland, 2008). Tek bir bakteri hücresinde tek kopyalıdan yüzlerce kopyaya kadar plazmit bulunabilmektedir. Plazmitler farklı tip ve boyutlarda olabilmektedir (Melzer ve Petersen, 2008). Büyüklükleri 1 kilobaz ile 1 megabaz arasında değişir. Plazmitler bakteri kromozomunun %5' inden daha küçüktür. Bakteri hücresinde plazmitler süperkoil yapıda bulunur. Plazmitler mantar gibi yüksek organizmalarda ve vahşi doğada yaşayan bakterilerde de bulunmaktadır (Madigan ve Martinko, 2012; Clark vd., 2019).

Plazmitler bakteri için hayati önem arz eden fonksiyonları barındıran genleri kodlamazlar. Bunun yerine bakteriye selektif avantaj sağlayan antibiyotik direnç genlerinin taşınması, bakteriyel toksin ve proteinlerin sentezi, bakterinin metabolizmasında kullanmak üzere değişik karbon kaynaklarından faydalanmasını sağlayacak enzimlerin sentezi ve ağır metal direncinde rol oynamaktadır (Melzer ve Petersen, 2008).

Kendi kendini aktarabilen (konjugatif) plazmitler hücreler arasında kendilerinin ve diğer DNA elemanlarının transferini sağlayan genleri (tra genleri) taşımaktadır. Bu plazmitler konjugasyon yoluyla gen transferini gerçekleştirmektedir. Sadece mobilize özellikte olan plazmitler ise transfer için gerekli olan proteinlerin sadece bir kısmını kodlarken, konjugatif plazmitlerin yardımına ihtiyaç duyarlar (Melzer ve Petersen, 2008).

Yapılarında antimikrobiyal, ağır metal veya kimyasal ajanlara karşı direnç genleri taşıyan plazmitlere R (rezistans) plazmiti olarak denir (Kruse ve Sørum, 1994; AbdelRahim vd., 2015). İlk kez 1950 yılında *Shigella flexneri* suşlarında keşfedilen R plazmitleri ilk olarak R faktörü olarak adlandırılmıştır (Batard vd., 2013). Birden fazla direnç geni taşıyabilen R plazmitinin bakteriler arasındaki transferi sonucunda kromozomal mutasyonlara göre daha etkili ve hızlı bir antimikrobiyal direnç gelişebilme yeteneği vardır. Günümüze kadar birçok R plazmiti tanımlanmıştır. İnsan ve hayvan kökenli bakteriyel izolatlardan izole edilen R plazmitleri yapısal olarak oldukça benzerdir (Kruse ve Sørum, 1994; Abd el Rahim vd., 2015). Gram pozitif ve Gram negatif patojen bakteriler ile ilişkilendirilen plazmitlerde tüm antibiyotikler için direnç genleri saptanmıştır. Bir plazmit birden fazla antibiyotiğe karşı direnç gelişimine ve bu direncin farklı bakteri türleri arasında yayılımına aracılık etmektedir (Wanke vd., 1991). Plazmitler transpozon ve integron gibi antimikrobiyal dirençte önemli rol oynayan genetik elemanların taşınmasına da aracılık etmektedir.

Plazmitler, genellikle aynı hücrede ilgili plazmitlerin bir arada bulunmasını engelleyen replikon uyumsuzluğu (incompatibility) temelinde gruplandırılır. Çoklu plazmitler genellikle aynı bakteri hücresinde bir arada bulunur, ancak plazmit replikasyon sistemleri arasındaki çapraz etkileşim, yakın ilişkili plazmitlerin uyumsuz olmasını ve birlikte kararlı bir şekilde replike olamamasına neden olur Kamruzzaman vd., 2017; Humbert vd., 2019). Geniş konakçı aralıklı Inc (incompatibility) plazmitlerinin, farklı filogenetik bakteri grupları arasında genleri yaydığı bilinmektedir. Bu genler antibiyotiklere, ağır metallere ve dezenfektan olarak kullanılan kuaterner amonyum bileşiklerine karşı dirençli kodlar ve plazmitlerin etkili bir şekilde çoğalmalarını, konjugatif transfer yoluyla yeni bir konakçıya geçmelerini ve bakteri hücrelerinde stabil bir şekilde muhafaza edilmelerini sağlayan modüller taşır. Çoklu ilaca direnç genleri kodlayabildikleri için endişe kaynağı olabilen patojenik veya fırsatçı bakteri suşlarında da bulunurlar. Geniş dağılımları, Inc plazmitlerinin, yatay gen transferini kullanarak bakteri adaptasyonunda çok önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Popowska ve Balska, 2013).

Plazmitlerin replikasyonu, oriV (vejetatif orijin) adı verilen sabit bir orijinden başlamaktadır. İki ya da daha fazla orijine sahip olan plazmitler de bulunmaktadır.

oriV bölgesinden başlayan replikasyon çift yönlü ilerlemekte ve dairesel yapı oluşana kadar devam etmektedir. Her iki yönde ilerleyerek (bidirectional) dairesel yapı oluşana kadar devam eder. Plazmitlerin replikasyon mekanizması R100 ve ColE1 plazmitlerinde detaylı bir şekilde araştırılmıştır (Dale ve Park, 2004).

Transpozonlar: Genom içinde konumunu değiştirebilen, mutasyon oluşturabilen ve ters tekrarlara sahip DNA dizileridir. İlk olarak 1940 yılında McClintock tarafından mısır bitkisinde (*Zea mays*) bulunmuş ve bu buluş 1983'te Nobel ödülü kazandırmıştır (Ravindran, 2012). Transpozonlar, antibiyotik direnç geni taşıyan mobil genetik elemanlardır. Birçok transpozon genomun farklı bölgelerine sıçrama yeteneğine sahiptir(Vrancianu vd., 2020b). Transpozonlar kromozom, plazmit ve fajlara entegre olabilmekte ve plazmitlerin konjugasyonu veya fajların transdüksiyonu sırasında birçok farklı bakteri türüne aktarılabilmektedir (Wanke vd., 1991).

Transpozonlar transpozisyon adı verilen hareket tarzıyla genomdaki kopya sayılarını arttırabilme yeteneğindedir (Le-Rouzic vd., 2007). Transpozonlar transpozisyon hareketine bağlı mekanizmalarına göre retrotranspozonlar ve DNA transpozonları olmak üzere iki sınıfa ayrılır. Retrotranspozonlar genom içindeki başka bir bölgeye hareket etmek için RNA aracılığı ile kopyala-yapıştır mekanizmasını kullanırken, DNA transpozonları hareket ederken kes-yapıştır mekanizmasını kullanmaktadır (Ågen ve Clark, 2018). Böylelikle retrotranspozonların genom içindeki sayısı DNA transpozonlarından daha fazla olmaktadır (Pray, 2008). Retrotranspozonlar uç kısımlarında LTR (Long Terminal Repeat) dizilerine sahipken, DNA transpozonları uç kısımlarında TIR (Terminal Inverted Repeat) dizilerine sahiptir. Bu diziler transpozisyonda önemli rol oynamaktadır. LTR dizileri genellikle 5'-TG…CA-3' tekrarlara sahip ve kodlama yapmayan DNA dizileridir (Voytas ve Boeke, 2002) TIR dizileri genelde 10-40 bç uzunluğundadır. LTR dizilerinden daha kısadır ve ters tekrarlara sahiptir. Otonom bir transpozonun üretmiş olduğu transpozaz enzimi aracılığı ile genomda hareket edebilmektedir. (Smit ve Riggs, 1996; Feschotte vd., 2002; Wessler, 2006).

Transpozonlar yapısal olarak kompozit transpozonlar ve kompozit olmayan transpozonlar olarak tiplendirilir. Kompozit olmayan transpozonlar basit yapılıdır ve

yapısında yaklaşık olarak 5000 baz çifti ve bu baz çiftlerinin her birininin sonunda kısa (38 bp) ters tekrar dizileri ve genetik marker içermektedir. Bir transpozaz (TnpA) ve iki fonksiyonlu işleve sahip olup aynı zamanda transpozisyon sürecinin bir aşamasından sorumlu olan baskılayıcı protein (TnpR) kodlamaktadır. *Tn*3 kompozit olmayan transpozona örnektir. Kompozit transpozonlar, her iki uçta insersiyon sekanslarının ters ya da doğrudan tekrar dizilerini ve direnç geni taşımaktadır. *Tn*10 ve *Tn*5 IS'nin ters tekrarlarıyla çevrelenirken, *Tn*9 doğrudan tekrarlarla çevrelenir (Dale ve Park, 2004).

Gram negatif bakterilerin çoğunda antibiyotik direncine kompozit transpozonlar aracılık etmektedir (Liebert vd., 1999). *Tn*903, *Tn*9, *Tn*10 ve *Tn*5 antibiyotik direncine aracılık eden en önemli kompozit transpozonlardır ve özellikle *Escherichia coli*' de tanımlanmıştır (Goryshin vd., 1998). Hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakterilerde bulunan *Tn*3 ampisiline direnç genini taşımaktadır (Dahlberg ve Hermansson M, 1995). Gram negatif bakterilerde beta-laktamaz genlerini ($bla_{\text{TEM-1}}$ gibi) taşımaktadır (Gómez-Lus, 1998).

İntegronlar: Çeşitli antibiyotik direnç genlerini kodlayan ve birçok bölgede lokalize olabilen yeni bir DNA elementi olarak 1980'li yıllarda tanımlanmıştır (Stokes ve Hall, 1989). İntegronlar gen kasetlerinin eklenmesi ve bu gen kasetlerinin doğru ifade edilerek fonksiyonel proteinlere dönüştürmelerini sağlayan doğal bir yakalama sistemi ve montaj platformudur (Mazel, 2006). Bu gen kasetlerinin eklenmesi ve kazanımı için bölgeye spesifik rekombinasyonu kullanma yeteneği ile diğer bütün genetik elemanlardan ayrılmaktadır. Antibiyotik direnç genlerini taşıyan gen kasetlerinin spesifik rekombinasyonla bakteri hücresine entegre olmasını sağlamaktadır. Hareket etme yetenekeri yoktur, plazmit ve transpozonlar üzerinde taşınmaktadır (Collis ve Hall, 1992). İntegronların büyük bir kısmı klinik izolatlarda saptanmakla birlikte su ve toprak gibi çevresel ortamlarda da bulunmaktadır (Tennstedt vd., 2003). Özellikle Gram negatif bakteriler arasında antibiyotik direncinin yayılmasında etkilidir (Gillings, 2014).

İntegronlar yapısal olarak, tirozin rekombinaz ailesinin üyesi olan integraz proteinini kodlayan *intI* geni; rekombinasyon bölgesinin yakınında gen kasetlerinin eklendiği ve integraz tarafından tanınan *attI* geni ve gen kasetlerinin

kodlanan genlerin transkripsiyonunu kontrol eden promotor bölge olmak üzere üç önemli kısımdan oluşmaktadır (Gillings, 2014).

İntegronların değişken bölgesinde yer alan gen kasetlerinin bazen integron yapısında yer almadığı farkedilmiş ve raporlanmıştır (Crowley vd., 2008). Gen kasetlerinin integronun bir parçası olması spesifik kesip çıkarma ve birleşme yoluyla iki rekombinasyon bölgesi (*attI* ve *attC*) arasında entegrasyonu ile gerçekleşmektedir (Xu vd., 2011). Birçok gen kaseti benzersiz *attC* bölgesine sahiptir ve 130'dan fazla farklı antibiyotik direnç geni barındırır (Rowe-Magnus ve Mazel, 2001; Xu vd., 2009). Bu kasetler tüm beta-laktam ve aminoglikozitlere, kloramfenikollere, streptotrisine, trimetoprime, rifampine, eritromisine, kinolonlara ve fosfomisine karşı direnç kazandıran genleri kodlamaktadır (Mazel, 2006).

İntegronlar direnç integronu ve süper integron olmak üzere iki önemli gruba ayrılır. Direnç integronlarında bulunan gen kasetleri antibiyotik ve dezenfektanlara karşı direnci kodlamaktadır ve bu integronlar transpozonlarda, plazmitlerde ve bakteriyel kromozomda bulunur. Gıda kaynakları dahil olmak üzere çok çeşitli kaynaklardan izole edilen direnç integronları *intI* dizilerindeki farklılıkları göz önünde bulundurularak beş sınıfta gruplandırılmıştır (Shrivastava, 2013). Sınıf 1-3 integronlar çoklu ilaç dirençli integron (RI'lar) olarak bilinmektedir. Aynı gen kasetlerini benzer rekombinasyon mekanizmasıyla ekleyebilmektedir (Hall vd., 1999). Süper integronlarda 100' den fazla gen kaseti taşıyabilirken direnç integronları 10' dan az gen kaseti taşımaktadır. Süper integronlarda bulunan gen kasetleri birden çok fonksiyonları kodlamaktadır. Direnç integronlarının süper integronlardan köken aldığı düşünülmektedir (Fluit ve Schmitz, 2004)

Sınıf 1 integronlarda 5' korunmuş bölge (5'CS) ve 3' korunmuş bölge (3'CS) ile gen kasetlerinin eklendiği değişken bölge (variable region) bulunmaktadır (Guerra vd., 2003). 5' korunmuş bölge integraz geni (*intI*), rekombinasyon bölgesi attI ve promotor bölgeden oluşmaktadır. 3' korunmuş bölge defektif kuaterner amonyum direnç geni (*qac*EΔ1), sulfonamidlere direnç geni (*sul1*), streptomisin ve spektinomisin direnç geni (*aadA)* taşıyan gen kasetlerini barındırmaktadır (Partridge vd., 2001). Klinik izolatlar arasında antibiyotik direncinin yayılımında en çok etkili olan sınıf 1 integronlardır. Sınıf 1 integronlar içerisinde 60' dan fazla farklı

antibiyotik direnç geni saptanmıştır (Recchia ve Hall, 1995). Sınıf 1 integronların *Tn*402 benzeri transpozonlar ve *Tn*3 transpozon ailesinden *Tn*21 ve *Tn*1696 transpozonların üzerinde yer aldığı bildirilmiştir (Recchia ve Hall, 1997; Rowe-Magnus ve Mazel, 2001). Yapılan çalışmalar sonucunda sınıf 1 integronlar *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Aeromonas*, *Burkholderia*, *Campylobacter*, *Vibrio*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* gibi Gram negatif ve Gram pozitif klinik izolatlarda tanımlanmıştır (Bhat vd., 2023).

Sınıf 2 integronlar sınıf 1 integronlar ile yaklaşık %50 homoloji göstermektedir (Xu vd., 2009). Sınıf 2 integronlar *Tn*7 transpozonda bulunmuş olup, dihidrofolat redüktaz gen kaseti içermektedir ve sırasıyla trimetoprime direnç geni (*dfrA1*), streptotrisine direnç geni (*sat2*) ve streptomisin/spektinomisine direnç geni (*aadA1*) taşıyan gen kasetlerini barındırmaktadır (Barlow ve Gobius, 2006).

Sınıf 3 integronlara ilk olarak 1993'te Japonya'da *Serratia marcescens* izolatlarında rastlanmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalarda *Klebsiella pneumoniae*'de bulunan bla_{GES} geni ile ilişkilendirilmiştir. Sınıf 3 integronlar *Acinetobacter* spp., *Alcaligenes* spp., *Citrobacter freundii*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *P. putida*, *Salmonella* spp. ve *S. marcescens'*te tanımlanmış ve IMP-1 metalo-beta-laktamaz enzimi ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Arakawa vd., 1995; Rowe Magnus vd., 2001). *E. coli*'de IncQ plazmitinde bla_{GES-1} geni taşıyan sınıf 3 integronu tanımlanmıştır (Collis ve ark, 2002).

Sınıf 4 integronlar çok sayıda gen kaseti barındırmaktadır ve ilk olarak *Vibrio* izolatlarında tanımlanmıştır (Shibata ve ark, 2003). Sınıf 4 integronlar *Vibrionaceae*, *Shewanella*, *Xanthomonas*, *Pseudomonad* gibi proteobakterilerde tanımlanmıştır (Rowe-Magnus ve Mazel, 2001). Kloramfenikol ve fosfomisine direnç geni taşıyan gen kasetleri barındırdığı tespit edilmiştir (Fluit ve Schmitz, 2004). Sınıf 4 ve Sınıf 5 integronlar *Vibrio* türlerinde trimetoprim direncinin gelişimine katkı sağlamaktadır. Sınıf 4 integronlar *V. cholera*'da STX elementi üzerinde, sınıf 5 integronlar *V. salmonicida*'da bir plazmit üzerinde taşınan transpozonda tanımlanmıştır (Shrivastava, 2013). Bu integron sınıflarının dünya çapındaki prevalansı diğer integron sınıflarından daha düşüktür (Nield ve ark, 2001).

İnsersiyon sekansları (IS): Transpozonlardan daha basit yapıda ve yaklaşık 750-1500 bç uzunluğundaki genetik elemanlardır. İki ucunda 10-40 bç uzunluğunda ters tekrar dizilerine sahiptir. Ters tekrar dizilerinin arasında transpozaz geni bulunmaktadır. İnsersiyon sekansları transpozonların iki ucunda ve plazmitler üzerinde bulunmaktadır. İnsersiyon sekansları arasında meydana gelen rekombinasyonlar bir plazmitten başka bir plazmite ya da kromozoma transferini arttırmaktadır (Arda, 2011)

6. Antibiyotik Direncinin Yayılmasında Rol Oynayan Gen Aktarım Mekanizmaları

Transformasyon: Ortamda serbest bulunan DNA'nın bakteri hücresi içine alınmasıdır. Genetik materyal bakterinin lize olması ile açığa çıkmaktadır. Başka bir bakteri tarafından sitoplazmik reseptörler aracılığı ile tanınan genetik materyal hücre zarı tarafından bakteri içerisine alınır. (Bengtsson-Palme ve Larsson 2016).

Transformasyon ilk olarak Frederick Giffith tarafından 1920'li yıllarda keşfedilmiştir. Giffith'in yaptığı deneyde, S tipi kapsüllü ve virülan suşlar farelere enjekte edilmiş ve farelerin enfekte olup pnömokok enfeksiyonundan öldüğü gözlenmiştir. Kapsülsüz ve avirülan R suşları ile enfekte olan fareler ise hayatta kalmaya devam etmiştir. Isıya maruz kalan ve öldürülen S suşları ile canlı R suşları fareye enjekte edildiğinde farelerin pnömokok enfeksiyonu geçirdiği ve öldüğü gözlenmiştir. Ölü farelerden izole edilen bakterilerin virülan S tipinde olduğu tespit edilmiştir. Bu deneyler sonucunda R tipi bakterilerin S tipi bakterilere dönüştüğü düşünülmüştür. Giffith'in yaptığı deney DNA'nın keşfi için çok önemli bir basamak olmuştur. Avery ve arkadaşları tarafından 1944 yılında yapılan transformasyon deneyinde pnömokokların kapsül özelliği dışında antibiyotik direnci ve şeker fermentasyonu gibi genetik özelliklerin de transforme olabildiğini gözlenmiştir (Madigan ve Martinko, 2012).

Belirli suşları ve türleri transforme olabilme yeteneğinde olan bakteri hücreleri kompetan özellik taşımaktadır. *Acinetobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Neisseria* ve *Thermus* doğal kompetan bakterilerdir ve yüksek düzeyde ve verimli transformasyon yapabilme yeteneğindedir. *Escherichia coli* ve birçok Gram negatif bakteri zayıf kompetan özellikte olup kalsiyum

iyonlarına maruz bırakıldıktan sonra birkaç dakika soğutulduklarında bakteri hücreleri transforme olabilmektedir (Madigan ve Martinko, 2012).

Transdüksiyon: Direnç genlerinin bakteri hücresini enfekte eden bakteriyofajlar aracılığıyla başka bir bakteri hücresine transfer edilmesidir. Bakteri hücresini enfekte eden bakteriyofaj bakteriyi lize ederek serbest kalır. Bakteri kromozomunu lize eden faj konak organizmayı kendi DNA'sını çoğaltmak için kullanmaktadır (Harbottle vd., 2006).

Transdüksiyon genelleştirilmiş ve özelleştirilmiş transdüksiyon olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Genelleştirilmiş transdüksiyonda verici hücreye ait DNA litik veya lizojenik (ılımlı) bir faj aracılığıyla alıcı hücreye aktarılmaktadır. Özelleşmiş transdüksiyonda verici hücreden alıcı hücreye DNA' nın belirli bir bölümü sadece lizojenik fajlar aracılığıyla aktarılmaktadır (Balcazar, 2014).

Transdüksiyon *Desulfovibrio, Escherichia, Pseudomonas, Rhodococcus, Rhodobacter, Salmonella, Staphylococcus* ve *Xanthobacter* cinslerinde gözlenmiştir (Madigan ve Martinko, 2012).

Konjugasyon: Antibiyotik direnç genlerinin aktarımında sorumlu en önemli mekanizma olduğu düşünülmektedir. Transformasyona göre gen aktarımını daha etkili bir şekilde gerçekleştirmekte ve transdüksiyona göre bakteri çeşitliliği açısından daha geniş bir yelpazeyi kapsamaktadır (Norman vd., 2009). İki bakteri hücresi arasında seks pilusu aracılığıyla sitoplazmik bir köprü oluşur ve mobil genetik eleman bir bakteriden diğerine aktarılır. Konjugasyonun gerçekleşmesi için bakterilerin genetik yapılarında konjugatif özellikleri kodlayan genlerin veya otonom olarak replike olabilen plazmitlerin bulunması gereklidir (Smillie vd., 2010; Wozniak ve Waldor, 2010). Plazmit ve transpozonlar konjugasyon yolu ile birbirinden farklı taksonomik gruplar arasında aktarılabilmekte ve böylelikle antibiyotik direnç genlerinin yayılımı kolaylaşmaktadır (von Wintersdorff vd., 2016). Transpozon ve integronlar da konjugasyon yoluyla aktarılabilmektedir. Özellikle Gram pozitif bakterilerde gen aktarımının konjugatif transpozonlar aracılığıyla gerçekleştiği bildirilmiştir (von Wintersdorff ve ark., 2016).

Konjugasyonda bakteriye bakteriye vericilik özelliğini sağlayan plazmitler seks faktörü içermektedir. Seks faktörü içeren bakterilere F^+ hücre (verici hücre),

içermeyen bakterilere ise F^- hücre (alıcı hücre) adı verilmektedir. Konjugasyon F^+ ve F^- hücreler arasında gerçekleşir. DNA'sı replike olan F^+ hücreler halkasal F genomunun kopyasını F^- hücrelere aktardıktan sonra alıcı hücre F^+ hücreye dönüşmektedir. F faktör direkt konak kromozomuna entegre olabilmekte ve meydana gelen bu yapıya 'high frequency of recombination' (Hfr) adı verilmektedir. Hfr hücresinin kromozomundan ayrılan F faktörü konak hücre kromozomuna ait genleri sitoplazmaya taşıyabilmektedir. F' faktörü olarak adlandırılan bu hücreler genleri alıcı bir hücreye (F-) aktarabilmektedir. Böylece bakteri kromozomu üzerinde ve yeni aktarılan F' faktöründe aynı genin birer kopyası bulunabilmektedir (Giffiths vd., 2000).

Konjugatif plazmitler karbenem direnç genlerinin taşınmasında ve türler arası aktarımında rol oynamaktadır. *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında IncP-2 grubunda yer alan bir mega plazmitin $bla_{\text{VIM-2}}$ genini barındıran integron taşıdığı bildirilmiştir (Urbanowicz vd., 2021). Yüksek riskli *P. aeruginosa* klonunda $bla_{\text{KPC-2}}$ ve $bla_{\text{VIM-2}}$ genini barındıran transpozonu taşıyan plazmit tespit edilmiştir (Wozniak vd., 2021). KDPA izolatlarında geniş konak aralıklı konjugatif plazmitin $bla_{\text{NDM-1}}$ genini taşıdığı gözlenmiştir (Olalekan vd., 2023).

7. GEREÇ ve YÖNTEM

7.1. Gereç

7.1.1. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar farklı firmalardan temin edildi. Etüv (Nüve EN500), mikrosantrifüj (Beckman coulter), çalkalayıcılı benmari (Memmert), ısıtıcı blok (HLC), inkübatör (WiseCube), 80°C derin dondurucu (New Brunswick Scientific Ultra Low Temperature Freezer U570), -20°C derin dondurucu (Bosch), buzdolabı (Bosch), vorteks (Velp Scientifica), hassas terazi (Ohaus), otomatik pipetler (Rainin), soğutmalı santrifüj (Hettich Rotina 380R), çalkalamalı inkübatör (IKA 4000i), elektroforez tankı (Cleaver), elektroforez güç kaynağı (Thermo Scientific), jel dökümantasyon ve işleme sistemi (DNR Bio-Imaging Systems, MiniLumi), polaroid kamera filmi yazıcısı (Sony), UV transillüminatörü (Vilber Lourmat), manyetik karıştırıcı (Daihan WiseStir), buz/kar makinesi (Scotsman), termal döngü cihazları (Techne Genius, Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific), pH metre (Hanna), mikrodalga fırın (Bosch), distile su cihazı (GFL), pastör fırını (Ecocell), otoklav (WiseClave), sınıf 2 kabin (Mars safety class training institute), Vitek 2 sistemi (Biomerieux), spektrofotometre (Shimadzu UV-1601)

7.1.2. Laboratuvar Suşları ve Standart Suşlar

Bu çalışmada, konjugasyon deneyleri için alıcı hücre olarak *P.aeruginosa* PU21 laboratuvar suşu (F^-, izolösin ve lösin oksotrof ve rifampisine dirençli, Dr. George A. Jacoby, Lahey Clinic Medical Center, Burlington'dan sağlandı) ve antimikrobiyal duyarlılık testlerinde *E. coli* ATCC 25922 suşu kalite kontrol olarak kullanıldı. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) deneylerinde sınıf 1 ve sınıf 2 integraz genleri ve integronların değişken bölgeleri için pozitif kontrol olarak *E. coli* ACC172 (Çopur Çicek vd., 2014), NDM, IMP, OXA-48 genleri için için pozitif kontrol olarak *Acinetobacter baumannii* BAK4 ve BAK40 (Çopur Çicek vd., 2014), plazmit DNA markeri olarak *E. coli* V517 suşundan izole edilmiş plazmit DNA'ları kullanıldı (Macrina, 1978).

