

T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Pseudomonas aeruginosa KLİNİK İZOLATLARINDA
BETA-LAKTAMAZ DİRENÇ GENLERİ İLE İNTEGRONLARIN
BELİRLENMESİ VE BAZI BİTKİ EKSTRELERİNİN DİRENÇLİ
İZOLATLAR ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ESMA AKYILDIZ

TEZ DANIŞMANI

YRD. DOÇ. DR. FATİH ŞABAN BERİŞ

TEZ JÜRİLERİ

PROF. DR. ALİ OSMAN BELDÜZ

PROF. DR. NEŞE KAKLIKKAYA

PROF. DR. ŞENGÜL ALPAY KARAOĞLU

YRD. DOÇ. DR. HAKAN KARAOĞLU

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

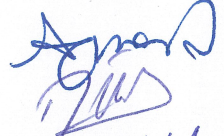

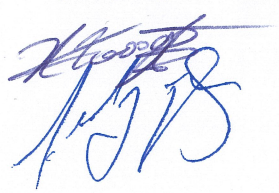
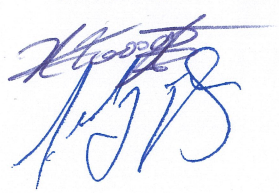
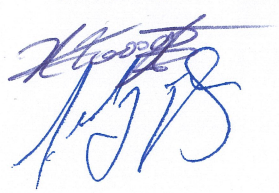
RİZE 2016

Her Hakkı Saklıdır

T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Pseudomonas aeruginosa KLİNİK İZOLATLARINDA BETA-LAKTAMAZ
DİRENÇ GENLERİ İLE İNTEGRONLARIN BELİRLENMESİ VE BAZI BİTKİ
EKSTRELERİNİN DİRENÇLİ İZOLATLAR ÜZERİNE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

Yrd. Doç. Dr. Fatih Şaban BERİŞ danışmanlığında, Esmâ AKYILDIZ tarafından hazırlanan bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla oluşturulan jüri tarafından 28/12/2016 tarihinde Biyoloji Anabilim Dalı'nda **DOKTORA** tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Unvanı Adı Soyadı	İmzası
Başkan	: Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ	
Üye	: Prof. Dr. Neşe KAKLIKKAYA	
Üye	: Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU	
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Hakan KARAOĞLU	
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Fatih Şaban BERİŞ	


Doç. Dr. Ferhat KALAYCI
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ



ÖNSÖZ

Bu çalışma, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi (RTEÜ) Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda “*Pseudomonas aeruginosa* Klinik İzolatlarında Beta-Laktamaz Direnç Genleri ile İntegronların Belirlenmesi ve Bazı Bitki Ekstrelerinin Dirençli İzolatlar Üzerine Etkisinin Araştırılması” başlıklı doktora tezi olarak hazırlanmıştır. Deneysel çalışmalar, üniversitemizin Biyoloji bölümü Moleküler Biyoloji, Kimya bölümü Analitik Kimya ve Biyoteknoloji Laboratuvarında yapılmıştır.

Doktora eğitimim ve tez çalışmalarım sırasında, ilgi ve desteğiyle her konuda bana yardımcı olan hocam ve tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Fatih Şaban BERİŞ'e, antimikrobiyal çalışmalarında deney ve sonuçları değerlendirme aşamasında Prof. Dr. Şengül ALPAY KARAOĞLU'na, bitkilerin ekstraksiyon işlemlerini gerçekleştirmemde yardımlarını esirgemeyen sevgili Havva ER ve Arş. Gör. Emine Selvi KILIÇKAYA'ya ve çalışmalarımda bana destek olan arkadaşlarım Yrd. Doç. Dr. Ayşegül SARAL, Yrd. Doç. Dr. Azer ÖZAD DÜZGÜN, Yrd. Doç. Dr. Yeşim AKTÜRK DİZMAN'a ve tüm RTEÜ Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ve Mikrobiyoloji Laboratuvar çalışanlarına çok teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca her zaman yanımda olan, bana her türlü desteği veren ve yılmadan sabırla bugünlere gelmemde en büyük payı olan çok kıymetli babam Musa AKYILDIZ, annem Asiye AKYILDIZ ve kardeşlerime en içten saygı, teşekkür ve minnetlerimi sunarım.

ESMA AKYILDIZ

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan “*Pseudomonas aeruginosa* Klinik İzolatlarında Beta-Laktamaz Direnç Genleri ile İntegronların Belirlenmesi ve Bazı Bitki Ekstrelerinin Dirençli İzolatlar Üzerine Etkisinin Araştırılması” başlıklı bu tezi Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesindeki hususlara uygun olarak hazırladığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal işlemi kabul ettiğimi beyan ederim.
28/12/2016

Esmâ AKYILDIZ

Uyarı: Bu tezde kullanılan özgün ve/veya başka kaynaklardan sunulan içeriğin kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Pseudomonas aeruginosa KLİNİK İZOLATLARINDA BETA-LAKTAMAZ DİRENÇ GENLERİ İLE İNTEGRONLARIN BELİRLENMESİ VE BAZI BİTKİ EKSTRELERİNİN DİRENÇLİ İZOLATLAR ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Esmâ AKYILDIZ

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Fatih Şaban BERİŞ

Bu doktora tez çalışmasında, 91 *Pseudomonas aeruginosa* klinik izolatında β -laktamaz direnç genleri ve integronlar araştırıldı. Ayrıca dirençli izolatlar üzerinde bazı bitki ekstraktlarının etkileri agar kuyucuk yöntemiyle belirlendi. bla_{TEM} , bla_{SHV} , bla_{CTX-M1} , bla_{CTX-M2} , bla_{GES} , bla_{VEB} , bla_{PER-2} , $bla_{PER-1-3-4-5}$, bla_{PER-6} , bla_{KPC} , bla_{IMP} , bla_{VIM} , bla_{NDM-1} , bla_{OXA-23} , bla_{OXA-40} , bla_{OXA-48} , bla_{OXA-51} , bla_{OXA58} , bla_{GIM-1} , bla_{SIM-1} , bla_{SPM-1} ve bla_{CMY} 'yi içeren β -laktamaz direnç genleri Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile araştırıldı. Sınıf 1 ve Sınıf 2 integronlarını tespit etmek için sırasıyla 5'-CS/3'-CS, hep51/hep74 değişken bölge primerleri kullanılarak PZR yapıldı. PZR çalışmaları sonucunda bla_{TEM-1} , bla_{PER-1} , bla_{VIM-2} , bla_{VIM-38} , bla_{NDM-1} genleri tespit edildi ve baz dizin analizi ile doğrulandı. 91 *P. aeruginosa* izolatının 33'ünde Sınıf 1 integron gen kaseti tespit edildi. Tespit edilen integronların *AacA4*, *AacA4/OXA-2* benzeri, *AAC(6')-Ib/AacA4/AadA7e*, *AacA4/AAC6'IB"*, *GcuD/AAC(6')-I/QacK*, *AacA4/AadA1*, *VIM-38/AAC(6')-Ib/EmrE/aadA1* gen kasetlerini içerdikleri baz dizin analizi ile belirlendi. Bir *P. aeruginosa* klinik izolatında 3,239 bp büyüklüğünde metallo β -laktamaz (MBL) geni içeren yeni bir gen kaseti $bla_{VIM-38}/AAC(6')-Ib/EmrE/aadA1$ gen kaseti tespit edildi. İzolatların hiçbirinde Sınıf 2 integron belirlenmedi. REP-PZR ile tüm izolatlar 9 farklı grup altında toplandı. *Ribes rubrum*, *Prunus divaricata* ve *Duchesnea indica*'nın meyve, *Punica granatum*'un yaprak ve *Vitis vinifera*'nın taze sürgün kısımlarının metanol özütlerinde direnç genleri ve direnç gen kasetlerini taşıyan klinik *P. aeruginosa* suşları üzerine inhibisyon etkisinin bulunduğu belirlendi.

2016, 117 sayfa

Anahtar kelimeler: *Pseudomonas aeruginosa*, β -Laktamaz Direnç Geni, İntegron, İnhibisyon Etkisi.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF BETA-LACTAMASES GENES AND INTEGRON CASSETTES IN *Pseudomonas aeruginosa* CLINICAL ISOLATES AND EFFECTS OF SOME PLANT EXTRACT ON RESISTANT ISOLATES

Esma AKYILDIZ

Recep Tayyip Erdoğan University
Graduated School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology
Ph. D. Thesis
Supervisor: Asst. Prof. Dr. Fatih Şaban BERİŞ

β -lactamase genes and integrons in clinical isolates of 91 *Pseudomonas aeruginosa* were investigated for in this PhD thesis. And also, inhibitory effects of 15 plant extracts on resistant isolates were determined by the agar well method. β -lactamase resistance genes including *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M1}, *bla*_{CTX-M2}, *bla*_{GES}, *bla*_{VEB}, *bla*_{PER-2}, *bla*_{PER-1-3-4-5}, *bla*_{PER-6}, *bla*_{KPC}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-40}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA58}, *bla*_{GIM-1}, *bla*_{SIM-1}, *bla*_{SPM-1} ve *bla*_{CMY} were determined by PCR. Class I and Class II integron cassette were amplified by PCR with 5'-CS /3'-CS and hep51/hep74 variable region primers, respectively. *bla*_{TEM-1}, *bla*_{PER-1}, *bla*_{VIM-2}, *bla*_{VIM-38}, and *bla*_{NDM-1} were determined and verified by DNA sequenced. Class I integron cassette including 91 isolates as *AacA4*, *AacA4/OXA-2* like, *AAC(6')-Ib/AacA4/AadA7e*, *AacA4/"AAC6'IB"*, *GcuD/AAC(6')-I/QacK*, *AacA4/AadA1* and *VIM-38/AAC(6')-Ib/EmrE/aadA1* was found in 33 isolates but no Class II ones. A novel gene cassette array *bla*_{VIM-38/AAC(6')-Ib/EmrE/aadA1} with an metallo β -lactamase (MBL) gene was detected in a *P. aeruginosa* clinical isolate as 3,239 bp. All isolates were classified into 9 different groups by REP-PCR. Extract from fruits, leaves, flowers, and/or young branches parts of 15 different plants were used to determine growth inhibitory effect on resistant isolates. Extract from *R. rubrum* fruit, *P. divaricata* fruit, *D. indica* fruit, *P. granatum* leaf, and *V. vinifera* young branches were observed against clinical *P. aeruginosa* strains which carrying resistance genes and resistance gene cassettes.

2016, 117 pages

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, β -Lactamase, Integron, Inhibitory Effect

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	II
ÖZET	III
ABSTRACT.....	IV
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
TABLolar DİZİNİ.....	XI
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XII
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş	1
1.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
1.2.1. Tarihçesi.....	2
1.2.2. Mikrobiyolojik Özellikleri.....	2
1.2.3. Virülans Faktörleri.....	4
1.2.3.1. Kırpık (Flajella)	4
1.2.3.2. Pili (Fimbria).....	4
1.2.3.3. Lipopolisakkarid	4
1.2.3.4. Aljinat	5
1.2.3.5. Proteazlar	5
1.2.3.6. Fosfolipaz C.....	6
1.2.3.7. Ramnolipid.....	6
1.2.3.8. Ekzotoksin A.....	6
1.2.4. Epidemiyoloji.....	6
1.2.5. Yaptığı Hastalıklar	7
1.2.5.1. Deri ve Yumuşak Doku Enfeksiyonları.....	7
1.2.5.2. Solunum Yolu Enfeksiyonları	7
1.2.5.3. Üriner Sistem Enfeksiyonları.....	8
1.2.5.4. Kemik ve Eklem Enfeksiyonları.....	8
1.2.5.5. Göz Enfeksiyonları	8
1.2.5.6. Kulak Enfeksiyonları	8
1.2.5.7. Santral Sinir Sistemi Enfeksiyonları.....	8

1.2.5.8.	Bakteriyemi ve Endokardit	9
1.2.6.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Enfeksiyonlarında Tedavi.....	9
1.3.	Antibiyotiklerin Sınıflandırılmaları	10
1.4.	Antibiyotik Direnç Mekanizmaları	10
1.4.1.	Doğal Direnç.....	10
1.4.2.	Kazanılmış Direnç ve Mekanizmaları	11
1.5.	Aminoglikozidler	12
1.6.	Florokinolonlar	12
1.7.	β -Laktam Antibiyotikler	13
1.7.1.	β -Laktam Antibiyotiklerin Etki Mekanizması.....	15
1.8.	β -Laktamaz İnhibitörler	16
1.9.	β -Laktamazlar	17
1.9.1.	β -Laktamazların Sınıflandırılması	17
1.9.2.	β -Laktamaz Türleri	19
1.9.2.1.	AmpC Tipi β -Laktamazlar.....	20
1.9.2.2.	Genişlemiş Spektrumlu β -Laktamazlar	20
1.9.2.2.1.	SHV	21
1.9.2.2.2.	TEM	21
1.9.2.2.3.	CTX-M.....	22
1.9.2.2.4.	KPC.....	22
1.9.2.2.5.	OXA.....	22
1.9.2.2.6.	PER.....	23
1.9.2.2.7.	GES.....	23
1.9.2.2.8.	VEB-1, BES-1 ve diğer GSBL'ler.....	24
1.9.3.	Metallo- β -Laktamazlar	24
1.9.3.1.	IMP	24
1.9.3.2.	VIM.....	25
1.9.3.3.	SPM	25
1.9.3.4.	GIM.....	25
1.9.3.5.	NDM.....	26
1.9.3.6.	FIM-1	26
1.10.	İntegronlar ve Gen Kasetleri.....	27
1.11.	Bitki Ekstrelerinin Antimikrobiyal Etkinliklerinin Önemi	32

1.11.1.	<i>Duchesnea indica</i> (Hint çileği)	33
1.11.2.	<i>Diospyros kaki</i> (Trabzon hurması)	33
1.11.3.	<i>Prunus divaricata</i> (Yunus eriği)	34
1.11.4.	<i>Citrus japonica</i> (Kamkat)	35
1.11.5.	<i>Citrus lemon</i> (Limon)	36
1.11.6.	<i>Citrus paradisi</i> (Greyfurt).....	37
1.11.7.	<i>Platanus orientalis</i> (Çınar)	38
1.11.8.	<i>Tilia cordata</i> (Ihlamur)	38
1.11.9.	<i>Equisetum arvense</i> (Atkuyruğu)	39
1.11.10.	<i>Punica granatum</i> (Nar).....	40
1.11.11.	<i>Phytolacca americana</i> (Şekerci otu).....	41
1.11.12.	<i>Plantago major</i> (Damar otu).....	41
1.11.13.	<i>Smilax excelsa</i> (Anadolu saparnası)	42
1.11.14.	<i>Vitis vinifera</i> (Asma).....	43
1.11.15.	<i>Ribes rubrum</i> (Frenk üzümü).....	44
1.12.	Literatür Özeti.....	45
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	48
2.1.	Materyal	48
2.1.1.	Kullanılan Alet ve Ekipmanlar	48
2.1.2.	Sarf Malzemeler (Kimyasallar, Enzimler, Kitler ve Vektörler)	49
2.1.3.	Besiyerlerinin Hazırlanması	50
2.1.4.	Çözeltiler ve Tampon Solüsyonlarının Hazırlanması.....	50
2.2.	Yöntem.....	53
2.2.1.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> İzolatlarının Temini ve Tanısı	53
2.2.2.	<i>P. aeruginosa</i> İzolatlarının Saklanması ve Total DNA İzolasyonu.....	54
2.2.3.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> İzolatlarının 16 S rDNA Dizi Analizi.....	54
2.2.4.	β -Laktamaz Direnç Genlerinin Varlığının Araştırılması	55
2.2.5.	İntegronların PZR ile Araştırılması	57
2.2.6.	Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntüleme	57
2.2.7.	Kompotent Hücrelerin Hazırlanması	58
2.2.8.	PZR Sonucunda Pozitif Çıkan Örneklerin pGEM-T/Easy-1 Vektörüne Klonlanması ve Plazmit İzolasyonu.....	58
2.2.9.	Tekrarlanan Palindromlara Dayalı PZR (REP-PZR).....	59

2.2.10.	Konjugasyon	59
2.2.11.	Bazı Bitki Ekstrelerinin β -Laktamaz Direnç Genleri ve İntegron Gen Kasetlerini Taşıyan <i>P. aeruginosa</i> İzolatları Üzerindeki Etkisinin Araştırılması.....	60
2.2.11.1.	Çalışmada Kullanılan Bitkilerin Temini ve Teşhisi	60
2.2.11.2.	Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması	61
2.2.11.3.	Bitki Ekstraktlarının Agar Kuyucuk Difüzyon Yöntemi ile Direnç Geni İçeren <i>P. aeruginosa</i> 'ya Karşı Antimikrobiyal Aktivite Tayini	62
3.	BULGULAR.....	63
3.1.	Mikrobiyolojik Özellikleri.....	63
3.1.1.	İzolatların Servislere Göre Dağılımı.....	63
3.1.2.	İzolatların Materyallere Göre Dağılımı	63
3.1.3.	İzolatların Antibiyotik Duyarlılıkları.....	64
3.1.4.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> İzolatlarının Antibiyotik Direnç Oranları	69
3.2.	<i>P. aeruginosa</i> İzolatlarının 16 S rDNA Gen DNA Dizi Analizi	69
3.3.	Moleküler Tiplendirme ve Klonal İlişki	69
3.4.	β -Laktamaz Genlerinin Moleküler Yöntemler ile Araştırılması.....	71
3.4.1.	<i>bla</i> _{NDM-1} Geninin PZR ile Araştırılması	71
3.4.2.	<i>bla</i> _{VIM} Geninin PZR ile Araştırılması	72
3.4.3.	<i>bla</i> _{PER} Geninin PZR ile Araştırılması.....	72
3.4.4.	<i>bla</i> _{TEM} Geninin PZR ile Araştırılması	72
3.5.	İntegronların Moleküler Yöntemlerle Araştırılması	73
3.6.	PZR ile Tespit Edilen β -Laktamaz Direnç Genlerinin ve İntegronların Baz Dizin Analizi.....	75
3.7.	Konjugasyon	77
3.8.	Bitki Ekstrelerinin Anti Pseudomonal Aktivitelerinin Araştırılması.....	77
4.	TARTIŞMA ve SONUÇLAR	83
5.	ÖNERİLER.....	94
	KAYNAKLAR	95
	ÖZGEÇMİŞ	116