7.1.3. Besiyeriler ve Kimyasallar

Çalışmada kullanılan besiyerleri ve kimyasal maddeler farklı firmalardan sağlandı. Brain Heart İnfusion agar (Biolife Italiana), Brain Heart Infusion broth (Biolife Italiana), agar-agar (Biolife Italiana), Mueller Hinton agar (Candalab), Mueller Hinton broth (Himedia), maya özütü (Pronadisa), sodyum klorid (NaCl) (Sigma), sodyum hidroksit (NaOH) (Merck), amonyum klorid (NH_4Cl) (Merck), di-sodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO4) (Himedia), di-potasyum hidrojen fosfat (K_2HPO4) (Himedia), D (+) glukoz (Fluka) sodyum dodesil sülfat (SDS) (Merck), tris asetat (Merck), hidroklorik asit (HCl) (Merck), trizma® hidroklorid (Tris-HCl), potasyum hidroksit (KOH) (Himedia), gliserol (Merck), orange red (Himedia), etil alkol (Merck), izopropanol (Merck), antibiyotik diskleri (Oxoid), etilen diamintetra asetik asit (EDTA) (Merck), PCR master mix (Thermo Fisher), etidyum bromid (Amresco), D-lizozim (Sigma), rifampisin (Koçak Farma), seftazidim (Tüm Ekip), serum fizyolojik (Turkfleks), trizma® base (Tris base) (Merck), tris asetat (Merck), etidyum bromid (Amresco), deoksi nükleotit trifosfat (dNTP) set (Biodyne), 100 bp DNA Ladder (Vivantis), Taq DNA polimeraz (Biodyne), tripton (Pronadisa), (Merck), oligonükleotit primerler (IDT, İngiltere) firmalarından sağlandı.

7.1.3.1. Besiyerilerin ve Antibiyotiklerin Hazırlanışı

Luria Bertani (LB) Broth: % 1 tripton, % 0,5 maya özütü % 0,5 NaCl (pH 7.4) distile su ile hazırlandı. Besiyeri pH'sı sodyum hidroksit ile ayarlandı. 121 ˚C'de 1 atm basınçta 15-20 dk otoklavda steril edildi.

Minimal Medyum (5X M9 medium): % 3 Na_2HPO_4, % 1,5 KH_2PO_4, % 0,5 NH_4Cl, % 0,25 NaCl 100 mL deiyonize su kullanılarak hazırlandı, otoklavlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

Minimal Agar: 400 mL deiyonize su, 7,5 g agar ilave edildi ve otoklavlandı. Agar karışımı 45-50 ˚C' ye soğutuldu ve aynı sıcaklığa ayarlanmış 100 mL 5X M9 minimal medyum eklendi ve iyice homojenize etmek için karıştırıldı. Karbon kaynağı olarak % 0,2 (v/v) bakteriyolojik filtre (ISOLAB, Türkiye) ile steril edilmiş 1 mL glukoz solüsyonu ilave edildi. Steril petri plaklarına döküldü ve kullanılana kadar 4 ˚C' de saklandı.

Seftazidim: İESETUM® 1 g IM/IV enjeksiyonluk çözelti tozu (İ.G. Ulugay, Türkiye) firma önerisi doğrultusunda seftazidim çözeltisi hazırlandı ve konjugasyon deneylerinde kullanmak üzere besiyeri mililitresinde 1 µg olacak şekilde seçici besiyerine katıldı.

Rifampisin: RİF 125 mg I.M. enjeksiyonluk çözelti (Koçak Farma, Türkiye) (rifampisin) konjugasyon deneylerinde kullanmak üzere besiyeri mililitresinde 150-200 µg olacak şekilde seçici besiyerine katıldı.

7.1.3.2. Agaroz Jel Elektroforezi İçin Solüsyonların Hazırlanışı

TAE Elektroforez Tamponu: 50X konsantre olarak hazırlandı. % 24,2 Tris base, % 5,71 glacial asetik asit, % 3,72 EDTA (pH~8.5) olacak şekilde deiyonize su kullanılarak hazırlandı. pH ayarlamak için, NaOH peletleri kullanıldı. Çalışma solüsyonu olarak distile veya deiyonize su ile sulandırılarak 1X solüsyon kullanıldı. Çalışma solüsyonunda 40 mM Tris-asetat, 2 mM EDTA içerik sağlanmış oldu.

Etidyum Bromid Solüsyonu: 10 mg/mL (w/v) stok solüsyon olacak şekilde deiyonize su kullanılarak hazırlandı. Işık almayan ortamda muhafaza edildi.

10X Orange Red Solüsyonu (Yükleme Tamponu): 20 g sükroz tartıldı 40 mL dH_2O içerisinde çözüldü. 100 mg Orange G çözeltiye eklenerek, çözeltinin hacmi 50 mL'ye tamamlandı. Bir filtre yardımı ile steril edildi ve 1'er mL olacak şekilde 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine dağıtıldı ve kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklandı.

Etilen Diamin Tetra Asetik Asit (EDTA) (0.5 M): 73,05 g EDTA tartılıp distile su ile 500 mL'ye hazırlandı. Solüsyonun berraklaşması için manyetik çalkalayıcı üstündeki solüsyona NaOH peleti ilave edildi ve iyice karıştırıldı. Solüsyonun pH'sı 8,0'a ayarlanarak 121 °C'de 1 atm'de 30 dk otoklavda steril edildi ve oda sıcaklığında saklandı.

Tris-HCl (1 M): Ticari Tris-HCl'den 78,8 g tartılıp distile su ile 500 mL'ye hazırlandı. Solüsyonun pH'sı HCl ile 7,5'e ayarlandı. Daha sonra 121 °C'de 1 atm'de 30 dk otoklavda steril edildi ve oda sıcaklığında saklandı.

TE (Tris/EDTA) Tamponu: 1 M Tris-HCl solüsyonundan son konsantrasyonu 10 mM Tris-HCl olacak şekilde (5 mL) alındı. 0.5 M EDTA

solüsyonundan son konsantrasyonu 1 mM EDTA olacak şekilde (1 mL) alındı. Ardından distile su ile (494 mL) hacim 500 mL'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

10X TBE Tamponu: 108 g Tris base ve 55 g borik asit tartıldı, 40 mL 0.5M EDTA pH:8,0 içerisinde çözüldü, toplam hacim dH_2O ile 1 L'ye tamamlandı.

7.1.3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu İçin Kullanılan Solüsyonların Hazırlanışı

dNTP Karışımı: Mikrosantrifüj tüplerine 100 mM'lık dATP, dGTP, dCTP ve dTTP stoklarından 10'ar µL alınıp 60 µL deiyonize suda çözüldü. Karışım vortekslenerek 10 mM'lık dNTP stok solüsyonu hazırlandı. Hazırlanan karışım steril ependorf tüplere 50 µL'lik hacimler halinde bölündü ve kullanılıncaya kadar - 20°C'lik derin dondurucuda saklandı.

Primer Karışımı: Liyofilize haldeki primerler; üretici firmanın talimatlarına uygun olarak stok konsantrasyonları 100 pmol/µL olacak şekilde TE tamponu ile sulandırılıp stok solüsyonu hazırlandı. Mikrosantrifüj tüplerine stok karışımdan her bir primer çifti için 10 µL transfer edildi ve üzerine 90 µL steril enjeksiyonluk su eklenerek son konsantrasyonu 10 pmol/µL olan primer çalışma stoğu hazırlandı. Çalışma stokları kullanılıncaya kadar - 20°C'de muhafaza edildi.

7.1.3.4. Plazmit DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Solüsyonların Hazırlanışı

Tris-HCl: 1 M stok çözelti elde edebilmek için 15,76 g Tris-HCl tartıldı, üzerine 100 mL dH_2O eklenerek pH 8 olacak şekilde ayarlandı. Elde edilen çözelti otoklavlandı ve steril edildi.

EDTA: 0,5 M stok çözelti elde edebilmek için 20,22 g EDTA tartıldı, dH_2O ile 100 mL'ye tamamlandı, pH:8 olacak şekilde ayarlandı. Elde edilen çözelti otoklavla steril edildi.

Glukoz: 1 M stok çözelti elde edebilmek için 3 g glukoz tartıldı, dH_2O ile 50 mL'ye tamamlandı.

SDS: %10 luk SDS hazırlamak için 5 g SDS tartıldı, dH_2O ile 50 mL'ye tamamlandı. Steril cam şişede muhafaza edildi.

Amonyum Asetat: 7,5 M stok çözelti elde edebilmek için 28,90 g amonyum asetat tartıldı, dH_2O ile 50 mL'ye tamamlandı. Steril cam şişede muhafaza edildi.

TE: 1 M Tris-HCl çözeltisinden 500uL, 0,5 M EDTA çözeltisinden 100 uL alınarak toplam hacim 50 mL olacak şekilde dH_2O eklendi.

Lizozim: 4 mg lizozim tartılarak toplam hacim 1 L olacak şekilde dH_2O eklendi. Elde edilen karışım vortekslendikten sonra steril falkon tüpte muhafaza edildi.

7.1.3.5. Pulsed Field Gel Elektroforezi İçin Kullanılan Solüsyonlar

Hücre Süspansiyon Tamponu (HST): 100mM Tris-HCL, 100mM EDTA pH:8.0 olacak şekilde istenen miktarda hazırlandı ve 4 °C'de muhafaza edildi.

Hücre Liziz Solüsyonu–1 (HLS-1): 50 mM Tris-HCL (pH 8.0), 50 mM EDTA istenilen miktarda hazırlandı, kullanılacağı anda 2.5 mg/mL lizozim ve 1.5mg/mL proteinaz K eklendi. 4 °C'de muhafaza edildi.

Hücre Liziz Solüsyonu–2 (HLS-2): 0.5 M EDTA ve % 1 sarkozil içerecek şekilde istenen miktarda hazırlandı, kullanım esnasında 400 µg/mL proteinaz K eklendi ve 4 °C'de muhafaza edildi.

7.2. Yöntem

7.2.1. Bakteriyel İzolatların Toplanması, Tanımlanması ve Saklanması

Kocaeli Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Merkez Laboratuvarı Bakteriyoloji Birimi' ne kültür isteği ile gönderilen klinik örneklerden izole edilen 47 adet KDPA izolatı toplandı. Laboratuvara poliklinik, servis ve yoğun bakım ünitelerinden gönderilen çeşitli klinik örnekler kültürü yapılmak üzere kanlı agar, çikolata agar ve Eozin Metilen Blue (EMB) agar besiyerlerine ekilip, etüvde 37°C' de 24 saat boyunca inkübe edildikten sonra üreyen *Pseudomonas* spp. şüpheli (aerob ve oksidaz pozitif, floresein pigmentli, non-fermentatif) (Procop vd., 2017) koloniler VITEK® 2 Compact (BioMérieux, Fransa) otomotize sistemi kullanılarak tanımlandı. Tanımlanması tamamlanan kültür örnekleri Brain Heart Infusion (BHI) agarda tek koloni yöntemi ile pasajlanarak saf kültürleri elde edildi. Brain Heart Infusion sıvı besiyerinde üretilen izolatlar %20' lik gliserollü ve boncuklu saklama besiyeri içeren tüplerde -80°C' lik derin dondurucuda muhafaza edildi.

Klinik örneklerin gönderildiği birim, izole edildiği tarih ve adlandırılması Tablo 2' de gösterilmektedir.

Tablo 2. Karbapenem dirençli *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının epidemiyolojik özellikleri

No	Klinik Örnek Orijini	Örneğin Geldiği Birim	İzole Edildiği Tarih	KDPA İzolatı
1	Balgam	Kalp-Damar Yoğun Bakım Ünitesi	4.11.2021	KUP1
2	Trakeal Aspirat	Yeni Doğan Yoğun Bakım Ünitesi	20.12.2021	KUP2
3	Balgam	Göğüs Hastalıkları Servisi	23.12.2021	KUP3
4	İdrar	Acil Polikliniği	22.12.2021	KUP4
5	Yara	Covid-19 Yoğun Bakım Ünitesi	24.12.2021	KUP5
6	Yara	Ortopedi Servisi	28.12.2021	KUP6
7	Yara	Enfeksiyon Hastalıkları Polikliniği	6.01.2022	KUP7
8	İdrar	Acil Polikliniği	30.01.2022	KUP9
9	Trakeal Aspirat	Göğüs Hastalıkları Polikliniği	1.02.2022	KUP10
10	Trakeal Aspirat	Göğüs Hastalıkları Servisi	1.02.2022	KUP11
11	Balgam	Covid-19 Yoğun Bakım Ünitesi	8.02.2022	KUP13
12	Balgam	Onkoloji Servisi	11.02.2022	KUP16
13	Trakeal Aspirat	Çocuk Yoğun Bakım Ünitesi	4.03.2022	KUP19
14	Balgam	Göğüs Hastalıkları Polikliniği	7.03.2022	KUP20
15	Bronkoalveolar Lavaj	Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesi	7.03.2022	KUP21
16	Balgam	Göğüs Hastalıkları Polikliniği	9.03.2022	KUP22
17	Balgam	Genel Cerrahi Servisi	18.03.2022	KUP24
18	Trakeal Aspirat	Göğüs Hastalıkları Servisi	27.03.2022	KUP27
19	Balgam	Plastik Cerrahi Servisi	5.04.2022	KUP29
20	Balgam	Göğüs Cerrahi Servisi	8.04.2022	KUP30
21	Yara	Enfeksiyon Hastalıkları Servisi	8.04.2022	KUP31
22	Balgam	Palyatif Onkoloji Servisi	9.04.2022	KUP32
23	Trakeal Aspirat	Göğüs Hastalıkları Servisi	11.04.2022	KUP33
24	Balgam	Göğüs Hatalıkları Polikliniği	11.04.2022	KUP34
25	Trakeal Aspirat	Romatoloji Servisi	11.04.2022	KUP35
26	Yara	Enfeksiyon Hastalıkları Polikliniği	18.04.2022	KUP36
27	Balgam	Dermatoloji Polikliniği	18.04.2022	KUP38
28	Balgam	Göğüs Hastalıkları Servisi	25.04.2022	KUP40
29	Yara	Kardiyoloji Yoğun Bakım Ünitesi	17.05.2022	KUP41
30	İdrar	Acil Polikliniği	21.05.2022	KUP42
31	Balgam	Acil Polikliniği	24.05.2022	KUP43
32	İdrar	Girişimsel Radyoloji Polikliniği	30.05.2022	KUP44
33	Balgam	Hematoloji Servisi	1.06.2022	KUP47
34	Trakeal Aspirat	Çocuk Yoğun Bakım Ünitesi	8.06.2022	KUP48
35	Trakeal Aspirat	Çocuk Cerrahi Servisi	7.06.2022	KUP49
36	Yara	Plastik Cerrahi Servisi	18.06.2022	KUP50
37	İdrar	Kulak Burun Boğaz Polikliniği	20.06.2022	KUP52
38	İdrar	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Servisi	14.06.2022	KUP53
39	Dren Sıvısı	Gastroenterolji Servisi	20.06.2022	KUP54
40	İdrar	Kalp-Damar Yoğun Bakım Ünitesi	28.06.2022	KUP56
41	İdrar	Çocuk Nefroloji Polikliniği	28.06.2022	KUP57
42	Yara	Plastik Cerrahi Servisi	21.07.2022	KUP58
43	Yara	Ortopedi Servisi	20.07.2022	KUP59

Tablo 3 (Devam). Karbapenem dirençli *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının epidemiyolojik özellikleri

44	Yara	Plastik Cerrahi Servisi	3.08.2022	KUP63
45	Balgam	Göğüs Hastalıkları Polikliniği	28.08.2022	KUP66
46	Yara	Dermatoloji Servisi	13.09.2022	KUP68
47	İdrar	Üroloji Servisi	13.09.2022	KUP69

7.2.2. Antibiyotik Duyarlılık Testi

Antibiyotik duyarlılık testleri VITEK ® 2 Compact (BioMérieux, Fransa) otomatize sistemi ile çalışıldı. Sonuçlar Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi (EUCAST) rehberdeki standartlara göre ve gentamisinin zon çapı Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) rehberlerine göre değerlendirildi (CLSI, 2020; EUCAST, 2023).

7.2.3. İmipenem-EDTA / Meropenem-EDTA Kombine Disk Yöntemi

Karbapenem dirençli bakterilerde MBL üretiminin fenotipik taranması için EUCAST önerileri doğrultusunda İmipenem-EDTA/Meropenem-EDTA kombine disk yöntemi uygulandı (EUCAST, 2017). Çalışmanın başlangıcında EDTA stok solüsyonu hazırlandı. Bunun için, 1000 mL distile suda 186,1 g disodyum EDTA.$2H_2O$ (Merck) çözdürülerek 0,5 M EDTA solüsyonu elde edildi ve NaOH ile pH 8,0'e ayarlandı, daha sonra otoklavlanarak sterilize edildi. 0,5 McFarland bulanıklığındaki bakteri süspansiyonu müller hinton agara ekildi. İki adet imipenem ve meropenem diski (10µg) besiyeri yüzeyine yerleştirildi, imipenem ve meropenem disklerinden bir tanesinin üzerine 10 µl EDTA eklendi. 37°C'de 18-24 saatlik inkübasyondan sonra zon çapları ölçüldü. Her iki karbapenem diskleri için ayrı ayrı etraflarındaki zon çapları ile bu disklerin EDTA ile kombine edildiği disklerin etrafındaki zon çapları arasındaki fark her bir suş için kaydedildi. İmipenem ve meropenem diski ile imipenem/EDTA'lı meropenem/EDTA'lı diskler arasındaki zon çapları arasında 7 mm veya daha fazla fark bulunması MBL pozitif olarak kabul edildi (Öcal, 2012).

7.2.4. Konjugasyon Deneylerinin Yapılması

Konjugasyon deneyleri Jacoby (1974)'nin önerileri ve bazı küçük modifikasyonlarla broth mating (sıvıda çiftleşme) yöntemiyle yapıldı (Jacoby, 1974). Derin dondurucuda, -80°C' de muhafaza edilen verici ve alıcı suşlar yeniden canlandırılmak üzere BHI agarda üretildi. BHI agarda resipient (alıcı) *P. aeruginosa*

PU21 kültür suşuna canlı bakteri sayımı (viable count) yapıldı. Bu işlem sonucunda elde edilen sayılar (cfu/mL) konjugasyon etkinliğinin hesaplanması için kullanıldı.

Canlı bakteri sayısının hesaplanması için "Eşitlik 1" kullanıldı.

Canlı Bakteri Sayısı (mL'de) = Agardaki Koloni Sayısı / Ekilen Miktar (mL) X Sulandırım Katsayısı

(Eşitlik1)

Konjugasyon karışımını hazırlamak için 5'er mL Brain Heart İnfüzyon Buyyona (BHI) tek koloni verici (klinik suş) ve alıcı (PU21) suşları ekilip, bir gece çalkalayıcı inkübatörde 36–37 °C'de üretildi. Steril bir tüpte 1 mL verici ve 1 mL alıcı suşun bulunduğu bakteri süspansiyonları karıştırılıp elde edilen konjugasyon karışımı 37 °C'de 1 gece inkübe edildi. Steril serum fizyolojik (%0,9 NaCl) kullanılarak, konjugasyon karışımının 1,5 mL' lik steril mikrosantrifüj tüpünde 10^{-1} ve 10^{-2} oranında dilüsyonları hazırlandı. BHI agar kullanılarak hazırlanan seleksiyon plaklarına [vericinin dirençli olduğu antibiyotik (seftazidim) ve alıcının dirençli olduğu antibiyotik (rifampisin) içeren] dilüsyon tüplerindeki karışımdan 100'er µL steril cam baget ile agar yüzeyine yayılarak ekildi ve 37 °C'de 18-24 saat inkübe edildi. 10^{-1} ve 10^{-2} oranındaki dilüsyonların bulunduğu agardaki koloniler ayrı ayrı sayılarak konjugasyon etkinliği hesaplandı.

Konjugasyon etkinliğinin hesaplanması için "Eşitlik 2" kullanıldı.

Konjugasyon Etkinliği = Transkonjugant Sayısı (cfu/mL) / Alıcı Hücre Sayısı (cfu/mL)

(Eşitlik2)

Her bir konjugasyon deneyi en az beş rastgele koloni replika ekimle doğrulandı. Bakteri kolonileri, 4 farklı içerikteki seçici agarlara replika ekimleri yapıldı:

Minimal Agar Besiyeri (P_1): Alıcı hücrenin oksotrof olduğu lösin ve izolösin amino asitlerinden sadece birini içeren minimal agar.

Seftazidim İçeren Agar Besiyeri (P_2): 1 µg/mL ampisilin içeren BHI agar plağı.

Rifampisin İçeren Agar Besiyeri (P_3): 200 µg/mL rifampisin içeren BHI agar plağı.

Rifampisin ve Seftazidim İçeren Agar Besiyeri (P_4): 200 µg/mL rifampisin+1 µg/mL seftazidim içeren BHI agar plağı.

Cam bir petri kutusu içinde sivri kürdanlar otoklavda steril edildi ve kurutma etüvünde saklandı. Kürdanın ucuyla koloniye dokunduktan sonra, sırasıyla P_1, P_2, P_3, P_4 plaklarına batırıldı ve 37 °C'de inkübe edildi. P1 hariç diğer plaklarda üreyenler koloniler muhtemel transkonjugant olarak düşünüldü. Muhtemel transkonjugant olduğu düşünülen kolonilerden tek koloni alınıp, seftazidim ve rifampisin içeren BHI sıvı besiyerine ekildi ve sıvı kültür boncuklu saklama besiyeri içeren tüplerde -80°C' de muhafaza edildi.

7.2.5. Transkonjugantların Antibiyotik Duyarlılık Testi

Alıcı suşunun (*ilvBll2 leu-I str-1* Rif^R) disk difüzyon yöntemiyle hangi antibiyotiklere dirençli olduğu belirlendikten sonra transkonjugantların antibiyotiklere dirençleri disk (Bioanalyse, Ankara) (imipenem 10µg, meropenem 10 µg, aztreonam 30µg, amikasin 30µg, netilmisin 10µg, tobramisin 10µg, piperasilin 30 µg, piperasilin/tazobaktam 30/6 µg, seftazidim 10 µg, sefepim 30 µg, siprofloksasin 5 µg ve levofloksasin 5 µg) difüzyon yöntemiyle belirlenip, gentamisinin zon çapı Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ve diğer antibiyotiklerin zon çapı European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) rehberlerine göre değerlendirilerek ko-transfer edilen (ortak aktarılan) antibiyotik dirençleri belirlendi (CLSI, 2020; EUCAST, 2023).

7.2.6. Alkali Lizis Yöntemiyle Plazmit DNA İzolasyonu

Muhtemel transkonjugant olarak değerlendirilen izolatların plazmit DNA izolasyonu Kado ve Liu (1981)'nun tarif ettiği alkali lizis yöntemiyle yapıldı. Plazmit DNA izolasyonu yapılacak kökenlerin tamamı yeniden canlandırma işlemi için -80 °C' den çıkarılıp, BHI buyyonda bir gece inkübe edilerek subkültürleri yapıldı. Taze pasajlarından steril öze ile alınan tek koloni, uygun antibiyotik içeren 3-5 mL LB besiyerinde 37 °C' de gece boyu çalkalayıcı inkübatörde üretildi. Gece

kültürü 1,5 mL' lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılarak 12.000 rpm' de 2-3 dakika mikrosantrifüj cihazında santrifüj edilip süpernatant kısmı atıldı. Pellet üzerine 200 µL solüsyon I [50 mM Glukoz/25mM Tris-HCl/10 mM EDTA/RNAse (100 µg)] eklenip, vortekslenerek ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra 400 µL solüsyon II (0,2 N NaOH /%1 SDS) eklenecek ve 3-5 defa alt üst edildikten sonra 5 dakika buzda bekletildi. Üzerine 300 µL solüsyon III (7,5M amonyum asetat pH7,2) ekleyip pellet dağılıncaya kadar alt üst edilip,10 dakika buzda bekletildi. 12.000 rpm' de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatantı yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılarak üzerine 500-600 µL izopropanol eklendi ve alt üst edildikten sonra 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 13.000 rpm' de 15 dakika santrifüj edildi. Pellet üzerine 500 µL soğuk %70'lik EtOH eklendi ve 13000 rpm' de 3 dakika santrifüj edildikten sonra sıvı kısmı döküldü. Pellet 37°C' de kurutulduktan sonra, 30-40 µL' lik TE (10 mM Tris pH 8, 1mM EDTA pH 8) solüsyonunda çözüldü. Plazmit DNA'sı -20°C'de saklandı.

7.2.7. Plazmit DNA'nın Agaroz Jelde Görüntülenmesi

Plazmit DNA'larının görüntülenmesinde etidyum bromür katkılı (0,5 µg/ml) %0,9'luk agaroz jele (Sigma, ABD) marker ve plazmit DNA'lardan 10 µL yükleme yapılarak 40 volt doğru akımda 3 saat yürütüldü. Marker DNA olarak plazmit içeren *E. coli* V517 suşu kullanıldı (Macrina, 1978). DNA bantları jel dökümantasyon sisteminde görüntülendi ve fotoğtaflandı.

7.2.8. Transkonjugantların Pulsed Field Jel Elektroforezi Analizi

PFGE uygulamasında Durmaz ve arkadaşlarının optimize ettikleri protokol izlendi (Durmaz ve ark., 2009).

İzolatların Hazırlanması: Muhtemel transkonjugant olduğu düşünülen ve -80 °C' de saklanmış olan izolatlar saklamadan çıkarılarak MHA besiyerine tek koloni yöntemiyle ekildi. Etüvde 37 °C' de 20–24 saat koşullarda inkübe edildi. Bir gecelik inkübasyondan sonra saflığı kontrol edilerek tek koloniden tekrar MHA besiyerine pasaj yapıldı. Bir gece inkübasyona bırakıldı. Saf kültür halinde üreyen koloniler, plastik öze ile toplanarak 2 mL hücre süspansiyon tamponu **(**HST) içinde süspanse edildi. Elde edilen süspansiyon mikrosantrifüj tüpüne alınarak vortekslendi. Hücre süspansiyonu 11.200 rpm' de 4 °C' de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant atıldı. Peletin üzerine tekrar 1 mL soğuk HST eklenerek kısa

süreli vorteks yapıldı. Bakteri yoğunluğu, spektrofotometre ile 590 nm' de 1 absorbans ayarlandı. Bakteri süspansiyonu kısa süre içinde (5 dakika) agaroza gömülecek ise oda ısısında, gecikecek ise kırık buz içinde bekletildi.

İzolatların Agaroza Gömülmesi: HST içerisinde % 2' lik düşük erime ısılı agaroz hazırlandı. Hazırlanan agaroz ısı bloğunda 90 °C'de eritildi ve % 10' luk SDS'den 1 mL eklenerek pipetajlanarak köpürmemesi için özen gösterilerek karıştırıldı. Agaroz-SDS karışımından mikrosantrifüj tüplerine 100 µL dağıtılırak ısı bloğunda 65 °C de bekletildi. Bakteri süspansiyonundan 100 µL alınarak 65 °C' de tutulan ve içerisinde 100 µL düşük erime ısılı agaroz-SDS bulunan tüpe eklendi. Birkaç defa pipetaj yapıldı. Hücrelerin agaroz içinde homojen dağılması sağlanarak hücre-agaroz-SDS karışımından hava kabarcığı olmayacak şekilde agaroz kalıbına 100 µL dağıtıldı. Kalıplar, 4 °C' de agaroz katılaşıncaya kadar 10 dakika bekletildi. (Agaroz kalıpların soğukta tutulması kaliteli DNA hazırlanması için önemlidir, erken parçalanması ve endonükleaz aktivitesi azalır, agarozun homojen katılaşması sağlanır).

Agaroz İçindeki Hücrelerin Parçalanması: Hücre liziz solüsyonu–1 (HLS–1) hazırlandı. Ancak, lizozim ve proteinaz K parçalama tamponunun içerisine kullanım sırasında eklendi. 5 mL' lik steril kapaklı tüplere 0,5 mL HLS–1 konuldu. Agaroz kalıptan çıkarılarak lizis solusyonuna yerleştirildi. 37 °C'de 1,5 saat etüvde bekletildi. HLS–1 dökülerek yerine hücre liziz solusyonu–2 (HLS–2) eklendi. HLS-1' de olduğu gibi proteinaz K, parçalama tamponu içerisine kullanım sırasında eklendi. 55 °C' de 2,5 saat çalkamalı su banyosunda bekletildi.

Agaroz Kalıpların Yıkanması: Tüpler buz içerisinde 15 dakika bekletilerek agaroz kalıbının katılaşması sağlandı. Sonra HLS–2 dikkatlice aspire edildi. Agaroz kalıp bulunan tüpe, 55 °C' de ısıtılmış olan steril ultra saf sudan 4 mL eklenerek 55 °C çalkamalı su banyosunda 15 dakika bekletildi. Su tamamen aspire edilerek yıkama işlemi iki defa daha tekrarlandı. Daha sonra agaroz kalıpları üç defa (her biri 55 °C'de 20-30 dakika olmak üzere) 4 mL TE tamponuyla yıkandı. Yıkama sonrasında agaroz kalıplarının şeffaflaştığı görüldü.

Agaroz Kalıpları İçindeki DNA'nın Restriksiyon Endonükleazlarla Kesilmesi: Bir lam üzerine alınan agaroz kalıbı bistürü yardımıyla ¼ oranında kesilerek mikrosantrifüj tüplerine konuldu. Parçalardan biri 100 µL 1X SpeI tamponu içerisine konularak etüvde 37 °C' de 10 dakika bekletildi. (Diğer parçalar

sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere 1X TE tamponu içerisinde 4°C' de saklandı). Sonra sıvı aspire edildi. Her agaroz kalıbı için; 10 µL 10X SpeI tamponu, 3 µl *SpeI* enzimi (20 U/örnek), 87 µL steril saf su toplam hacim 100 µL olacak şeklinde hazırlandı. Süre sonunda enzim tamponu aspire edilerek yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanan enzim karışımından mikrosantrifüj tüplerine konulup etüvde 37 °C' de 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüpler buzdolabında 15 dakika bekletildi.

Elektroforez Jelinin Hazırlanması ve Kalıpların Jele Yüklenmesi: 0.5X TBE içinde 100 mL % 1' lik agaroz hazırlandıktan sonra 45–50 ºC' de su banyosunda bekletildi. Agaroz dökülecek kaset hazırlanarak su terazisi ile tamamen düzgün olduğu kontrol edilmiş bir zemine konuldu. On beş dişli tarağın uç kısmına enzimle kesilmiş agaroz kalıplarının her biri yerleştirildi. Tarağın iki kenar ve ortasındaki dişlere kontrol suşuna (PU21) ait kalıplar yüklendi. Sıcaklığı yaklaşık 45–50 ºC olan agaroz, dikkatli bir şekilde hava kabarcığı oluşturulmadan kaset içine döküldü. Oda ısısında katılaşıncaya kadar bekletildi. Tarak dikkatlice çıkarıldı. Sonra agaroz kasetinin çerçeveleri çıkarılarak tabla üzerindeki agaroz, içerisinde 1900–2000 mL 0.5X TBE tamponu bulunan PFGE tankına yerleştirildi.

Elektroforez: CHEF DR II sisteminde; başlangıç vuruş süresi 5 sn, bitiş vuruş süresi 20 sn, vuruş açısı 120°, akım 200 V (6 volt/cm^2)'da , sıcaklık 14 °C, süre 18 saat olacak şekilde elektroforez koşulları belirlendi.

Sonucun Gözlenmesi ve Analizi: Elektroforez sonrası 10µl etidyum bromür (Amresco, ABD) ile 20 dakika boyanan jel, UV transillüminatör (Vilber Lourmat, Almanya) ile görüntülendi ve Tenover ve arkadaşları tarafından belirlenen ilkelere göre değerlendirildi (Durmaz ve ark., 2009). Jel dökümantasyon sistemi (DNR Bio-Imaging System, İsrail) ile fotoğraflandı ve BioNumerics (AppliedMaths, Inc., Belçika, 6.01 versiyon) yazılım sistemi kullanılarak bant profilleri analiz edildi.

7.2.9. PZR Deneyleri

PZR deneyleri için izolatların toplam DNA'ları fenol-kloroform yönteminin bazı modifikasyonları ile elde edildi (Chen ve Kuo, 1993). Tüm DNA örnekleri -20°C' de stoklandı. PZR tamponu, deoksinükleotit trifosfatlar, primerler, *Taq* DNA polimeraz ve kalıp DNA'lar -20 °C'den çıkartıldı ve buz üzerinde çözünmeleri sağlandı. PZR deneyleri son hacim 25 µL olacak şekilde 200 µL' lik PZR tüplerinde yapıldı. Bir ünite *Taq* DNA polimeraz (Invitrogen), 2,5 µL 1X DNA

polimeraz tamponu (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 9.0, % 1 Triton-X-100), 3 µL 1,5 mM $MgCl_2$ (Invitrogen), 0,5 µL 1 mM dNTP mix (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Solis Biodyne), 0,25 µL primer (stok konsantrasyon 10 pmol/µL), 1 µL kalıp DNA ilave edildi ve son hacim steril deiyonize su ile tamamlanarak PZR karışımı hazırlandı. Örnekler termal döngü cihazına yerleştirildi ve uygun programda çalıştırıldı. Amplifikasyon ürünleri % 1,5-2' lik agaroz jelde yürütüldü ve UV transillüminatöründe görüntülendi.

7.2.9.1. Biyofilm Genlerinin PZR ile Taranması

Virülans faktörü olan QS sisteminde etkili transkripsiyonel regülatör genlerin varlığının araştırılması için biyofilm genleri olan *lasR* ve *rhlR* PZR ile tarandı (Sabharwal, 2014). PZR reaksiyonunda kullanılan komponentler "7.2.9. PZR Deneyleri" kısmında açıklandığı şekilde hazırlandı.

PZR reaksiyonu için kullanılan primerler Tablo 3' te ve reaksiyon şartları Tablo 4' te belirtilmiştir.

7.2.9.2. Karbapenemaz Genlerinin PZR ile Taranması

PZR ile karbapenemaz genlerinden bla_{KPC}, bla_{NDM}, bla_{IMP}, bla_{VIM} ve bla_{OXA-48} tarandı (Poirel vd., 2011) PZR reaksiyonunda kullanılan komponentler "7.2.9. PZR Deneyleri" kısmında açıklandığı şekilde hazırlandı.

PZR reaksiyonu için kullanılan primerler Tablo 3' te ve reaksiyon şartları Tablo 4' te belirtilmiştir.

7.2.9.3. İntegronların PZR ile Taranması

İzolatlarda *IntI1* integraz ve *IntI2* integraz genleri PZR ile tarandı (Machado vd., 2005). İntegraz geni pozitif saptanan izolatlarda integron gen kaseti varlığı değişken bölgeler taranarak araştırıldı (Lévesque vd., 1995; White, 2000). PZR reaksiyonunda kullanılan komponentler "7.2.9. PZR Deneyleri" kısmında açıklandığı şekilde hazırlandı.

PZR reaksiyonu için kullanılan primerler Tablo 3' te ve reaksiyon şartları Tablo 4' te belirtilmiştir.

Tablo 4. Kullanılan oligonükleotit primerlerin özellikleri

Gen	Primer İsmi	Oligonükleotit Dizisi (5' → 3')	PZR Ürünü (bp)	Referans
IntI1 integraz	**IntI1F** **IntI1**	F: GGTCAAGGATCTGGATTTGG R: ACATGCGTGTAAATCATCGTC	500	Machado ve ark.,2005
IntI2 integraz	**IntI2** **IntI2**	F:CACGGATATGCGACAAAAAGGT R:GTAGCAAACGAGTGACGAAATG	740	Machado ve ark.,2005
Sınıf 1 integron değişken bölge	**5'-CS** **3'-CS**	F: GGCATCCAAGCAGCAAG R: AAGCAGACTTGACCTGA	Değişken	Lévesque ve ark., 1995
Sınıf 2 integron değişken bölge	**Hep51** **Hep74**	F: GATGCCATCGCAAGTACGAG R:CGGGATCCCGGACGGATGCACGATTTGTA	Değişken	White, 2000
bla$_{KPC}$	**KPC** **KPC**	F: CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG R: CTTGTCATCCTTGTTAGGCG	798 232	Poirel ve ark., 2011
bla$_{NDM}$	**NDM** **NDM**	F: GGTTTGGCGATCTGGTTTTC R: CGGAATGGCTCATCACGATC	621	Poirel ve ark., 2011
bla$_{IMP}$	**IMP** **IMP**	F:GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC R: GGTTTAAYAAAACAACCACC	232	Poirel ve ark., 2011
bla$_{VIM}$	**VIM** **VIM**	F: GATGGTGTTTGGTCGCATA R: CGAATGCGCAGCACCAG	390	Poirel ve ark., 2011
bla$_{OXA-48}$	**OXA-48OXA-48**	F: GCGTGGTTAAGGATGAACAC R: CATCAAGTTCAACCCAACCG	438	Poirel ve ark., 2011

Tablo 5 (Devam). Kullanılan oligonükleotit primerlerin özellikleri

lasR	**lasR**	F: AAGTGGAAAATTGGAGTGGAG	130	Sabharwal, 2014
	lasR	R: GTAGTTGCCGACGACGATGAAG		
rhIR	**rhlR**	F: TGCATTTTATCGATCAGGGC	133	Sabharwal, 2014
	rhlR	R: CACTTCCTTTTCCAGGACG		

bp: Baz çifti; Y: C veya T

Tablo 6. Polimeraz zincir reaksiyonlarının siklus parametreleri

Reaksiyon Adı	**İlk Denaturasyon**	**Denaturasyon**	**Bağlanma**	**Uzama**	**Son Uzama**	**Döngü Sayısı**	**Referans**
IntI1 integraz	94°C 5dk	94°C 1dk	57°C 1dk	72°C 1dk	72°C 10dk	34	Machado vd., 2005
IntI2 integraz	94°C 5dk	94°C 1dk	57°C 1dk	72°C 1dk	72°C 10dk	34	Machado vd., 2005
Sınıf 1 integron değişken bölge	94°C 2dk	94°C 30sn	56°C 45 sn	72°C 2dk	72°C 5dk	34	White, 2000
Sınıf 2 integron değişken bölge	94°C 3dk	94°C 45sn	55°C 1 dk	72°C 2dk	72°C 5dk	34	Lévesque vd., 1995
Metallobetalaktamazlar	94°C 10dk	94°C 30 sn	52°C 40 sn	72°C 50 sn	72°C 5dk	36	Poirel ve ark., 2011
lasR	95°C 2dk	94°C 1dk	60°C 1dk	72°C 2dk	72°C 10dk	30	Sabharwal, 2014
rhlR	95°C 2dk	95°C 40sn	60°C 1dk	72°C 2dk	72°C 10dk	30	Sabharwal, 2014

7.2.10. ERIC-PZR İle İzolatların Klonal İlişki Analizi

ERIC-PZR analizinde 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3' ERIC1R ve 5'- AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3' ERIC2 oligonükleotid primerleri kullanıldı (Versalovic vd., 1991). PZR karışımı 10 µl master mix (Thermo Scientific), birer µl primer, 1,5 µl $MgCl_2$, 2 µl kalıp DNA ve 3,5 µl deiyonize su ilave edilerek hazırlandı. PZR aşaması ilk denaturasyon 94 °C'de 1 dakika, denaturasyon 94 °C'de 30 saniye, bağlanma 52 °C'de 35 saniye, uzama 72 °C'de 4 dakika ve son uzama 72 °C'de 5 dakika olacak şekilde 30 döngüde gerçekleştirildi. PZR ürünleri 80 voltta 3 saat boyunca %1.5'luk agaroz jelde yürütüldü (Ardakani ve Ranjbar, 2016). DNA'ların bant profilleri jel dökümantasyon sisteminde (DNR Bio-Imaging System, İsrail) görüntülenerek değerlendirildi.

ERIC-PZR yöntemiyle elde edilen klinik izolatlara ait bant profilleri GelCompar II yazılım sistemi (version 6.5; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) kullanılarak genotipik analizi yapıldı. Bant analizleri için benzerlik hesaplarının yapılmasında Dice Korelasyon katsayısı ve kümeleşme analizi için de Unweighthed Pairvise Grouping Matematical Avenaging (matematiksel ortalamayla ağırlıksız çiftlerin gruplandırılması, UPGMA) yöntemi kullanıldı (optimizasyon 1.0, tolerans 1.0). Bant benzerlikleri %90'in üzerinde olan izolatlar aynı klonda kabul edildi (Menekşe ve ark., 2023).

8. BULGULAR

8.1. Bakteriyel İzolatların İzole Edildiği Klinik Örneklere Ait Bilgiler

Çalışılan 47 izolatın 23 tanesi (%48,9) servis, 15 tanesi (%31,9) poliklinik, dokuz tanesi (%19,2) yoğun bakım hastalarından izole edildi. Bu izolatların 16 (%34,0) balgam, 11 (%23,4) tanesi yara, 9 (%19,2) tanesi trakeal aspirat, 9 (%19,2) tanesi idrar, 1 (%2,1) tanesi bronkoalveolar lavaj, 1 (%2,1) tanesi dren sıvısı örneklerinden izole edildi. Bu çalışmaya dahil edilen izolatların klinik örnek türünün geldiği hastane ünitesine göre dağılımı Tablo 5' te gösterilmektedir.

Tablo 7. Klinik örnek türünün hastane ünitesine göre dağılımı

Örnek Türü	Poliklinik (Sayı/%)	Servis (Sayı/%)	Yoğun Bakım Ünitesi (Sayı/%)	Toplam (Sayı/%)
Balgam	6 (12,9)	8 (16,9)	2 (4,2)	16 (34,0)
Yara	2 (4,2)	7 (15)	2 (4,2)	11 (23,4)
TA	1 (2,1)	5 (10,7)	3 (6,4)	9 (19,2)
İdrar	6 (12,9)	2 (4,2)	1 (2,1)	9 (19,2)
BAL	0 (0)	1 (2,1)	0 (0)	1 (2,1)
Dren Sıvısı	0 (0)	1 (2,1)	0 (0)	1 (2,1)

TA: Trakeal Aspirat, BAL: Bronkoalveolar Lavaj

Klinik örneklerin gönderildiği birimlerin dağılımı Tablo 6' da gösterilmektedir.

Tablo 8. Klinik örneklerin gönderildiği birimlerin dağılımı

Birim	Poliklinik (Sayı/%)	Servis (Sayı/%)	Yoğun Bakım Ünitesi (Sayı/%)	Toplam (Sayı/%)
Acil	3 (6,4)	0 (0)	0 (0)	3 (6,4)
Cerrahi	0 (0)	0 (0)	1 (2,1)	1 (2,1)
Covid-19	0 (0)	0 (0)	2 (4,2)	2 (4,2)
Çocuk Cerrahi	0 (0)	1 (2,1)	2 (4,2)	3 (6,4)
Çocuk Nefroloji	1 (2,1)	0 (0)	0 (0)	1 (2,1)
Dermatoloji	1 (2,1)	1 (2,1)	0 (0)	2 (4,2)
Enfeksiyon Hastalıkları	2 (4,2)	1 (2,1)	0 (0)	3 (6,3)
Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	0 (0)	1 (2,1)	0 (0)	1 (2,1)
Gastroenteroloji	0 (0)	1 (2,1)	0 (0)	1 (2,1)
Genel Cerrahi	0 (0)	1 (2,1)	0 (0)	1 (2,1)
Girişimsel Radyoloji	1 (2,1)	0 (0)	0 (0)	1 (2,1)
Göğüs Cerrahi	0 (0)	1 (2,1)	0 (0)	1 (2,1)
Göğüs Hastalıkları	5 (10,7)	5 (10,7)	0 (0)	10 (21,4)
Hematoloji	0 (0)	1 (2,1)	0 (0)	1 (2,1)

Tablo 9 (Devam). Klinik örneklerin gönderildiği birimlerin dağılımı

Kalp-Damar	0 (0)	0 (0)	2 (4,2)	2 (4,2)
Kardiyoloji	0 (0)	0 (0)	1 (2,1)	1 (2,1)
Kulak Burun Boğaz	1 (2,1)	0 (0)	0 (0)	1 (2,1)
Onkoloji	0 (0)	1 (2,1)	0 (0)	1 (2,1)
Ortopedi	0 (0)	2 (4,2)	0 (0)	2 (4,2)
Palyatif Onkoloji	0 (0)	2 (4,2)	0 (0)	2 (4,2)
Plastik Cerrahi	0 (0)	4 (8,4)	0 (0)	4 (8,4)
Romatoloji	0 (0)	1 (2,1)	0 (0)	1 (2,1)
Üroloji	0 (0)	1 (2,1)	0 (0)	1 (2,1)
Yeni Doğan	0 (0)	0 (0)	1 (2,1)	1 (2,1)

8.2. Klinik İzolatların Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçları

Bu çalışmaya dahil edilen 47 izolatın antibiyotik duyarlılık test sonuçları Tablo 7' de gösterilmektedir.

Tablo 10. *Pseudomonas aeruginosa* klinik izolatların antibiyotik duyarlılık test sonuçları

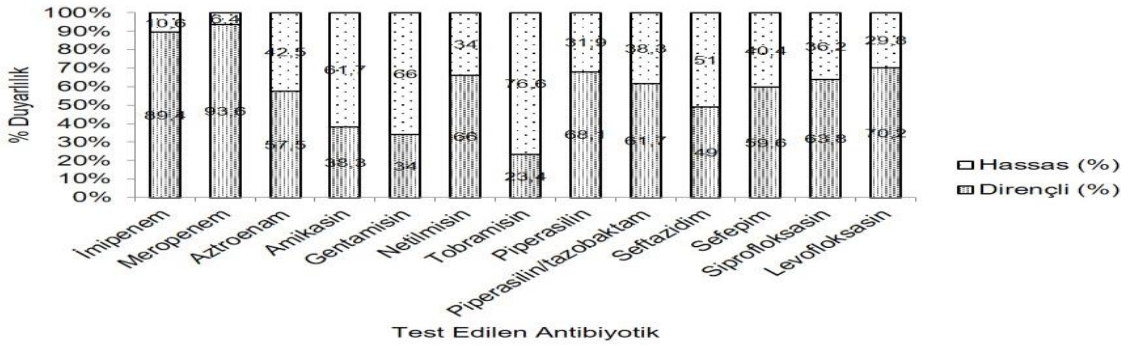
No	İzolat No	IMP	MEM	AMK	CN	NET	PIP	TZP	ATM	CAZ	CIP	FEP	LEV	TOB
1	KUP1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
2	KUP2	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
3	KUP3	R	R	S	R	R	S	S	R	S	S	S	R	S
4	KUP4	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
5	KUP5	R	R	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S
6	KUP6	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
7	KUP7	S	R	S	R	R	S	R	S	S	R	R	R	S
8	KUP9	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S
9	KUP10	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S
10	KUP11	R	R	S	S	R	R	S	S	S	R	S	R	S
11	KUP13	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S
12	KUP16	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S
13	KUP19	R	R	S	S	R	R	S	R	R	S	R	S	S
14	KUP20	S	R	S	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S
15	KUP21	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S
16	KUP22	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
17	KUP24	R	R	S	S	S	R	R	R	S	R	R	R	S
18	KUP27	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S
19	KUP29	R	R	S	S	S	R	R	R	R	S	R	S	S
20	KUP30	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
21	KUP31	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
22	KUP32	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S
23	KUP33	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R

Tablo 11 (Devam). *Pseudomonas aeruginosa* klinik izolatların antibiyotik duyarlılık test sonuçları

24	KUP34	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
25	KUP35	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
26	KUP36	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
27	KUP38	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S
28	KUP40	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
29	KUP41	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
30	KUP42	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
31	KUP43	R	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R
32	KUP44	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R
33	KUP47	S	R	S	R	R	R	S	R	S	R	S	R	R
34	KUP48	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	R	S
35	KUP49	R	R	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S
36	KUP50	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
37	KUP52	R	R	S	S	R	R	R	R	R	S	S	R	S
38	KUP53	R	R	S	S	S	R	R	R	R	S	R	S	S
39	KUP54	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S
40	KUP56	R	R	S	S	R	S	S	S	S	R	S	R	S
41	KUP57	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	S
42	KUP58	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R
43	KUP59	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
44	KUP63	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
45	KUP66	R	R	R	S	S	R	R	R	S	R	R	S	S
46	KUP68	R	S	S	R	S	R	S	S	R	R	S	R	S
47	KUP69	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

IMP: İmipenem, MEM: Meropenem, AK: Amikasin, CN: Gentamisin, NET: Netilmisin
PIP: Piperasillin, TZP: Piperasillin-Tazobaktam, ATM: Aztroenam, CAZ: Seftazidim
CIP: Sipfofloksasin, FEP: Sefepim, LEV: Levofloksasin, TOB: Tobramisin

Antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarına göre en yüksek direnç oranı meropenem (n=44, %93,6), imipenem (n=42, %89,4) ve levofloksasine (n=33, %70,2), en düşük direnç oranı tobramisin (n=11, %23,4), gentamisin (n= 16, %34,0) ve amikasine (n=18, %38,3) karşı tespit edildi (Şekil 1).