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	β -laktamların çekirdek yapısı	13
Şekil 2.	β -laktamaz kararlı oksimino sefalosporinler	14
Şekil 3.	Bir β -laktamazla β -laktam antibiyotik Karbapenemin β -laktam halkasının hidrolizi	20
Şekil 4.	Korunmuş integron ve direnç geni taşıyan integron yapısı	32
Şekil 5.	<i>Duchesnea indica</i> (Hint çileği)	33
Şekil 6.	<i>Diospyros kaki</i> (Trabzon hurması)	34
Şekil 7.	<i>Prunus divaricata</i> (Yunus eriği)	35
Şekil 8.	<i>Citrus japonica</i> (Kamkat)	36
Şekil 9.	<i>Citrus lemon</i> (Limon)	37
Şekil 10.	<i>Citrus paradisi</i> (Greyfurt)	38
Şekil 11.	<i>Platanus orientalis</i> (Çınar)	38
Şekil 12.	<i>Tilia cordata</i> (Ihlamur)	39
Şekil 13.	<i>Equisetum arvense</i> (Atkuyruğu)	40
Şekil 14.	<i>Punica granatum</i> (Nar)	40
Şekil 15.	<i>Phytolacca americana</i> (Şekerci otu)	41
Şekil 16.	<i>Plantago major</i> (Damar otu)	42
Şekil 17.	<i>Smilax excelsa</i> (Anadolu saparnası)	43
Şekil 18.	<i>Vitis vinifera</i> (Asma)	44
Şekil 19.	<i>Ribes rubrum</i> (Frenk üzümü)	44
Şekil 20.	<i>P. aeruginosa</i> izolatlarında disk difüzyon yöntemi ile antibiyotik direnç profilinin belirlenmesi	67
Şekil 21.	REP-PZR agaroz jel görüntüsü.	70
Şekil 22.	REP-PZR analizi sonucu Neighbor-Joining metoduyla oluşturulan <i>P. aeruginosa</i> izolatları arasındaki genetik ilişkiyi gösteren dendrogram.	71
Şekil 23.	<i>bla_{NDM-1}</i> geninin % 1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü	71
Şekil 24.	<i>bla_{VIM}</i> geninin % 1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü	72
Şekil 25.	<i>bla_{PER}</i> geninin % 1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü	72
Şekil 26.	<i>bla_{TEM}</i> geninin % 1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü	73
Şekil 27.	Sınıf 1 integronların DNA markır ile % 1'lik agaroz jeldeki görüntüsü	74
Şekil 28.	Sınıf 1 integronların DNA markır ile % 1'lik agaroz jeldeki görüntüsü	74
Şekil 29.	Sınıf 1 integron pozitif PA140 nolu izolatin % 1'lik agaroz jel görüntüsü	74

Şekil 30.	Sınıf 1 integronun korunmuş yapısı	75
Şekil 31.	Bu çalışmada tanımlanan yeni Sınıf 1 integron gen kasetinin yapısı.....	75
Şekil 32.	<i>P. granatum</i> (A), <i>P. divaricata</i> (A), <i>V. vinifera</i> (B) ekstraktlarının PA13 nolu <i>P. aeruginosa</i> suşu üzerindeki inhibisyon etkisi.	78
Şekil 33.	<i>R. rubrum</i> (C), <i>V. vinifera</i> (D), <i>P. divaricata</i> (E), <i>P. granatum</i> (F) ekstraktlarının PA22 nolu <i>P. aeruginosa</i> suşu üzerindeki inhibisyon etkisi	78
Şekil 34.	<i>P. divaricata</i> (G), <i>R. rubrum</i> (H), <i>V. vinifera</i> (I) ekstraktlarının PA36 nolu <i>P. aeruginosa</i> suşu üzerindeki inhibisyon etkisi.....	79
Şekil 35.	<i>V. vinifera</i> (İ), <i>P. granatum</i> (J), <i>P. divaricata</i> (K), <i>R. rubrum</i> (L) ekstraktlarının PA48 nolu <i>P. aeruginosa</i> suşu üzerindeki inhibisyon etkisi	79
Şekil 36.	<i>P. divaricata</i> (M), <i>P. granatum</i> (N) ekstraktlarının PA51 nolu <i>P. aeruginosa</i> suşu üzerindeki inhibisyon etkisi.	80
Şekil 37.	<i>V. vinifera</i> (O), <i>P. divaricata</i> (Ö), <i>R. rubrum</i> (P) ekstraktlarının PA112 nolu <i>P. aeruginosa</i> suşu üzerindeki inhibisyon etkisi.....	80
Şekil 38.	<i>V. vinifera</i> (R), <i>D. indica</i> (S), <i>R. rubrum</i> (Ş) ekstraktlarının PA140 nolu <i>P. aeruginosa</i> suşu üzerindeki etkisi.....	81

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.	Çalışmada kullanılan antipseudomonal antibiyotikler ve sınıfları	10
Tablo 2.	β -laktam antibiyotikler.....	15
Tablo 3.	β -laktamazların sınıflandırılması	19
Tablo 4.	Yaygın integron gen kasetleri ve fonksiyonları.....	29
Tablo 5.	Avrupa klinik sınır değer tablosu.....	54
Tablo 6.	PZR'de kullanılan primerler ve ürün büyüklükleri.....	56
Tablo 7.	PZR reaksiyon karışımının bileşenleri ve miktarları	57
Tablo 8.	Çalışmada antipseudomonal aktivitesi incelenen bitkilerin familya ve tür adları ile test edilen kısımları	61
Tablo 9.	Çalışmada kullanılan <i>P. aeruginosa</i> izolatlarının elde edildikleri yoğun bakım üniteleri ve oransal dağılımı.....	63
Tablo 10.	Çalışma izolatlarının izole edildiği materyallere göre dağılımı.....	64
Tablo 11.	<i>P. aeruginosa</i> izolatlarının antimikrobiyal duyarlılık sonuçları.....	65
Tablo 12.	Antibiyotik direnç oranları.....	67
Tablo 13.	<i>P. aeruginosa</i> izolatlarının çoklu antibiyotik direnç oranları	68
Tablo 14.	Genotip grupları oluşturan izolat tablosu.....	70
Tablo 15.	β -laktamaz direnç genleri ve integron gen kasetleri	76
Tablo 16.	Agar kuyucuk yöntemi ile oluşan zon çapları	82

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Aac(6')-Ib	Aminoglikozid 6'-N-Asetiltransferaz
AAC(6')-I	Aminoglikozid N-Asetiltransferaz
AadA1	Aminoglikozid 3'-Adeniltransferaz
Aad7e	Aminoglikozid Adeniltransferaz Benzeri Protein
AAC6'IB	6'-N-Aminoglikozid Asetittransferaz
AC	Amoksisilin
ACC	Ambler Sınıf C
ACT	AmpC Tipi
aGMI	Asialo-Gangliozid MI
AHL	Açıl Homoserin Lakton
AK	Amikasin
AMP	Ampisilin
AmpC	Ampisilin Sınıf C
APA	Aminopenisilanik Asit
ATP	Adenozin Trifosfat
ATCC	American Type Culture Collection
<i>attl 1</i>	İntegron İlişkili Rekombinasyon Bölgesi
AZT	Aztreonam
BAL	Bronkoalveolar Lavaj
Bp	Baz Çifti
BEL	Belçika Genişlemiş Spektrum Beta Laktamaz
BES	Brezilya Genişlemiş Spektrum
Bla	Beta Laktamaz
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CARB	Karbenisilin Üzerinde Aktif
CAZ	Seftazidim
CFE	<i>Citrobacter freundii</i> kökenli
CLSI	Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü Kuralları
cm	Santimetre
CMY	Sefamisin Direnci
CMT	Kompleks Mutant Kökenli TEM-1

CTX	Sefotaksim
CTX-M	Sefotaksim Hidrolizleyen
DHA	Dhahran Hastanesi
Dk	Dakika
DMSO	Dimetil Sülfoksit
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EcoRI	<i>E. coli</i> RY13
EDTA	Etilendiamin Tetra Asetik Asit
EMB	Eozin Metilen Blue Agar
EmrE	Çoklu İlaç Taşıyıcı
EF-2	Elongasyon Faktör 2
ETA	Endotrakeal Aspirat
EUCAST	Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi
FEP	Sefepim
FIM	Floransa İmipenemaz
FOX	Sefoksitin
FSB	Frozen Storage Buffer
GcuD	OrfD Tipi Kabul Edilen Protein
GES	Guyana Genişlemiş Spektrum
GIM	Alman İmipenemaz
IMI	İmipenem Hidrolizleyen Beta Laktamaz
IMP	İmipenem Üzerinde Aktif Metallo Beta Laktamaz
IND	<i>Chrysebacterium indologenes</i> Kökenli
<i>intl 1</i>	Sınıf 1 İntegraz
IPTG	İzopropiltiogalaktozid
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Karbapenemaz
LAT	Latamofeks Üzerinde Etkili
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolisakkarit
L	Litre
MA	Molekül Ağırlığı
mg	Miligram
MIR	Miriar Hastanesi

MİK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
ml	Mililitre
Mm	Milimolar
MOX	Moksalaktam Üzerinde Etkili
n	Sayı
NAG	N-asetilglukozamin
NAM	N-asetilmuramik Asit
NaOH	Sodyum Hidroksit
NDM	New Delhi Metallo Beta Laktamaz
Nm	Nanometre
OH	Hidroksil
OMP	Dış Zar Proteini
OmpC	Dış Zar Proteini C
OmpF	Dış Zar Proteini F
ORF	Açık Okuma Çerçevesi
OXA	Oksasilinaz Grup Beta Laktamaz
<i>P_{ant}</i>	Gen Kaset Ekspresyonunu Sağlayan Promotor
PBP	Penisilin Bağlayan Protein
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PenP	Beta Laktamaz Öncüsü
PER	<i>Pseudomonas</i> Genişlemiş Direnç
<i>P_{int}</i>	İntegrainin Transkripsiyonundan Sorumlu Promotor
PSE	<i>Pseudomonas</i> Özgü Enzim
PTZ	Piperasilin/Tazobaktam
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
QacK	Kuaterner Amonyum Bileşeni Efluks SMR Taşıyıcı
<i>qacEAI</i>	Kuaterner Amonyum Direnç Geni
REP	Tekrarlanan Palindrom
Rif	Rifampisin
RNA	Ribonükleik Asit
Rpm	Dakikadaki Dönüş Sayısı
S	Saniye
SCP	Sefoperazon/Sulbaktam

SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SHV	Sülfidril Değişken
SIM	Seoul İmipenemaz
SME	<i>Serratia marcescens</i> Enzimi
SMR	Küçük Çoklu İlaç Direnci
<i>SulA</i>	Hücre Bölünmesi İnhibitör Geni
<i>sulI</i>	Sulfonamidlere Direnç Sağlayan Gen
TAE	Tris-Asetik Asit-Etilendiamintetraasetik Asit
TE	Tris-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCA	Trikarboksilik Asit
TEM	Temoniera
VEB	Vietnam Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz
VIM	Verona İntegron Kökenli Metallo Beta Laktamaz
YBÜ	Yoğun Bakım Ünitesi
X-Gal	5-Bromo-4-Kloro-3-İndol-b-D-Galaktozid
B	Beta
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Antibiyotikler, bakterilerin sebep olduğu enfeksiyonlara karşı mücadele etmekte klinik önem taşımaktadır. Fırsatçı bakteriyel bir patojen olan *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*)’da çeşitli mekanizmalara bağlı olarak gelişen antibiyotik direnci tedavide güçlükler yol açmakta ve hızla yayılmaktadır. Direncinin en yaygın türüne β -laktam halkasının hidrolize edilmesiyle β -laktam antibiyotikleri inaktive eden β -laktamaz üreten bakteriler sebep olmaktadır. Bu gibi enzimler β -laktam isimli antibiyotiklerin belirli bir sınıfını inaktive edebilir. Antibiyotik direnci spontan genetik mutasyonlarla ve antibiyotik direnç markırları taşıyan genlerle gelişebilir. Bakteriler β -laktam antibiyotiklere doğal olarak veya diğer bakterilerden direnç genlerini edinerek ya da *de novo* mutasyonla direnç edinebilirler. Direnç genleri integron gen kasetleri içerisinde de yer alabilmektedir. Son zamanlarda patojenik organizmalara karşı artan antibiyotik direnç problemi yeni antibiyotik ajanlar için doğal bitkisel ürünlerin keşfine yol açmıştır.

Bu doktora tez çalışmasında, çoklu ilaç dirençli *P. aeruginosa* klinik izolatlarında β -laktamaz direnç genleri ve integron gen kasetlerinin moleküler yöntemlerle belirlenmesi amaçlandı. Ayrıca bazı bitki ekstraktlarının dirençli izolatlar üzerindeki etkisi araştırıldı. Enfeksiyon etkeni *P. aeruginosa*’nın sahip olduğu direnç mekanizması sebebiyle tedavi seçenekleri sınırlıdır. Yayılımını önlemek için antibiyotik direnç paternlerinin belirlenmesi tedavi protokollerinin geliştirilmesi ve antibiyotik kullanım politikalarının yeniden gözden geçirilmesi için büyük önem taşımaktadır. Bu günlerde bakterilerin antibiyotik direnci artan önemli bir sağlık problemi haline gelmiştir. Bunun için günümüzde yapılan çalışmalarda bitkilerin antimikrobiyal etkileri araştırılarak enfeksiyonlarla mücadele etmekte alternatif yolların oluşturulması amaçlanmaktadır.

1.2. *Pseudomonas aeruginosa*

1.2.1. Tarihçesi

Günümüzde *P. aeruginosa* olarak bilinen fırsatçı bakteriyel patojen, üretilen kültür esnasında karakteristik mavi-yeşil renginden dolayı tarih boyunca çeşitli isimler aldı. Se'dillot 1850'de ilk kez cerrahi yara pansumanlarında mavi renk değişimini transfer edilebilir bir ajanla ilişkilendirdi. Mavi renkten sorumlu pigment 1860'da Fordos tarafından tespit edildi. 1862'de Lucke bu pigmenti ilk kez çubuk şeklindeki organizmalarla ilişkilendirdi. *P. aeruginosa* 1882'ye kadar saf kültür olarak izole edilemedi. Ancak 1882'de Gessard'ın çalışmaları ile saf kültür olarak izole edilmiştir. 1889-1894 tarihleri arasında birkaç raporda *P. aeruginosa* (*Bacillus pyocyaneus*) hastaların yaralarındaki mavi-yeşil irin etkeni olarak nitelendirildi (Lister vd., 2009). 1990'da Migula, Yunanca anlamı yalancı olan 'pseudo' ve birim anlamında kullanılan 'monas' terimlerinden oluşan *Pseudomonas* tanımını cins adı olarak; *Pseudomonas pyocyanea* tanımını ise tür adı olarak kullanmıştır (Beşli, 2013). 1897'de Hitschman ve Kreibich, 1917'de Frenkel ve 1925'te Osler patojen bir bakteri olduğunu tanımlamışlardır. 1926 yılında Dooren de Jong, *Pseudomonas* türlerini, çeşitli organik bileşiklerin karbon ve enerji kaynağı olarak kullanımına dayanan fenotipik özelliklerine göre sınıflandırmıştır (Şen ve Halkman, 2006). 1960'lı yılların sonlarında DNA-DNA hibridizasyon tekniklerinin gelişmesiyle birlikte fenotipik sınıflandırma tanımlanmıştır (Beşli, 2013). 1973 yılında Palleroni ve çalışma arkadaşları, nükleik asit hibridizasyon deneylerini genişleterek *Pseudomonas*'ları rRNA homolojilerine göre 5 gruba ayırmışlardır (Palleroni vd., 1973).

1.2.2. Mikrobiyolojik Özellikleri

Proteobacteria şubesinde, Gamma Proteobacteria sınıfı, Pseudomonadales takımı, Pseudomonadaceae ailesi ve *Pseudomonas* cinsinde yer alan *P. aeruginosa* suda ve toprakta yaşayan nonfermentatif, sporsuz, polar flagellaları ile hareketli, düz veya hafif kıvrımlı, aerob, karakteristik olarak çiftler halinde, 0,5-1,0 µm eninde 1,5-5,0 µm boyunda Gram negatif çomaklardır. *In vitro* koşullarda, inci beyazı koloni görüntüsü ve

kültürlerin çoğunda, triptofandan 2-aminoasetfenon üretimine bağlı olarak üzüm benzeri koku oluşturmaları ile tanınır (Murray vd., 2010; Ustaçelebi, 1999).

P. aeruginosa karbonhidratları fermente etmediğinden glikoz, ksiloz gibi şekerlere oksidatif etki gösterirken maltoz, laktoz, sükroza ve nişastaya etki etmezler. Oksidaz, katalaz, sitrat, L-arjinin dihidrolaz pozitifken, L-lizin dekarboksilaz ve L-ornitin dekarboksilaz negatiftir. Oksidaz pozitif olmaları ile Enterobacteriaceae familyasından ayrılırlar. İndol ve H₂S (hidrojen sülfür) oluşturmaz, metil kırmızısı ve Voges Proskauer testi negatiftir. Asetamini deamine ederek amonyak oluşturur. Nitratı nitrite indirgerler ve koagüle plazma ve jelatini eritip parçalarlar. Potasyum siyanüre dirençlidir (Şen ve Halkman, 2006). Kanlı agarda üreyen klinik izolatlar hemoliz oluştururlar ve sıklıkla beta hemolitiklerdir (Bilgehan, 2004). Optimal üreme sıcaklığı 37°C olan *P. aeruginosa*'nın diğer bazı türleri 42°C'de de ürerler, 4°C'de üremezler (Ustaçelebi, 1999).

Pseudomonas suşlarının çoğu kültür ortamında pigment üretirler. *P. aeruginosa*'nın ürettiği mavi bir pigment olan piyosiyenin (fenazin pigment) hidrojen peroksit ve süperoksidin üretimini katalize eder. Sarı-yeşil bir pigment olan piyoverdin (florasan pigment) demiri bağlayan bir siderofordur. Demirin az olduğu ortamlarda pigment üretimi artmaktadır. *P. aeruginosa*'nın bu iki pigment üretimi ile agar kültürlerinde mavi-yeşil renk oluşturmaları karakteristik özelliğidir (Beşli, 2013; Murray vd., 2010). Pigment oluşumunu açığa çıkarmak için King A ve King B besiyerleri kullanılır. King A besiyerinde yer alan magnezyum klorür ve potasyum sülfat florasan üretimini baskıladığı için kültürlerde gözlenen mavi-yeşil piyosiyenin pigment üretimi türe özgüdür. Daha az oranda tuz içeren King B besiyeri ortamında piyoverdin oluşumu belirginleşir ve ultraviyole ışık altında incelenmesiyle yayılan pigment oluşumu ile karakterize edilir. Piyoverdin suda çözünebilir ve besiyerine diffüze olabilen bir pigmenttir. Suda çözünen ancak kloroformda çözünmeyen bir fenazin pigment olan parlak kırmızı renkteki piyorubin bazı *P. aeruginosa* suşları tarafından üretilir. Piyomelanin, kahverengi-siyah renkli *P. aeruginosa* tarafından üretilen sık gözlenmeyen bir pigmenttir (Şen ve Halkman, 2006).

1.2.3. Virülans Faktörleri

Fırsatçı bir patojen olarak kabul edilen *P. aeruginosa* yapısal bileşenler, toksin ve enzim formunda çok sayıda virülans faktörü salgılayabilmektedir (Driscoll vd., 2007; Moore ve Flaws, 2011).

1.2.3.1. Kirpik (Flajella)

Doku yüzeyi ile ilk etkileşimde rol oynayan önemli bir virülans faktörü olan flajella, hareketliliği de sağlar. Bakterinin adezyonunu epitel hücresi membranı bileşeni olan asialo-gangliozid M1 (aGM1)'e bağlanarak yapar (Karatuna ve Yağcı, 2008). aGM1 ekspresyonunun daha çok epitel hasarı sonrası ve hücre yenilenmesi esnasında gerçekleşmesi, *P. aeruginosa*'nın hasarlı solunum yoluna adhere olma sebebini açıklamaktadır (Moore ve Flaws, 2011; Plotkowski vd., 2001).