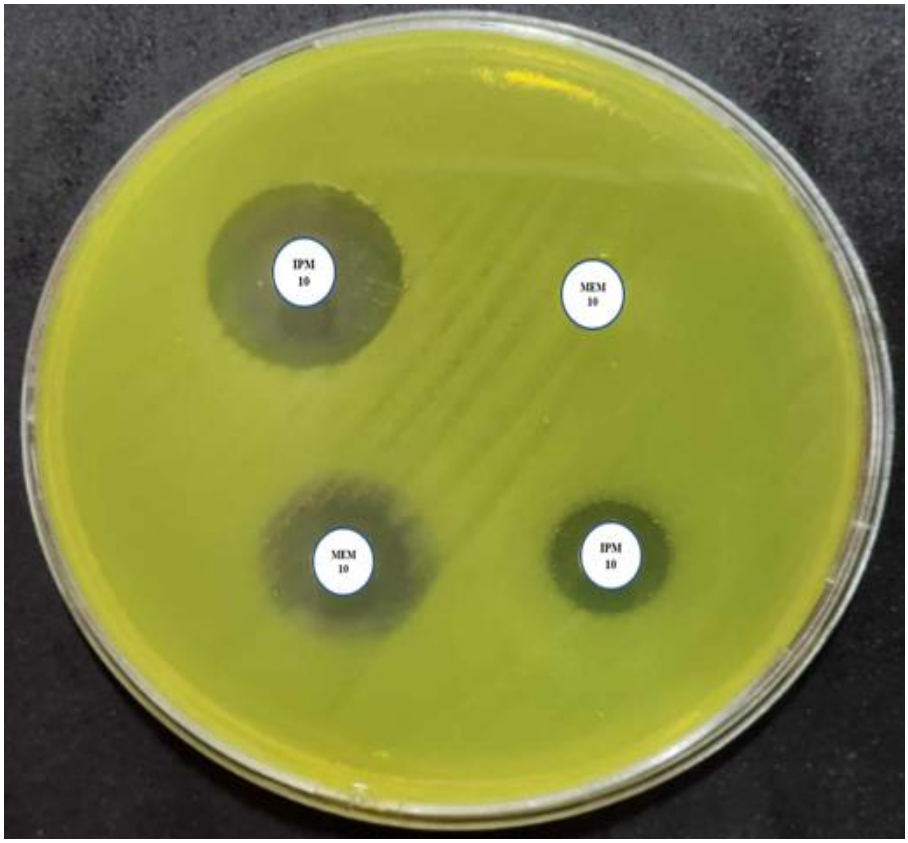


Şekil 1. Karbapenem dirençli *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının antibiyotiklere duyarlılık oranları

8.3. İmipenem-EDTA / Meropenem-EDTA Kombine Disk Yöntemi Sonuçları

Kırk yedi adet izolatın MBL aktivitesini belirleyebilmek için yapılan imipenem/meropenem-EDTA kombine disk yönteminde izolatların 25' inde (%53,2) fenotipik olarak MBL üretimi tespit edilmiştir.

İmipenem/meropenem-EDTA kombine disk yöntemi sonuçlarına ait orijinal plak görüntüsü Şekil 2' de gösterilmiştir.



Şekil 2. İmipenem/meropenem-EDTA kombine disk yöntemine ait plak görüntüsü (orijinal) (İmipenem ve meropenem diski ile imipenem/EDTA'lı meropenem/EDTA'lı diskler arasındaki zon çapları arasında 7 mm veya daha fazla fark bulunması MBL pozitif olarak kabul edildi).

8.4. Konjugasyon Deneyleri

Replika ekimler sonucunda 12 (%25,5) *P. aeruginosa* PU21 transkonjugantı belirlendi, 10^{-6} ile 10^{-2} arasında olmak üzere konjugasyon etkinlikleri hesaplandı.

Suşların konjugasyon etkinlikleri Tablo 8' de gösterilmiştir.

8.5. Transkonjugantların Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçları

Replika ekimler sonucunda 12 (%25,5) *P. aeruginosa* PU21 transkonjugantı belirlendi ve 10^{-6} ile 10^{-2} arasında olmak üzere konjugasyon etkinlikleri hesaplandı.

Transkonjugantların antibiyotik duyarlılık sonuçlarına göre ko-transfer edilen antibiyotik direnç paternleri Tablo 8' de gösterilmiştir.

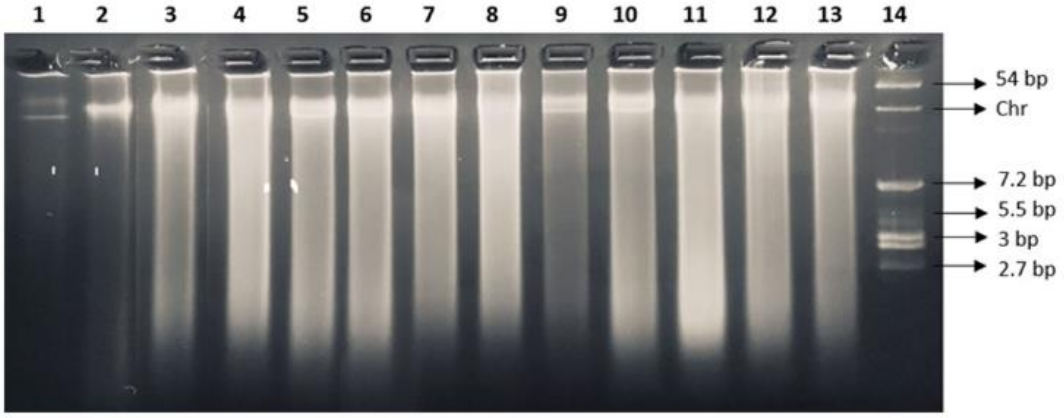
Tablo 12. Transkonjugantların direnç fenotipleri, ko-transfer edilen direnç ve konjugasyon etkinliği

***Pseudomonas* İzolatı**	**Direnç Fenotipi**	**PU21 Transkonjugantı**	**Ko-transfer Edilen Direnç**	**Konjugasyon Etkinliği**
KUP2	CAZ, TZP	PU21 (pKUP2)	-	$2,6x10^{-6}$
KUP3	CAZ, TZP	PU21 (pKUP3)	-	$3,2x10^{-5}$
KUP24	ATM, FEP, CAZ, LEV, TZP	PU21 (pKUP24)	ATM, FEP, LEV, TZP	$1,6x10^{-5}$
KUP32	FEP, CAZ, IMP, MEM	PU21 (pKUP32)	IMP, MEM	$3,3x10^{-5}$
KUP33	FEP, CAZ, LEV, TZP	PU21 (pKUP33)	-	$6,6x10^{-4}$
KUP38	FEP, CAZ, TZP	PU21 (pKUP38)	-	$3,3x10^{-2}$
KUP44	FEP, CAZ, TZP	PU21 (pKUP44)	FEP, TZP	$1,2x10^{-4}$
KUP48	FEP, CAZ, CIP, TZP	PU21 (pKUP48)	-	$2x10^{-3}$
KUP49	FEP, CAZ, CIP, NET, TZP	PU21 (pKUP49)	-	$7x10^{-6}$
KUP54	FEP, CAZ, TZP	PU21 (pKUP54)	FEP, CAZ, TZP	$1,5x10^{-4}$
KUP56	FEP, CAZ, CIP, LEV, TZP	PU21 (pKUP56)	CIP, LEV	$3,6x10^{-4}$
KUP66	FEP, CAZ, TZP	PU21 (pKUP66)	FEP, TZP	$8,3x10^{-2}$
PU21	PIP	-	-	

IMP: İmipenem, MEM: Meropenem, AK: Amikasin, CN: Gentamisin, NET: Netilmisin
PIP: Piperasillin, TZP: Piperasillin-Tazobaktam, ATM: Aztroenam, CAZ: Seftazidim
CIP: Sipfofloksasin, FEP: Sefepim, LEV: Levofloksasin, TOB: Tobramisin

8.6. Plazmit DNA'ların Agaroz Jel Elektroforezi

Transkonjugantlardan alkali lizis yöntemiyle elde edilen plazmit DNA preparat örneklerinin agaroz jel elektroforezi Şekil 3' te gösterilmiştir.

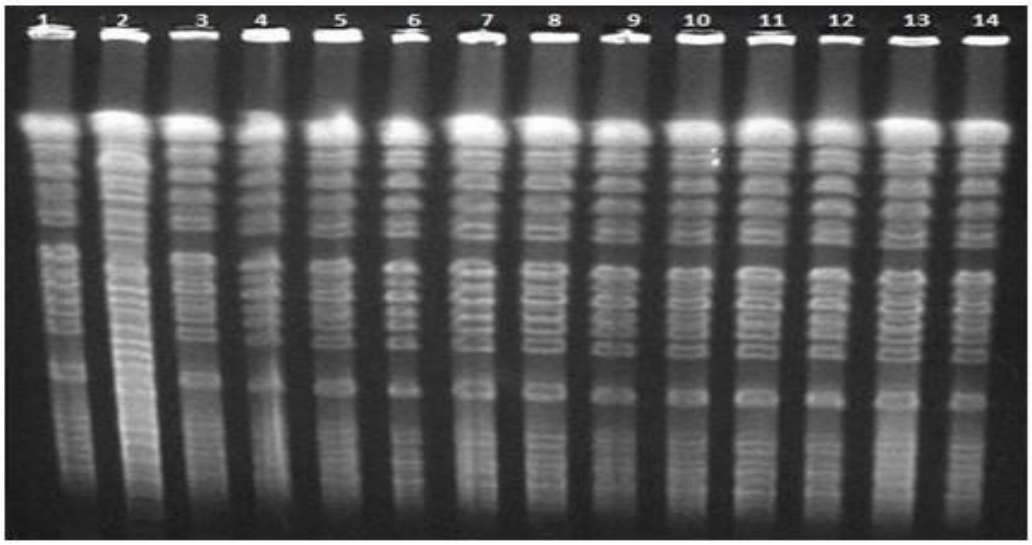


Şekil 3. Plazmit DNA preperatlarının agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü

1: PU21(pKUP2), 2: PU21(pKUP3), 3: PU21(pKUP24), 4: PU21(pKUP32), 5: PU21(pKUP33), 6: PU21(pKUP38), 7: PU21(pKUP44), 8: PU21(pKUP48), 9: PU21(pKUP49), 10: PU21(pKUP54), 11: PU21(pKUP56), 12: PU21(pKUP66), 13: PU21, 14: Plazmit moleküler marker (*E. coli* V517).

8.7. Transkonjugantların Pulsed Field Jel Elektroforezi Analizi

Fenotipik olarak replika ekimlerle (M9 minimal agarda üremeyen, seftazidim ve rifampisin plaklarında üreyen) gösterilen transkonjugantların PFGE analizi yapılarak bant profilleri değerlendirilmiş ve 12 transkonjugantın *P. aeruginosa* PU21 verici suşuyla aynı bant profiline sahip olduğu doğrulanmıştır (Şekil 4).



Şekil 4. *Pseudomonas aeruginosa* PU21 transkonjugantlarının PFGE görüntüsü. 1, *P. aeruginosa* PU21; 2, P. aeruginosa KUP2; 3, PU21 (pKUP2); 4, PU21 (pKUP3); 5, PU21 (pKUP2); 6, PU21 (pKUP24); 7, PU21 (pKUP32); 8, PU21 (pKUP33); 9, PU21 (pKUP44); 10, PU21 (pKUP48); 11, PU21 (pKUP49); 12, PU21 (pKUP54); 13, PU21 (pKUP56); 14, PU21 (pKUP66).

8.8. PZR Deneyleri

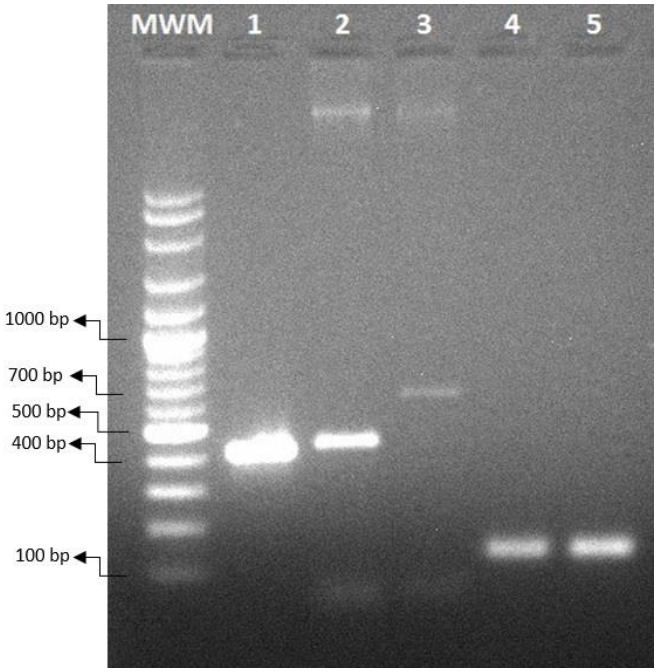
8.8.1. Biyofilm Genleri

Biyofilm genleri *lasR* ve *rhlR* genlerine spesifik PZR'larda suşların %90'nının pozitif oldukları belirlenmiştir (Tablo 9).

Biyofilm genlerine spesifik PZR ürünleri Şekil 5' te gösterilmiştir.

8.8.2. Karbapenemaz Genleri

PZR sonuçlarına göre altı suşta (%12,8) bla_{VIM} geni, beş suşta (%10,6) bla_{NDM} geni, üç suşta (%6,4) bla_{OXA-48} genine rastlanmıştır. bla_{KPC} ve bla_{IMP} genleri tespit edilememiştir. Konjugatif plazmit içeren suşların ikisi bla_{VIM} geni (%16,6) ,biri bla_{OXA-48} geni (%8,3), biri bla_{NDM} geni (%8,3) taşımaktadır. MBL genlerine rastlanan 11 suşun 3 tanesinde (%27,3) fenotipik olarak MBL üretimi gözlenmiştir. Bu 3 suşun 2' si bla_{VIM} geni, 1'i bla_{NDM} geni taşımaktadır. (Tablo 9). Tespit edilen karbapenemaz genlerine spesifik PZR ürünleri Şekil 5' te gösterilmiştir.

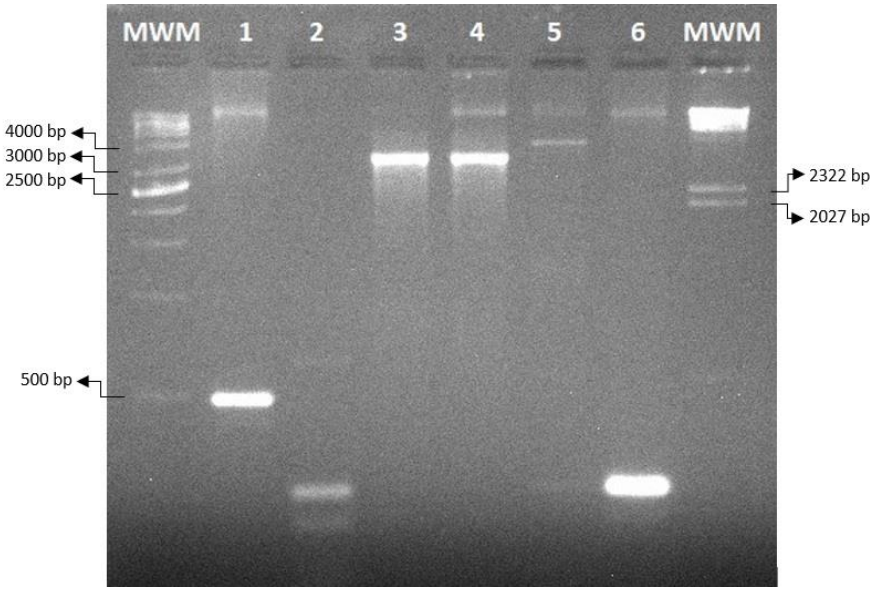


Şekil 5. Karbapenemaz ve biyofilm genlerine spesifik PZR ürünleri. MWM (Moleküler ağırlık standardı): 100bp DNA ladder (Vivantis), 1: *bla*$_{VIM}$ gen ürünü (390 bp), 2: *bla*$_{OXA-48}$ gen ürünü (438 bp), 3: *bla*$_{NDM}$ gen ürünü (621 bp), 4: *rhl* gen ürünü (133bp)), 5: *lasR* gen ürünü (130bp).

8.8.3. İntegronlar

PZR sonuçlarına göre 34 suşta (%72,3) *IntI1* integraz geni, 33 suşta (%70,2) sınıf-1 integron, konjugatif plazmit içeren suşların altı tanesinde (%50) *IntI1* integraz geni, altı tanesinde (%50) sınıf 1 integron gözlenmiştir. Suşlarda *IntI2* integraz 2 geni ve sınıf 2 integron varlığına rastlanmamıştır (Tablo 9).

IntI1 integraz geni ve bazı suşlardaki (KUP16, KUP30, KUP57 ve KUP69) sınıf 1 integronun değişken bölgesinin amplikonları (moleküler büyüklükleri yaklaşık 300 – 2700 bp) Şekil 6' da gösterilmiştir.



Şekil 6. *IntI1* integraz geni ve bazı seçilmiş sınıf 1 integronun değişken bölgesinin PZR gen ürünleri. MWM (Moleküler ağırlık standardı): VC 1kb DNA ladder (Vivantis), 1: *intI1* gen ürünü (bp), 2: Sınıf 1 integron değişken bölge (*E. coli* ACC172), 3: KUP16 sınıf 1 integronun değişken bölgesi, 4: KUP30 sınıf 1 integronun değişken bölgesi, 5: KUP57 sınıf 1 integronun değişken bölgesi, 6: KUP69 sınıf 1 integronun değişken bölgesi, MWM (Moleküler ağırlık standardı): VC Lambda/Hind III Marker (Vivantis).

Tablo 13. Karbapenem dirençli *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının epidemiyolojik özellikleri

Klinik İzolat	**Klinik Örnek**	**Hastane Ünitesi**	**İzolasyon Tarihi**	**Antibiyotik Direnç Paterni**	**MBL Test**	***lasR* / *rhlR***	***bla*$_{VIM}$**	***bla*$_{IMP}$**	***bla*$_{KPC}$**	***bla*$_{NDM}$**	***bla*$_{OXA-48}$**	***intI1* İntegraz Geni**	**İntegron Değişken Bölge**
KUP1	Balgam	Kalp-Damar YBÜ	4.11.2021	AMK, CN, ATM, FEP, CAZ, IMP, MEM, CIP, LEV, NET, PIP, TZP, TOB	+	+/+	-	-	-	-	-	+	Boş İntegron
KUP2	TA	Yeni Doğan YBÜ	20.12.2021	IMP, MEM, NET	+	+/+	-	-	-	-	-	+	Boş İntegron
KUP3	Balgam	Göğüs Hastalıkları Servisi	23.12.2021	IMP, MEM, CN, NET, ATM, LEV	+	-/-	-	-	-	-	-	+	Boş İntegron
KUP4	İdrar	Acil Polikliniği	22.12.2021	AMK, CN, ATM, FEP, CAZ, IMP, MEM, CIP, LEV, NET, PIP, TZP, TOB	+	+/+	-	-	-	-	-	-	-
KUP5	Yara	Covid-19 YBÜ	24.12.2021	IMP, MEM, NET	+	+/+	-	-	-	-	-	+	Boş İntegron
KUP6	Yara	Ortopedi Servisi	28.12.2021	AMK, CN, ATM, FEP, CAZ, IMP, MEM, CIP, LEV, NET, PIP, TZP, TOB	+	+/+	-	-	-	-	-	-	-

Tablo 14 (Devam). Karbapenem dirençli *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının epidemiyolojik özellikleri

KUP7	Yara	Enfeksiyon Hastalıkları Polikliniği	6.01.2022	FEP, CIP, MEM, LEV, NET, TZP, CN	+	+/+	+	-	-	-	-	+	+
KUP9	İdrar	Acil Polikliniği	30.01.2022	IMP, MEM, CIP, LEV, NET	-	-/+	+	-	-	-	-	+	Boş İntegron
KUP10	TA	Göğüs Hastalıkları Polikliniği	1.02.2022	AMK, ATM, FEP, CAZ, IMP, MEM, CIP, LEV, NET, PIP, TZP	+	+/+	-	-	-	-	-	+	+
KUP11	TA	Göğüs Hastalıkları Servisi	1.02.2022	CIP, IMP, MEM, LEV, NET, PIP	-	+/+	-	-	-	-	-	+	Boş İntegron
KUP13	Balgam	Covid-19 YBÜ	8.02.2022	ATM, FEP, CAZ, IMP, MEM, CIP, LEV, PIP, TZP	+	-/+	-	-	-	-	-	+	+
KUP16	Balgam	Onkoloji Servisi	11.02.2022	AMK, CN, FEP, MEM, CIP, TZP	+	-/+	-	-	-	-	+	+	+
KUP19	TA	Çocuk YBÜ	4.03.2022	ATM, FEP, CAZ, IMP, MEM, NET, PIP	+	+/+	-	-	-	-	-	+	+
KUP20	Balgam	Göğüs Hastalıkları Polikliniği	7.03.2022	ATM, FEP, CAZ, MEM, LEV, NET, PIP, TZP	-	+/+	+	-	-	-	-	+	+

Tablo 15 (Devam). Karbapenem dirençli *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının epidemiyolojik özellikleri

KUP21	BAL	Cerrahi YBÜ	7.03.2022	ATM,FEP,CAZ, MEM,CIP,LEV,PIP,TZP	-	+/+	-	-	-	-	+	+	+
KUP22	Balgam	Göğüs Hastalıkları Polikliniği	9.03.2022	MEM	-	+/+	-	-	-	-	-	+	Boş İntegron
KUP24	Balgam	Genel Cerrahi Servisi	18.03.2022	FEP, CIP, IMP, MEM, LEV, TZP, PIP, ATM	-	+/+	-	-	-	-	-	+	+
KUP27	TA	Göğüs Hastalıkları Servisi	27.03.2022	ATM, FEP, CAZ, IMP, MEM, CIP, LEV, NET, PIP, TZP	+	+/+	-	-	-	-	-	-	-
KUP29	Balgam	Plastik Cerrahi Servisi	5.04.2022	ATM, FEP, CAZ, IMP, MEM, PIP, TZP, TOB	+	+/+	-	-	-	-	-	+	+
KUP30	Balgam	Göğüs Cerrahi Servisi	8.04.2022	AMK, ATM, FEP, CAZ, IMP, MEM, CIP, LEV, NET, PIP, TZP, TOB	+	+/+	+	-	-	-	-	+	+
KUP31	Yara	Enfeksiyon Hastalıkları Servisi	8.04.2022	AMK, CN, ATM, FEP, CAZ, IMP, MEM, CIP, LEV, NET, PIP, TZP, TOB	+	-/+	-	-	-	-	-	+	+
KUP32	Balgam	Palyatif Onkoloji Servisi	9.04.2022	CIP, LEV, IMP, MEM	-	-/+	-	-	-	-	-	+	+

Tablo 16 (Devam). Karbapenem dirençli *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının epidemiyolojik özellikleri

KUP33	TA	Göğüs Hastalıkları Servisi	11.04.2022	IMP, MEM, NET, TOB	-	+/+	-	-	-	-	+	-	-
KUP34	Balgam	Göğüs Hatalıkları Polikliniği	11.04.2022	AMK, CN, ATM, FEP, CAZ, IMP, MEM, CIP, LEV, NET, PIP, TZP, TOB	+	+/+	-	-	-	-	-	+	+
KUP35	TA	Romatoloji Servisi	11.04.2022	IMP, MEM	+	+/+	-	-	-	-	-	+	Boş İntegron
KUP36	Yara	Enfeksiyon Hastalıkları Polikliniği	18.04.2022	AMK, CN, ATM, FEP, CAZ, IMP, MEM, CIP, LEV, NET, PIP, TZP, TOB	+	-/-	-	-	-	-	-	+	Boş İntegron
KUP38	Balgam	Dermatoloji Polikliniği	18.04.2022	CIP, IMP, LEV	+	+/+	-	-	-	-	-	+	Boş İntegron
KUP40	Balgam	Göğüs Hastalıkları Servisi	25.04.2022	IMP, MEM, TOB	-	+/+	-	-	-	-	-	-	-
KUP41	Yara	Kardiyoloji YBÜ	17.05.2022	AMK, CN, ATM, FEP, CAZ, IMP, MEM, CIP, LEV, NET, PIP, TZP, TOB	-	-/-	-	-	-	+	-	+	+
KUP42	İdrar	Acil Polikliniği	21.05.2022	IMP, MEM, NET	-	+/+	-	-	-	+	-	-	-

Tablo 17 (Devam). Karbapenem dirençli *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının epidemiyolojik özellikleri

KUP43	Balgam	Acil Polikliniği	24.05.2022	AMK, IMP, MEM, NET	-	+/+	-	-	-	-	-	+	+
KUP44	İdrar	Girişimsel Radyoloji Polikliniği	30.05.2022	CN ,FEP, CIP, IMP, LEV, NET, TZP, PIP, TOB, MEM, AMK	+	+/+	-	-	-	-	-	+	+
KUP47	Balgam	Hematoloji Servisi	1.06.2022	CN, ATM, MEM, CIP, LEV, NET, PIP, TOB	-	+/+	-	-	-	+	-	+	+
KUP48	TA	Çocuk YBÜ	8.06.2022	IMP, MEM, AMK, NET, PIP, LEV	-	+/+	-	-	-	+	-	-	-
KUP49	TA	Çocuk Cerrahi Servisi	7.06.2022	IMP, MEM, PIP, TZP	-	+/+	-	-	-	-	-	+	Boş İntegron
KUP50	Yara	Plastik Cerrahi Servisi	18.06.2022	AMK,CN, ATM,FEP,CAZ,IMP,MEM,CIP,LEV,NET,PIP,TZP,TOB	-	-/-	-	-	-	-	-	+	+
KUP52	TA	Kulak Burun Boğaz Polikliniği	20.06.2022	AMK, TE, ATM, FEP, CAZ, IMP, MEM, CIP, LEV, NET, PIP, TZP, TOB	-	+/+	-	-	-	-	-	+	+
KUP53	İdrar	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Servisi	14.06.2022	CAZ, IMP, MEM,TZP	+	-/-	-	-	-	-	-	+	Boş İntegron
KUP54	Dren Sıvısı	Ortopedi Servisi	20.06.2022	IMP, MEM, PIP, TZP, ATM,CAZ,CIP,FEP,LEV	-	+/+	+	-	-	-	-	+	Boş İntegron

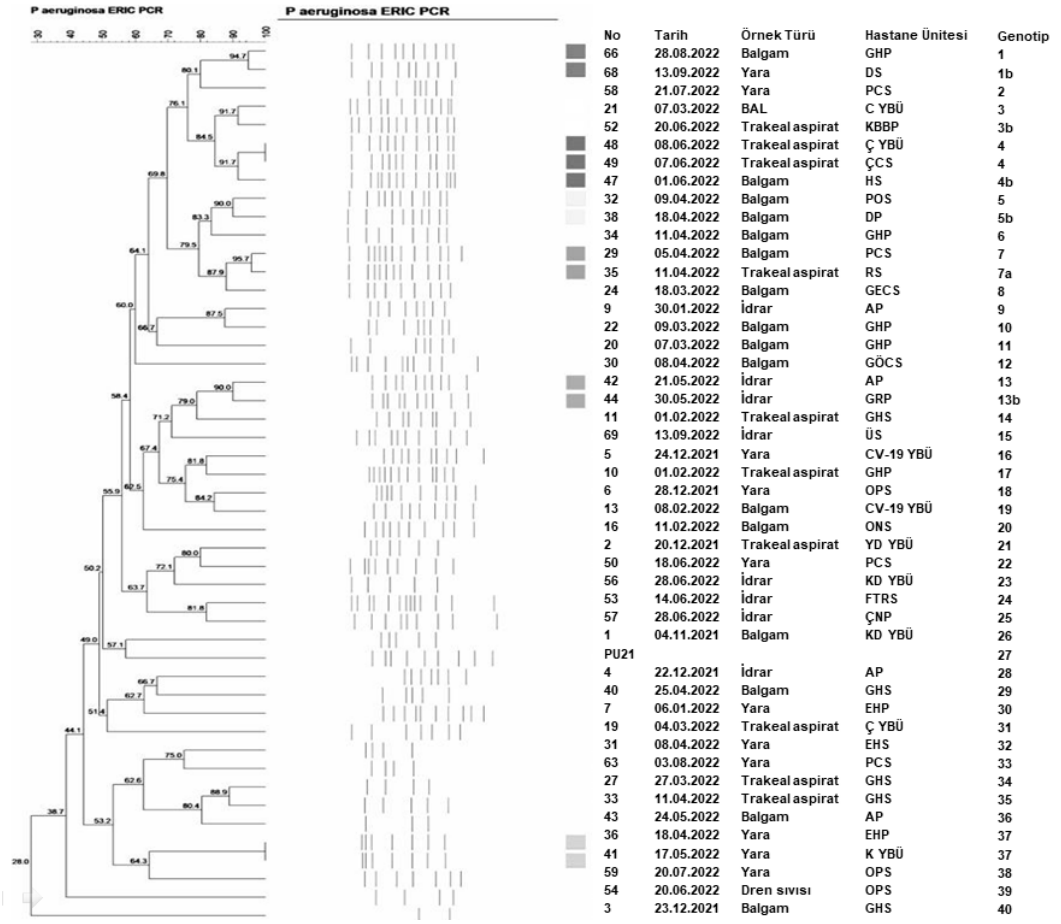
Tablo 18 (Devam). Karbapenem dirençli *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının epidemiyolojik özellikleri

KUP56	İdrar	Kalp-Damar YBÜ	28.06.2022	NET, IMP, MEM, CIP, LEV	-	+/+	+	-	-	-	-	+	Boş İntegron
KUP57	İdrar	Çocuk Nefroloji Polikliniği	28.06.2022	AMK, CN, CAZ, IMP, MEM, CIP, LEV, NET, PIP, TZP, TOB	+	+/+	-	-	-	+	-	+	+
KUP58	Yara	Plastik Cerrahi Servisi	21.07.2022	ATM, FEP, CAZ, IMP, MEM, CIP, LEV, PIP, TZP	-	+/+	-	-	-	-	-	+	+
KUP59	Yara	Ortopedi Servisi	20.07.2022	AMK, CN, ATM, FEP, CAZ,IMP, MEM, CIP, LEV, NET, PIP, TZP, TOB	+	-/-	-	-	-	-	-	+	Boş İntegron
KUP63	Yara	Plastik Cerrahi Servisi	3.08.2022	IMP, NET	+	+/+	-	-	-	-	-	-	-
KUP66	Balgam	Göğüs Hastalıkları Polikliniği	28.08.2022	FEP, IMP, MEM, AMK, TZP, PIP, ATM, CIP	-	-/-	-	-	-	-	-	+	+
KUP68	Yara	Dermatoloji Servisi	13.09.2022	CAZ	+	-/-	-	-	-	-	-	+	+
KUP69	İdrar	Üroloji Servisi	13.09.2022	AMK, CN, ATM, FEP ,CAZ, IMP, MEM, CIP ,TZP	+	+/+	-	-	-	-	-	+	+

IMP: İmipenem, MEM: Meropenem, AK: Amikasin, CN: Gentamisin, NET: Netilmisin PIP: Piperasillin, TZP: Piperasillin-Tazobaktam, ATM: Aztroenam, CAZ: Seftazidim, CIP: Sipfofloksasin, FEP: Sefepim, LEV: Levofloksasin, TOB: To

8.9. ERIC- PZR ile İzolatların Klonal İlişki Analizi

Toplam 47 *P. aeruginosa* izolatı arasında 40 farklı genotip tespit edilmiş olup kümeleşme gösteren izolatlar 7 farklı küme içerisinde toplanmıştır (tolerans 1.0, optimizasyon 1.0, cutoff %90). 47 *P. aeruginosa* izolatının 15'i herhangi bir küme içerisinde yer almakta olup, kümeleşme oranı %31,91 bulunmuştur. En büyük küme 3 izolatın yer aldığı genotip 4 kümesi, ikinci en büyük kümeleri ikişer izolatın yer aldığı genotip 1, 3, 5, 7, 13 ve 37 kümeleri olmuştur (Şekil 7).



No	Tarih	Örnek Türü	Hastane Ünitesi	Genotip
66	28.08.2022	Balgam	GHP	1
68	13.09.2022	Yara	DS	1b
58	21.07.2022	Yara	PCS	2
21	07.03.2022	BAL	C YBÜ	3
52	20.06.2022	Trakeal aspirat	KBBP	3b
48	08.06.2022	Trakeal aspirat	Ç YBÜ	4
49	07.06.2022	Trakeal aspirat	ÇCS	4
47	01.06.2022	Balgam	HS	4b
32	09.04.2022	Balgam	POS	5
38	18.04.2022	Balgam	DP	5b
34	11.04.2022	Balgam	GHP	6
29	05.04.2022	Balgam	PCS	7
35	11.04.2022	Trakeal aspirat	RS	7a
24	18.03.2022	Balgam	GECS	8
9	30.01.2022	İdrar	AP	9
22	09.03.2022	Balgam	GHP	10
20	07.03.2022	Balgam	GHP	11
30	08.04.2022	Balgam	GÖCS	12
42	21.05.2022	İdrar	AP	13
44	30.05.2022	İdrar	GRP	13b
11	01.02.2022	Trakeal aspirat	GHS	14
69	13.09.2022	İdrar	ÜS	15
5	24.12.2021	Yara	CV-19 YBÜ	16
10	01.02.2022	Trakeal aspirat	GHP	17
6	28.12.2021	Yara	OPS	18
13	08.02.2022	Balgam	CV-19 YBÜ	19
16	11.02.2022	Balgam	ONS	20
2	20.12.2021	Trakeal aspirat	YD YBÜ	21
50	18.06.2022	Yara	PCS	22
56	28.06.2022	İdrar	KD YBÜ	23
53	14.06.2022	İdrar	FTRS	24
57	28.06.2022	İdrar	ÇNP	25
1	04.11.2021	Balgam	KD YBÜ	26
PU21				27
4	22.12.2021	İdrar	AP	28
40	25.04.2022	Balgam	GHS	29
7	06.01.2022	Yara	EHP	30
19	04.03.2022	Trakeal aspirat	Ç YBÜ	31
31	08.04.2022	Yara	EHS	32
63	03.08.2022	Yara	PCS	33
27	27.03.2022	Trakeal aspirat	GHS	34
33	11.04.2022	Trakeal aspirat	GHS	35
43	24.05.2022	Balgam	AP	36
36	18.04.2022	Yara	EHP	37
41	17.05.2022	Yara	K YBÜ	37
59	20.07.2022	Yara	OPS	38
54	20.06.2022	Dren sıvısı	OPS	39
3	23.12.2021	Balgam	GHS	40

Şekil 7. Karbapenem dirençli 47 *Pseudomonas aeruginosa* KUP izolatlarının ERIC-PZR paternlerinin dendogram analizi ve epidemiyolojik verileri. BAL: Bronkoalveolar Lavaj; GHP: Göğüs Hastalıkları Polikliniği; DS: Dermatoloji Servisi; PCS: Plastik Cerrahi Servisi; C YBÜ: Cerrahi YBÜ; KBBP: Kulak Burun Boğaz Polikliniği; ÇYBÜ: Çocuk Yoğun Bakım Ünitesi; ÇCS: Çocuk Cerrahi Servisi; HS: Hematoloji Servisi; POS: Palyatif Onkoloji Servisi; DP: Dermatoloji Polikliniği; PCS: Plastik Cerrahi Servisi; RS: Romatoloji Servisi; GECS: Genel Cerrahi Servisi; AP: Acil Polikliniği; GÖCS: Göğüs Cerrahi Servisi; GRP: Girişimsel Radyoloji Polikliniği; GHS: Göğüs Hastalıkları Servisi; ÜS: Üroloji Servisi; CV-19 YBÜ: Covid-19 Yoğun Bakım Ünitesi; OPS: Ortopedi Servisi; ONS: Onkoloji Servisi; YD YBÜ: Yeni Doğan Yoğun Bakım Ünitesi; KD YBÜ: Kalp-

Damar Yoğun Bakım Ünitesi; FTRS: Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Servisi; ÇNP: Çocuk Nefroloji Polikliniği; EHP: Enfeksiyon Hastalıkları Polikliniği; Ç YBÜ: Çocuk Yoğun Bakım Ünitesi; EHS: Enfeksiyon Hastalıkları Servisi; K YBÜ: Kardiyoloji Yoğun Bakım Ünitesi.

Moleküler epidemiyolojik veriler açısından incelendiğinde izolatlar arasında heterojen dağılım gözlenmiş ve baskın bir salgın klonu tespit edilmemiştir.

9. TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER

9.1. Tartışma

Bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antibiyotiklere karşı gelişen dirence antibiyotiklerin uygunsuz kullanımı neden olmaktadır. Bu durum küresel bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir. *Pseudomonas aeruginosa* fırsatçı bir patojen olup özellikle bağışıklığı baskılanmış hastalarda gözlenen en önemli enfeksiyon etkenidir. CDC' ye göre *P. aeruginosa* çok ilaca dirençli olması nedeniyle ciddi tehditler kategorisinde yer almaktadır (CDC, 2013).

Dünya çapında yapılan çalışmalarda; 12 ülkeden 3 yılda toplanan klinik örneklerden izole edilen *P. aeruginosa* suşu ile ilgili yapılan çok merkezli bir çalışmada yoğun bakım ünitelerinden %49 ve servislerden %51 (Gill vd., 2022); iki merkezli bir çalışmada yoğun bakım ünitelerinden %33,7 ve servislerden %66,3 oranında *P. aeruginosa* suşu izole edilmiştir (Zhao vd., 2023). Ülkemizde yapılan bir çalışmada dört yıllık süreçte toplanan klinik örneklerden izole edilen *P. aeruginosa* izolatı oranı yoğun bakım ünitelerinde %37 ve servislerde %63 olarak belirlenmiştir (Mirza ve İnce Ceviz, 2022). Bu tez çalışmasında yoğun bakım ünitelerinden %19,2, servislerden %48,9 ve polikliniklerden %31,9 oranında *P. aeruginosa* izole edilmiştir.

Türkiyede yapılan bir çalışmada 92 adet *P. aeruginosa* suşunun 40'ı (%43,5) trakeal aspirat, 19'u (%20,6) kan, 10'u (%10,9) yara, 7'si (%7,6) bronkoalveolar lavaj, 6'sı (%6,5) idrar, 5'i (%5,4) balgam, 2'si (%2,2) doku biyopsisi, 2'si (%2,2) dren sıvısı, 1'i (%1,1) kateter örneklerinden izole edilmiştir (Mirza ve İnce Ceviz, 2022). Bu tez çalışmasında 47 adet *P. aeruginosa* suşunun 16'sı (%34) balgam, 11'i (%23,4) yara, 9'u (%19,2) trakeal aspirat, 9'u (%19,2) idrar, 1'i (%2,1) bronkoalveolar lavaj, 1'i (%2,1) dren sıvısı örenklerinden izole edilmiştir. *P. aeruginosa* suşlarının izole edildiği örnek dağılımları açısından yapılan çalışma ile bu tez çalışması arasında benzerlikler bulunmaktadır.

Brezilya' da bir devlet hastanesinin yoğun bakım ünitesinde yatan hastalardan izole edilen 28 adet KDPA suşu ile yapılan antimikrobiyal duyarlılık testi sonuçlarına göre izolatların direnç oranları ATM %75, CN %68, CAZ %60, FEP %71, PIP %71, CIP %71, AMK %53, LEV %68 olarak belirlenmiştir. Karbapenemaz üretimi, Brezilya'da klinik *P. aeruginosa* izolatları arasında

karbapenem direncinin ana mekanizması olarak ortaya çıkmıştır. Karbapenemaz üreten *P. aeruginosa'* da direnç genlerinin oluşumunda anlamlı ilişki olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte, düşük seviyede KPC üreten *P. aeruginosa* izolatlarında meydana gelen direncin evriminde OprD kaybının rol oynayabileceği düşünülmüştür. PZR analizi sonucunda KDPA izolatlarında OprD porin genine rastlanmamış çok düşük seviyelerde üretildiği fikrine varılmıştır. OprD porin proteinlerinde meydana gelen amino asit delesyonları ve buna bağlı sekans değişikliklerinin karbapenem direncine yol açtığı düşünülmektedir (Souza vd., 2021).

Çin' de üçüncü basamak bir hastanede 2018-2020 yılları arasında yatan yaşlı hastalardan izole edilen 155 adet KDPA suşu ile yapılan antimikrobiyal duyarlılık testi sonuçlarına göre izolatların direnç oranları ATM %36,1, CN % 28,4, CAZ %27,7, FEP %23,2, PIP %29, CIP %51, AMK %17,4, LEV %48,4, TOB %27,1, AK %17,4, TZP %20 olarak belirlenmiştir (Qin vd., 2022b).

Ülkemizde 92 adet KDPA suşu ile yapılan antimikrobiyal duyarlılık testi sonuçlarına göre izolatların direnç oranları ATM %39,1, CN % 8,7, CAZ %28,3, CIP %70,7, AMK %17,4, LEV %80,6, TOB %27,1, TZP %43,5 olarak belirlenmiştir. Karbapenem dirençli izolatların en dirençli olduğu antibiyotik LEV %80,6 olarak bulunmuştur (Mirza ve İnce Ceviz, 2022).

Bu tez çalışmasındaki 47 izolatın antibiyotik duyarlılıkları değerlendirildiğinde ATM %47,8, CN % 34, CAZ %47,8, FEP %55,5, PIP %63,4, CIP %63, LEV %70,7, TOB %28,2, AMK %39,1, TZP %59,1, NET %68,3 olarak belirlenmiştir. İzolatların tamamı karbapenemlere dirençlidir. Bu çalışmadaki direnç oranının diğer çalışmalara oranla yüksek olmasının nedeni seçilen izolat kümesinin %67,3' lük kısmının yoğun bakım ve serviste yatan hastalara ait örneklerden izole edilmiş olması ve direncin diğer ülkelere göre daha fazla görülmesinin nedeni de ülkemizde hastane başvurusunun fazla olması ve amprik antibiyotik tedavinin sıklıkla uygulanması olabilir.

Yapılan çalışmalarda genellikle izolatların karbapenem direnç genleri moleküler yöntemlerle araştırılırken aynı zamanda izolatların karbapenemaz üretimini belirleyebilmek için çeşitli fenotipik yöntemler uygulanmıştır. Bu çalışmada da izolatların MBL aktivitesini belirleyebilmek için imipenem/meropenem-EDTA kombine disk yöntemi uygulanmıştır. İzolatların 25'

inde (%53,2) fenotipik olarak MBL üretimi tespit edilmiştir. Bu bulgu El-Mahdy ve ark.' nın (2019) yaptığı çalışma sonuçları ile uyumluluk göstermektedir. MBL genlerine rastlanan 11 suşun 3 tanesinde (%27,3) imipenem/meropenem-EDTA kombine disk yöntemi ile MBL üretimi gözlenmiştir. Fenotipik olarak MBL üretiminin pozitif saptandığı suşlarda herhangi bir direnç genine rastlanmamış olmasının nedeni AmpC ekspresyonu gibi diğer direnç mekanizmalarının ve C sınıfı beta-laktamazların varlığının genotipik olarak araştırılmamasından kaynaklanmış olabilmektedir (Muderris vd., 2008). Ayrıca E-test ve imipenem-EDTA disk yöntemlerinde meydana gelen pozitifliğin, MBL enzimindeki çinko iyonlarının EDTA ile şelasyon yaparak MBL aktivitesinin etkisiz hale getirilmesinden çok mikroorganizmaların EDTA'ya duyarlılıkları nedeniyle oluştuğuna dair görüşler bildirilmiştir. EDTA bakteriyel hücre duvarı geçirgenliğini arttırabilme özelliğine sahiptir ve buna bağlı olarak *P. aeruginosa*' nın Opr D ekspresyonununda azalmaya neden olmaktadır. Bu nedenlere bağlı olarak MBL aktivitesinin fenotipik olarak araştırılmasında kombine disk yönteminin yanlış pozitif sonuçlara neden olabileceği vurgulanmıştır (Chu vd., 2005).

Karbapenem direncinin yayılmasında önemli mobil genetik elemanlardan olan plazmitler konjugasyon yoluyla direnç genlerinin aktarımında kilit rol oynamaktadır. Plazmit aracılı karbapenemaz genlerinin, farklı suşlar ve türler arasında hızla yayılma potansiyeli oldukça riskli bir durum teşkil etmektedir. *P. aeruginosa'da* karbapenemaz kodlayan genleri taşıyan plazmitler farklı uyumsuzluk gruplarında yer almaktadır. IncP' nin bilinen 13 uyumsuzluk tipi arasında IncP-2 tipi plazmitler *P. aeruginosa*'da sıklıkla tanımlanmaktadır. Bu plazmitin karbapenemazlardan $bla_{\text{VIM-1}}$ ve $bla_{\text{IMP–45}}$ genlerini taşıdığı bildirilmiştir (Hu vd., 2019). Colombia ve Çin' de yapılan çalışmalar sonucunda IncP-6 ve IncU plazmitlerinin $bla_{\text{KPC–2}}$ genini taşıdığı bildirilmiştir (Naas vd., 2013; Dai vd., 2016).

Çin'de yapılan bir çalışmada yedi hastaneden toplam 374 KDPA klinik izolatı toplanmış ve PZR sonuçlarına göre izolatların 151' inde (%40,4) bla_{KPC} geni pozitif bulunmuştur. Plazmit tabanlı yöntemlerle sınıflandırma yapılmış ve bu izolatlarda 8 plazmit tipi tanımlanmıştır. Beş plazmitin bla_{KPC} geni kodladığı belirlenmiştir. Araştırmacılar daha önce yapılan çalışmalardan yola çıkarak *P. aeruginosa*' daki $bla_{\text{KPC-2}}$ geninin *K. pneumoniae*' den köken aldığını ve *P. aeruginosa*'ya gen

transferinin mobil genetik elemanlardan özellikle konjugatif plazmitlerle aktarıldığını düşünmektedir (Zhu vd., 2021).

Naas ve ark.'nın yaptığı konjugasyon deneyleri ve PZR sonuçlarına göre çok ilaca dirençli *P. aeruginosa* izolatlarında bla_{KPC-2} genini taşıyan iki plazmitin varlığı ortaya konmuştur. Yapılan plazmit sınıflandırmasında plazmitlerden birinin IncP-6 diğerinin IncU uyumsuzluk gubuna ait olduğu belirlenmiştir (Naas vd., 2013).

Paul ve ark.' nın yaptığı çalışmada bla_{NDM-1} veya bla_{VIM-2} barındıran dört *P. aeruginosa* izolatının konjugasyon deneyleri yapılmıştır. Plazmit izolasyonu ve PZR sonuçlarına göre; bla_{NDM} geninin yaklaşık 40 kb ve bla_{VIM} geninin 55 kb büyüklüğünde konjugatif bir IncF plazmiti üzerinde taşındığı tespit edilmiştir. Bu plazmitler üzerinde taşınan konjugatif olarak aktarılabilen MBL genlerinin oldukça kararlı olduğu belirlenmiştir (Paul vd., 2020).

Bu tez çalışmasında çalışmada transkonjugantların plazmit DNA izolasyon preparatlarının agaroz jel elektroforezinde konjugatif plazmit bantları açıkça gözlenememiştir (PU21 [pKUP2 hariç]). Bu durum büyük moleküler ağırlıklı konjugatif plazmit DNA'ların (≥200 kbp) izolasyon prosedürü sırasında kromozomal DNA ile birlikte denatüre olarak kaybedilmesinden kaynaklanabilir. Bu yüzden, antibiyotik duyarlılıkları açısından farklılık gösteren transkonjugantların genotipik açıdan *P. aeruginosa* PU21 transkonjugantları olduğunun doğrulanması için bakteriyel tiplendirmede altın standart olan PFGE yöntemi kullanılmıştır (Neoh vd., 2019). Jeldeki transkonjugant bant paternlerinin PU21 ile aynı, klinik izolatınkinden (KUP2) farklı olduğu açıkça görülmektedir (Şekil 4).

Virulans faktörlerini ve biyofilm oluşumunu yöneten QS sistemlerine sahip bakteriler tedavide kullanılan karbapenemler ve yeni nesil antibiyotiklere karşı daha dirençlidir (Ahmed vd., 2020). *Pseudomonas aeruginosa'nın* antibiyotik direnç mekanizmalarına ek olarak biyofilm üretebilmesi ve konakçı immun sistemden kaçabilme yeteneği neden olduğu enfeksiyonların tedavisini güçleştirmektedir. Bakteriler hücreler arası iletişimi sağlamak için küçük sinyal moleküllerini (otoindükleyiciler, AI'ler) salgılamaktadır. Bu iletişim sistemi çekirdek algılama (QS) olarak adlandırılır. Her sistem *las* ve *rhl* genleri tarafından düzenlenir: AI sentezi (*lasI* ve *rhlI* genleri) ve bunların aynı kökenli transkripsiyonel aktive edici proteini (*lasR* ve *rhIR*). *P. aeruginosa*'nın elastaz (*lasB*), toksin A (*toxA*) ve

alkalin proteaz (*aprA*) gibi bazı virülans faktörülerini kodlayan genler , *las* ve *rhl* sentez genleri (*lasI / lasR* ve *rhlI / rhlR*) tarafından yönetilir (Başkan vd., 2022).

Güney Hindistan'da üçüncü basamak bir hastanede yatan hastalardan toplanan 156 adet yüksek düzeyde karbapenem dirençli *P.aeruginosa* izolatı çalışmaya dahil edilerek çoklu ilaç direnç mekanizmaları ve çeşitli virülans genleri araştırılmıştır. İzolatların %23,1' inde bla_{VIM}, %17,3' ünde bla_{NDM-1}, %1,3' ünde bla_{IMP} genlerine rastlanmıştır. bla_{VIM} ve bla_{NDM-1} genlerini birlikte bulunduran izolatların oranı %7,1 olarak saptanmıştır. İzolatlarının %84' ünde *rhlR* va *lasR* %81' inde *lasR* genlerine rastlanmıştır. Araştırmacılar karbapenem dirençli izolatlarda virülans genleri ile birlikte çoklu antimikrobiyal direnç mekanizmalarının bir arada bulunması endişe verici bir tehdit haline geldiği kanısına varmışlardır (Ellappan vd., 2018).

Başkan ve ark.' nın yaptığı bir çalışmada 52 KDPA çalışmaya dahil edilmiş ve izolatlar iki QS sistem geni (*lasI/R* ve *rhIl/R*) , dört virülans geni (*algD, lasB, toxA, aprA*) , biyofilm üretimi ve sınıf 1 integron varlığı açısından araştırılmıştır. Araştırma sonuçlarına göre, 51 izolatta (%98,1) iki QS sistem geni saptanmış ve 41 izolatta (%78,8) iki QS sistem geninin (*lasI/R* ve *rhIl/R* genleri) birlikte var olduğu saptanmıştır. İki QS sistem genlerinin varlığı karşılaştırıldığında, *las* sistem genlerinin yüzdesi (%98,1), *rhl* sistem genlerininkinden (%90.4) daha yüksek oranda bulunmuştur. İki QS sistem geni arasında istatistiksel olarak pozitif bir korelasyon saptanmıştır ($p < .10$). Las-rhl sistemleri, dört virülans geni ve slime üretimi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir pozitif korelasyon olduğu gözlenmiştir. İzolatların 27' sinde (%51,9) sınıf 1 integron varlığına rastlanmış ve biyofilm oluşumunun sınıf 1 integron barındıran KDPA izolatlarında daha yaygın olduğu gözlenmiştir. Tüm bu bulgular neticesinde KDPA izolatlarının oldukça virülent olduğu ve QS sistemlerinin patogeneze önemli katkı sağladığı kanısına varılmıştır (Başkan vd., 2022).