Kirpik *P. aeruginosa*'nın kolonizasyonunun başarısından sorumludur ayrıca güçlü immünojen olması sebebi ile kronik *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında konak bağışık yanıtından kaçmak için kirpiksiz mutantlar seçilmektedir (Karatuna ve Yağcı, 2008).

1.2.3.2. Pili (Fimbria)

P. aeruginosa'nın epitellere tutunmadan sorumlu olan piluslar ve hücre yüzeyi yapıları olmak üzere iki tane protein adenizini vardır. *P. aeruginosa*'da seğirme (twitching) şeklinde hareketten sorumludur. Bakteri virülansında rol aldığı ayrıca sitotoksitede etkisi olduğu görülmüştür. Piluslar da tıpkı kirpikler gibi epitel hücre yüzeyinde asitsiz gangliosid reseptörler (asialo GM1) yapılarına bağlanır. (Karatuna ve Yağcı, 2008).

1.2.3.3. Lipopolisakkarid

P. aeruginosa'nın çeşitli suşlarını gruplandırırken lipopolisakkarit (LPS) yapısında, somatik (O) antijenleri kullanılır. *P. aeruginosa* suşları, bazı koşullarda

polisakkarid kapsül yapar. Slaym ya da glikokaliks denen bu yapı alginatla sonlanan ve tekrar eden yapılar şeklinde mannuronik asit ve glukuronik asitten oluşmaktadır. Bakterinin etrafında bir matriks olarak şekillenen bu karbonhidrat konak savunmasından bakteriyi korur. Endotoksik aktiviteden sorumlu lipid A bileşeni organizmanın biyolojik etkisini düzenler. Lipid A diğer bakteri lipopolisakkaritleri gibi organizmanın biyolojik etkisini düzenler (Ustaçelebi, 1999).

1.2.3.4. Aljinat

B-1,4 D-mannuronik asit ve L-glukronik asidin tekrarlayan polimerlerinden meydana gelen ekstraselüler polisakkarittir. Bu yapı mukoid koloninin fiziksel görüntüsünü vermektedir. Mukoid suşlar tarafından aşırı miktarda üretilen aljinat bakteriyi fagositozdan ve antibiyotiklerden korumanın yanı sıra konağın bakteriyeye karşı yanıtını da zayıflatır (Karatuna ve Yağcı, 2008; Pitt vd., 2006; Murray vd., 2010).

1.2.3.5. Proteazlar

P. aeruginosa klinik suşlarında çok sayıda proteaz aktivitesi bilinmektedir. Bunlardan en fazla araştırılan elastaz ve alkalın proteazdır. Elastaz elastin içeren doku hasarından sorumludur. Las A (serin proteaz) ve Las B (çinko metalloproteaz) olmak üzere elastini sinerjistik olarak indirgeyebilen iki enzimden oluşmaktadır. Akciğer parankim hasarına ve hemorajik deri lezyonlarına neden olur. Kronik *Pseudomonas* enfeksiyonların çoğunda elastaza karşı antikor saptanmıştır (Beşli, 2013; Pitt vd., 2006).

Alkalın proteaz ise doku hasarına ve konak bağışık yanıtına etkili etkili olan *P. aeruginosa* yayılımına da neden olur. Proteaz IV özellikle *P. aeruginosa*'nın keratitinin patogenezinine katıldığı bilinmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda proteaz IV'ün sürfaktan proteinleri A, D ve B'yi yıkarak akciğer enfeksiyonlarının patogenezinde de rol aldığı gösterilmiştir (Ustaçelebi, 1999; Murray vd., 2010; Karatuna ve Yağcı, 2008).

1.2.3.6. Fosfolipaz C

Doku hasarını kolaylaştıran fosfolipaz C bir hemolizindir. İki çeşit hemolizini bulunmakta olup fosfolipaz C ısıya duyarlı olan, ısıya dirençli olan ise bir glikolipittir. Her iki madde sinerjik hareket ederek lipidleri ve lesitini hasara uğratar, nekroz yaparak enfeksiyon dokusunun içine girmeye (invazyon) yardım eder (Murray vd., 2010; Ustaçelebi, 1999).

1.2.3.7. Ramnolipid

Isıya dayanıklı olan ramnolipid bir tür hemolizindir. Ramnoz ve beta-hidroksidekanoid asitten ibaret olan ramnolipid deterjan benzeri bir etki göstererek akciğer sürfaktanı fosfolipidlerini çözünür hale getirir ve fosfolipaz C'nin etki etmesine yardımcı olur. Ayrıca mukosilyer taşınımı ve silya fonksiyonlarını inhibe eder (Pitt vd., 2006; Salyers ve Whitt, 1994).

1.2.3.8. Ekzotoksin A

Ekzotoksin A hücre dışı bir enzim olup patojen *P. aeruginosa* kökenleri tarafından üretilen en önemli bir virülans faktörü olduğu düşünölmektedir. Etkisini ökaryotik hücrede elongasyon faktör 2'yi (EF-2) inhibe edip protein sentezini bozarak göstermektedir (Pitt vd., 2006; Wick vd., 1990). İnvazyondan ve doku hasarından sorumlu olan Ekzotoksin A'nın konak yanıtını baskılayıcı özelliği de gösterilmiştir (Vidal vd., 1993; Woods vd., 1983).

1.2.4. Epidemiyoloji

Geniş sıcaklık aralığında üreyebilen *Pseudomonas* türleri farklı besin kaynaklarını kullanabilmeleri sayesinde doğada yaygın olarak bulunmaktadırlar. Çok az besine gereksinim duyarlar. Fiziksel ve kimyasal şartlara ve antibakteriyel ajanlara toleranslı olmaları nedeniyle tehlikeli fırsatçı bir patojen haline gelebilmektedir (Beşli, 2013). Özellikle nemli ortamlarda kolay üreyebilir. *P. aureginosa*, özellikle immün sistemin baskılandığı hastalarda, ağır yanık durumlarında ve yaşlılarda hastalık

oluşturan ve daha çok hastane enfeksiyonlarına (Nazokomiyal) neden olabilen önemli fırsatçı bir patojendir. Birçok antibiyotiğe ve dezenfektana karşı dirençlidir. Solunum destek cihazları, lavabolar, paspaslar, temizleme solusyonları gibi hastanede kullanılan çeşitli ekipman ve malzeme *P. aeruginosa* için rezervuardır (Berthelot vd., 2001; Morrison ve Wenzel, 1984; Pitt vd., 2006).

1.2.5. Yaptığı Hastalıklar

Fırsatçı bir patojen olarak kabul edilen *P. aeruginosa* insanlarda enfeksiyonlara neden olmaktadır (Ustaçelebi, 1999). *P. aeruginosa*'nın neden olduğu başlıca enfeksiyonlar şunlardır:

1.2.5.1. Deri ve Yumuşak Doku Enfeksiyonları

Birincil deri enfeksiyonlarına neden olan *P. aeruginosa* ayrıca yanık enfeksiyonlarında sık etkenlerden biri olarak karşımıza çıkmaktadır. İleri derecede yanığı olan hastalarda yaranın kolonizasyonu, genellikle lokalize damar hasarı, doku nekrozu (doku hasarı) ve ardından bakteriyemi (kana bakteri karışımı) ile sonuçlanmaktadır. Kontamine sularla (havuz, termal sular, jakuziler gibi) temas sonucu gelişen folikülit (kıl kökü iltihapı) veya eklem bölgelerinde dermatit gibi cilt enfeksiyonları görülebilmektedir. *P. aeruginosa* cerrahi alan yaralarında sık izole edilen etkenlerdendir (Pier ve Ramphal, 2005; Pitt vd., 2006).

1.2.5.2. Solunum Yolu Enfeksiyonları

Alt solunum yollarındaki *P. aeruginosa* enfeksiyonları daha çok, konağın lokal solunum ve sistemik savunmasında hasar olduğunda görülür. Kistik fibrozisli hastalar, nötropenili (lökosit azlığı) hastalar ve diğer kronik akciğer enfeksiyonlu hastalarda kolonizasyon sıklıkla görülmektedir. Bu hastalıkları taşıyan insanların örneklerinden izole edilen suşlar genellikle mukoid özellikte ve çoğu antibiyotiğe dirençli olduğundan eradikasyonları zordur (Murray vd., 2010).

1.2.5.3. Üriner Sistem Enfeksiyonları

P. aeruginosa'nın etken olduğu üriner sistem enfeksiyonları birincil olarak uzun süreli üriner katater uygulanan hastalarda görülmektedir. Genellikle hastanede kazanılmaktadır (Murray vd., 2010).

1.2.5.4. Kemik ve Eklem Enfeksiyonları

Penetran yaralanmalar, diyabetik hastalar veya damar içi ilaç kullananlarda hematojen yayılım sonucu kemik ve eklem enfeksiyonları oluşabilir. Septik artritis sık görülmeyen klinik bir tablodur. *P. aeruginosa* enfeksiyonları son zamanlarda artmaktadır (Vahaboğlu ve Akhan, 2002; Pitt vd., 2006).

1.2.5.5. Göz Enfeksiyonları

Lens solüsyonlarının, göze uygulanan ilaçların veya kozmetik malzemenin *P. aeruginosa* ile kontamine olması sonucu konjonktivit (göz iltihabı), keratit, korneal ülserler gibi tablolar görülmektedir (Ustaçelebi, 1999; Pitt vd., 2006).

1.2.5.6. Kulak Enfeksiyonları

P. aeruginosa, yüzmenin önemli bir risk faktörü olduğu yüzücü kulağı olarak da isimlendirilen otitis (orta kulak iltihabı) eksternanın etkeni olarak sıklıkla izole edilmektedir. Ayrıca diyabetli ve yaşlı hastalarda görülen tehlikeli, virülan bir enfeksiyon olan topikal antimikrobiyal tedaviye cevap vermeyen malign (kötü huylu) otitis eksternaya (dış kulak iltihabı) da yol açmaktadır (Vahaboğlu ve Akhan, 2002).

1.2.5.7. Santral Sinir Sistemi Enfeksiyonları

Doku nakli (transplantasyon) hastaları, altta yatan kronik hastalığı olanlar, nörocerrahi geçirmiş hastalar ve yenidoğanlarda *P. aeruginosa*'ya bağlı santral sinir sistemi enfeksiyonu açısından risk altında olan hastalardır (Bilgehan, 2004).

1.2.5.8. Bakteriyemi ve Endokardit

P. aeruginosa'ya bağlı bakteriyemi diğer Gram-negatif bakteriyemilerden klinik olarak ayırlamaz. Bakteriyemi diyabetli, n6topenili, ciddi yanığı olan hastalar veya hematolojik malignensili hastalarda daha sık g6zlenir ve mortalitesi daha y6ksektir. Bakteriyemi genellikle 6st solunum yolu enfeksiyonları, alt solunum yolu enfeksiyonları, deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarından kaynaklanmaktadır. Damar içi ilaç kullananlarda *P. aeruginosa* endokarditi, kontamine olmuş şahsi eşyalar ile enfekte olurlar (Bilgehan, 2004; Ustaçelebi, 1999).

1.2.6. *Pseudomonas aeruginosa* Enfeksiyonlarında Tedavi

P. aeruginosa birçok antibiyotiğe doğal dirençli olmasının yanı sıra kullanımda olan antimikrobiyal ajanlara karşı çok çabuk direnç geliştirebilmektedir. Bu y6zden *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisi oldukça g6t6r. Uygun tedavi hayati 6nem taşımaktadır. Geniş spektrumlu penisilinler (azlosilin, tikarsilin, karbenisilin, mezlosilin, piperasilin), karbapenemler (imipenem, meropenem), monobaktamlar (aztreonam), aminoglikozidler (amikasin, streptomisin, tobramisin, gentamisin), 66nc6 kuşak sefalosporinler (seftazidim, sefoperazon, sefsulodin), florokinolonlar (siprofloksasin, levofloksasin) *Pseudomonas* t6rlerine etkili olan antibiyotiklerdir. Ayrıca kolistin (polimiksin E) oklu dirençli suşların tedavisinde yeni bir alternatif olarak tekrar kullanılmaya başlanmıştır. Aminoglikozidlerin β -laktamlar, 66nc6 kuşak sefalosporinler, monobaktamlar veya karbapenemlerle kombine edilerek hastalara verilmesi tedavide 6nerilir (Pitt vd., 2006; Ustaçelebi, 1999). *P. aeruginosa* izolatlarının etken olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilcek antibiyotiklerin birçoğuna karşı direnç gelişimi hızla artmaktadır. Bundan dolayı uygunsuz antibiyotik kullanımını engellemek için alınan 6nlemler titizlikle izlenmeli, direnç gelişiminin belirli aralıklarla takibine devam edilmeli ve antibiyotik duyarlılık testlerinin sonuçları tedavi planı hazırlanırken mutlaka g6z 6n6ne alınmalıdır (Tunçoğlu vd., 2009).

1.3. Antibiyotiklerin Sınıflandırılmaları

Antibiyotikler çeşitli kriterlere göre sınıflandırılabilir. Günümüzde en fazla kullanılan sınıflandırma kimyasal yapılarına göre (β -laktamlar, aminoglikozitler), etki mekanizmalarına göre (hücre duvarı sentezi inhibitörleri) veya etkili oldukları mikroorganizma türüne göre (bakteri, mantar, virüs) sınıflandırılabilirler. Antibiyotiklerin etki mekanizmalarına göre ise antibiyotikler; bakteri hücre duvar sentezini bozan ve litik enzimleri aktive edenler (β -laktamlar, vankomisinler vb.), sitoplazmik membran geçirgenliğini artırarak etki gösterenler (polimiksinler, siklosporin A, gramisidin, amfoterisin B ve katyonik deterjanlar), ribozomlarda protein sentezini bozanlar (tetrasiklinler, aminoglikozitler, makrolitler, klindamisin, kloramfenikol), DNA ve RNA sentezini bozanlar (florokinolonlar ve rifampin), metabolizmayı inhibe edenler (sulfonamidler ve trimetoprim) bakteriyel antimetabolitler olmak üzere beş gruba ayrılırlar (Kohanski vd., 2010). Çalışmada kullanılan antipseudomonal antibiyotikler ve sınıfları Tablo 1’de yer almaktadır.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan antipseudomonal antibiyotikler ve sınıfları

Antibiyotikler	Sınıfları
β -laktam antibiyotikler	
Seftazidim (CAZ)	3. kuşak sefalosporin
Sefepim (CEP)	4. kuşak sefalosporin
İmipenem (IMP)	Karbapenem
Meropenem (MEM)	
β -laktamaz inhibitörü	Kombinasyonlar
Piperasilin/Tazobaktam (PTZ)	
Sefoperazon/Sulbaktam (SCP)	
Amikasin (AK)	Aminoglikozid
Siprofloksasin (CIP)	Florokinolon

1.4. Antibiyotik Direnç Mekanizmaları

1.4.1. Doğal Direnç

Bir mikroorganizma türünün genetik özelliği olan direnci tanımlamaktadır. Bu direnç mikroorganizmaların türe özgü olarak ilacın hedefi olan yapıyı taşıyamaları veya ilacın yapısal özelliğinden dolayı hedefe ulaşmamasından kaynaklanır. Bir türe ait bütün suşlar bazı antibiyotiklere “intrinsik direnç”, “doğal direnç” gösterebilirler. Doğal

direnç genellikle yapısal ve biyokimyasal özellikler sayesinde bakterinin doğasına bağlı olarak meydana gelmektedir (Ustaçelebi, 1999; Çiftçi ve Aksoy, 2015).

1.4.2. Kazanılmış Direnç ve Mekanizmaları

Bakterilerin genetik özelliklerindeki değişikliklere bağlı olarak eskiden duyarlı olduğu bir antimikrobiyal ajandan etkilenmemesi anlamına gelmektedir. Bakteriler antibiyotiklere belirli bazı mekanizmalarla direnç geliştirirler. Gelişen direnç bakteriden bakteriye dikey (türler arası) ya da yatay (tür içi) olarak konjugasyon, transformasyon ve transdüksiyon aracılığıyla aktarılabilir. Çeşitli yollarla aktarılan antibiyotik direncinin temel mekanizmaları şunlardır (Ustaçelebi, 1999; Çiftçi ve Aksoy, 2015).

1. Hedef enzimde modifikasyonlar ve hedefe ulaşmanın engellenmesi, (kinolonlar, rifampin, β -laktamazlar vb.)
2. Hedefin fizyolojik öneminin azalması,
3. Hedef enzimin duplikasyonu,
4. Metabolik aktivitenin baskılanması,
5. Enzim sentezi
 - a) Antibiyotikleri inaktive eden enzimler (β -laktamazlar vb.),
 - b) Girişi veya reseptöre bağlanmayı engelleyen enzimler (PBP'ler vb.).

Antibiyotik inaktivasyonu; hidrolitik enzimler, grup transferi ve redoks mekanizması ile gerçekleşmektedir. β -laktam antibiyotikler ve kloramfenikol enzimatik yoldan antibiyotiğin inaktivasyonu ile kazanılan direnç en önemli antibiyotik gruplarını oluşturmaktadır. β -laktamazlar etkilerini penisilin ve sefalosporin antibiyotiklerinin β -laktam halkalarını bozarak gerçekleştirirler (Çiftçi ve Aksoy, 2015).

Bakterilerde antibiyotik hedef bölgesinin modifikasyonu sonucunda antibiyotiğin hedefine uygun şekilde bağlanamaması olarak tanımlanan bu mekanizma ile de direnç oluşmaktadır. Bakteriye hücre duvarının peptidoglikan yapısı antibiyotikler için çok uygun hedefleri içermektedir. Bu hedef bölgelerinden en önemlilerinden birisi olarak bakteri hücre duvarı yapısında bulunan penisilin bağlayıcı proteinler (PBP) gösterilmektedir. PBP-3s ve PBP-4s ile ilişkilendirilmiş β -laktam

dirençli *P. aeruginosa* izolatları bildirilmiştir (Strateva ve Yordanov, 2009; Pechere ve Kohler, 1999).

Pseudomonas aeruginosa'nın β -laktam direncinde rol alan β -laktamazlardan sonra en önemli direnç mekanizmaları aktif dışa pompalama (efluks) sistemleridir. *P. aeruginosa*'da MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXYOprM aktif dışa pompalama sistemleri tanımlanmıştır. Bu sistemlerden en iyi tanımlanmış olanı MexAB-OprM'dir (Louis vd., 1999).

Gram negatif bakteriler için dış membran oldukça önemlidir. *P. aeruginosa* dış membranındaki asıl porin proteini OprF dir. OprB, OprC, OprD, OprE yardımcı porin proteinleridir. OprD porin kaybından karbapenemler etkilenir ve sonuçta karbapenem direnci oluşur. Bu durumda meropeneme duyarlılık azalırken, imipeneme direnç ortaya çıkabilir (Akkurt vd., 2002; Nikaido, 1998; Louis vd., 1999).

1.5. Aminoglikozidler

Doğal veya semi-sentetik olan aminoglikozidler aminosiklitol halkasına iki veya daha fazla aminoşekerin glikozid bağlarıyla bağlanmasından oluşmuştur. Aminoglikozidler arasındaki bireysel farklılık aminosiklitol halkaya bağlı aminoşekerlerin yapı ve sayısından kaynaklanmaktadır. *Pseudomonaslar* başta olmak üzere Gram negatif aerob basiller üzerine etkilidirler. Amikasin, kanamisin, gentamisin, streptomisin, neomisin, tobramisin, sisomisin, netilmisin aminoglikozid sınıfında yer alan antibiyotiklerdir (Leblebicioğlu vd., 2003).