Mısır' da yapılan başka bir çalışmada 80 izolatın virülans faktörleri ve QS genleri (*las* ve *rhlR*) taranmıştır. Tüm izolatlarda *lasR* ve *rhlR* genleri tespit edilmiştir. Bu çalışmadaki verilere göre QS genleri ile karbapenem direnci arasında önemli bir korelasyon bulunamamıştır (El-Mahdy vd., 2019).

Bu tez çalışmasında 47 izolatta QS genleri (*lasR* ve *rhlR*) taranmıştır. İzolatların 34' ünde (%72,3) *lasR*, 39'unda (%83) *rhlR* genlerinin pozitif olduğu saptanmıştır. Karbapenemaz genlerinin tespit edildiği 14 izolatın 13' ünde (%93) QS genlerine rastlanmıştır. Sınıf-1 integron varlığı gözlenen 33 izolatın 27' sinde (81,8) QS genleri mevcuttur. Bu bulgulara göre karbapenemaz genlerine, sınıf-1 integronlara ve QS genlerine sahip olan izolatların antibiyotik direncinin gelişimindeki etkinliğinin çoklu direnç mekanizmalarından dolayı oldukça güçlü olduğu ve bu durumun enfeksiyon hastalıklarının seyrinde ve patogenezinde önemli derecede rol oynadığı düşünülebilir. Sekiz izolatta *lasR* ve *rhlR* genlerinin varlığına rastlanmamış olması virülans genlerinin farklı QS sistemleri tarafından kontrol edilebileceğini düşündürmektedir. Virülans çalışmalarına katkı sağlamak amacıyla mevcut QS genleri ile ilgili daha çok çalışmaya ihtiyaç olmakla birlikte *P. aeruginosa*' nın mükemmel evrimsel yeteneğine bağlı olarak gelişen çevresel adaptasyon sürecinde henüz tespit edilememiş ve tanımlanamamış QS sistemlerini de barındırabileceği ihtimali göz önünde bulundurulmalıdır. Antibiyotik direnci ve virülans genleri arasındaki bilişki belirsizliğini korumakta ve buna bağlı olarak daha fazla araştırma ve çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Karbapenemazlar ilk olarak 1990'lı yıllarda Avrupa'da keşfedilmiştir ve günümüzde yüksek oranda tespit edilmektedir. Genellikle plazmit aracılı aktarılan karbapenemazlardan sıklıkla bla_{KPC}, bla_{VIM}, bla_{IPM}, bla_{NDM} ve bla_{OXA-48} tipleri bildirilmektedir (Nasser vd., 2020; Cantón vd., 2012). Bu enzimler özellikle *Enterobacterales* üyeleri, *P. aeruginosa* ve *A.baumannii*'de tanımlanmıştır. Karbapenem direçli *P.aeruginosa* izolatlarının yayılımını önlemek için için karbapenemaz enzimini kodlayan genlerin moleküler yöntemlerle taranmsı kritik bir öneme sahiptir (Vallabhaneni vd., 2021).

McCracken ve ark.'nın 3864 izolat ile yaptığı çalışmada izolatların %12,1'inin (n: 466) karbapenem dirençli olduğu tespit edilmiştir. CARBA NP testi ile karbapenem dirençli izolatların % 4.3' ünün (n = 20) karbapenemaz ürettiği

gözlenmiştir. Karbapenemaz genlerinin dağılımı *bla*$_{\text{GES-5}}$ % 1.5 (*n* = 7); *bla*$_{\text{VIM-2}}$, % 0.6 (*n* = 3); *bla*$_{\text{VIM-4}}$,% 0.6 (*n* = 3); *bla*$_{\text{IMP-1}}$,% 0.4 (*n* = 2); *bla*$_{\text{IMP-18}}$,% 0.4 (*n* = 2); *bla*$_{\text{IMP-7}}$,% 0.4 (*n* = 2); ve *bla*$_{\text{IMP-13}}$, %0,2 (*n* = 1) şeklinde olduğu belirtilmiştir (McCracken vd., 2019). Diorio-Toth ve ark.' ın 142 izolatta yaptığı çalışmada % 29,6' sında (n=42) karbapenem geni tespit edilmiştir. İzolatların %12,7' sinde (n=18) *bla*$_{\text{GES-5}}$, %0,7' sinde *bla*$_{\text{IMP-1}}$ (n=1), %0,7' sinde *bla*$_{\text{IMP-10}}$ (n=1), %3,5' inde *bla*$_{\text{NDM-1}}$ (n=5), %7,7' sinde *bla*$_{\text{VIM-2}}$ (n=11), %3,5' inde *bla*$_{\text{VIM-6}}$ (n=5), %0,7' sinde *bla*$_{\text{VIM-11}}$ (n=1) genleri olduğu belirlenmiştir. İzolatların hiçbirinde çoklu karbapenemaz genine rastlanmamıştır (Diorio-Toth vd., 2022). Liew ve ark.' nın yaptığı çalışmada 53 *P. aeruginosa* izolatında fenotipik karbapenemaz üretimi taranmıştır. İmipenem-EDTA kombine disk yöntemi ve MBL imipenem / imipenem inhibitörü (IP / IPI) E-test şeritleri kullanılarak 3 izolatta (%5,6) MBL üretimi tespit edilmiş ve bu izolatlar genotipik olarak taranmıştır. İzolatın her birinde *bla*$_{\text{IMP}}$, *bla*$_{\text{VIM}}$, *bla*$_{\text{NDM}}$ saptanmış, *bla*$_{\text{KPC}}$ tespit edilmemiştir (Liew vd., 2018). Sudan' da 81 KDPA izolatları ile yapılan bir çalışmada *bla*$_{\text{OXA-48}}$ geni taranmış ve izolatların 54' ünde (%66,7) pozitif bulunmuştur (Ali ve Nagla, 2020).

El-Mahdy ve ark.' nın Mısır'da yaptığı bir çalışmada 80 izolattan 34 (42,5) KDPA izolatlarının direnç genleri araştırılmıştır. İzolatların 18'inde (%52,9) *bla*$_{\text{VIM}}$, birinde (% 2,9) *bla*$_{\text{KPC}}$ ve birinde (%2,9) *bla*$_{\text{NDM}}$ geni saptanmıştır. 1 izolatın (%2,9) *bla*$_{\text{VIM}}$ ve *bla*$_{\text{KPC}}$ geni taşıdığı gözlenmiştir. İzolatların hiçbirinin *bla*$_{\text{IMP}}$ ve *bla*$_{\text{OXA-48}}$ genini taşımadıkları belirlenmiştir. Karbapenemaz aktivitesinin araştırılması için 80 *P. aeruginosa* izolatına Modifiye Hodge testi (MHT) ve kombine disk yöntemi uygulanmıştır. Elde edilen bulgulara göre MHT yöntemine göre izolatların 22' sinin (%64,7) ve kombine disk yöntemine göre izolatların 18'inin (%52,9) MBL aktivitesine sahip olduğu gözlenmiştir. MHT ve kombine disk yönteminin duyarlılığı sırasıyla %81 ve%95,2, özgünlüğü ise %92,3 ve %84,6 olarak belirlenmiştir (El-Mahdy vd., 2019).

Ülkemizde Hosbul ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada 100 KDPA izolatının sadece bir tanesinde *bla*$_{\text{VIM}}$ genine rastlanmış, araştırılan diğer MBL genleri tespit edilememiştir (Hosbul vd., 2022). Başka bir çalışmada KDPA izolatlarının karbapenemaz üretimi fenotipik yöntemlerle araştırılmış ve MBL

genlerinden *bla*$_{VIM}$, *bla*$_{IMP}$, *bla*$_{SPM-1}$, *bla*$_{GIM-1}$, *bla*$_{SIM-1}$, *bla*$_{NDM-1}$ taranmıştır. Fakat bu direnç genlerinden herhangi biri saptanamamıştır (Aksoy ve Tuğrul, 2020).

Ozgumus ve ark.'nın Trabzon bölgesinde yaptığı bir çalışmada 100 *P. aeruginosa* izolatının MBL üretimi E-test yöntemiyle araştırılmış, *bla*$_{VIM}$ ve *bla*$_{IMP-1}$ genleri PZR yöntemiyle taranmıştır. Bir izolatta *bla*$_{VIM}$ geni tespit edilmiştir. 9 izolatta *bla*$_{IMP-1}$ genine rastlanmış ve bu genlerin sınıf-1 integron gen kaseti içinde taşındığı gözlenmiştir (Ozgumus vd., 2007).

Mansur ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada 29 KDPA izolatı çalışmaya dahil edilmiş, MBL üretimini değerlendirmek için E-test, modifiye Hodge testi ve imipenem-EDTA kombine disk yöntemi kullanılarak fenotipik yöntemler birbiriyle karşılaştırılmıştır. MBL genlerinin varlığını saptamak için *bla*$_{IMP}$, *bla*$_{VIM}$, *bla*$_{SIM}$, *bla*$_{SPM}$, *bla*$_{GIM}$ genleri taranmış fakat herhangi bir gen varlığı tespit edilememiştir. E-test yöntemiyle iki izolatta, kombine disk yöntemiyle altı izolatta, MHT ile 10 izolatta MBL üretimi gözlenmiştir (Mansur vd., 2013).

Bu tez çalışmasında karbapenem dirençli 47 adet *P. aeruginosa* izolatı çalışmaya dahil edilerek *bla*$_{KPC}$, *bla*$_{IMP}$, *bla*$_{NDM}$, *bla*$_{VIM}$, *bla*$_{OXA-48}$ genleri PZR yöntemiyle tarandı. MBL genlerinden altı suşta (%12,8) *bla*$_{VIM}$, beş suşta (%10,6) *bla*$_{NDM}$ genine rastlandı. Serin karbapenemaz genlerinden üç suşta (%6,4) *bla*$_{OXA-48}$ genine rastlandı. *bla*$_{IMP}$ ve *bla*$_{KPC}$ genlerine rastlanmadı. İzolatların hiçbirinde çoklu karbapenemaz genine rastlanmamıştır. Tespit edilen genlere sekans analizi yapılamamıştır. Bu tez çalışmasının sonuçlarıyla uyumlu olan araştırmalar mevcuttur. Ülkemizde yapılan çalışmalarda *bla*$_{IMP}$ ve *bla*$_{VIM}$ genlerine rastlanması açısından benzerlik gösteren çalışmalar mevcutken, dünya çapında yapılan çalışmalarda özellikle *bla*$_{NDM}$ ve *bla*$_{OXA-48}$ genlerinin tespit edilmesi açısından benzerlikler mevcuttur. Bu durum hem dünyada hem ülkemizde *P. aeruginosa'*nın karbapenem direncinin karbapenemaz genlerinin üretimiyle yüksek oranda ilişkili olduğunu ve direnç genlerinin plazmit, integron, transpozon gibi mobil genetik elemanlar aracılığıyla taşınarak türler arasında hızla yayılım gösterdiğini ortaya koymaktadır. Karbapenem dirençli izolatlarda karbapenem direnç genlerinin düşük oranda tespit edilmesinin nedeni porin kaybı ve efluks pompalarının ekspresyonundaki artış gibi mekanizmalara bağlı olabilmektedir. Değişken direnç

profili sergileyen *P. aeruginosa* izolatları araştırılan genler dışındaki direnç genlerine de sahip olabilir.

Karbapenem direncinin yayılmasında rol oynayan mobil genetik elemanlardan bir diğeri de integronlardır. Aruhomukama va ark.' nın yaptığı bir çalışmada 25 KDPA izolatında PZR yöntemiyle MBL genleri ve integron varlığı araştırılmıştır. İzolatların tamamında bla_{VIM} geni tespit edilmiş, bla_{IMP}, bla_{SPM} ve bla_{NDM} genlerine rastlanmamıştır. bla_{VIM} geninin 16 izolatta (%64) sınıf-1 integronlarla birlikte bulunduğu ve bu genlerin integronlar tarafından taşındığı belirlenmiştir. bla_{VIM} ve sınıf-1 integron taşıyan KDPA izolatlarının antibiyotik direnç profillerinin, sınıf-1 integron taşımayan izolatlardan farklı olmadığı ve izolatlardaki integronların ya ilaç direnç genleri taşımadığını ya da taranmayan direnç fenotiplerini kodlayan kasetleri taşıdıkları kanısına varılmıştır. (Aruhomukama, vd., 2019).

Tunus'ta bir hastanenin yanık ünitesinde yatan hastalardan izole edilen imipenem dirençli *P.aeruginosa* izolatları klonal ilişki açısından araştırılmış ve aynı zamanda bu izolatlarda bla_{VIM-2} geni tespit edilmiştir. Bu genlerin yaklaşık 7500 bç uzunluğunda sınıf-1 integron üzerinde taşındığı gözlenmiştir (Belotti vd., 2015).

Portekizde yapılan bir çalışmada hastanede yatan hastalardan izole edilen 4 KDPA izolatı ile ilgili yapılan çalışmada olarak bla_{VIM-2} genini taşıyan 30 kb büyüklüğünde bir plazmite rastlanmıştır. Plazmitin sekans analizi sonucunda bir adet sınıf-1 integron taşıdığı tespit edilmiştir (Botelho vd., 2017).

Kolombiya' da iki farklı hastaneden alınan örneklerden izole edilen 23 KDPA izolatıyla ilgili yapılan bir çalışmada PZR sonuçlarına göre 11 izolatın bla_{VIM-2} , 11 izolatın bla_{KPC-2} ve bir izolatın da bla_{VIM-2} ve bla_{KPC-2} genlerini birlikte taşıdığı tespit edilmiştir. bla_{VIM-2} geni içeren altı izolatta sınıf-1 integron varlığına rastlanmıştır. Bir izolatta plazmit izole edilmiş ve sekans sonuçlarına göre bu plazmitin bla_{KPC-2} genini taşıdığı belirlenmiştir (Rada vd., 2021).

Bu tez çalışmasında PZR sonuçlarına göre bla_{VIM} geni taşıyan 6 KDPA izolatından tamamında, bla_{NDM} geni taşıyan beş izolatın iki tanesinde sınıf-1 integron varlığına rastlanmıştır. Bu çalışmadan elde edilen bulgular dünyada ve ülkemizde yapılan çalışmaları destekler niteliktedir. bla_{VIM} geninin türler arası aktarımının integronlar aracılığı ile gerçekleştiği gözlenmektedir. Çalışmamızda

integron ile birlikte *bla*$_{NDM}$ geninin bulunması daha önce yapılan çalışmalarda nadiren gözlenmekte ve literatüre katkı sağlamaktadır.

Bu tez çalışmasında klinik izolatlar arasındaki klonal ilişkinin araştırılması için ERIC-PZR yöntemi kullanılmıştır. Bu yönteme göre izolatlar arasındaki kümeleşme oranı %31,91 olarak belirlenmiştir. Baskın bir salgın klonu tespit edilmemiştir. Jena ve ark. tarafından yapılan çalışmada MBL üreten *P. aeruginosa* izolatları arasındaki klonal ilişkinin araştırılması için ERIC-PZR yöntemi kullanılmış ve dendogram analizi sonucunda izolatlar arasında düşük düzeyde benzerlik gözlenmiştir.

Sonuç olarak, KDPA izolatlarının genel olarak diğer antibiyotiklere yüksek oranda dirençli oldukları gözlenmiştir. Yapılan konjugasyon deneyleri neticesinde transkonjugantların antibiyotik direnç profillerine bakıldığında karbapenem grubu antibiyotikler dışındaki antbiyotiklere karşı da dirençli oldukları gözlenmiştir. İzolatlarının bazılarında konjugatif plazmitlerle ko-transfer edilen antibiyotik direnci tespit edilmiştir. Aynı zamanda izolatlarda integron gen kasetlerine de rastlanması, bu suşların çevresel adaptasyon sağlayabilmek için mobil genlerini yakın ve akraba bakteri türleriyle paylaşabilme potasiyelinde olduklarını düşündürmektedir. Bu tez çalışmasında elde edilen veriler ışığında, dünyada ve ülkemizde antibiyotiklere karşı direnci kodlayan mobil genetik elemanların varlığının araştırılmasının gerekliliği ve önemi ortaya konulmaktadır. Antibiyotiklere karşı direnç kodlayan mobil genetik elemanların evrimsel adaptasyonlara katkısının moleküler epidemiyolojik analizlerinin ve takibinin, direnç gelişiminin kontrol altına alınması için yapılacak ulusal ve uluslararası düzeydeki çalışmalara ve veri tabanlarına önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.

9.2. Sonuç ve Öneriler

Tamamı karbapenem dirençli olan izolatlarla yapılan bu çalışmada antibiyotik direnç oranı literatürdeki çalışmalara göre değerlendirildiğinde ülkemizde yapılan çalışmalara ait bulgularla paralellik gösterdi. Farklı ülkelerde yapılan çalışmalara ait bulgulara göre daha yüksek oranda direnç gözlendi. Karbapenem dirençli izolatların en dirençli olduğu antibiyotik levofloksasisn (%70,7) olarak bulundu.

Direnç genlerinin tespit oranıfarklı ülkelerde yapılan çalışmalara göre yüksek oranda görüldü. Bu çalışmada *bla*$_{VIM}$, *bla*$_{NDM}$ ve *bla*$_{OXA-48}$ genlerinin tespiti varlığı

dünyada yapılan çalışmalarla uyumluluk göstermektedir. Ülkemizde yapılan çalışmalarda *bla*$_{IMP}$ ve *bla*$_{VIM}$ genlerine rastlanması açısından benzerlik bulunmakla birlikte bu çalışmada *bla*$_{NDM}$ geninin tespiti dikkat çekicidir.

Bu çalışmada izolatların karbapenem direnç genleri moleküler yöntemlerle taranırken aynı zamanda karbapenemaz üretimi fenotipik yöntemle araştırıldı. İzolatların MBL aktivitesini belirleyebilmek için imipenem/meropenem-EDTA kombine disk yöntemi uygulandı ve %53,2' sinde MBL üretimi tespit edildi. Bu oran daha önce yapılan çalışmalara ait bulgulara göre yüksek oranda gözlendi. MBL genleri tespit edilen suşların fenotipik olarak %27,3' ünde MBL üretimi gözlendi. Bu oranın düşük olmasının nedeninin diğer direnç mekanizmalarının varlığının etkili olabileceği görüşünü destekledi.

Bu çalışmada tespit edilen virülans genlerine (*lasR* ve *rhlR)* ait oranların ülkemiz ve dünya genelinde yapılan çalışmalara ait bulgularla uyumlu olduğu gözlendi. İntegron barındıran izolatlarda biyofilm genlerinin bulunma oranının yüksek olmasının biyofilm oluşumunun sınıf-1 integron barındıran KDPA izolatlarında daha yaygın olduğunu düşündürdü.

Antibiyotik direncine neden olan bazı direnç genlerinin plazmit ve integronlar üzerinde olup olmadığı araştırıldı. Konjugatif plazmit içeren bazı suşların MBL geni taşıdığı ve direncin plazmitler aracılığı ile aktarıldığı gözlendi. Bu bulgular ülkemizde ve dünya çapında yapılan çalışmalarla benzerlik gösterdi. Plazmit varlığının gözlendiği izolatlarda sınıf-1 integron varlığına da rastlandı. Bu durum integronların plazmitte bulunduğunu düşündürdü.

İntegron varlığının araştırıldığı bu çalışmadan elde edilen bulgular dünyada ve ülkemizde yapılan çalışmaları destekler niteliktedir. *bla*$_{VIM}$ genini taşıyan izolatların tamamında *ıntI1* integraz geni tespit edildi ve %50' sinin integron gen kaseti taşıdığı belirlendi. *bla*$_{NDM}$ taşıyan izolatlarınbazıların *ıntI1* integraz geni ve integron gen kaseti taşıdığı gözlendi. Çalışmada sınıf- 2 integron varlığı araştırıldı fakat tespit edilemedi.

Suşlar arası benzerliği tespit edebilmek için genotipleme analizleri yapılarak kümeler oluşturulmalı ve filogenetik açıdan değerlendirilmelidir. Karbapenem direncine neden olan izolatların direnç evrimi ulusal ve uluslararası ölçekte moleküler düzeyde araştırılmalıdır. Dirence neden olan genlerin tespitiyle sekans

analizleri yapılmalı, direnç genlerinin aktarımına neden olan mobil genetik elemanlar epidemiyolojik açıdan araştırılmalı, bu suşların tüm genom sekanslaması yapılarak antibiyotik direnci ve virülans genleri taşıyan gen lokusları belirlenerek direncin önlenmesine yönelik diğer çalışmalara bilgi zemini sağlanmalıdır.

KAYNAKÇA

Abboud, M. I., Damblon, C., Brem, J., Smargiasso, N., Mercuri, P., Gilbert, B., Rydzik, A. M., Claridge, T. D., Schofield, C. J., & Frère, J. M. (2016). Interaction of Avibactam with Class B Metallo-β-Lactamases. Antimicrobial agents and chemotherapy, 60(10), 5655–5662. https://doi.org/10.1128/AAC.00897-16

AbdelRahim, K. A., Hassanein, A. M. & Abd El Azeiz, H. A. (2015). Prevalence, plasmids and antibiotic resistance correlation of enteric bacteria in different drinking water resources in sohag, Egypt. Jundishapur journal of microbiology, 8(1), e18648. https://doi.org/10.5812/jjm.18648

Ågen, J. A. & Clark, A. G. (2018). Selfish genetic elements. PLoS genetics, 14(11), e1007700. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007700

Ahmed, T., Pattnaik, S., Khan, M. B., Ampasala, D. R., Busi, S., & Sarma, V. V. (2020). Inhibition of quorum sensing-associated virulence factors and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by Mycoleptodiscus indicus PUTY1. Brazilian Journal of microbiology : [publication of the Brazilian society for microbiology], 51(2), 467–487. https://doi.org/10.1007/s42770-020-00235-y

Aksoy, M. D. & Tuğrul, H.M. (2020). Karbapenemlere Dirençli Pseudomonas *aeruginosa* Kökenlerinde Metallo-Beta-laktamaz Enzimlerinin Fenotipik ve Moleküler Yöntemlerle Araştırılması. Flora, 25(3), 301-307. https://doi.org/10.5578/flora.68921

Alcorn, J. F. & Wright, J. R. (2004). Degadation of pulmonary surfactant protein D by *Pseudomonas aeruginosa* elastase abrogates innate immune function. The journal of biological chemistry, 279(29), 30871–30879. https://doi.org/10.1074/jbc.M400796200

Ali, D. O. & Nagla, M. M. (2020). Molecular detection of $bla_{\text{OXA-48}}$ gene encoding carbapenem resistance *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Khartoum State Hospitals, Sudan. medRxiv, 2020-06.https://doi.org/10.1101/2020.06.22.20137034

Arakawa, Y., Murakami, M., Suzuki, K., Ito, H., Wacharotayankun, R., Ohsuka, S., Kato, N., & Ohta, M. (1995). A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene $bla_{\text{IMP.}}$ Antimicrobial agents and chemotherapy, 39(7), 1612–1615. https://doi.org/10.1128/AAC.39.7.1612

Arda, M (2011). Temel Mikrobiyoloji. 5. baskı. Medisan Yayınevi, Ankara; Sayfa: 183-207.

Ardakani, M. A., & Ranjbar, R. (2016). Molecular typing of uropathogenic E. coli strains by the ERIC-PCR method. Electronic physician, *8*(4), 2291–2296. https://doi.org/10.19082/2291

Aruhomukama, D., Najjuka, C. F., Kajumbula, H., Okee, M., Mboowa, G., Sserwadda, I., Mayanja, R., Joloba, M. L., & Kateete, D. P. (2019). *bla*$_{VIM}$- and *bla*$_{OXA}$-mediated carbapenem resistance among *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the Mulago hospital intensive care unit in Kampala, Uganda. BMC infectious diseases, 19(1), 853. https://doi.org/10.1186/s12879-019-4510-5

Ayaz, C. (2008). Beta-laktamların Genel Özellikleri ve Penisilinler. Ed: Topçu, A.W., Söyletir, G., Doğanay, M. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Sistemine Göre Enfeksiyonlar. 3. baskı. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul. Sayfa: 267-268.

Ayaz, C. (2017). Beta-laktamların Genel Özellikleri ve Penisilinler. Ed. Topçu, A.W., Söyletir, G., Doğanay, M. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi.4. baskı. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul. Sayfa: 243-53.

Aydın, F. (2001). Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen *Pseudomonas* Suşlarının Değişik Yöntemlerle Çeşitli Antimikrobiyellere Duyarlılıklarının Araştırılması. A.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Uzmanlık Tezi, Ankara.