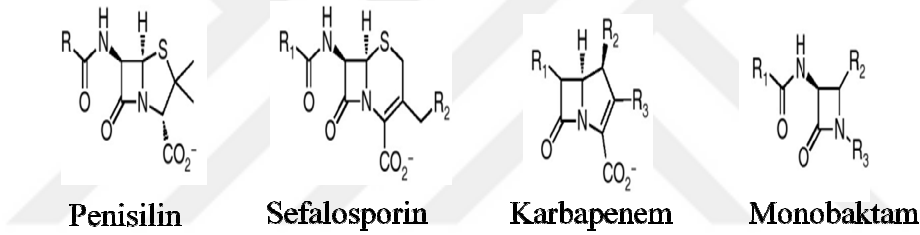
1.6. Florokinolonlar

Tamamen sentetik olarak üretilen florokinolonların yapıları bir kinolon olan nalidiksik aside benzer. Bu grubun en yaygın kullanılan üyesi siprofloksasindir. Siprofloksasin genellikle ampisilin gibi β -laktam antibiyotiklere dirençli enfeksiyonların tedavisinde etkilidirler. Antibakteriyel etkili kemoterapötik olan kinolonların temel çekirdeği iki halkadan oluşmaktadır. Birinci pozisyonda (N), üçüncü pozisyonda

(COOH) ve dördüncü karbon atomunda (O) içeren temel yapı antibakteriyel etki için gereklidir (Leblebicioğlu vd., 2003; Mycek vd., 2001).

1.7. β -Laktam Antibiyotikler

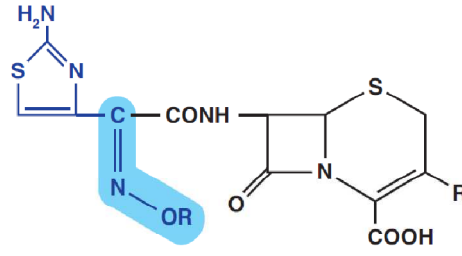
Hücre duvarı sentezini inhibe eden β -laktamlar bu güne kadar geliştirilmiş antibiyotiklerin en başarılı sınıfıdır (Lewis, 2013). β -laktam halkası, üç karbon atomu ve bir azot atomundan oluşan dört üyeli halkasal bir amiddir. Azot atomu karbonil grubuna ait β karbonuna bağlandığından β -laktamlar olarak adlandırılırlar (Şekil 1) (Nicola vd., 2010). β -laktam antibiyotikleri, antimikrobiyal aktivitelerine ve etki spektrumlarına göre penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler, monobaktamlar şeklinde sınıflandırılır. β -laktam antibiyotikler Tablo 2’te verilmiştir.



Şekil 1. β -laktamların çekirdek yapısı (Llarrull vd., 2010).

Penisilinler, konakta düşük toksik etki gösteren en geniş etkiye sahip antibiyotiklerdir. Bir β -laktam halkası, bir tiazolidin halkası ve bir yan zincirden oluşurlar. β -laktam ve tiazolidin halkasının oluşturduğu yapı 6-aminopenisilanik asit (APA) olarak isimlendirilir (Leblebicioğlu vd., 2003; Mycek vd., 2001).

Sefalosporinler 6 üyeli dihidrotiazin halkası (sefem çekirdeği)’na sahiptirler (Şekil 2). Bu yapıyla 5 üyeli tiazolidin halkası içeren penisilinlerden ayrılırlar. PBP’lere bağlanarak hücre duvar sentezini önlerler ve bakterisidal etki gösterirler. Yapılarına ve antimikrobiyal aktivitelerine göre 1., 2., 3., 4. kuşak olmak üzere dört kuşakta incelenirler. Her kuşak içindeki üyeler birbirinden antibakteriyel etkinlik bakımından farklıdır (Leblebicioğlu vd., 2003).



Şekil 2. β -laktamaz kararlı oksiminocefalosporinler. Oksiminocarbonyl grubu mavi renkte işaretlidir. Sefem çekirdeği siyah olarak gösterilmiştir (Cricco vd., 1999).

Karbapenemler, en geniş spektruma sahip β -laktam grubu antibiyotiklerdir. Karbapenemler, penisilinler ve penemlerle benzer yapıdadırlar ancak yapılarındaki sülfür atomu bir karbon atomu ile yer değiştirmiştir ve hidroksietil grubunun bir transkonfigürasyonu vardır. Karbapenemlerdeki bu trans konfigürasyon penisilinler ve sefalosporinlerle karşılaştırıldığında onların gücünü artırır (Jones vd., 2005; Moellering vd., 1989; Mushtaq vd., 2004).

Monobaktamlar, monosiklik β -laktam halkasından oluşur. Hücre duvar sentezini bozarak etki ederler. Bu etkisini PBP3'e bağlanarak oluşturur. Aztreonam bu grubun kullanılan tek üyesidir (Leblebicioğlu vd., 2003; Mycek vd., 2001).

Tablo 2. β -laktam antibiyotikler

Penisilinler	β -laktamaz duyarlı	Benzilpenisilin, Penisilin G, klometisilin, Fenoksimetil penisilin, Penisilin V, Propisilin, Azidosilin, Fenetisilin, Penamesilin, Klemizol penisilin		
	β -laktamaz dirençli	Dikloksasilin, Kloksasilin, Metisilin, Oksasilin, Nafsilin, Flukloksasilin,		
	Geniş spektrumlu	Aminopenisilinler	Ampisilin, Episilin, Siklasilin Amoksisilin, Bakampisilin, Hetasilin, Metampisilin, Talampisilin	
		Karboksipenisilinler	Karbenisilin, Temosilin, Tikarsilin	
Ureidopenisilinler		Azlosilin, Mezlosilin, Piperasilin		
Diğer		Sulbenisilin, Mesilinam		
Sefalosporinler	1. Kuşak	Sefaleksın, Sefaloridin, Sefalotin, Sefazolin, Sefadroksil, Sefazedon, Sefatirizin, Sefapirin, Sefasetril, Sefroksatin, Seftezol		
	2. Kuşak	Sefoksitin, Sefuroksim, Sefamandol, Sefaklor, Sefotetan, Sefonisid, Sefotiyam, Lorakarbef, Sefmetazol, Sefprozil, Seforanid, Sefminoks, Sefbuperazon, Folomoksef		
	3. Kuşak	Sefotaksim, Seftezidim, Sefsulodin, Seftriakson, Sefmenoksım, Latamoksef, Seftizoksım, Sefiksım, Sefodizim, Sefdinir, Sefkapen, Sefditoren Sefetamet, Sefpiramid, Sefoperazon, Sefpodoksım, Sefitibuten,		
	4. Kuşak	Sefepim, Sefpirom, Sefozopran		
Karbapenemler	Meropenem, Ertapenem, Doripenem, İmipenem, Panipenem, Biapenem, Lenapenem, Temopenem, Tebipenem pivoksil, Razupenem, Ritipenem			
Monobaktamlar	Aztreonam, Karumonam, Oksimonam, Kloksimonam, Pirazmonam, Tigemonam			

1.7.1. β -Laktam Antibiyotiklerin Etki Mekanizması

β -laktamlar bakteri hücre çeperi oluşumunu inhibe ederler. Bakteri hücre duvarı peptidoglikan (murein) varlığıyla diğer organizmalarla farklılık gösterir (Llarrull vd., 2010). Peptidoglikan, hücre duvarının rijiditesinden ve hücre şeklinin oluşmasından sorumludur. Peptidoglikan, hücrenin osmotik stabilitesini korumak için N-asetilmuramik asit (NAM), N-asetilglukozamin (NAG) ve oligopeptitten oluşur. Peptidoglikan tabaka, Gram pozitif bakterilerde Gram negatif bakterilerden daha

kalındır. Gram pozitif bakteri dış kısmında büyük bir peptidoglikan tabakayla birlikte bir membran içerir. Gram negatif bakteri iki zar arasında ince bir peptidoglikan tabakadan oluşur. İkinci membran bir zırh olarak görev yapar (Savage, 2001). β -Laktam antibiyotikler penisilin bağlayan proteinler olarak da adlandırılan transpeptidazlara geri dönüşümsüz bağlanır ve onları inaktive eder. PBP'in fonksiyonu peptid köprüleri oluşturmak için komşu oligopeptidleri çapraz bağlar. Bu da rijid hücre duvarlarının oluşmasıyla sonuçlanır (Nicola vd., 2010). Glikozidik birimler olan NAM ve NAG, transglikosidazlar tarafından bağlanır. Pentapeptid her bir NAM ünitesine bağlanır ve NAM pentapeptitlerinin 2 D-alanin-D-alanin çapraz bağlanması PBP proteinler tarafından katalizlenir. β -laktam halkası sterik olarak NAM pentapeptidin D-alanin-D-alanine benzerdir ve PBP'ler hücre duvar sentezi sırasında β -laktamı bir "yapı bloğu" olarak kullanmakta bu, enzimin transpeptidasyon reaksiyonlarını katalize edemeyeceği PBP'nin açılmasına yol açmaktadır (Drawz ve Bonomo, 2010). Hücre duvar sentezi β -laktam antibiyotikleri tarafından inhibe edildiğinde artık peptid köprüler oluşturulamayacak ve bakteri hücre duvarı yüksek iç osmotik basınç yüzünden parçalanacaktır. Antibiyotik ve PBP arasında oluşan kompleks, bakteriyel hücre duvarını sindirme yeteneğinde olan otolizinlerin salınmasını uyarır. Otolizinler, peptidoglikan içeren bakteriler tarafından düşük seviyede doğal olarak üretilmektedir. Peptidoglikan tabaka çok sert olduğu için otolizine ihtiyaç duyarlar. Bu enzimler peptidoglikan tabakayı küçük parçalara böler böylece büyüme ve hücre bölünmesi meydana gelebilir. Otolizinler NAM ve NAG molekülleri arasındaki bağı hidrolize ederler (Kitano ve Tomasz, 1979). β -laktam antibiyotik ile kombinasyon halinde olan otolizinler bakteriyel hücre duvarını yıkmada yardımcı olarak bakterilerin ölümüne neden olurlar (Lewis, 2013).

1.8. β -Laktamaz İnhibitörler

β -laktamaz üreten bakterilerin oluşturduğu enfeksiyonların tedavisinde β -laktamazların etkinliğini sınırlamak için β -laktamaz inhibitörleri (klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam) β -laktamlarla bir arada kullanılmaktadır (Sulton vd., 2005). Klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam benzer etki mekanizmasına sahiptir ve β -laktamızı bağlayarak enzimatik fonksiyonları devre dışı bırakır (Kalp vd., 2009). Bu şekilde β -laktamaz inhibitörleri β -laktamaz üreten bakterilere karşı antibiyotiklerin

öldürücü etkilerinden korunmalarını sağlarlar. β -laktam antibiyotikler gibi β -laktamaz inhibitörleri de β -laktam halkası içerirler. β -laktamaz inhibitörleri β -laktam halkası paylaşımlarına rağmen antimikrobiyal aktivite göstermezler. Onun başlıca işlevi β -laktamaz inhibisyonudur. Antibiyotik ve inhibitör arasındaki benzer kimyasal yapı β -laktamazla moleküler etkileşime izin verir. β -laktamaz inhibitörlerinin etki mekanizması enzimlerin aktif bölgede bir serin rezidüsüne bağlanarak β -laktamaz ile geri dönüşü olmayan bir bağlantı oluşturmaktır. β -laktamaz inhibitör molekülünün yeniden yapılmasıyla çok daha fazla reaktif türler üretilir ve bu şekilde aktif bölgedeki başka aminoasitlere saldırarak onları sürekli olarak inaktive eder ve sonuçta enzim inaktive olur. Bu inhibisyon, β -laktam antibiyotiklerin antimikrobiyal aktivitesini β -laktamaz salgılayan bakterilere karşı geri kazanmasını sağlar (Booth ve McDonald, 1991).

Bu inhibitörler şiddetli enfeksiyonların tedavisinde ortak β -laktamların (amoksisilin, ampisilin, piperasilin ve tikarsilin) etkinliğini büyük ölçüde artırır (Drawz ve Bonomo, 2010).

1.9. β -Laktamazlar

1.9.1. β -Laktamazların Sınıflandırılması

β -laktam antibiyotiklere karşı dirençli olabilen bakteriler β -laktamaz üretmeleriyle, değişmiş PBP tarafından, dış membran proteinlerin (OMP) ifadesini azaltarak ve efluks pompalarıyla belirlenir. β -laktam antibiyotiklere bakteri direncinin en yaygın ve en önemli mekanizması β -laktamaz üretimidir. Bu enzimler β -laktam antibiyotiklere direnç sağlayan bazı bakteriler tarafından üretilir. β -laktamazlar (EC: 3.5.2.6), β -laktam halkasını (siklik amid) bölerek onu hidrolize eder, ilacı zararsız hale getirir. β -laktamazları sınıflandırmada önerilen farklı yollar bulunmaktadır. İlk sınıflandırma düzeni 1968'de Sawai tarafından denenmiştir (Sawai vd., 1968). Gram-negatif bakterilerin β -laktamazları substrat profillerine göre beş grupta toplanmıştır (Richmond ve Sykes, 1973). Aminoasit sekansına dayalı ilk moleküler yapı sınıflandırması 1980'de Ambler tarafından önerilmiştir. Ambler'e göre β -laktamazlar A, B, C ve D olmak üzere dört sınıfta düzenlenmiştir (Ambler, 1980). Bush, klavulanik asitle inhibisyon duyarlılığı yanı sıra enzim substrat ilişkisine (penisilin, oksasilin,

karbenisilin, sefaloridin, geniş spektrumlu sefalosporinler ve imipenem) göre de 1989'da alternatif sınıflandırma önermiştir. Bu sınıflandırma Bush, Jacoby ve Medeiros tarafından 1995'te güncellenmiş ve 2009'da tekrar revize edilmiştir. Ancak Ambler'in moleküler sınıflandırması enzimler arasındaki filogenetik ilişki ve basitliği sayesinde Bush'un fenotip sınıflandırmasına göre geniş ölçüde kabul görmüştür. A ve D sınıfı geniş spektrumlu β -laktamazlar ve daha çok TEM, SHV, CTX-M ve OXA enzimlerinden oluşur. B sınıfı metallo- β -laktamazları ve son olarak C sınıfı Amp C β -laktamazları içerir (Bush vd., 1995). Sınıf B metallo enzimler hariç β -laktamazlar aktif bölgesinde serin bulunduran hidrolazlardır. Sınıf B metallo enzimlerin aktif bölgelerinde çinko bulunmaktadır (Ambler, 1980; Rawlings vd., 2008). β -laktamazların sınıflandırılması Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. β -laktamazların sınıflandırılması. (Rice vd., 2007; URL-1, 2016).

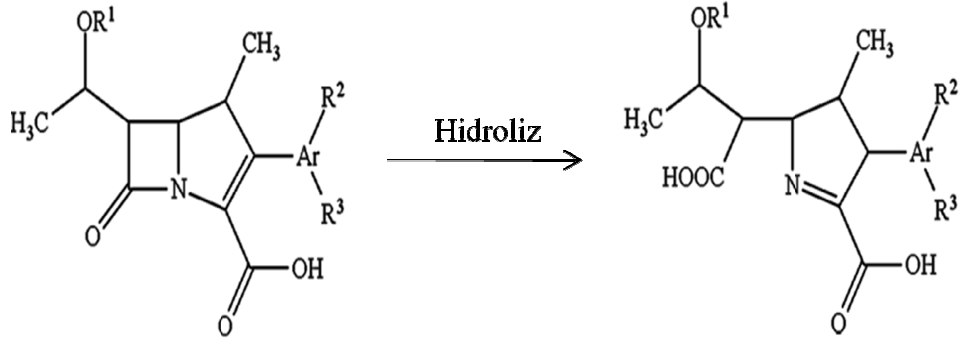
Ambler Sınıfı		Bush-Jacoby Sınıfı	Substrat	Enzim Adı	Alel Sayısı		
Serin	A	2b	Penisilinler, dar spektrumlu sefalosporinler	TEM	223		
Serin				SHV	193		
Serin				CTX-M	172		
Serin				LAP	-		
Serin				PER	8		
Serin				VEB	16		
Serin				BEL	3		
Serin				KPC	24		
Serin				2f	Penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler, monobaktamlar	GES	27
Serin						IMI	11
Serin		SME	5				
Serin		2c	Penisilinler, karbenisilin			CARB	44
Serin		A	Sınıflandırılmamış	penP	-		
Serin		D	2d	Oksasilin, penisilinler	OXA	498	
Serin	C	1	Sefalosporinler	CMY	136		
Serin				FOX	12		
Serin				MOX	11		
Serin				PDC	10		
Serin				ACC	5		
Serin				DHA	23		
Serin				ACT	38		
Serin				MIR	18		
Serin				ADC	81		
Serin				CFE	1		
Serin	LAT	1					
Serin		Sınıflandırılmamış	AmpC	-			
Metallo	B	3	Karbapenemler dahil birçok β -laktam (monobaktamlar hariç)	IMP	53		
Metallo				VIM	46		
Metallo				NDM	16		
Metallo				GIM	2		
Metallo				IND	15		
Metallo				Sınıflandırılmamış	bla2	-	

1.9.2. β -Laktamaz Türleri

β -laktamazlar, AmpC tipi β -laktamazlar, genişlemiş spektrumlu ve metallo- β -laktamazlar olarak alt bölümlere ayrılmıştır.

1.9.2.1. AmpC Tipi β -Laktamazlar

Penisilini parçalayan rapor edilmiş ilk bakteriyel enzim, *E. coli*'nin ürettiği AmpC β -laktamazdır (Abraham ve Chain, 1940). AmpC tipi β -laktamazlar genellikle geniş spektrumlu sefalosporin dirençli Gram negatif bakterilerden izole edilir. *Citrobacter*, *Serratia* ve *Enterobacter* (*Escherichia coli* dahil) gibi birkaç Gram negatif bakteride karakteristik olarak kromozom üzerinde kodlanırlar. GSBL'nin aksine AmpC tipi β -laktamazlar, oxiiimino β -laktamlar yanı sıra sefamisinleri hidroliz ederler ve β -laktamaz inhibitörleri tarafından inhibe edilmezler. Suşlar dış membran porinlerinin yok olmasıyla karbapenemlere dirençli olabilir (Philippon vd., 2002). β -laktamaz üreten suşlar, dış membran porin Omp-K35 kaybı yüzünden aynı zamanda sefamisine de dirençli olabileceği *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) ve *E. coli* izolatlarında rapor edilmiştir. Bu porin hücre içine erişmek için β -laktam antibiyotikler gibi küçük hidrofilik çözünenlere izin veren su dolu bir kanal oluşturur (Ananthan ve Subha, 2005; Delcour, 2009). AmpC tipi β -laktamazlar sefamisin (CMY), sefoksitin (FOX) ve moksalaktam'a (MOX) üretilen dirence göre β -laktamaz terminolojisine uymayan bir şekilde isimlendirilmiştir (Philippon vd., 2002). β -laktam antibiyotik olan Karbapenemin β -laktam halkasının hidrolizi Şekil 3'te verilmiştir.



Şekil 3. Bir β -laktamazla β -laktam antibiyotik olan Karbapenemin β -laktam halkasının hidrolizi (Pfaendler ve Golz, 2013).

1.9.2.2. Genişlemiş Spektrumlu β -Laktamazlar

Genişlemiş spektrumlu β -laktamaz (GSBL)'lar bir oxiiimino grup içeren geniş spektrumlu ve monobaktam antibiyotiklerin β -laktam halkasını hidrolize edebilen β -laktamazlardır. GSBL'ler Ambler sınıflandırmasına göre moleküler sınıf A ve D'de yer almaktadır (Paterson, 2000; Pitout vd., 2005; Tenover vd., 1999). GSBL'ler β -laktamaz

inhibitörleri (klavulanik asit, tazobaktam ve sulbaktam) tarafından inhibe edilebilirler. GSBL'ler diğer antimikrobiyal direnç belirleyiciler ve kromozomal mutasyonlar kodlayan mobil genetik elemanlar nedeniyle florokinolonlar, aminoglikozitler ve trimetoprim-sulfometaksozol gibi diğer antimikrobiyal ajanlara yaygın bir şekilde dirençlidirler (Fennell vd., 2012). Sefamisin ve karbapenemler GSBL üreten bakterilerin çoğuna karşı hala etkilidirler (Paterson, 2000; Philippon vd., 1989).

1.9.2.2.1. SHV

Genellikle plazmid aracılı *E. coli*, *K. pneumoniae* izolatlarında kromozomal olarak kodlanmış penisilinaz SHV-1 yaygın plazmit aracılı β -laktamazdır (Pitout vd.,2005). İlk 1972'de bahsedilen SHV, sülfhidril değişken aktif bölge adını almıştır (Pitton, 1972). Ampisilin, piperasilin ve tikarsiline direnç oluşturmaktadır. Oksimino sefalosporinlere karşı aktivitesi yoktur (Livermore, 1995). 1983'te sefotaksimi hidroliz eden β -laktamazı barındıran SHV-2 diye adlandırılan tek bir aminoasitin değişimiyle ortaya çıkan yeni β -laktamları hidrolize edebilen ilk GSBL SHV-1'in bir çeşiti idi. *E. coli*'ye konjugasyonla aktarılabilen SHV-2 sefotaksim ve seftazidimlere karşı anormal direnç göstermesiyle keşfedilmiştir (Knothe vd., 1983).

1.9.2.2.2. TEM

İlk plazmit aracılı β -laktamaz, kan kültüründen bir tek *E. coli* suşundan izole edilmiş ve 1965'te rapor edilen TEM-1 penisilinaz'dır (Datta ve Kontomichalou, 1965). Temoniera isimli bir yunan hastadan izole edildiği için direnç geni TEM olarak adlandırıldı. TEM-1 *E. coli* gibi organizmalarda en yaygın plazmit aracılı β -laktamaz'dır (Paterson, 2000). TEM-1 plazmid ve transpozon aracılı olarak, diğer bakteri türlerine yayılmasını sağlamıştır. Transpozon Gram negatif bakterilerin çeşitli plazmitleri içine sokulabilen genetik bir elementtir. TEM-1'in ilk izolasyonundan sonra birkaç yıl içinde TEM β -laktamaz tüm dünyada yayılmış ve Enterobacteriaceae üyelerinin birçok farklı türlerinde bulunmuştur. SHV-2'nin belirlenmesinden hemen sonra benzer fenotipli izolatlar 1984'te Fransa'da bir hastanede tespit edilmiştir. Bu durumda SHV-2, TEM-2'nin bir varyantı olarak iki aminoasit değişimiyle TEM-3 adını

almıştır. Bugüne kadar çok sayıda TEM tipi β -laktamaz tanımlanmıştır ve bunların büyük çoğunluğu GSBL'dir (Jacoby vd., 1988; Quinn vd., 1989).

1.9.2.2.3. CTX-M

1990 yılında Münih'de GSBL ailesinde yeni CTX-M β -laktamazlar izole edildi. İsimlendirilmeleri oximinino β -laktam üçüncü kuşak sefalosporin ve sefotaksime karşı büyük aktivitesinden sonra oldu (Bauernfeind vd., 1990). Bu ailedeki enzimlerin çoğu seftazidimden ziyade başlıca sefotaksime direnç kazandırır (bunların ikisi de 3. kuşak sefalosporin) (Bauernfeind vd., 1992). Küçük bir aktif bölgeye sahip CTX-M enzimleri elektrostatik etkileşimlerin geniş ağı ve aktif bölgelerindeki esneklik sayesinde büyük geniş spektrumlu sefalosporinleri tanıyabilirler (Delmas vd., 2010). TEM benzeri ve SHV tipi GSBL'lerin aksine CTX-M β -laktamazlar plazmit aracılıdır. *Kluyvera* türlerinin kromozomunda normal bir şekilde bulunurlar. CTX-M β -laktamazlar TEM veya SHV β -laktamazlarla çok yakın ilişkileri yoktur. Sadece yaklaşık % 40'lık bir benzerlik gösterirler (Karim vd., 2001). Günümüzde CTX-M ailesinde 172 alel bulunmaktadır (URL-1, 2016).

1.9.2.2.4. KPC

İlk *Klebsiella pneumoniae* karbapenemaz (KPC) üreten *K. pneumoniae* izolatı Kuzey Karolina'da 2001 yılında rapor edilmiştir (Yigit vd., 2001). Karbapenemazlar önemli bir karbapenem hidroliz aktivitesine sahiptir. KPC üreten bakteriler, önemli morbidite ve mortaliteyle ilişkili enfeksiyonlara sebep olan çoklu ilaç dirençli Gram negatif basillerde ortaya çıkan bir gruptur (Arnold vd., 2011). Tn3 tabanlı transpozon (Tn4401) üzerinde yer alan Karbapenemaz *bla*_{KPC} geni dünyada hızlı bir şekilde yayılmaktadır. Tn4401, KPC genlerinin yüksek sıklıkta hareket edebildiği aktif bir transpozondur (Cuzon vd., 2011).

1.9.2.2.5. OXA

Oksasilini hidrolize edebilmeleri sayesinde OXA tipi β -laktamazlar olarak isimlendirilirler. Sıklıkla *P. aeruginosa*'da tespit edilen bu enzimler 1991'de Türkiye'de

keşfedilmiştir (Bush vd., 1995; Queenan ve Bush, 2007). OXA β - laktamazlar oksasilin ve kloksasilin penisilin türlerine karşı yüksek hidrolitik aktiviteleriyle karakterize edilirler. *E. coli* içine klonlanan tüm OXA tipi GSBL'ler oksiminosefalosporinlere zayıf dirençli iken *P. aeruginosa* transkonjugantlara oldukça yüksek seviyede direnç sağlarlar (Hall vd., 1993). TEM ve SHV türevlerindeki gibi aminoasit dizilerinde meydana gelen nokta mutasyonları sonucunda oksiminosefalosporinleri hidroliz edebilme yeteneği kazanırlar. Bu şekilde geniş spektrumlu enzimler haline dönüşürler (Livermore, 1995; Nordmann ve Guibert, 1998). Karbapenemler GSBL'lerin neden olduğu ciddi enfeksiyonlar için tedavi seçeneğidir (Rhomborg ve Jones, 2009). GSBL'nin yeni üyelerinden biri OXA-48'tir ve karbapenemaz üretir (Moquet vd., 2011). OXA-48 ilk kez klinik *K. pneumoniae* izolatında İstanbul'da tespit edilmiştir (Poirel vd., 2004). Karbapenemazların çoğu ticari olarak temin edilebilen β -laktamaz inhibitörleriyle inhibe edilemezler (Livermore ve Woodford, 2006; Nordmann ve Poirel, 2002; Walther-Rasmussen ve Hoiby, 2006).

1.9.2.2.6. PER

PER tipi GSBL'lerin homolojileri TEM ve SHV tipi GSBL'lerle yaklaşık % 25-27 benzerlik gösterir. PER-1 tipi β -laktamazlar penisilinleri ve sefalosporinleri etkili bir şekilde hidrolize ederler ve klavulanik asit inhibisyonuna duyarlıdır. PER-1, ilk *P. aeruginosa*'da belirlenmiştir. Türkiye'de *Acinetobacter spp.* izolatlarının % 46'sında ve *P. aeruginosa* izolatlarının % 11'inde PER-1 tespit edilmiştir (Vahaboglu vd., 2001). PER-2, PER-1'e % 86 homolojiyle benzemektedir. PER-2 *S. enterica*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus mirabilis* ve *Vibrio cholerae* O1 El Tor'da belirlenmiştir (Shaikh vd., 2015).

1.9.2.2.7. GES

GES-1 ilk olarak Fransız Guyana bölgesinden Fransa'ya transfer edilen yenidoğan hastasından elde edilen *K. pneumoniae* izolatında tanımlanmıştır. GES-1, penisilinler ve geniş spektrumlu sefalosporinlere karşı hidrolitik aktivite gösterirken sefamisinler ve karbapenemlere karşı hidrolitik aktivite göstermezler ve β -laktamaz

inhibitörler tarafından inhibe edilirler. Bu enzimatik özelliklerle diğer A sınıfı GSBL'lere benzemektedirler (Shaikh vd., 2015).

1.9.2.2.8. VEB-1, BES-1 ve Diğer GSBL'ler

GSBL olan başka enzimler de tanımlanmıştır. BES-1, CME-1, VEB-1, FEC-1, TLA-1, SFO-1 az bulunan bu enzimler değişik coğrafik alanlarda yayılım gösteren diğer genişlemiş spektrumlu β -laktamazlardır (Shaikh vd., 2015).

1.9.3. Metallo- β -Laktamazlar

Japonya'da 1995 yılında *Serratia* izolatından tespit edilen plazmit aracılı gen hakkında endişe verici bir rapor bildirildi. Bu enzim imipenem hidrolize eden β -laktamaz imipenemaz (IMP-1) olarak kodlandı (Ito vd., 1995). Bu metallo- β -laktamaza ait ilk tespit edilen karbapenemaz oldu. Metallo β -laktamazların sahip olduğu yapı onları çoğu β -laktama son derece dirençli hale dönüştürür. GSBL'ler aktif bölgesinde serin içeren hidrolitik mekanizmaya sahipken metallo- β -laktamazlar çinko içeren aktif bölgeye sahiptirler ve EDTA tarafından inhibe edilirler. Metallo- β -laktamazlar öncelikle *P. aeruginosa*'da belirlenmiştir. Ancak Enterobacteriaceae'de β -laktamazların bu grubunda dünya çapında artan sayıda raporlar vardır (Queenan ve Bush, 2007). Her bir metallo β -laktamaz geni integronlar, transpozonlar, plazmitler veya kromozomlar da dahil olmak üzere spesifik genetik elemanlar üzerinde yerleşiktir. Karbapenemlere ve diğer antibiyotiklere dirençliliği ortaya koyan genleri taşırlar ve *P. aeruginosa*'ya çoklu ilaç direncini kazandırır (Hong vd., 2015).

Bundan sonra çok sayıda GIM, SIM, SPM, NDM, KHM, AIM, DIM, SMB, TMB ve FIM MBL'ler bildirilmiştir. *P. aeruginosa*'da IMP, VIM, SPM, GIM, NDM ve FIM tipi varyantlar sürekli bildirilmiştir (Salabi vd., 2012; Wachino vd., 2011).

1.9.3.1. IMP

Transfer edilebilir IMP-1, ilk kez 1988 yılında Japonya'da *P. aeruginosa*'dan izole edilmiştir (Watanabe vd., 1991). Konjugatif plazmid üzerinde yer alan sınıf 1

integron tespit edilmiştir. Daha sonra Gram negatif olmayan türler arasında *bla*_{IMP-1}'in yatay gen transferini düşündüren birçok tür tanımlandı ve aynı zamanda klonal genişleme gösteren IMP üreten izolatların üstünlüğü gösterilmiştir (Queenan ve Bush, 2007). IMP benzeri enzimler birkaç alt gruba ayrılırlar ve bu alt gruplar içerisinde % 90-% 99 arasında aminoasit benzerliği görülmektedir. Bu da onlar arasında çok benzer hidrolitik aktivite olduğunu göstermektedir (Walsh vd., 2005).

1.9.3.2. VIM

VIM (Verona integron kodlayan metallo- β -laktamaz) enzimleri, IMP tipi enzimlerle % 40'dan daha az olan aminoasit benzerliği ile aynı hidrolitik spektrumu paylaşırlar (Nordmann ve Poirel, 2002). VIM-1 ilk kez *P. aeruginosa*'da 1999'da tanımlanmış ve ondan sonra çeşitli ülkelerden diğer Gram negatif türler de bildirilmiştir (Lauretto vd., 1999). VIM-2 *P. aeruginosa*'da en yaygın MBL'dir (Walsh vd., 2005).

1.9.3.3. SPM

P. aeruginosa klinik izolatında Brezilya'da 1997 yılında ilk defa izole edilen SPM-1 (Sao Paulo metallo- β -laktamaz), kolistin hariç mevcut antibiyotiklerin hepsine direnç göstermiştir (Toleman vd., 2002). SPM, VIM ve IMP'den oldukça farklıdır ve MBL'nin yeni bir alt ailesini temsil eder. SPM-1 üreten çoklu ilaç dirençli *P. aeruginosa* dağılımı Brezilya'nın farklı bölgelerinde gösterilmiştir. Ancak bu suşlar, Brezilya'da bir hastanede kalan İsviçreli bir hastada tanımlanan tek bir izolat hariç henüz diğer ülkelerde rastlanmamıştır (Gales vd., 2003; Salabi vd., 2010). *Pseudomonas* ve *Acinetobacter spp.* izolatlarında Brezilya'nın çeşitli hastanelerinden izole edilen *bla*_{SPM-1} geni rapor edilmiştir. Bu ürün Güney Amerika'da görülen yüksek seviyede karbapenem direncine önemli bir katkıda bulunmaktadır. *bla*_{SPM-1} geni hem plazmitle hem de kromozomal olarak kodlanmıştır (Jones vd., 2005).

1.9.3.4. GIM

GIM-1 (Alman imipenemaz), *P. aeruginosa* izolatlarında Almanya'da 2002 yılında tespit edilmiştir. Moleküler analizler GIM-1'in aminoasit sekans benzerliğinin

IMP ve VIM varyantları içeren klinik olarak önemli diğer MBL'lerden % 45'ten daha az olduğunu gösterdi. GIM-1, MBL'lerin yeni bir filogenetik alt sınıfıdır. Başlangıçta bu enzimin sınırlı konak aralığına sahip ve konjugatif olmayan In77 taşıyan 22 kb'lık plazmit sayesinde hareket edebileceği tahmin edilmemiştir (Castanheira vd., 2004). Ancak GIM-1, ayrıca *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas putida*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* ve *Citrobacter freundii* bakterilerinde bulunmuştur. Sınıf 1 integron dizilerinin moleküler analizleri bla_{GIM-1} gen kasetlerinin benzer elemanları (*aacA4*, *aadA1* ve bla_{OXA-2}) paylaştığını göstermiştir (Wendel vd., 2013).

1.9.3.5. NDM

NDM-1 (New Delhi metallo- β -laktamaz), ilk kez 2009'da Hindistan'da New Delhi hastanesinde yatmakta olan bir hastadan elde edilen *K. pneumoniae* ve *E. coli* suşlarından izole edilmiştir (Yong vd., 2009). NDM-1 üreten üreten *P. aeruginosa* suşları ilk defa 2011'de rapor edilmiştir (Jovcic vd., 2011). Daha sonra NDM-1 pozitif *P. aeruginosa* izolatları Sırbistan, Hindistan, İtalya, Mısır, ve Slovakya dahil olmak üzere dünya çapında görülmüştür (Khajuria vd., 2013; Kulkova vd., 2015). bla_{NDM-1} geninin günümüzde kıtalar arası yayılımının yüksek olması büyük endişe yaratmaktadır (Cornaglia vd., 2011).

1.9.3.6. FIM-1

Yeni bir MBL olan FIM-1 (Floransa imipenemaz), 2012 yılında Floransa (İtalya)'da çoklu ilaç dirençli *P. aeruginosa*'dan izole edilmiştir. FIM-1 en yüksek (% 40 aminoasit) NDM- tipi enzimle benzerlik göstermiştir. Bu izolat ST235 epidemik klonal soya aittir. Kinetik parametreler analizi FIM-1'in özellikle penisilinler ve karbapenemler ile geniş bir substrat özgüllüğüne sahip olduğunu göstermiştir. bla_{FIM-1} geni kromozomda yer alır. Kökeni belli değildir (Pollini vd., 2013).

1.10. İntegronlar ve Gen Kasetleri

Hall ve Collis tarafından tanımlanan integronlar bölgeye spesifik rekombinasyon sistemine sahip çoğunlukla direnç genleri taşıyan hareketli gen kasetleri içeren genetik determinantlardır (Hall ve Collis, 1995). Antibiyotik direncini kodlayan genler plazmitler, kromozomlar veya transpozonlar üzerinde yerleşmiş integron isimli hareketli genetik elementler tarafından taşınmaktadır. Bu sayede integronlardaki gen kasetlerine ait antibiyotik direnç genlerinin Gram negatif bakteriler arasında yayılması beklenen bir etkidir. *bla* genleri integronlar sayesinde yayılırlar. Ambler'in A, B ve D sınıflarına ait β -laktamazları taşıyan integronlar *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* ve diğer Gram negatif bakteri türlerinde bulunmuştur (Keramati vd., 2014). İntegronlar iki korunmuş bölge (5'-3') ve korunmuş bölgeler arasında yer alan, çoğunlukla antibiyotik direnç genlerini içeren gen kasetlerinden oluşur. 5' korunmuş bölgede; bölgeye spesifik rekombinasyonu kodlayan integraz geni (*intI*), attI dizisi gen kaseti için reseptör olarak değerlendirilen *intI*'in hemen yakınında yer alan integraz tarafından tanınan spesifik rekombinasyon yeridir. 3'-5' bölgeleri arasında entegre edilmiş mevcut gen kasetinin ekspresyonu için gerekli promotör (P_{ant}) bölge bulunur ve P_1 ve P_2 olmak üzere iki promotör içerir (Zareei vd., 2014). 3' korunmuş bölgede; kuaterner amonyum direnç geni *qacEΔ1*, ORF (açık okuma çerçevesi) bölgesi ve sulfonamidlere direnç sağlayan *sulI* geni bulunmaktadır (Poirel vd., 2001).

İntegronlar, direnç integronları ve süper integronlar olmak üzere iki ana gruba ayrılabilirler. Kromozomlar ya da plazmitler üzerinde yer alabilen direnç integronları çoğunlukla antibiyotiklere ve dezenfektanlara karşı direnci kodlayan gen kasetlerini taşırlar. Kromozomal integronlar süper integronlara ait gen kasetlerini içerirler (Hall ve Collis, 1995). İntegraz genlerinin homolojilerine dayanarak şimdiye kadar tanımlanan çok sayıda integron sınıfı vardır (Arakawa vd., 1995; Boucher vd., 2007). Sınıf 1, 2, 3 direnç integronlarının en iyi bilinen örnekleridir. Direnç integronlarının çoğu sınıf 1'e aittir ve bu integronlar *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Campylobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* cinslerini de içeren çok sayıda Gram negatif bakterilerde tespit edilmiştir (Fluit ve Schmitz, 2004). Sınıf 1 integronlar Tn21 gibi transpozonlar üzerinde tespit edilmişlerdir ayrıca tek veya çok sayıda gen kaseti taşıyan klinik izolatlarda en

yaygın sınıftır (Weldhagen, 2004). Plazmitler üzerinde yerleşmiş Sınıf 1 integronlar konjugasyonla transfer edilebilir (Girlich vd., 2000).