Babich, T., Naucler, P., Valik, J. K., Giske, C. G., Benito, N., Cardona, R., Rivera, A., PuLcini, C., Fattah, M. A., Haquin, J., MacGowan, A., Gier, S., Chazan, B., Yanovskay, A., Ami, R. B., Landes, M., Nesher, L., Zaidman-Shimshovitz, A., McCarthy, K., Paterson, D. L., & Yahav, D. (2020). Risk factors for mortality among patients with *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia: a retrospective multicentre study. International journal of antimicrobial agents, 55(2), 105847. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.11.004

Balcazar, J. L. (2014). Bacteriophages as vehicles for antibiotic resistance genes in the environment. PLoS pathogens, 10(7), e1004219. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004219

Barlow, R. S., & Gobius, K. S. (2006). Diverse class 2 integrons in bacteria from beef cattle sources. The journal of antimicrobial chemotherapy, 58(6), 1133–1138. https://doi.org/10.1093/jac/dkl423

Başkan, C., Sırıken, B., Tüfekci, E. F., Kılınç, Ç., Ertürk, Ö., & Erol, İ. (2022). Presence of quorum sensing system, virulence genes, biofilm formation and relationship among them and class 1 integron in carbapenem-resistant clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates. Archives of microbiology, 204(8), 464.

Batard, E., Ollivier, F., Boutoille, D., Hardouin, J. B., Montassier, E., Caillon, J., & Ballereau, F. (2013). Relationship between hospital antibiotic use and quinolone resistance in *Escherichia coli*. International Society for infectious diseases, 17(4), e254–e258. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2012.10.005

Belotti, P. T., Thabet, L., Laffargue, A., André, C., CouLange-Mayonnove, L., Arpin, C., Messadi, A., M'Zali, F., Quentin, C., & Dubois, V. (2015).

Description of an original integron encompassing *bla*$_{VIM-2}$, *qnrVC1* and genes encoding bacterial goup II intron proteins in *Pseudomonas aeruginosa*. The journal of antimicrobial chemotherapy, 70(8), 2237–2240. https://doi.org/10.1093/jac/dkv103

Bengtsson-Palme, J., & Larsson, D. G. (2016). Concentrations of antibiotics predicted to select for resistant bacteria: Proposed limits for environmental reguLation. Environment international, 86, 140–149. https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.10.015

Bhat, B. A., Mir, R. A., Qadri, H., Dhiman, R., Almilaibary, A., Alkhanani, M., & Mir, M. A. (2023). Integrons in the development of antimicrobial resistance: critical review and perspectives. Frontiers in microbiology, 14, 1231938. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1231938

Bilgehan, H. (2000). Fermentasyon yapmayan Gram olumsuz bakteriler. Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları.10. baskı. Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, İzmir; Sayfa: 422.

Blanco-Cabra, N., Paetzold, B., Ferrar, T., Mazzolini, R., Torrents, E., Serrano, L., & LLuch-Senar, M. (2020). Characterization of different alginate lyases for dissolving *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Scientific reports, 10(1), 9390. https://doi.org/10.1038/s41598-020-66293-2

Botelho, J., Gosso, F., & Peixe, L. (2017). Characterization of the pJB12 Plasmid from *Pseudomonas aeruginosa* Reveals *Tn*6352, a Novel Putative Transposon Associated with Mobilization of the *bla*$_{VIM-2}$-Harboring In58 Integron. Antimicrobial agents and chemotherapy, 61(5), e02532-16. https://doi.org/10.1128/AAC.02532-16

Breidenstein, E. B., de la Fuente-Núñez, C., & Hancock, R. E. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. Trends in microbiology, 19(8), 419–426. https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.04.005

Britt, N. S., Ritchie, D. J., Kollef, M. H., Burnham, C. A., Durkin, M. J., Hampton, N. B., & Micek, S. T. (2018). Importance of Site of Infection and Antibiotic Selection in the Treatment of Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Sepsis. Antimicrobial agents and chemotherapy, 62(4), e02400-17. https://doi.org/10.1128/AAC.02400-17

Brooks, G. F., Carroll, K. C., Butel, J. S., Morse, S. A., & Mietzner, T. A. (2014). Jawetz, Melnick ve Adelberg Medical microbiology. 26th ed. (Yenenler OŞ (çeviri editörü), ed.). Nobel Tıp Kitabevi.

Cantón, R., Akóva, M., Carmeli, Y., Giske, C. G., Glupczynski, Y., Gniadkowski, M., Livermore, D. M., Miriagou, V., Naas, T., Rossolini, G. M., Samuelsen, Ø., Seifert, H., Woodford, N., & Nordmann, P., European Network on Carbapenemases (2012). Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and

Infectious Diseases, 18(5), 413–431. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03821.x

Carmeli, Y., Troillet, N., EliopouLos, G. M. & Samore, M. H. (1999). Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. Antimicrobial agents and chemotherapy, 43(6), 1379–1382. https://doi.org/10.1128/AAC.43.6.1379

Castanheira, M., Jones, R. N. & Livermore, D. M. (2009). Antimicrobial activities of doripenem and other carbapenems against *Pseudomonas aeruginosa*, other nonfermentative bacilli and *Aeromonas* spp. Diagnostic Microbiology and infectious disease, 63(4), 426–433. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.01.026

CDC, Centers for Disease Control and Prevention (2013). https://www.cdc.gov/drugesistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf

Chen, W. P., & Kuo, T. T. (1993). A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic acids research*, *21*(9), 2260. https://doi.org/10.1093/nar/21.9.2260

Chu, Y. W., Cheung, T. K., Ngan, J. Y., & Kam, K. M. (2005). EDTA susceptibility leading to false detection of metallo-beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* by Etest and an imipenem-EDTA disk method. International journal of antimicrobial agents, 26(4), 340–341. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.07.004

Clark, D.P., Pazdernik, N.J. & McGehee M.R. (2019). Plasmids. Moleculer biology. 4th Edition, 712-748.

Clinical and Laboratory Standards Institute (2020). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Zone Diameter and MIC Breakpoints for *Pseudomonas aeruginosa* (Table 2B-1). CLSI M100, Ocak 2020; 30th ed. Available from: https://www.nih.org.pk/wp-content/uploads/2021/02/CLSI-2020.pdf

Collis, C. M., Kim, M. J., Partridge, S. R., Stokes, H. W., & Hall, R. M. (2002). Characterization of the class 3 İntegron and the site-specific recombination system it determines. Journal of bacteriology, 184(11), 3017–3026. https://doi.org/10.1128/JB.184.11.3017-3026.2002

Copur-Cicek, A., Ozgumus, O. B., Saral, A., & Sandalli, C. (2014). Antimicrobial resistance patterns and integron carriage of *Escherichia coli* isolates causing community-acquired infections in Turkey. Annals of laboratory medicine, 34(2), 139–144. https://doi.org/10.3343/alm.2014.34.2.139

Correia, S., Poeta, P., Hébraud, M., Capelo, J. L., & Igejas, G. (2017). Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand?. Journal of medical microbiology, 66(5), 551–559. https://doi.org/10.1099/jmm.0.000475

Crowley, D., Cryan, B. &Lucey, B. (2008). First detection of a class 2 integron among clinical isolates of Serratia marcescens. British journal of biomedical science, 65(2), 86–89. https://doi.org/10.1080/09674845.2008.11732803

Çeken, N., Duran, H. & Atik, B. (2021). Yoğun bakım ünitelerinden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının dört yıllık direnç profili. Pamukkale tıp dergisi, 14: 306–311. https://doi.org/10.31362/patd.789332

Dahlberg, C. & Hermansson, M. (1995). Abundance of *Tn*3, *Tn*21, and *Tn*501 transposase (tnpA) sequences in bacterial community DNA from marine environments. Applied and environmental microbiology, 61(8), 3051–3056. https://doi.org/10.1128/aem.61.8.3051-3056.1995

Dai, X., Zhou, D., Xiong, W., Feng, J., Luo, W., Luo, G., Wang, H., Sun, F., & Zhou, X. (2016). The IncP-6 Plasmid p10265-KPC from *Pseudomonas aeruginosa* Carries a Novel ΔISEc33-Associated bla_{KPC-2} Gene Cluster. Frontiers in microbiology, 7, 310. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00310

Dale, J. W., & Park, S. F. (2004). Molecular Genetics of Bacteria. 4th Editio. West Sussex, England: John Willey & Sons Ltd., 141-195.

Das, T., Sehar, S. & Manefield, M. (2013). The roles of extracellular DNA in the structural integity of extracellular polymeric substance and bacterial biofilm development. Environmental microbiology reports, 5(6), 778–786. https://doi.org/10.1111/1758-2229.12085

Dave, A., Samarth, A., Karolia, R., Sharma, S., Karunakaran, E., Partridge, L., MacNeil, S., Monk, P. N., Garg, P., & Roy, S. (2020). Characterization of Ocular Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Non-Contact Lens Related Keratitis Patients from South India. Microorganisms, 8(2), 260. https://doi.org/10.3390/microorganisms8020260

Davis, D. B., Dulbecco, R., Eisen, H., Ginsberg, H. S. & Wood, W. B. (1968). Microbiology. Hober Medical Division, New York, 756–757.

de Sousa, T., Hébraud, M., Dapkevicius, M. L. N. E., Maltez, L., Pereira, J. E., Capita, R., Alonso-Calleja, C., Igejas, G., & Poeta, P. (2021). Genomic and Metabolic Characteristics of the Pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. International journal of molecular sciences, 22(23), 12892. https://doi.org/10.3390/ijms222312892

Diorio-Toth, L., Irum, S., Potter, R. F., Wallace, M. A., Arslan, M., Munir, T., Andleeb, S., Burnham, C. D., & Dantas, G. (2022). Genomic Surveillance of Clinical *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Reveals an Additive Effect of Carbapenemase Production on Carbapenem Resistance. Microbiology spectrum, 10(3), e0076622. https://doi.org/10.1128/spectrum.00766-22

Doi, Y. (2019). Treatment Options for Carbapenem-resistant Gram-negative Bacterial Infections. Clinical infectious diseases: an official publication of the

Infectious Diseases Society of America, 69(Suppl 7), S565–S575. https://doi.org/10.1093/cid/ciz830

Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. Emerging infectious diseases, 8(9),881–890.https://doi.org/10.3201/eid0809.020063e0172913.doi: 10.1371/journal.pone.0172913

Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clinical microbiology reviews, 15(2), 167–193. https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002

Durmaz, R., Otlu, B., Koksal, F. (2009). The optimization of a rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for the typing of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Klebsiella spp*. Japanese journal of infectious diseases, 62: 372–377.

Ellappan, K., Belgode Narasimha, H. & Kumar, S. (2018). Coexistence of multidrug resistance mechanisms and virulence genes in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from a tertiary care hospital in South India. Journal of global antimicrobial resistance, 12, 37–43. https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.08.018

El-Mahdy, R. & El-Kannishy, G. (2019). ViruLence Factors Of Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* In Hospital-Acquired Infections In Mansoura, Egypt. Infection and drug resistance, 12, 3455–61. https://doi.org/10.2147/IDR.S222329

Erdem, B. (1999). Pseudomonaslar. Ustaçelebi Ş (Editör). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji'de. Ankara: Güneş Kitabevi, 5511-558.

Erol, Ç. & Aktaş, F. (2008). Pseudomonas türlerinin neden olduğu enfeksiyonlar. İç Hastalıkları Enfeksiyon Hastalıkları. 1.baskı. Ankara, MN Medikal ve Nobel Tıp Kitabevi, 329-42.

Ertuğrul, B. M., Oryasin, E., Lipsky, B. A., Willke, A., & Bozdogan, B. (2018). Virulence genes *fliC, toxA* and *phzS* are common among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from diabetic foot infections. Infectious diseases (London, England), 50(4), 273–279.

EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2023). Clinical breakpoints. http:// www.eucast.org/clinical_breakpoints/. https://doi.org/10.1080/23744235.2017.1393839EUCAST.

Feschotte, C., Jiang, N, & Wessler, S. R. (2002). Plant transposable elements: where genetics meets genomics. Nature reviews. Genetics, 3(5), 329–341. https://doi.org/10.1038/nrg793

Fluit, A. C. & Schmitz, F. J. (2004). Resistance integrons and super-integrons. Clinical microbiology and infection: the official publication of the

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 10(4), 272–288. https://doi.org/10.1111/j.1198-743X.2004.00858.x

Fukuda, K., Ishida, W., Fukushima, A., & Nishida, T. (2017). Corneal Fibroblasts as Sentinel Cells and Local Immune Modulators in Infectious Keratitis. International journal of molecular sciences, 18(9), 1831. https://doi.org/10.3390/ijms18091831

Gera, C. & Srivastava, S. (2006). Quorum-sensing: the phenomenon of microbial communication. Current science, 666-676.

Ghuysen, J. M. (1994). Molecular structures of penicillin-binding proteins and beta-lactamases. Trends in microbiology, 2(10), 372–380. https://doi.org/10.1016/0966-842x(94)90614-9

Gill, C. M., Nicolau, D. P., & ERACE-PA Global Study Goup (2022). Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: an assessment of frequency of isolation from ICU versus non-ICU, phenotypic and genotypic profiles in a multinational popuLation of hospitalized patients. Antimicrobial resistance and infection control, 11(1), 146. https://doi.org/10.1186/s13756-022-01187-8

Gillings, M. R. (2014). Integrons: past, present, and future. Microbiology and molecular biology reviews*:* MMBR, *78*(2), 257–277. https://doi.org/10.1128/MMBR.00056-13

Gómez-Lus, R. (1998). Evolution of bacterial resistance to antibiotics during the last three decades. International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology, 1(4), 279–284.

Goryshin, I. Y., Miller, J. A., Kil, Y. V., Lanzov, V. A., & Reznikoff, W. S. (1998). *Tn*5/IS50 target recognition. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95(18), 10716–10721. https://doi.org/10.1073/pnas.95.18.10716

Giffiths, A. J., Miller, J. H., Suzuki, D. T., Lewontin, R. C., & Gelbart, W. M. (2000). Bacterial conjugation. In An Introduction to Genetic Analysis. 7th edition. WH Freeman.

Guerra, B., Junker, E., Schroeter, A., Malorny, B., Lehmann, S., & Helmuth, R. (2003). Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle, swine and poultry. The Journal of antimicrobial chemotherapy, 52(3), 489–492. https://doi.org/10.1093/jac/dkg362

Hall, R. M., Collis, C. M., Kim, M. J., Partridge, S. R., Recchia, G. D., & Stokes, H. W. (1999). Mobile gene cassettes and integrons in evolution. Annals of the New York Academy of Sciences, 870, 68–80. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb08866.x

Hammoudi-Halat, D., & Ayoub-Moubareck, C. (2022). The Intriguing Carbapenemases of *Pseudomonas aeruginosa*: Current Status, Genetic Profile, and Global Epidemiology. *The Yale journal of biology and medicine*, *95*(4), 507–515.

Harbottle, H., Thakur, S., Zhao, S., & White, D. G. (2006). Genetics of antimicrobial resistance. Animal biotechnology, 17(2), 111–124. https://doi.org/10.1080/10495390600957092

Harvey, R.A., Cornelissen, C.J. & Fisher, B.D. (2013) Lippincott's Illustrated Reviews: Microbiology. Ed:. Harvey RA, 3rd ed, 129-148

Hassuna, N. A., Mandour, S. A., & Mohamed, E. S. (2020). Virulence Constitution of Multi-Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Upper Egypt. Infection and drug resistance, 13, 587–595. https://doi.org/10.2147/IDR.S233694

Hauser, A. R., Jain, M., Bar-Meir, M., & McColley, S. A. (2011). Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. Clinical microbiology reviews, 24(1), 29–70. https://doi.org/10.1128/CMR.00036-10

Henry, DA & Speert, DP (2011). Mechanisms of Resistance to Antibacterial Agents. Manual of Clinical Microbiology. Ed: Versalovic J, Carroll KC, Jorgensen JH, Funke G, Landry ML, Warnock DW, 10th ed Washington DC, ASM Press, (1), 677-691.

Hilliam, Y., Kaye, S. & Winstanley, C. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* and microbial keratitis. Journal of medical microbiology, 69(1), 3–13. https://doi.org/10.1099/jmm.0.001110

Horcajada, J. P., Montero, M., Oliver, A., Sorlí, L., Luque, S., Gómez-Zorrilla, S., Benito, N., **&** Gau, S. (2019). Epidemiology and Treatment of Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infections. Clinical microbiology reviews, 32(4), e00031-19. https://doi.org/10.1128/CMR.00031-19

Hosbul, T., Aydogan, C. N., Sinem, K. A. Y. A., Bedir, O., Özcan, H., & Gümral, R. (2022). In Vitro Activity of Ceftazidime-Avibactam and Colistin Against Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates. Journal of Istanbul Faculty of Medicine, 85(3), 355-361. https://doi.org/10.26650/IUITFD.1092556

Hu, Y. Y., Wang, Q., Sun, Q. L., Chen, G. X., & Zhang, R. (2019). A novel plasmid carrying carbapenem-resistant gene bla_{KPC-2} in *Pseudomonas aeruginosa*. Infection and drug resistance, 12, 1285–1288. https://doi.org/10.2147/IDR.S196390

Humbert, M., Huguet, K. T., CouLombe, F., & Burrus, V. (2019). Entry Exclusion of Conjugative Plasmids of the IncA, IncC, and Related Untyped Incompatibility Goups. Journal of bacteriology, 201(10), e00731-18. https://doi.org/10.1128/JB.00731-18

Ilgaz, A. (1999). Özel Mikrobiyoloji Medisan Yayınları, Ankara,91–96.

Islamieh, D. I., Afshar, D., & Esmaeili, D. (2019). Effect of Satureja khuzistanica essential oil (SKEO) extract on expression of lasA and lasB genes in *Pseudomonas aeruginosa*. Iranian journal of microbiology, 11(1), 55–59.

İbrahim, B. & Heydarlou, M. M. (2020). Dirençli *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Direnç Mekanizmaları ve Tedavi Seçenekleri. Euroasia Journal of Mathematics, Engineering, Natural & Medical Sciences, 7(11), 28-43.

Jacoby, G. A. (1974). Properties of R plasmids determining gentamicin resistance by acetylation in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 1974; 6(3): 239-52.

Jain, S. &Ohman, D. E. (2005). Role of an alginate lyase for alginate transport in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. Infection and immunity, 73(10), 6429–6436. https://doi.org/10.1128/IAI.73.10.6429-6436.2005

Jones, R. N., Baquero, F., Privitera, G., Inoue, M., & Wiedemann, B. (1997). Inducible β-lactamase-mediated resistance to third-generation cephalosporins. Clinical Microbiology and Infection, 3, s7-s20.

Kado, C. I. And Liu, & S. T. (1981). Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. Journal of bacteriology, 145(3), 1365–1373. https://doi.org/10.1128/jb.145.3.1365-1373.1981

Kamruzzaman, M., Shoma, & S., Thomas, C. M., Partridge, S. R. and Iredell, J. R. (2017). Plasmid interference for curing antibiotic resistance plasmids in vivo. PloS one, 12(2), e0172913. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172913

Karatuna, O. &Yağcı, A. (2008). *Pseudomonas aeruginosa*'da virülans faktörleri ve quorum sensing. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 38(1), 42-51.

Kim, E. J., Wang, W., Deckwer, W. D., & Zeng, A. P. (2005). Expression of the quorum-sensing regulatory protein LasR is strongly affected by iron and oxygen concentrations in cultures of *Pseudomonas aeruginosa* irrespective of cell density. Microbiology (Reading, England), 151(Pt 4), 1127–1138. https://doi.org/10.1099/mic.0.27566-0

King, J. D., Kocíncová, D., Westman, E. L. & Lam, J. S. (2009). Review: Lipopolysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. Innate immunity, 15(5), 261–312. https://doi.org/10.1177/1753425909106436

Kipnis, E., Sawa, T., & Wiener-Kronish, J. (2006). Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. Medecine et maladies infectieuses, 36(2), 78–91. https://doi.org/10.1016/j.medmal.2005.10.007

Kitagawa, K., Shigemura, K., Yamamichi, F., Osawa, K., Uda, A., Koike, C., Tokimatsu, I., Shirakawa, T., Miyara, & T.,Fujisawa, M. (2019). Bacteremia complicating urinary tract infection by *Pseudomonas aeruginosa*: Mortality risk factors. International journal of urology: official journal of the Japanese Urological Association, 26(3), 358–362. https://doi.org/10.1111/iju.13872

Kruse, H., & Sørum, H. (1994). Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. Applied and environmental microbiology, 60 (11), 4015–4021. https://doi.org/10.1128/aem.60.11.4015-4021.1994

Lakhundi, S., Siddiqui, R., & Khan, N. A. (2017). Pathogenesis of microbial keratitis. Microbial pathogenesis, 104, 97–109. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.12.013

Lamont, I. L., Beare, P. A., Ochsner, U., Vasil, A. I., & Vasil, M. L. (2002). Siderophore-mediated signaling reguLates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99(10), 7072–7077. https://doi.org/10.1073/pnas.092016999

Lau, G. W., Hassett, D. J., Ran, H., & Kong, F. (2004). The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. Trends in molecular medicine, 10(12), 599–606. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2004.10.002

Le Rouzic, A., Boutin, T. S., & Capy, P. (2007). Long-term evolution of transposable elements. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104(49), 19375–19380. https://doi.org/10.1073/pnas.0705238104

Leblebicioğlu, H. (2008). Parenteral Sefalosporinler. Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler. Ed. Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S. Ankara, Bilimsel Tıp Yayınevi, 285-98.

Lederberg, J., (2000). Pseudomonas. Encyclopedia of Microbiology. Second Edition. Volume 3., SanDiego, p. 876-891.

Lévesque, C., Piché, L., Larose, C., & Roy, P. H. (1995). PCR mapping of İntegrons reveals several novel combinations of resistance genes. Antimicrobial agents and chemotherapy, 39(1), 185–191. https://doi.org/10.1128/AAC.39.1.185

Levinson, W. 2008. Review of Medical Microbiology and Immunology. p. 150.

Li, H., Luo, Y. F., Williams, B. J., *Bla*ckwell, T. S., & Xie, C. M. (2012). Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: from antibiotic resistance to novel therapies. International journal of medical microbiology: IJMM, 302(2), 63–68. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.10.001

Liebert, C. A., Hall, R. M., & Summers, A. O. (1999). Transposon *Tn*21, flagship of the floating genome. Microbiology and molecular biology reviews: MMBR, 63(3), 507–522. https://doi.org/10.1128/MMBR.63.3.507-522.1999

Liew, S. M., Rajasekaram, G., Puthucheary, S. D., & Chua, K. H. (2018). Detection of VIM-2-, IMP-1- and NDM-1-producing multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Malaysia. Journal of global antimicrobial resistance, 13, 271–273. https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.01.026

Lister, P. D., Wolter, D. J., & Hanson, N. D. (2009). Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. Clinical microbiology reviews, 22(4), 582–610. https://doi.org/10.1128/CMR.00040-09

Livermore, D. M. (1995). Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. Clinical microbiology reviews, 8(4), 557-584.

Livermore, D. M., & Woodford, N. (2000). Carbapenemases: a problem in waiting?. Current opinion in microbiology, 3(5), 489-495.

Lyczak, J. B., Cannon, C. L., & Pier, G. B. (2002). Lung infections associated with cystic fibrosis. Clinical microbiology reviews, 15(2), 194–222. https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.194-222.2002

Machado, E., Cantón, R., Baquero, F., Galán, J. C., Rollán, A., Peixe, L., & Coque, T. M. (2005). Integon content of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains over 12 years in a single hospital in Madrid, Spain. Antimicrobial agents and chemotherapy, 49(5), 1823–1829. https://doi.org/10.1128/AAC.49.5.1823-1829.2005

Macrina, F. L., Kopecko, D. J., Jones, K. R., Ayers, D. J., & McCowen, S. M. (1978). A muLtiple plasmid-containing *Escherichia coli* strain: convenient source of size reference plasmid molecules. Plasmid, 1(3), 417–420. https://doi.org/10.1016/0147-619x(78)90056-2

Maçin, S. (2014). Pigmentli ve Pigmentsiz *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Virulans Faktörlerinin Fenotipik ve Genotipik Olarak Karşılaştırılması. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Uzmanlık Tezi, Ankara.

Malloy, J. L., Veldhuizen, R. A., Thibodeaux, B. A., O'Callaghan, R. J., & Wright, J. R. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* protease IV degades surfactant proteins and inhibits surfactant host defense and biophysical functions. American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology, 288(2), L409–L418. https://doi.org/10.1152/ajplung.00322.2004

Mansur, A., Ay, S., Otlu, B., Güclüer, N., Ersoy, Y. (2013). Karbapenem Dirençli *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarmda Metallo Beta Laktamaz Üretiminin Araştırılması. Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi, 20(3), 237-242.

Mazel, D. (2006). Integrons: agents of bacterial evolution. Nature reviews. Microbiology, 4(8), 608–620. https://doi.org/10.1038/nrmicro1462

McCracken, M. G., Adam, H. J., Blondeau, J. M., Walkty, A. J., Karlowsky, J. A., Hoban, D. J., Zhanel, G. G., Mulvey, M. R., & Canadian Antimicrobial

Resistance Alliance (CARA) and CANWARD (2019). Characterization of carbapenem-resistant and XDR *Pseudomonas aeruginosa* in Canada: results of the CANWARD 2007-16 study. The Journal of antimicrobial chemotherapy, 74(Suppl 4), iv32–iv38. https://doi.org/10.1093/jac/dkz285

Medeiros, A. A. (1997). Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 24 Suppl 1, S19–S45. https://doi.org/10.1093/clinids/24.supplement_1.s19

Madigan, M. T., & Martinko, J. M. (2012). Mikroorganizmaların biyolojisi (C. Çökmüş, Çev.). Ankara: Palme Yayınları Biyoloji Dizisi, 270-282.