Transpozonlar (sıçrayıcı genler), doğrudan DNA olarak yer değiştirebilen hareketli elementlerdir. Tn7 transpozonlar üzerinde bulunan Sınıf 2 integronlar tam olarak karakterize edilmemiştir. Çalışmalar trimetoprim (*dfrA1*), streptotirisin (*sat*) ve streptomisine (*aadA1*) direnç kodlayan gen kasetleri ve pseudo-integraz gen içeren 5' korunmuş segmentten oluştuğunu göstermektedir. *Acinetobacter*, *Shigella*, *Salmonella* türlerinde bulunmuştur (Hall ve Collis, 1995).

Sınıf 3 integronlar öncelikle Tn5053 transpozon familyasıyla ilişkili olarak tanımlandı. 5' korunmuş bölgede *intI3*, *attI3* ve promotorlar içerir. Sınıf 1 integronlarla benzer yapıda olan Sınıf 3 integronlar Japonya'daki izolatlarda tanımlandı. *P. aeruginosa*, *P. putida*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*'de gösterilmiştir (Arakawa vd., 1995; Fluit ve Schmitz, 2004).

Gen Kasetleri: Gen kasetleri, promotor içermezler. 5' bölgede yer alan promotor, genlerin ifadesi için gereklidir. Kasetler bir veya daha çok sayıda çoğunlukla antibiyotik direnç geni ve 59-baz elementleri (*attC*) olarak tanınan bir ailenin üyesi olan integraz spesifik rekombinasyon bölgesi içerir. İntegraz integrondan gen kasetlerinin eklenmesi ve çıkarılmasını katalizler. Kasetler insersiyon bölgesi olan *attI*'e birbiri ardına sokulabilirler. Genellikle bir bakteride birden fazla integron bulunmakta ayrıca bir integronun içinde çok farklı sayıda gen kaseti yer alabilmekte ve bu da çoklu ilaç direncine neden olmaktadır (Recchia ve Hall, 1997). Gen kasetleri, integronun bir parçası olarak veya ayrı küçük halkasal moleküller halinde olmak üzere iki formda bulunmaktadır. Halkasal formlarında, gen kasetleri; replikasyon orjinleri içermediğinden replikasyon ve ifade yeteneğine sahip değildirler (Stokes vd., 1997). Gen kasetlerinin çok sayıda kombinasyonları rapor edilmiştir (Partridge vd., 2009). İntegronların listesi, integrall veri tabanından edinilebilir (URL-2, 2016) Yaygın integron gen kasetleri ve fonksiyonları Tablo 4'te verilmiştir. Korunmuş integron ve direnç geni taşıyan integron yapısı da Şekil 4'te gösterilmiştir.

Tablo 4. Yaygın integron gen kasetleri ve fonksiyonları (URL-2, 2016).

Gen/Sinonim	Enzim	Fonksiyon	Büyüklik	GenBank No
<i>aacA/ aac(6')</i>	Aminoglikozid 6'-N-asetiltransferaz	Amikasin, dibekasin, isepamisin, sisomisin netilmisin, ve tobramisine karşı direnç kazandırır.	147 aa 209 aa	CUS03345.2 CTQ86036.1
<i>aacC/ aac(3')</i>	Aminoglikozid 3'-N-asetiltransferaz	Dibekasin, neomisin, gentamisin, sisomisin kanamisin, lividomisin, paromomisin, ve tobramisin gibi aminoglikozitlere karşı direnç kazandırır	154 aa 304 aa	AEN55731.1 KKZ87186.1
<i>aacB/ aac(2')</i>	2'-N-asetiltransferaz	Dibekasin, neomisin, gentamisin, sisomisin kanamisin, lividomisin, paromomisin, ve tobramisin gibi aminoglikozitlere karşı direnç kazandırır	177 aa 281 aa	AAA61597.1 SDU57662.1
<i>aadA/ ant(3')</i>	Aminoglikozid 3'-adeniltransferaz	Streptomisin ve spektinomisine karşı direnç kazandırır.	58 aa 336 aa	CAA33851.1 AMK48966.1
<i>aadB/ ant(2')</i>	Aminoglikozid 2'-adeniltransferaz	Kanamisin, gentamisin, tobramisin, dibekasin ve sisomisine karşı direnç kazandırır	29 aa 249 aa	CAA45720.1 AFQ60593.1
<i>aphA</i>	Aminoglikozid 3'-fosfotransferaz	Gentamisin, kanamisin, lividomisin, neomisin, paramomisin ve ribostamisine karşı direnç kazandırır.	237 aa 343 aa	CCI74656.1 AEV65809.1
<i>blaAmpC</i>	Sınıf C β -laktamaz AMPC	Oksiiimino β -laktamlar ve sefamisinlere karşı direnç kazandırır	69 aa 371 aa	CEE15334.1 AAS46851.1
<i>blaBEL</i>	Geniş spektrumlu sınıf A β -laktamaz	Geniş spektrumlu sefalosporinler ve aztreonam dahil olmak üzere β -laktamlara karşı direnç kazandırır.	283 aa	ANM44757.1
<i>blaCTX-M</i>	Sınıf A β -laktamaz	Seftazidim gibi β -laktamlara karşı direnç kazandırır.	131 aa 291 aa	AMO65332.1 AOA70434.1
<i>blaDHA</i>	Plazmid kodlayan sınıf C β -laktamaz	β -laktam antibiyotiklere direnç kazandırır.	379 aa	ADM51921.1
<i>blaESP</i>	Geniş spektrumlu β -laktamaz	β -laktam antibiyotiklere karşı direnç kazandırır.	246 aa	BAA23768.1

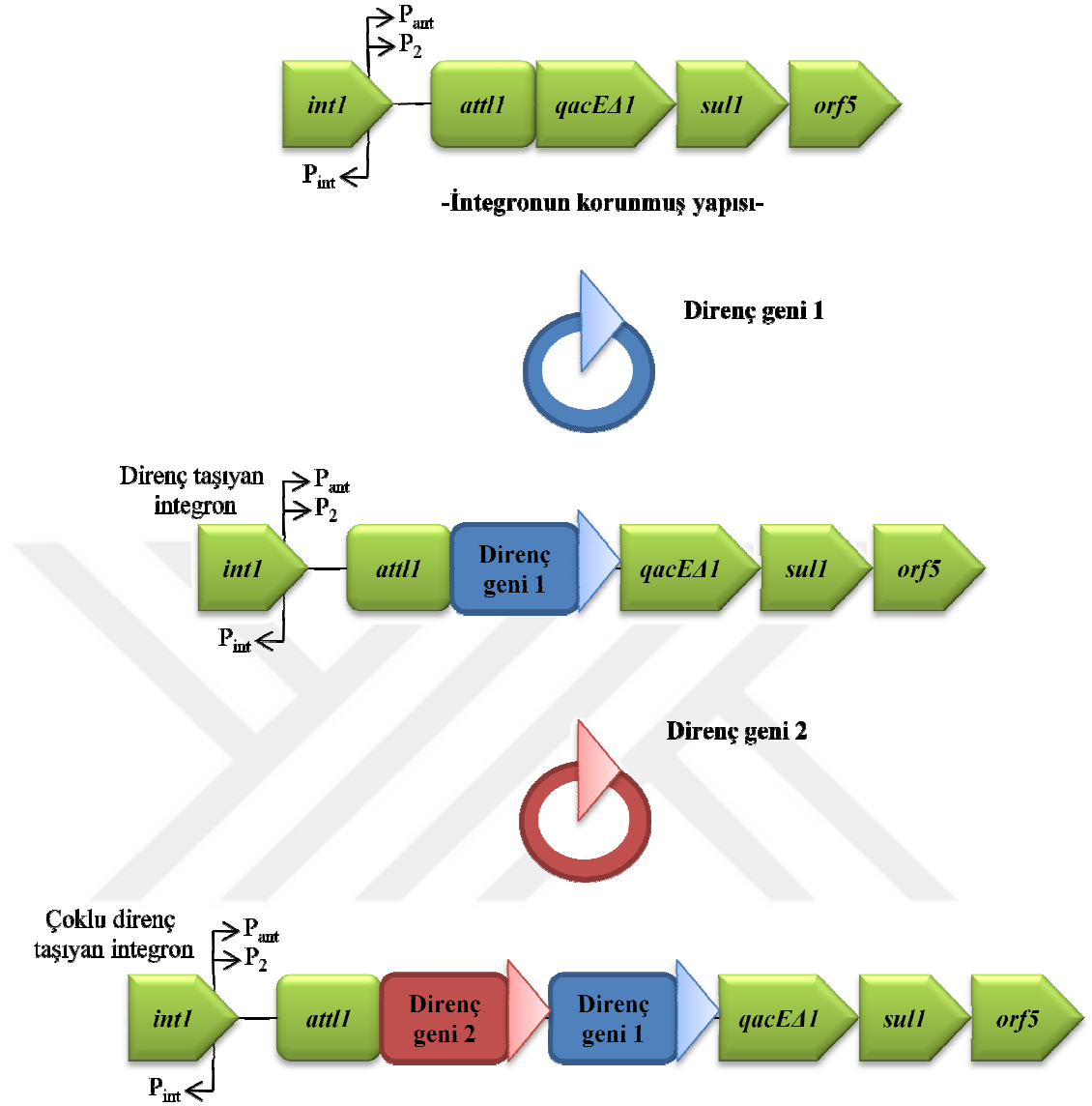
Tablo 4 (devam). Yaygın integron gen kasetleri ve fonksiyonları (URL-2, 2016).

<i>blaGES</i>	Geniş spektrumlu sınıf A β -laktamaz	Geniş spektrumlu sefalosporinler (seftriakson, sefotaksim ve seftazidim), aztreonam ve oksiiimino β -laktamlarla ilişkili β -laktam antibiyotiklere karşı direnç kazandırır.	287 aa	ALC74967.1
<i>blaIBC/blaGES-7/-8</i>	Geniş spektrumlu β -laktamaz	Geniş spektrumlu sefalosporinler (seftriakson, sefotaksim ve seftazidim), aztreonam ve oksiiimino β -laktamlarla ilişkili β -laktam antibiyotiklere karşı direnç kazandırır.	287 aa	AAP22974.1
<i>blaIMP</i>	Sınıf B β -laktamaz (metallo β -laktamaz)	Monobaktamlar hariç β -laktam antibiyotiklere karşı direnç kazandırır.	246 aa	BAB71948.1
<i>blaOXA</i>	Sınıf D β -laktamaz (oksasilinaz)	Ampisilin, sefalotin, oksasilin ve kloksasilin gibi β -laktam antibiyotiklere karşı direnç kazandırır.	219 aa	AFQ62610.1
<i>blaPI</i>	PSE-1/CARB-2 β -laktamaz	Karbenisilin içeren β -laktam antibiyotiklere karşı direnç kazandırır.	288 aa	ABI50479.1
<i>blaSHV</i>	Sınıf A β -laktamaz	β -laktam antibiyotiklere karşı direnç kazandırır	239 aa	ADY02604.1
<i>blaVEB</i>	Geniş spektrumlu sınıf A β -laktamaz	Geniş spektrumlu sefalosporinler (seftriakson, sefotaksim ve seftazidim), aztreonam ve oksiiimino β -laktamlarla ilişkili β -laktam antibiyotiklere karşı direnç kazandırır.	209 aa	ANQ47251.1
<i>blaVIM</i>	Sınıf B β -laktamaz (metallo β -laktamaz)	Monobaktamlar hariç β -laktam antibiyotiklere karşı direnç kazandırır.	266 aa	AID37278.1
<i>blaTEM</i>	Sınıf A β -laktamaz	Penisilinler ve sefalosporinlere karşı direnç kazandırır.	286 aa	ALJ52334.1
<i>blaTLA</i>	GSBL sınıf A β -laktamaz	Sefotaksim, seftazidim ve aztreonam dahil β -laktam antibiyotiklere karşı direnç kazandırır.	301 aa	ADM26831.1
<i>Dfr/ Dhfr</i>	Dihidrofolat redüktaz	Trimetoprim karşı direnç kazandırır.	115 aa	BAH04243.1

Tablo 4 (devam). Yaygın integron gen kasetleri ve fonksiyonları (URL-2, 2016).

<i>Qac</i>	Dörtlü amonyum bileşenlerine direnç proteini	Dörtlü amonyum bileşenlerine karşı direnç kazandırır.	107 aa	AAB47993.1
<i>Qnr</i>	Florokinolon direnç proteini	Florokinolonlara karşı direnç kazandırır.	169 aa	AAY56091.1





Şekil 4. Korunmuş integron ve direnc geni taşıyan integron yapısı. *intl* 1 (Sınıf 1 integras) ve *attl* 1 (integron ilişkili rekombinasyon bölgesi) 5' korunmuş bölgede yer alır. 3' korunmuş bölgede *qacEA1* (kuaterner amonyum direnc geni), ORF (açık okuma çerçevesi) ve *sulI* (sulfonamidlere direnc sağlayan gen) bulunmaktadır. P_{ant} gen kaset ekspresyonunu sağlayan promotör. P_{int} integrasın transkripsiyonundan sorumludur. P_2 daha zayıf P_{ant} promotörleriyle integronlarda tanımlanan ikinci promotördür. Gen kasetleri 1 ve 2 integronlar tarafından yakalanıp entegre edebilen farklı antimikrobiyal ajanlara direnc kazandıran gen kasetlerini ifade eder (Carattoli, 2001; Fluit ve Schmitz, 1999).

1.11. Bitki Ekstrelerinin Antimikrobiyal Etkinliklerinin Önemi

Son zamanlarda patojenik organizmalara karşı artan antibiyotik direnc problemi yeni antibiyotik ajanlar için doğal bitkisel ürünlerin keşfine yol açmıştır Eskiden beri,

halk arasında kullanılan bazı bitkiler çeşitli hastalıkların tedavisi için kullanılmaktadır. Geleneksel tıbbın bu sistemi gelişmiş ülkelerin çoğunda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu bitkiler aktif bileşenlere sahiptir ve bu bileşenler onlara tıbbi değer kazandırır.

Bu çalışmada kullanılan 15 bitkinin özütleri hazırlanırken meyve, yaprak, çiçek ve/veya taze sürgün kısımları kullanıldı.

1.11.1. *Duchesnea indica* (Hint çileği)

Asya, Avrupa ve Amerika'da yaygın olarak dağılım gösteren *Duchesnea indica*, Rosaceae familyasına ait nemli ve gölgeli alanlarda yetişen bir yıllık, üç yapraklı, sürünücü bir bitkidir. Asya'da binlerce yıldır konjenital ateş, doku iltihabı, hematemez ve kanser hastalıklarında geleneksel bitkisel ilaç olarak kullanılmıştır (Zhu vd., 2015). Bitkilerin hemen hemen hepsinde bulunan fenolik bileşikler aromatik halka üzerinde aromatik grup ve bir veya daha fazla hidroksil grup içeren geniş spektrumlu molekülleri kapsar (Martins vd., 2011). Fenolik asitler, ellacik asitler ve flavonoidler dahil birkaç fenolik bileşik *Duchesnea* cinsinden izole edilmişlerdir. Ayrıca farmakolojik çalışmalar fenolik bileşenlerin en aktif bileşenler olduğunu göstermiştir (Zhu vd., 2015).



Şekil 5. *Duchesnea indica* (Hint çileği)

1.11.2. *Diospyros kaki* (Trabzon hurması)

Ebenaceae familyasında yer alan 12 m yükseklikte ve 7 m çapında ölçülere sahip olan *D. kaki* türü yaprak döken bir ağaçtır (Singh ve Joshi, 2011). Anavatanı Çin ve Japonya'dır. Türkiye'de Karadeniz, Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde yetiştirilir (Güner vd., 2012) (Şekil 6). Son yıllarda Trabzon hurması tıbbi

uygulamalarda kanser, viral ve bakteriyel enfeksiyonları önlemek için ilgi odağı olmuştur (Arakawa vd., 2014).

Trabzon hurma yaprağının aktif bileşenleri uçucu yağın varlığı, total flavonoid, kumarinler ve organik asit gıda bozulmaları ve gıda kaynaklı patojenlere karşı antimikrobiyal aktiviteden sorumludurlar (Singh ve Joshi, 2011). Yapraklar 40-dihidroksi-a-truksilik asit taarin C, mirisetin, anulatin, trifolin, astragalin, hiperin, izokuersetin, rutin, kuersetin kamferol ve kakispiyon ve kaki saponin içerdiği rapor edilmiştir (Chen vd., 2007).

Trabzon hurması (100 g taze meyvede) - su, 80.3 g; protein, 0.58 g; total lipid, 0.19 g; toplam karbonhidrat, 18.6 g; toplam diyetel lif, 1.48 g; ve bazı mineraller, yani, magnezyum, demir, çinko, bakır ve manganez içerir. Askorbik asit (7,5 mg'a kadar), karetenoidler (özellikle kriptoksantin, zeaksantin ve karoten), polifenoller, polifenollerin spesifik bir grubu (taninler), kateşin ve gallokateşin gibi antioksidanlar Trabzon hurmasında yüksek konsantrasyonda bulunmuştur (Gorinstein vd., 2007).



Şekil 6. *Diospyros kaki* (Trabzon hurması)

1.11.3. *Prunus divaricata* (Yunus eriği)

Prunus divaricata yaygın isimleri cherry plum ve myrobalan plum olarak bilinen bir erik türüdür. Gülgiller (Rosaceae) familyasından Avrupa ve Asya'da doğal olarak yetişen bu tür, Kuzey Amerika'da sonradan dikilerek yetiştirilen dağınık yerleşmiş bir ağaç türüdür. Büyük çalılar veya küçük ağaçlar 6-15 m yüksekliğe ulaşırlar. Kışın yaprak döken ağaçlardır. Avrupa'da ilkbaharda genellikle Şubat ayı ortalarında ilk çiçek açan ağaçlardan biridir. Çiçekler beyaz ve yaklaşık 2 cm'dir. Beş taç yaprağa sahiptir. Meyve sarı veya kırmızı renkte 2-3 cm kalınlığında sert çekirdeklidir. Temmuz'un

başından Eylül ayının ortalarına kadar olgunluğa ulaşan yenilebilir bir meyvedir. Yunus eriği çok erken çiçeklendiği için yetiştirilen bahçe ve peyzaj kullanım için popüler bir süs ağacıdır (URL-4, 2016).

P. divaricata antosiyaninlerce zengindirler ve organik asitler, pektin, mineral madde ve tüm aminoasitleri bol miktarda içerirler. Meyvenin kabuğu bol miktarda doğal antosiyanin içerir. Antosiyaninler çoğu vasküler bitkilerde mevcut ve zararsız olan suda çözülebilen renklendiricilerdir. *In vitro* ve hayvan deneylerinde antosiyaninler C ve E vitaminlerinden daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiler ayrıca kanserin gelişmesini inhibe etmede ve arterosklerozisi önlemede de önemli rol oynarlar. Doğada antosiyaninler arasında büyük bir çeşitlilik bulunabilir. Antosiyaninler antosiyanidinlerin glukozit türevlerine, ve glukoz, galaktoz, ramnoz, ksiloz veya bir aglikon çekirdeğe bağlı arabinoz kısımlarından oluşabilir (Wang vd., 2012). *Prunus divaricata*'nın görüntüsü Şekil 7'de verilmiştir (URL-5, 2016).



Şekil 7. *Prunus divaricata* (Yunus eriği)

1.11.4. *Citrus japonica* (Kamkat)

Rutaceae familyasına ait bir meyvedir. Tohum hariç, kabuğu ile birlikte bütün meyve çiğ olarak yenir. Meyve kabuğu flavonoidler ve terpenoidler sayesinde tipik aromasıyla tatlı ve yenilebilir bir meyvedir. Kamkatlar ayrıca askorbik asit, karotenoidler, flavonoidler ve uçucu yağlar da dahil fitokimyasalların ve besinlerin önemli bir kaynağıdır (Koyasako ve Bernhard, 1983).

F. crassifolia Swingle türü bilim dünyasında *Citrus japonica* türünün sinonimi olarak kabul edilmiştir (URL-3, 2016). *F. crassifolia*, flavonoidlerce zengindir. Karakteristik bir flavonoid 3',5'-di-C- β -glukopiranosilfiloretin önceden *Fortunella*

cinsinde ayrıntılı olarak çalışılmıştır (Ogawa vd., 2001). Son zamanlarda, *F. crassifolia*'nın antioksidan aktivitesi bildirilmiştir (Kondo vd., 2005). Ancak *F. crassifolia* kabuk yağının kimyasal bileşenleri ve biyolojik aktiviteleri üzerindeki çalışmalar sınırlıdır (Schirra vd., 2008). *Citrus* türleri esansiyel yağlar çekici aroması, böcek ve hayvanlara karşı itici bir madde ve antioksidan aktiviteler gibi çeşitli fonksiyonel özelliklere sahiptirler (Subba ve Soumithri, 1967).

Citrus türleri sadece gıda endüstrisi için değil aynı zamanda Gram negatif ve Gram pozitif bakterilere karşı hem yağ hem de buhar formunda inhibitör olduğu tespit edilmiştir (Fisher ve Phillips, 2008). Ayrıca, gıda endüstrisinde antimikrobiyal maddeler için kaynak geliştirmek amacıyla antimikrobiyal özellikleri ile ilgili bitkisel uçucu yağlar hakkında çok sayıda çalışma vardır (Mkaddem vd., 2009; Salleh vd., 2011) (Şekil 8).



Şekil 8. *Citrus japonica* (Kamkat)

1.11.5. *Citrus lemon* (Limon)

Rutaceae familyasına ait önemli tıbbi bir bitkidir. Ham ekstraktın yaprak, çiçek ve kök gibi farklı kısımlarında antikanser aktiviteler ve antibakteriyel potansiyele sahip olan başlıca alkaloidler için yetiştirilmektedir. *Citrus* türleri flavonoidler antibakteriyel, antifungal, antidiyabetik, antikanser ve antiviral faaliyetleri de dahil olmak üzere biyolojik aktivitenin geniş bir spektrumuna sahiptirler. Flavonoidler doğrudan antioksidanlar ve serbest radikal temizleyiciler olarak görev yapabilirler ve enzimatik aktivitelerini modüle eden ve hücre çoğalmasını inhibe etme kapasitesine sahiptirler. Bitkilerde, flavonoidler bakteri, mantar ve virüslere karşı bir savunma rolü oynarlar. *Citrus lemon* meyvesinin kabuğu flavonoid glikozidler, kumarinler, β ve γ -sitosterol, glikozidler ve uçucu yağların zengin bir kaynağıdır (Şekil 9). *Citrus lemon* meyvesi

aynı zamanda polifenoller gibi biyoaktif bileşenler içerirler, C vitamini bakımından zengindirler. Meyve kabuğunun antimikrobiyal aktivitesi içerdikleri bileşenlerle doğrudan ilişkilidir. Çalışmalar uçucu yağlar, protopin, koridalin alkaloidler, poliasetilen, asiklik seskuiterpenler, hiperisin ve psödohiperisin bileşenlerinin çeşitli bakterilere karşı etkili olduklarını göstermiştir. Bununla birlikte alkoller, aldehytler ve esterlerin yanı sıra diğer aktif terpenler uçucu yağların antimikrobiyal etkilerine katkı sağlayabilirler. Etanol, metanol ve aseton gibi farklı çözücülerde hazırlanmış limon kabuğu ekstraktlarının antimikrobiyal deneyleri yapıldı. Etanol çözücüsünde hazırlanmış ekstrakt metanol ve aseton çözücülerinde hazırlanmış olanlara göre test edilmiş mikroorganizmalara karşı yüksek antimikrobiyal aktivite göstermiştir (Dhanavade vd., 2011).



Şekil 9. *Citrus lemon* (Limon)

1.11.6. *Citrus paradisi* (Greyfurt)

Hibrid kökenli Rutaceae familyasında yer alan orta boylu meyve ağacıdır. Portakal ile pomelonun doğal bir melezidir. Meyvelerin tadı acı tatlı-ekşi arasında değişir (URL-6, 2016). Greyfurt, beslenme ve antioksidan özelliklerinden dolayı son yıllarda büyük ilgi görmüştür. Ayrıca, *Citrus paradisi* bileşiklerinin antiviral, antikanser, antienflamatuar, antialerjik ve analjezik etkinliklere sahip olduğu bilinmektedir. Greyfurt, organik asit, şeker ve fenolik bileşiklerin iyi bir kaynağıdır (Uysal vd., 2011). *Citrus paradisi*'nde antifungal, antimutajenik, östrojenik ve antimikrobiyal aktiviteler gösteren bir fenolik asit olan hidroksibenzoik asit bileşikleri gösterildi (Oksana vd., 2012). *Citrus paradisi* kabuklarının uçucu yağ bileşimi hakkında birkaç rapor bulunmaktadır, bunların bazıları şunları içerir: D-limonen, β -Myrcen, α -pinen, β -pinen, γ -terpinen, α -terpinolen, α -karyofilen, kopaen, β -fellandiren vb. *Citrus paradisi* meyve kabuklarının flavonoidler (hesperidin, narirutin, naringin, eriositrin) ve

aynı zamanda polifenoller (kafeik asit, p-kumarik asit, ferulik asit ve sinapinik asit) gibi bazı antioksidanlar içerdiği bilinmektedir (Okunowo vd., 2013) (Şekil 10).



Şekil 10. *Citrus paradisi* (Greyfurt)

1.11.7. *Platanus orientalis* (Çınar)

Dünyada Doğu Akdeniz bölgesinde doğal olarak yetişir (Şekil 11). *Platanus orientalis* Platanaceae familyasının benzersiz yaşam üyesidir. Ağrı kesici, antienflamatuar ve inflamasyon gibi tıbbi kullanımı vardır. Çınar yaprakları flavonoidler, pentasiklik triterpenoidler, taninler ve kafeik asit içerirler. Sitotoksik, stostatik, antimikrobiyal, antiseptik etkiler gibi birçok farmakolojik aktivite, *Platanus* türlerine atfedilmiştir (Irtiza vd., 2016).



Şekil 11. *Platanus orientalis* (Çınar)

1.11.8. *Tilia cordata* (Ihlamur)

Ebegümeçigiller (Malvaceae) familyasından *Tilia* cinsini oluşturan Kuzey yarımkürenin ılıman ve yarı tropik bölgelerinde yetişen ağaç türlerine verilen addır. Türkiye’de doğal yayılışı olmamakla birlikte Ege ve Akdeniz bölgesinin kıyıları hariç her yerinde yetiştirilebilir. Avrupa’da doğal olarak yetişmektedir (URL-7, 2016). *Tilia*

cordata (Tiliaceae) ıhlamur kış aylarında soğuk algınlığı, grip ve nezleye karşı oldukça sık tüketilen bir bitkidir (Şekil 12). Ayrıca uyku bozuklukları veya anksiyete için narkotik olmayan sakinleştirici olarak, alternatif tıpta kullanılmaktadır. Fitokimyasal yapılan çalışmalarda *Tilia* türlerinin hidrokarbonlar, esterler, alifatik asitler, terpenoidler, kuersetin ve kamferol türevleri, fenolik bileşenler, yoğunlaştırılmış tanenler ve kumarin skopoletine sahip olduğu gösterilmiştir (Vatfák vd., 2014).



Şekil 12. *Tilia cordata* (Ihlamur)

1.11.9. *Equisetum arvense* (Atkuyruğu)

Equisetaceae familyasında yer alan bu takson doğal olarak kuzey yarım kürede rizom kök formasyonu ile yetişen çok yıllık gür bir bitkidir. Sporla üreyen bitki Mart ve Nisan aylarında 15-25 cm boylarında sürgünler geliştirerek büyümektedir. Sürgünler Nisan'dan sonra yeşil rengini alırlar. Gövde içi boş olan bitkinin, 6-15 arası boğumda ince, çam ağacına benzer yaprakları çıkar. Yumru kökleri derine kadar iner. Türün yayılıcı bir özelliği olduğundan kontrolsüz olarak tarlalara dikilmemelidir. Su kenarları, nemli alanlar ile kumlu, balçıklı topraklarda yetişir (URL-8, 2016) (Şekil 13).

Bu bitkinin tıbbi özellikleri arasında karaciğer koruyucu, idrar söktürücü, antibakteriyel, antioksidan etkileri bulunmuştur. Ayrıca yara ve artrit gibi enflamatuar hastalıkların tedavisi için anti enflamatuar özellikler tanımlandı (Gründemann vd., 2014).

E. arvense'nin en iyi bilinen biyoaktif bileşenleri fenolik bileşikler, saponinler, aconite, okzalik ve malik asit, resinler, taninler, pektin, flavonik bileşikler, vitamin C, karetenoidler ve mineral maddelerdir (Kukrić vd., 2013).



Şekil 13. *Equisetum arvense* (Atkuyruğu)

1.11.10. *Punica granatum* (Nar)

Nar olarak bilinen Punicaceae familyasında yer alan *P. granatum*'un meyveleri, çiçekleri, yaprakları ve kabukları birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. *P. granatum* bileşikleriyle yapılan bazı çalışmalar yüksek antioksidan, antikanserojik ve antimikrobiyal aktivite göstermiştir. *P. granatum* meyvesinde bulunan birçok bileşen arasında alkaloidler, polifenolikler, ellacik asit ve gallik asit vardır. Meyve kabuğu antibiyotik etkinliğe sahip olan punicalagin, granatins A ve B, gallagyldilacton, casuarinin, pedunculagin, tellimagrandin I ve corilagin dahil alkaloidler ve yaklaşık % 20 oranında taninler içerir. Perikarptan izole edilmiş granatins A ve B, punikalagin ve punicalin gibi bileşenler antimikrobiyal aktiviteden sorumlu olan temel bileşiklerdir (Anibal vd., 2013). Dudonné ve arkadaşları 2009 yılında yaptıkları kimyasal analizlerle nar'da punikalın, punikalagin, pedunculagin ve puniglukonin gibi hidrolizlenebilir taninler yüksek seviyede bulunan fenolik bileşikleri göstermişlerdir (Dudonné vd., 2009) (Şekil 14).



Şekil 14. *Punica granatum* (Nar)

1.11.11. *Phytolacca americana* (Şekerci otu)

Phytolaccaceae familyasında yer almaktadır. Asya ve Avrupa'da geniş dağılım gösteren Kuzey Amerika'nın batısında doğal olarak yetişen büyük, yabancı ve yıllık bir bitkidir. Tıbbi kullanımı uzun bir tarihe sahip olan şekeriotu zayıflamış immün sistemi ile ilgili hastalıkların tedavisinde geleneksel olarak kullanılmaktadır. İlginç bir kimyaya sahip olan bitki günümüzde anti-AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome=Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu) ilaç olarak araştırılmaktadır. Hücre bölünmesini etkileyen antienflamatuar ajanlar, antiviral proteinler ve maddeler içerirler. Bu bileşenler birçok hastalık yapıcı organizma için toksiktirler. Bitkinin bütün kısımları toksiktir, bu nedenle ishal ve kusmaya sebep olabilir (Aron' ve Irvın, 1980). Saponinler içeren meyvenin 28-30 dikarboksi ve/veya karbometoksi oleanen'den oluştuğu gösterilmiştir. Bitkinin tümünde triterpen saponinler tespit edilmiştir. Yapraklarda, flavanoller astragalin ve azokuersitrin bulundu. Olgun meyveler betasiyanin, meyvenin kırmızı öz suyu başlıca betanin içerir. Kökler triterpensaponinler ve fitolakkositler içerir. Asit hidrolizinden sonra şeker içermeyen kısımda eskulentik asit, jaligonik asit, jaligonik asit -30- metil ester (eskulentik asit -30- metilester) vardır (Ravikiran vd., 2011) (Şekil 15).



Şekil 15. *Phytolacca americana* (Şekerci otu)

1.11.12. *Plantago major* (Damar otu)

Plantaginaceae familyasına ait çok yıllık bir bitkidir. Dünya çapında bir dağılım gösteren *Plantago* cinsinin Türkiye'de 24 türü bulunmaktadır. Özellikle yol kenarlarında, nemli yerlerde yetişmektedir (Şekil 16). *Plantago* türleri kanamayı durdurucu, idrar söktürücü, balgam söktürücü, teskin edici, ağrıyı hafifleten, antibakteriyel ve antiviral özelliğe sahip maddeler içerir. Bu bitki genellikle deri ile

ilgili bir takım hastalıklar, solunum organları, sindirim organları, üreme, dolaşım, kanseri önlemede, ağrının giderilmesinde, bulaşıcı hastalıkların tedavisinde şifalı bitki olarak kullanılmakta ayrıca hemoroid, ishal ve sistit için bir çare olarak kullanılmaktadır (URL-9, 2016).

P. major polisakkaritler, lipidler, fenolik bileşikler, flavonoidler, iridoid glikozidler, terpenoidler, benzoik bileşen (vanilik asit), taninler, saponinler ve steroller gibi biyolojik olarak aktif bileşikleri içerir. Biyoaktif kafeik asit türevi olan plantamajosid, *P. major*'de antienflamatuar, antioksidan ve antibakteriyel aktivitelere sahiptir. Antiallerjenik, antiviral, antienflamatuar dahil biyolojik aktiviteleri bilinen apigenin, baikalein, baikalin, luteolin, hispidulin, plantaginin, skutellarein, nepetin ve homoplantagin gibi flavonoidler *P. major*'den izole edilmişlerdir (Stanisavljevic' vd., 2008).



Şekil 16. *Plantago major* (Damar otu)

1.11.13. *Smilax excelsa* (Anadolu saparnası)

Dünyanın tropikal ve ılıman bölgelerinde doğal olarak yetişen *Smilax* cinsi tırmanmayı sağlayan filizlerlele tırmanıcı, odunsu, dikenli, sarmaşık bir bitkidir (Özsoy vd., 2008). Sonbaharın başında çiçek açan bu bitkinin başlangıçta yeşil olan salkım şeklindeki meyveleri olgunlaştığı zaman kırmızı renge dönüşür (Şekil 17). Türkiye'de denize kıyısı olan bölgelerde 800 metreye kadar olan yüksekliklerde görülür (Güner vd., 2012; URL-10, 2016). *Smilax* rizomlarının immünomodülatör, karaciğer koruyucu, antibakteriyel, antifungal ve antioksidan gibi çeşitli farmakolojik aktiviteleri iyi bilinmektedir (Ban vd., 2006; Chen vd., 1999; Jiang ve Xu, 2003; Navarro vd., 2003). *Smilax* türleri birçok ülkede enfeksiyon hastalıkları, cilt bozuklukları ve karaciğer enflamasyonunun tedavisinde uzun süre kullanılmaktadır (Kubo vd., 1992; Ng ve Yu,

2001). Gallik asit, protokatekuik asit, kafeik asit, gentisik asit, trans-o-kumarik asit and bazı flavonoidler gibi fenolik bileşikler *Smilax* cinsinin bazı türlerinden izole edildi. *S. excelsa* zengin saponin üreticileri arasındadır (Kubo vd., 1992; Özsoy vd., 2008; Yang vd., 2008; Wungsintaweekul vd., 2011; Zhang vd., 2009).



Şekil 17. *Smilax excelsa* (Anadolu saparnası)

1.11.14. *Vitis vinifera* (Asma)

Vitaceae familyasına aittir. *Vitis vinifera* yaprak döken, sarmaşık, odunsu yapısı vardır ve büyük yapraklara sahiptir (Şekil 18). Küçük, soluk, yeşil renkte çiçek açar. Salkım şeklinde meyveler yeşilden olgunlaştıkça siyah renge dönüşür. Üzüm eskiden beri biyolojik aktiviteler için halk arasında ilaç olarak kullanılmaktadır. Hemostatik özelliklere sahip bitkinin yaprakları ishal, kanama, varis, hemoroid, iltahabi hastalıklar, ağrı, hepatit hastalıklarının tedavisinde kullanılmakta ayrıca Anadolu'da yüzyıllardır çıban drenajı ve yaraların iyileştirilmesinde haricen kullanılmaktadır (Orhan vd., 2009). Üzüm suyu kanserin primer safhasında etkili özelliğe sahiptir (Jung vd., 2005). Bitkinin iyileştirici özelliklerinin çoğu fenolik bileşiklere bağlı olabilir.

Polifenoller üzümdeki en önemli fitokimyasal maddedir. Fenolik bileşenler antosiyaninler, flavanoller, resveratrol ve fenolik asitler içerirler. *V. vinifera* yaprağı çoğunlukla mirisetin, ellacik asit, kamferol, kuersetin ve gallik asit içerirler (Ahmad vd., 2014; URL-11, 2016).



Şekil 18. *Vitis vinifera* (Asma)

1.11.15. *Ribes rubrum* (Frenk üzümü)

Ribes cinsinin bir türü olan frenk üzümü Belçika, Hollanda, Almanya, Portekiz, Fransa, Kuzey İtalya, Kuzey İspanya’da doğal olarak yetişmektedir. *R. rubrum* yaprak dökken çok yıllık çalı formunda bir bitki olup normalde 1-1,5 metre büyüebilmekte, nadiren boyu 2 metreye ulaşabilmektedir (Şekil 19). Sarı ve yeşil renkte olan çiçekleri 4-8 cm üzüm salkımı şeklindedir ve olgun meyveler şeffaf kırmızı renge sahiptir. Kırmızı frenk üzümü ateş düşürücü, iştah artırıcı, terletici, hafif laksatif, idrar söktürücü, kanama önleyici, sindirime yardımcı özellikler göstermektedir (URL-12, 2016).

Meyvelerde doğal olarak bulunan ve antioksidan aktiviteye sahip fenolik bileşikler bitkileri fungal ve antibakteriyel enfeksiyonlardan ayrıca çevresel stresten koruyabilirler. Polifenoller bakımından zengin olan meyveler antimikrobiyal etkilere sahiptirler. *Ribes* türleri fenolik bileşikler, fenolik asitler (p-kumarik asit), flavonoller (kuersetin, izokuersitrin, mirisetin ve kamferol, antosiyaninler ve proantosiyanidinler ve aromatik bileşikler (terpenler, asterler, alkoller) gibi birçok aktif bileşen içerirler (Kendir ve Köroğlu, 2015; Krisch vd., 2009).