Melzer, M., & Petersen, I. (2007). Mortality following bacteraemic infection caused by extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *E. coli* compared to non-ESBL producing E. coli. The Journal of infection, 55(3), 254–259. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2007.04.007

Menekşe, Ş., Tanrıverdi, E. S., Oğuş, H., Altınay, E., Kaya, Ç., Çağlayan, E., Aydoğan, A. A., Otlu, B., & Kırali, M. K. (2023). *Stenotrophomonas maltophilia* outbreak with a commercial blood gas injector as the culprit and interventions for source and prevention: A possible passage between patient and ECMO water heater device. American journal of infection control, 51(5), 533–538. https://doi.org/10.1016/j.ajic.2022.07.012

Mirza, H. C., & İnce Ceviz, G. (2022). Karbapenem dirençli *Pseudomonas aeruginosa* suşlarına karşı sefiderokol, imipenem/relebaktam ve diğer antibiyotiklerin in vitro etkinliklerinin karşılaştırılması. Türk hijyen ve deneysel biyoloji dergisi, 79(3), 433-442. https://doi.org/10.5505/TurkHijyen.2022.79095

Moreau-Marquis, S., Stanton, B. A., & O'Toole, G. A. (2008). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation in the cystic fibrosis airway. Pulmonary pharmacology & therapeutics, 21(4), 595–599. https://doi.org/10.1016/j.pupt.2007.12.001

Morita, Y., Tomida, J., & Kawamura, Y. (2014). Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. Frontiers in microbiology, 4, 422. https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00422

Mouton, J. W., Touzw, D. J., Horrevorts, A. M., & Vinks, A. A. (2000). Comparative pharmacokinetics of the carbapenems: clinical implications. Clinical pharmacokinetics, 39(3), 185–201. https://doi.org/10.2165/00003088-200039030-00002

Muderris, T., Durmaz, R., Ozdem, B., Dal, T., Unaldı, O., Aydogan, S., Celikbilek, N., & Acıkgoz, Z. C. (2018). Role of efflux pump and OprD porin expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Journal of infection in developing countries, 12(1), 1–8. https://doi.org/10.3855/jidc.9486

Murphy, T. F. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* in adults with chronic obstructive pulmonary disease. Current opinion in pulmonary medicine, 15(2), 138–142.

Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2016). Tıbbi Mikrobiyoloji. Pseudomonas ve ilişkili bakteriler. Çev. Ed. Başusatoğlu, 6. Baskı, Elsevier, Ankara: Hipokrat Kitabevi, 333-342. https://doi.org/10.1097/MCP.0b013e328321861a

Naas, T., Bonnin, R. A., Cuzon, G., Villegas, M. V., & Nordmann, P. (2013). Complete sequence of two KPC-harbouring plasmids from *Pseudomonas aeruginosa*. The Journal of antimicrobial chemotherapy, 68(8), 1757–1762. https://doi.org/10.1093/jac/dkt094

Nasser, M., Gayen, S., & Kharat, A. S. (2020). Prevalence of β-lactamase and antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the Arab region. Journal of global antimicrobial resistance, 22, 152–160. https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.01.011

Nation, R. L., Velkov, T., & Li, J. (2014). Colistin and polymyxin B: peas in a pod, or chalk and cheese?. Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 59(1), 88–94. https://doi.org/10.1093/cid/ciu213

Neoh, H. M., Tan, X. E., Sapri, H. F., & Tan, T. L. (2019). Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the "gold standard" for bacteria typing and current alternatives. Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases, 74, 103935. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.103935

Nield, B. S., Holmes, A. J., Gillings, M. R., Recchia, G. D., Mabbutt, B. C., Nevalainen, K. M., & Stokes, H. W. (2001). Recovery of new integron classes from environmental DNA. FEMS microbiology letters, 195(1), 59–65. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10498.x

Norman, A., Hansen, L. H., & Sørensen, S. J. (2009). Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences, 364(1527), 2275–2289. https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0037

Olalekan, A., Bader, B. K., Iwalokun, B., Wolf, S., Lalremruata, A., Dike, A., Mannie-Udoh, M., Lo Presti, L., Liese, J., Guther, J., D'alvise, P., & Peter, S. (2023). High incidence of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Lagos, Nigeria. JAC-antimicrobial resistance, *5*(2), dlad038. https://doi.org/10.1093/jacamr/dlad038

Opal, S. M., Mayer, K. H., & Medeiros, A. A. (1995). Mechanisms of bacterial antibiotic resistance: control of antibiotic resistance. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th ed. Philadelphia, Pa: Churchill Livingstone, 212-225..

Ozgumus, O. B., Caylan, R., Tosun, I., Sandalli, C., Aydin, K., & Koksal, I. (2007). MolecuLar epidemiology of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates carrying IMP-1 metallo-β-lactamase gene in a university hospital in Turkey. Microbial Drug Resistance, 13(3), 191-198. https://doi.org/10.1089/mdr.2007.748

Öcal, D.(2012). Gram negatif bakterilerde antibakteriyal direncin fenotipik yöntemler ile tayin ve bildirimi. Ankem dergisi, 26 (3), 154-64. https://doi.org/10.5222/ankem.2012.154

Papp-Wallace, K. M., & Bonomo, R. A. (2016). New β-Lactamase Inhibitors in the Clinic. Infectious disease clinics of North America, 30(2), 441–464. https://doi.org/10.1016/j.idc.2016.02.007

Parsek, M. R., & Geenberg, E. P. (2005). Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. Trends in microbiology, 13(1), 27–33. https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.007

Partridge, S. R., Brown, H. J., Stokes, H. W., & Hall, R. M. (2001). Transposons *Tn*1696 and *Tn*21 and their integrons In4 and In2 have independent origins. Antimicrobial agents and chemotherapy, 45(4), 1263–1270. https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.1263-1270.2001

Patel, T. S., Pogue, J. M., Mills, J. P., & Kaye, K. S. (2018). Meropenem-vaborbactam: a new weapon in the war against infections due to resistant Gram-negative bacteria. Future microbiology, 13(9), 971–983. https://doi.org/10.2217/fmb-2018-0054

Paul, D., Chanda, D. D., Chakravarty, A., & Bhattacharjee, A. (2020). An insight into analysis and elimination of plasmids encoding metallo-β-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of global antimicrobial resistance, 21, 3–7. https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.09.002

Pesci, E. C., Milbank, J. B., Pearson, J. P., McKnight, S., Kende, A. S., Geenberg, E. P., & Iglewski, B. H. (1999). Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 96(20), 11229–11234. https://doi.org/10.1073/pnas.96.20.11229

Philippon, A., Arlet, G., & Lagange, P. H. (1994). Origin and impact of plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamases. European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology, 13 Suppl 1, S17–S29. https://doi.org/10.1007/BF02390681

Pier, G.B. and Ramphal, R. (2010) *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mandell, G.L., Bennett, J.E. and Dolin, R., Eds., Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Disease, 6th Edition, Churchill Livingstone, New York, 2587-2615.

Pitout, J. D., & Laupland, K. B. (2008). Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. The Lancet. Infectious diseases, 8(3), 159–166. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(08)70041-0

Poirel, L., Walsh, T. R., Cuvillier, V., & Nordmann, P. (2011). Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. Diagnostic microbiology and infectious disease, 70(1), 119–123. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002

Poole, K. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. Frontiers in microbiology, 2, 65. https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00065

Popowska, M., & Krawczyk-Balska, A. (2013). Broad-host-range IncP-1 plasmids and their resistance potential. Frontiers in microbiology, 4, 44. https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00044

Pray, L. A. (2008). Transposons: The jumping genes. Nature education, 1(1), 204.

Procop, G. W., Church, D. L., Hall, G. S., & Janda, W. M. (2017). Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Jones & Bartlett Learning. (Color Atlas & Textbook of Diagnostic Microbiology). 7th ed. (Başustaoğlu A, Us D, eds.), Hipokrat Yayınevi

Qin, S., Xiao, W., Zhou, C., Pu, Q., Deng, X., Lan, L., Liang, H., Song, X., & Wu, M. (2022a). *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. Signal transduction and targeted therapy, 7(1), 199. https://doi.org/10.1038/s41392-022-01056-1

Qin, J., Zou, C., Tao, J., Wei, T., Yan, L., Zhang, Y., & Wang, H. (2022b). Carbapenem Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infections in Elderly Patients: Antimicrobial Resistance Profiles, Risk Factors and Impact on Clinical Outcomes. Infection and drug resistance, 15, 2301–2314. https://doi.org/10.2147/IDR.S358778

Rada, A. M., De La Cadena, E., Agudelo, C. A., Pallares, C., Restrepo, E., Correa, A., Villegas, M. V., & Capataz, C. (2021). Genetic Diversity of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Carrying $bla_{\text{VIM-2}}$ and $bla_{\text{KPC-2}}$ Genes That Spread on Different Genetic Environment in Colombia. Frontiers in microbiology, 12, 663020. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.663020

Rashid, M. H., & Kornberg, A. (2000). Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97(9), 4885–4890. https://doi.org/10.1073/pnas.060030097

Rasmussen, T. B., & Givskov, M. (2006). Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. International journal of medical microbiology: IJMM, 296(2-3), 149–161. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2006.02.005

Ravindran, S. (2012). Barbara McClintock and the discovery of jumping genes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109(50), 20198–20199. https://doi.org/10.1073/pnas.1219372109

Recchia, G. D., & Hall, R. M. (1995). Gene cassettes: a new class of mobile element. Microbiology (Reading, England), 141 (Pt 12), 3015–3027. https://doi.org/10.1099/13500872-141-12-3015

Recchia, G. D., & Hall, R. M. (1997). Origins of the mobile gene cassettes found in İntegrons. Trends in microbiology, 5(10), 389–394. https://doi.org/10.1016/S0966-842X(97)01123-2

Rowe-Magnus, D. A., & Mazel, D. (2001). Integrons: natural tools for bacterial genome evolution. Current opinion in microbiology, 4(5), 565–569. https://doi.org/10.1016/s1369-5274(00)00252-6

Roy, D., Huguet, K. T., Genier, F., & Burrus, V. (2020). IncC conjugative plasmids and SXT/R391 elements repair double-strand breaks caused by CRISPR-Cas during conjugation. Nucleic acids research, 48(16), 8815–8827. https://doi.org/10.1093/nar/gkaa518

Ryan, K. J., Lawrence, D. W., Barth, R. L., Andrew, A. J., Reller, M. E., Ahmad, N., Pottinger, P., & Weissman, S. (2019). Sherris Medical Microbiology, (Başustaoğlu A, Us D, eds.), 7. Baskı, Hipokrat Yayınevi, 654-655.

Sabharwal, N., Dhall, S., Chhibber, S., & 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), 125–134.

Salyers, A. A., Whitt, D. D., & Whitt, D. D. (1994). Bacterial pathogenesis: a molecuLar approach (Vol. 1). Washington, DC: ASM press.

Shaver, C. M., & Hauser, A. R. (2004). Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. Infection and immunity, 72(12), 6969–6977. https://doi.org/10.1128/IAI.72.12.6969-6977.2004

Shibata, N., Doi, Y., Yamane, K., Yagi, T., Kurokawa, H., Shibayama, K., Kato, H., Kai, K., & Arakawa, Y. (2003). PCR typing of genetic determinants for metallo-beta-lactamases and integrases carried by Gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. Journal of clinical microbiology, 41(12), 5407–5413. https://doi.org/10.1128/JCM.41.12.5407-5413.2003

Sırıken, B., & Veli, Ö. Z. (2017). *Pseudomonas aeruginosa*: özellikleri ve quorum sensing mekanizması. Gıda ve yem bilimi teknolojisi dergisi, (18), 42-52.

Singh, P. K., Parsek, M. R., Geenberg, E. P., & Welsh, M. J. (2002). A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. Nature, 417(6888), 552–555. https://doi.org/10.1038/417552a

Smit, A. F., & Riggs, A. D. (1996). Tiggers and DNA transposon fossils in the human genome. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93(4), 1443–1448. https://doi.org/10.1073/pnas.93.4.1443

Smillie, C., Garcillán-Barcia, M. P., Francia, M. V., Rocha, E. P., & de la Cruz, F. (2010). Mobility of plasmids. Microbiology and molecular biology reviews: MMBR, 74(3), 434–452. https://doi.org/10.1128/MMBR.00020-10

Soberón-Chávez, G., González-Valdez, A., Soto-Aceves, M. P., & Cocotl-Yañez, M. (2021). Rhamnolipids produced by Pseudomonas: from molecular genetics to the market. Microbial biotechnology, 14(1), 136–146. https://doi.org/10.1111/1751-7915.13700

Soukarieh, F., Williams, P., Stocks, M. J., & Cámara, M. (2018). *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing Systems as Drug Discovery Targets: Current Position and Future Perspectives. Journal of medicinal chemistry, 61(23), 10385–10402. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00540

Souza, G. H. A., Rossato, L., Brito, G. T., Bet, G. M. D. S., & Simionatto, S. (2021). Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains: a worrying health problem in intensive care units. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo, 63, e71. https://doi.org/10.1590/S1678-9946202163071

Stokes, H. W., & Hall, R. M. (1989). A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integation functions: İntegrons. Molecular microbiology, 3(12), 1669–1683. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1989.tb00153.x

Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrener, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrock-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L. L., CouLter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., Larbig, K., … Olson, M. V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. Nature, 406(6799), 959–964. https://doi.org/10.1038/35023079

Sy, S. K., Zhuang, L., Beaudoin, M. E., Kircher, P., Tabosa, M. A., Cavalcanti, N. C., Gunwitz, C., Pieper, S., Schuck, V. J., Nichols, W. W., & Derendorf, H. (2017). Potentiation of ceftazidime by avibactam against β-lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in an in vitro infection model. The Journal of antimicrobial chemotherapy, 72(4), 1109–1117. https://doi.org/10.1093/jac/dkw535

Syed, Y. Y. (2021). Cefiderocol: A Review in Serious Gram-Negative Bacterial Infections. Drugs, 81(13), 1559–1571. https://doi.org/10.1007/s40265-021-01580-4

Şenol, E. (2008). Karbapenemler ve monobaktamlar. Topçu AW., Söyletir G., Doğanay M. (Eds). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 288-293.

Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., PuLcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outterson, K., Patel, J., Cavaleri, M., Cox, E. M., Houchens, C. R., Gayson, M. L., Hansen, P., Singh, N., Theuretzbacher, U.,WHO Pathogens Priority List Working Goup (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tubercuLosis. The Lancet. Infectious diseases, 18(3), 318–327. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3

Telford, G., Wheeler, D., Williams, P., Tomkins, P. T., Appleby, P., Sewell, H., & Pritchard, D. I. (1998). The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecuLe N-(3- oxododecanoyl)-L-homoserine lactone has immunomodulatory activity. Infection and immunity, 66(1), 36-42.

Tennstedt, T., Szczepanowski, R., Braun, S., Pühler, A., & Schlüter, A. (2003). Occurrence of İntegron-associated resistance gene cassettes located on antibiotic resistance plasmids isolated from a wastewater treatment plant. FEMS microbiology ecology, 45(3), 239–252. https://doi.org/10.1016/S0168-6496(03)00164-8

Tenover, F. C., Nicolau, D. P., & Gill, C. M. (2022). Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* -an emerging challenge. Emerging microbes & infections, 11(1), 811–814. https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2048972

Toussaint, K. A., & Gallagher, J. C. (2015). β-lactam/β-lactamase inhibitor combinations: from then to now. The Annals of pharmacotherapy, 49(1), 86–98. https://doi.org/10.1177/1060028014556652

Traczewski, M. M., & Brown, S. D. (2006). In vitro activity of doripenem against *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* isolates from both cystic fibrosis and non-cystic fibrosis patients. Antimicrobial agents and chemotherapy, 50(2), 819–821. https://doi.org/10.1128/AAC.50.2.819-821.2006

Urbanowicz, P., Bitar, I., Izdebski, R., Baraniak, A., Literacka, E., Hrabák, J., & Gniadkowski, M. (2021). Epidemic Territorial Spread of IncP-2-Type VIM-2 Carbapenemase-Encoding Megaplasmids in Nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* Populations. Antimicrobial agents and chemotherapy, *65*(4), e02122-20. https://doi.org/10.1128/AAC.02122-20

Vahaboğlu, H. ve Akhan, S. (2008). *P. aeruginosa* ve diğer Pseudomonas türleri. Topçu A.W., Söyletir G., Doğanay M. (Eds). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2175-2186.

Vallabhaneni, S., Huang, J. Y., Gass, J. E., Bhatnagar, A., Sabour, S., Lutging, J. D., Campbell, D., Karlsson, M., Kallen, A. J., Nazarian, E., Snavely, E. A., Morris, S., Wang, C., Lee, R., Koag, M., Lewis, R., Garcia, B., EIP Work Goup, Brown, A. C., & Walters, M. S. (2021). Antimicrobial Susceptibility Profiles To Predict the Presence of Carbapenemase Genes among Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. Journal of clinical microbiology, 59(6), e02874-20. https://doi.org/10.1128/JCM.02874-20

van der Zee, A., Kraak, W. B., Burggaaf, A., Goessens, W. H. F., Pirovano, W., Ossewaarde, J. M., & Tommassen, J. (2018). Spread of Carbapenem Resistance by Transposition and Conjugation Among *Pseudomonas aeruginosa*. Frontiers in microbiology, 9, 2057. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02057

Vasil, M. L., & Ochsner, U. A. (1999). The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron: genetics, biochemistry and viruLence. Molecular microbiology, 34(3), 399–413. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01586.x

Velkov, T., Roberts, K. D., Nation, R. L., Thompson, P. E., & Li, J. (2013). Pharmacology of polymyxins: new insights into an 'old' class of antibiotics. Future microbiology, 8(6), 711–724. https://doi.org/10.2217/fmb.13.39

Versalovic, J., Koeuth, T., & Lupski, J. R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic acids research, *19*(24), 6823–6831. https://doi.org/10.1093/nar/19.24.6823

von Wintersdorff, C. J., Penders, J., van Niekerk, J. M., Mills, N. D., Majumder, S., van Alphen, L. B., SavelkouL, P. H., & Wolffs, P. F. (2016). Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. Frontiers in microbiology, 7, 173. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00173

Voytas, D. F., & Boeke, J. D. (2007). Ty1 and Ty5 of *Saccharomyces cerevisiae*. Mobile DNA II, 631-662.

Vrancianu, C. O., Gheorghe, I., Dobre, E. G., Barbu, I. C., Cristian, R. E., Popa, M., Lee, S. H., Limban, C., Vlad, I. M., & Chifiriuc, M. C. (2020a). Emerging Strategies to Combat β-Lactamase Producing ESKAPE Pathogens. International journal of molecular sciences, 21(22), 8527. https://doi.org/10.3390/ijms21228527

Vrancianu, C. O., Popa, L. I., Bleotu, C., & Chifiriuc, M. C. (2020b). Targeting Plasmids to Limit Acquisition and Transmission of Antimicrobial

Resistance. Frontiers in microbiology, 11, 761. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00761

Wanke, C. A., Schorling, J. B., Barrett, L. J., Desouza, M. A., & Guerrant, R. L. (1991). Potential role of adherence traits of *Escherichia coli* in persistent diarrhea in an urban Brazilian slum. The Pediatric infectious disease journal, 10(10), 746–751. https://doi.org/10.1097/00006454-199110000-00006

Wessler, S. R. (2006). Eukaryotic transposable elements: teaching old genomes new tricks. The implicit genome, 138-165.

White, P. A., McIver, C. J., Deng, Y., & Rawlinson, W. D. (2000). Characterisation of two new gene cassettes, aadA5 and dfrA17. FEMS microbiology letters, 182(2), 265–269. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb08906.x

Wiener-Kronish, J. P., Sakuma, T., Kudoh, I., Pittet, J. F., Frank, D., Dobbs, L., Vasil, M. L., & Matthay, M. A. (1993). Alveolar epithelial injury and pleural empyema in acute *P. aeruginosa* pneumonia in anesthetized rabbits. Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985), 75(4), 1661–1669. https://doi.org/10.1152/jappl.1993.75.4.1661

Wiener-Kronish, J. P., & Pittet, J. F. (2011). Therapies against virulence products of Staphylococcus aureus and *Pseudomonas aeruginosa*. Seminars in respiratory and critical care medicine, 32(2), 228–235. https://doi.org/10.1055/s-0031-1275535

Wilson, S. G. & Miles, A. A. (1964). Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity.. Edward Arnold (Publishers) Ltd., London, 636–643.

Woods, D. E. (2004). Comparative genomic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* virulence. Trends in microbiology, 12(10), 437–439. https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.08.003

Wozniak, R. A., & Waldor, M. K. (2010). Integative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. Nature reviews. Microbiology, 8(8), 552–563. https://doi.org/10.1038/nrmicro2382

Wozniak, A., Figueroa, C., Moya-Flores, F., Guggiana, P., Castillo, C., Rivas, L., Munita, J. M., & García, P. C. (2021). A multispecies outbreak of carbapenem-resistant bacteria harboring the bla_{KPC} gene in a non-classical transposon element. BMC microbiology, *21*(1), 107. https://doi.org/10.1186/s12866-021-02169-3

Wu, Y. T., Truong, T. N., Tam, C., Mendoza, M. N., Zhu, L., Evans, D. J., & Fleiszig, S. M. J. (2019). Impact of topical corticosteroid pretreatment on susceptibility of the injured murine cornea to *Pseudomonas aeruginosa* colonization and infection. Experimental eye research, 179, 1–7. https://doi.org/10.1016/j.exer.2018.10.010

Xu, Z., Li, L., Shirtliff, M. E., Alam, M. J., Yamasaki, S., & Shi, L. (2009). Occurrence and characteristics of class 1 and 2 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients in southern China. Journal of clinical microbiology, 47(1), 230–234. https://doi.org/10.1128/JCM.02027-08

Xu, Z., Li, L., Shi, L., & Shirtliff, M. E. (2011). Class 1 integron in Staphylococci. Molecular biology reports, 38(8), 5261–5279. https://doi.org/10.1007/s11033-011-0676-7

Yao, J. D. C., & RC, M. Antibakteriyel ajanlar. İn: Murray PR, Boran EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. Manual of Clinical Microbiology. Köksal İ.(Çeviren), 9, 1077-1137.

Zhao, Y., Chen, D., Chen, K., Xie, M., Guo, J., Chan, E. W. C., Xie, L., Wang, J., Chen, E., Chen, S., Chen, W., & Jelsbak, L. (2023). Epidemiological and Genetic Characteristics of Clinical Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strains in Guangdong Province, China. Microbiology spectrum, 11(3), e0426122. https://doi.org/10.1128/spectrum.04261-22

Zhu, Y., Chen, J., Shen, H., Chen, Z., Yang, Q. W., Zhu, J., Li, X., Yang, Q., Zhao, F., Ji, J., Cai, H., Li, Y., Zhang, L., Leptihn, S., Hua, X., & Yu, Y. (2021). Emergence of Ceftazidime- and Avibactam-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* in China. mSystems, 6(6), e0078721. https://doi.org/10.1128/mSystems.00787-21

ETİK KURUL KARARI

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

Etik Kurul Bilgileri	Adı	Kocaeli Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu	
	Adres	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu, 3. Kat, 41380 Umuttepe Yerleşkesi /KOCAELİ	
	Tel / Faks / E-posta	0262 303 74 50 - 0262 303 74 63, gokaetikkurul@kocaeli.edu.tr	
Başvuru Bilgileri	Araştırmanın Adı	Klinik örneklerden izole edilen karbapenem dirençli pseudomonas aeruginosa izolatlarında konjugatif direnç plasmidlerinin moleküler analizi	
	Sorumlu Araştırmacı	Prof. Dr. Osman Birol Özgümüş	
	Sorumlu Arş. Uzmanlığı	Tıbbi Mikrobiyoloji	
	Araştırma Merkez(ler)i	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	
	Destekleyici		
	Araştırmanın Türü		
	Araştırmanın Tipi		
Karar ve Dayanak	**Tarih : 24/03/2022**	**Karar No: KÜ GOKAEK-2022/06.06**	**Proje No: 2022/68**
	Hasta Hakları Yönetmeliği (01.08.1998/23420); Biyoloji ve Tıbbın Uygulanması Bakımından İnsan Hakları ve İnsan Haysiyetinin Korunması Sözleşmesi: İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesinin Uygun Bulunduğuna Dair Kanun (09.12.2003/25311); Biyotıp Araştırmalarına İlişkin İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesine Ek Protokolün Onaylanmasının Uygun Bulunduğuna Dair Kanun (29.03.2011/27899); İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik (13.04.2013/28617); Tıbbi Cihaz Klinik Araştırmaları Yönetmeliği (06.09.2014/29111); Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesi; İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu; Türk Tabipleri Birliği Hekimlik Meslek Etiği Kuralları; Türk Tabipleri Birliği Araştırma Etiği Bildirgesi ilgili maddelerine göre; yukarıda ismi geçmekte olan araştırmacının sorumluluğunda yapılan ve yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler, araştırmanın gerekçesi, amacı, yaklaşım ve yöntemleri, gönüllüler için beklenen yarar ve riskler dikkate alınarak değerlendirilmiş ve araştırmanın ilgili protokol doğrultusunda belirtilen merkezlerde yürütülmesi etik ve bilimsel açıdan, ☒ Uygun bulunmuştur. ☐ Uygun bulunmamıştır. ☐ Kapsam dışı olarak değerlendirilmiştir.		

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