Şekil 19. *Ribes rubrum* (Frenk üzümü)

1.12. Literatür Özeti

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*), doğada yaygın olarak izole edilen non-fermentatif Gram negatif basildir. Özellikle hastanede yatan ve immun sistemi çeşitli nedenlerle zayıflamış olan hastalarda, pnömoni, bakteriyemi, yanık enfeksiyonları, menenjit, beyin apsesi, endokardit, septik artrit, osteomyelit, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları gibi klinik tablolara neden olmaktadır (Berктаş vd., 2011b). *P. aeruginosa* çeşitli antibiyotiklere direnç geliştirebilmektedir (Gül vd., 2004). *P. aeruginosa*'nın antibiyotiklere dirençli olması, fiziksel ortamlara dayanıklı olması, ve üreyebilmesi için az besine ihtiyaç duyması hastane ortamında yaşamasını kolaylaştırmaktadır. *P. aeruginosa* hastane enfeksiyonları etkenleri içerisinde ilk sıralarda yer almakta ve oluşturduğu enfeksiyonlara bağlı yüksek mortalite ve morbiditeye neden olmaktadır (Berктаş vd., 2011a; Gül vd., 2004).

Yücel vd. (2006) tarafında yapılan çalışmada yoğun bakım hastalarının çeşitli örneklerinden üç yılda elde edilen, enfeksiyon etkeni ya da kolonizan olarak düşünülen toplam 265 *P. aeruginosa* suşunun antibiyotiklere direnç oranlarının yıllar içindeki değişimi incelenmiştir. Cesur vd. (2000) tarafından Ankara'da yapılan bir çalışmada çeşitli klinik örneklerden izole edilen *P. aeruginosa* suşlarının karbapenem ve diğer β -laktam antibiyotiklere duyarlılıkları araştırılmıştır. Gültepe vd. (2014) tarafından yapılan çalışmada hastalardan gönderilen klinik örneklerden izole edilen ve enfeksiyon etkeni olarak değerlendirilen 636 *P. aeruginosa* suşunun antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Mersin'de hastane enfeksiyon etkeni olarak izole edilen 34 *P. aeruginosa* suşunun anti-psödomonal antibiyotiklere duyarlılığı NCCLS önerilerine uygun olarak standart disk difüzyon yöntemi ile araştırılmış ve bu yöntemle karbapenemlere dirençli bulunan suşlar için meropenemin MİK'ları E-test ile belirlenmiştir (Ersöz vd.2004). Kireçci vd. (2008), yatarak veya ayaktan tedavi gören hastaların çeşitli klinik örneklerinden izole edilen 92 *P. aeruginosa* suşu değerlendirmeye alınmıştır. Araştırılan suşların antibiyotiklere duyarlılık oranları CLSI standartlarına uygun olarak Mueller-Hinton agarda, Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. İncelenen 92 suşun amikasinine, siprofloksasine, tobramisine, netilmisine, imipeneme, aztreonama, seftazidime ve gentamisine duyarlı bulunmuştur.

P. aeruginosa, bilinen tüm enzimatik ve mutasyonel bakteriyel direnç mekanizmalarını kullanabilme yeteneğine sahip olmasına rağmen en sık β -laktamaz aracılı dirence rastlanmaktadır (Berktaş vd., 2011a). β -laktamazlar ve diğer mekanizmaların neden olduğu direnç imipenem, meropenem ve doripenem gibi karbapenemleri, *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisi için son derece önemli antibiyotikler haline getirmiştir. Karbapenem direncine karbapenemaz ekspresyonu, dış zar geçirgenliğinde azalma neden olabilmektedir. *Pseudomonas* türlerinde karbapenem direncine neden olan karbapenemazlardan bazıları KPC, GES, OXA, VIM, IMP, SPM, GIM, AIM, DIM ve NDM'dir (Eraksoy, 2014). Çin'de seftazidim dirençli klinik *P. aeruginosa* izolatları ile yapılan çalışmada β -laktamazların çeşitliliğine PZR metoduyla bakılmıştır (Qink vd., 2014). Zafer vd. (2014) tarafından yapılan metallo- β -laktamaz (MBL) ve genişlemiş spektrumlu β -laktamazların (GSBL) prevalansını araştırıldığı çalışma 122 *P. aeruginosa* izolatu üzerinde gerçekleştirilmiştir. Er vd. (2015) tarafından yapılan çalışmada yatan hastalardan izole edilen *P. aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi ve PER, GES, KPC, VIM, IMP ve OXA gibi direnç genlerinin varlığını araştırılmıştır. Karbapenem dirençli toplam 84 *P. aeruginosa* izolatında *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA-48} ve *bla*_{GES} genlerinin varlığı PZR ile incelenmiştir (Malkoçoğlu vd., 2016). Litvanya'dan toplanan 73 karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatında kazanılmış karbapenemazların moleküler epidemiyolojisi ve prevalansı çalışılmıştır (Mikucionyte vd., 2016).

İntegron antibiyotik direnç determinantlarını kodlayan, belirli gen kasetlerini entegre etme veya taşıma yeteneğine sahip genetik elemanlardır. Bakterilerde direnç genleri integronlar ile yayılabilmektedir. β -laktamaz genleri, aminoglikozid modifiye edici enzimleri kodlayan genler integron gen kasetlerinde bulunabilir (Mengeloğlu vd., 2014). Türkiye'de farklı hastanelerden elde edilen 205 *P. aeruginosa* suşunun kullanıldığı bir çalışmada Sınıf 1 integron tespit edilmiştir. Tespit edilen Sınıf 1 integronlarda *aadA*, *aac* ve *bla*_{OXA} genleri belirlenmiştir (Cicek vd., 2013). Klinik örneklerden izole edilen sefazidime dirençli Gram-negatif bakterilerde PER-1 enzim prevalansını ve klinik olarak önemli integron sınıflarının varlığını incelenmiştir (Eraç vd., 2013)

Mengeloğlu vd. (2014)'ün yapmış olduğu çalışmada klinik örneklerden izole edilen *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* suşlarında, Sınıf 1 ve 2 integron varlığı ile antibiyotik direnç gen kasetleri dizi analiziyle karakterize edilmiştir.

P. aeruginosa'nın da dahil olduğu patojen mikroorganizmalarda artan antibiyotik direnci bu patojenlerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisi güçleştirmektedir. Endüstriyel antibiyotiklerin geliştirilmesinde azalma ve antibiyotik direncinin hızla yayılması antimikrobiyal özelliklere sahip bitki ekstraktlarının araştırılması çalışmalarına hız kazandırmıştır (Köse ve Vural, 2009). Manisa'da çoklu ilaç dirençli klinik izolatlara karşı 19 bitkinin etanol ekstraktının antimikrobiyal aktivitesi agar kuyucuk difüzyon metoduyla araştırılmıştır (Oskay vd., 2009). Ahmad vd. (2014) tarafından yapılan çalışmada *V. vinifera* bitkisinin sıcak su ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. Taze sağlıklı yapraklardan oluşan rneğin *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Enterococcus faecalis* olmak üzere dört bakteri üzerindeki etkisini belirlemek için disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Türkiye'de yapılan bir çalışmada *Bacillus megaterium* DSM 32, *P. aeruginosa* DSM 9027, *Staphylococcus aureus* Cowan 1, *Corynebacterium xerosis* UC 9165, *E. coli* DM, *Enterococcus faecalis* A10, *Micrococcus luteus* LA 2971 bakterilerine karşı, *P. granatum* ekstraktları MİK ve agar difüzyon metoduyla antimikrobiyal özellikleri açısından test edilmiştir (Duman vd., 2009).

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Alet ve Ekipmanlar

Çalışmada kullanılan, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Moleküler Biyoloji Laboratuvarında mevcut olan cihazlar şunlardır:

- Termal döngü cihazı (Bio-Rad, ABD),
- Çalkalayıcı etüv (Jeio Tech, Kore),
- Etüv (Memmert, Almanya),
- Steril kabin (Heal Force, Çin),
- Soğutmalı santrifüj (Sigma, ABD),
- Santrifüj (Sigma, ABD),
- Mini santrifüj (Hangzhov Allsheng, Çin),
- pH metre (Mettler Toledo, ABD),
- Manyetik karıştırıcı (Stuart, İngiltere),
- Vorteks (Cleaver Scientific, İngiltere),
- Hassas terazi (Denver, Türkiye),
- Buz makinesi (Fiocchetti, İtalya),
- Elektroforez tankı (Thermo Scientific Owl, ABD),
- Jel dökümantasyon sistemi (Bio-Rad, ABD),
- UV illüminatör (Vilber Lourmat, Fransa),
- Mikrodalga fırın (Arçelik, Türkiye),
- Buzdolabı (Arçelik, Türkiye),
- Derin dondurucu (-20°C) (Arçelik, Türkiye),
- Derin dondurucu (-80°C) (New Brunswick Scientific, ABD)
- Distile su cihazı (Gesellschaft für Labortechnik, Almanya),
- Diktip otoklav (Alp Tekinler, Türkiye),
- Pastör fırını (Nüve, Türkiye),
- Thermo-Shaker inkübatör (ABD),
- Spektrofotometre (Cole Parmer, ABD),

- Otomatik pipetler (Nichipet EX, ABD).

Çalışmada kullanılan ve Biyoteknoloji ve Analitik Kimya Laboratuvarında yer alan cihazlar ise şunlardır:

- Evaporatör (Heidolph, Almanya),
- Konsantratör (Genevac, ABD),
- Rondo (Waring, ABD)
- Çalkalamalı su banyosu (Heidolph, Almanya)

Anabilim dalında mevcut olan erlenmayer, petri, mezür, jel dökme tepsisi ve tarak kullanıldı.

2.1.2. Sarf Malzemeler (Kimyasallar, Enzimler, Kitler ve Vektörler)

Kullanılan kimyasallar: Agaroz, agar, NaOH, NaCl, Tris-HCl, etanol, ampicilin KCO_2CH_3 , $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, IPTG, X-gal (Sigma, ABD), Gliserol, RNaz A (BioShop, Kanada), Tripton, Tris-Base, EDTA, SDS, KCl, glasiyal asetik asit, Dimetil sülfoksit (DMSO), Metanol, sodyum asetat (Merck, Almanya), maya ekstraktı (HiMedia, Hindistan), etidyum bromür (Bio-Rad, ABD), DNA markırı, dNTP (Thermo Fisher Scientific, ABD).

Kullanılan enzimler: *Taq* DNA polimeraz, *EcoRI*, T4 DNA ligaz (Thermo Fisher Scientific, ABD).

Kullanılan kitler ve vektörler: pGEM-T Easy klonlama kiti (Promega, ABD), plazmit DNA izolasyon kiti (Thermo Fisher Scientific, ABD).

Kullanılan besiyerleri; LB (Luria-Bertani), LB (Luria-Bertani) agar, Eozin Metilen Blue agar (EMB) (Merck, Almanya), Minimal agar, Mueller-Hinton agar (Merck, Almanya), Mueller-Hinton Broth (Merck, Almanya).

2.1.3. Besiyerlerinin Hazırlanması

LB (Luria-Bertani): 10 g tripton, 5 g maya ekstraktı, 5 g NaCl tartılarak 800 mL'de çözüldü. pH 7,4'e ayarlanarak son hacim 1 L'ye tamamlandı. 121°C'de 20 dk süreyle otoklavlanarak steril edildi.

LB (Luria-Bertani) Agar: 10 g tripton, 5 g maya ekstraktı, 5 g NaCl, 15 g agar tartılarak 800 ml'de çözüldü. pH 7,4'e ayarlanarak son hacim 1 L'ye tamamlandı 121°C'de 20 dk süreyle otoklavlanarak sterilizasyon yapıldı. 55°C'ye kadar soğutulduktan sonra petri plaklarına 4 mm kalınlığında dökülerek donduruldu.

Eozin Metilen Blue agar (EMB): Ticari olarak temin edilen EMB'den 36 g alınıp 1000 ml saf su ilave edilerek hazırlandı. 121°C'de 20 dk süreyle otoklavlanarak sterilizasyon yapıldı. 55°C'ye kadar soğutulduktan sonra petri plaklarına 4 mm kalınlığında dökülerek donduruldu.

Müeller-Hinton Agar: Ticari olarak temin edilen Müeller-Hinton besiyerinden 34 g alınıp 1000 ml saf su ilave edilerek hazırlandı. Sterilizasyon 121°C'de 20 dk süreyle yapıldı. 55°C'ye kadar soğutulduktan sonra petri plaklarına 4 mm kalınlığında olacak şekilde dökülerek donduruldu.

Müeller-Hinton Broth: Ticari olarak temin edilen Müeller-Hinton Broth besiyerinden 22 g alınıp 1000 ml saf su ilave edilerek hazırlandı. Sterilizasyon 121°C'de 20 dk süreyle yapıldı.

2.1.4. Çözeltiler ve Tampon Solüsyonlarının Hazırlanması

Primer Karışımı: Son konsantrasyonu 100 pmol/ μ l olacak şekilde liyofilize haldeki primerler steril deiyonize su kullanarak stok çözeltiler elde edildi. 1,5 ml'lik santrifüj tüplerine primerlerin stok çözeltilerinin her birinden 10 μ l koyuldu. Üzerine 90 μ l steril deiyonize su ilave edilerek son konsantrasyonu 10 pmol/ μ l olan primer karışımı hazırlandı. Karışım -20°C'de muhafaza edildi.

dNTP Karışımı: Yoğunlukları 100 mM olan dATP, dTTP, dGTP ve dCTP'nin her birinden 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne 20'şer µl koyuldu ve üzerine 420 µl steril deiyonize su ilave edildi. Bu şekilde 4 mM yoğunlukta dNTP karışımı elde edildi. Karışım -20°C'de saklandı.

50X TAE (Tris-Asetik Asit-EDTA) Tamponu: Beher içerisine 242 g Tris-Base, 100 ml 0,5 M EDTA, 57,1 ml glasiyal asetik asit kondu ve yaklaşık 700 ml distile su ile çözüldü ve pH 8,5 olarak ayarlandıktan sonra hacmi 1000 ml'ye tamamlandı. Son kullanım için 1X konsantrasyona seyreltili.

Etidyum Bromür: Son konsantrasyonu 10 mg/ml olacak şekilde 100 mg etidyum bromür 10 ml distile suda çözüldü. Koyu renkli cam şişede oda ısısında muhafaza edildi.

% 1 Agaroz Jel: Erlenmayer içerisine 1 g agaroz tartılarak kondu ve 100 ml 1X TAE'den ilave edilerek mikrodalga fırında çözünmesi sağlandı. Ilıdıktan sonra 10 mg/ml olacak şekilde hazırlanmış etidyum bromürden 3 µl ekleyip içine tarak takılmış jel tepsisine döküldü.

Ampisilin: Son konsantrasyonu 50 mg/ml olacak şekilde hazırlanan ampisilin 0,5 g tartılıp suda çözüldü. Son hacmi 10 ml'ye tamamlanan çözelti 0,22 µm'lik filtreyle süzülerek steril edildi. 1,5 ml'lik santrifüj tüplerine bölünerek -20°C'de saklandı.

Frozen Storage Buffer (FSB): 100 mM KCl, 50 mM CaCl₂.2H₂O, % 10 gliserol, 1 M KCO₂CH₃ bileşenlerin hepsi 50 ml ddH₂O'da çözümlenerek pH'sı HCl ile 6,2 olarak ayarlandı. Son hacim 100 ml'ye tamamlandıktan sonra otoklavlanıp +4°C'de saklandı.

İzopropil β-D-1-tiyogalaktopiranosid (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside, IPTG): IPTG'den (MA: 238 g/mol) 2,38 g tartılıp 10 ml ddH₂O'da çözüldü ve 0,22 µm'lik filtreyle süzülerek steril edildi. Böylece 1 M konsantrasyonda hazırlanan çözelti 1,5 ml'lik santrifüj tüplerine bölünerek -20°C'de saklandı.

5-Bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranosid (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside, X-Gal): Molekül ağırlığı 408,63 g/mol olan X-Gal 10 ml N-N-dimetil formamidde çözüldü. Filtreyle steril edildi ve 1,5 ml'lik santrifüj tüplerine bölündükten sonra ışık almayacak şekilde alüminyum folyo ile kapatılarak -20°C'de muhafaza edildi.

Sodyum Asetat (3M, pH 5,2): Molekül ağırlığı 82,03 g/mol sodyum asetat konsantrasyonu 3 M ve son hacmi 100 ml olacak şekilde 246,09 g tartılıp dH₂O'da çözüldü. Glasiyel asetik asit ile pH 5,2'ye ayarlandı.

Tris-HCl (1 M, pH 7,5): Tris-HCl'den (MA: 121,1 g/mol) konsantrasyonu 1 M, son hacmi 200 ml olacak şekilde 24,22 g tartılıp 150 ml dH₂O'da çözüldü. pH 7,5'e ayarlandı ve son hacim mezür yardımıyla 200 ml'ye tamamlandı. otoklavlanarak oda ısısında muhafaza edildi.

Etilendiamin tetra asetik asit (EDTA, 0,5 M, pH 8,0): EDTA'dan (MA: 372,24 g/mol) konsantrasyonu 0,5 M, son hacmi 200 ml olacak şekilde 37,22 g tartılıp 100 ml dH₂O'da çözüldü. pH 8,0'e ayarlandı ve son hacim mezür yardımıyla 200 ml'ye tamamlandı. 121°C'de 20 dk süreyle otoklav yapılarak oda ısısında saklandı.

Sodyum Hidroksit (NaOH, 0,1 N): 1 L'de 1 N'i 40 g olan NaOH' ten konsantrasyonu 0,1 N ve son hacmi 200 ml olacak şekilde hesap yapılarak 0,8 g tartılıp 200 ml'de çözüldü. Otoklavlanarak koyu renkli cam şişede oda ısısında muhafaza edildi.

Sodyum Dodesil Sülfat (SDS, % 10): SDS'den 10 g tartıldı ve 90 ml dH₂O'da çözüldü. Koyu renkli cam şişede oda ısısında muhafaza edildi.

TENS (Tris-EDTA-NaOH-SDS) Solüsyonu: Son hacim 100 ml'de 10 mM Tris (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0), 0,1 N NaOH ve % 0,5 SDS olacak şekilde hesapları yapılarak stoktan alındı ve kalanı dH₂O'yla 100 ml'ye tamamlandı. Oda ısısında saklandı.

Tris-EDTA Tamponu (TE): Son konsantrasyonları 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0) olacak şekilde TE tamponu hazırlandı. Bunun için Tris-HCl (1 M, pH 8,0) stok solüsyonundan 1 ml ve EDTA (0,5 M, pH 8,0) stok solüsyonundan 200 µl hacminde 98,8 ml steril distile su üzerine eklenerek tampon hazırlandı.

2.2. Yöntem

2.2.1. *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarının Temini ve Tanısı

Çalışmada materyal olarak kullanılacak olan 91 adet *P. aeruginosa* izolatu, Aralık 2013-Mart 2015 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi ve Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültelerinde tedavi gören hastalardan izole edilmiştir. Örneklerin izole edildiği hastaların dağılımı; 33'ü endotrakeal aspirat, 21'i kan kültürü, 9'u yara sürüntüsü, 9'u balgam ve 28'i diğer örneklerden (dren, boğaz sürüntüsü, apse, doku, açık mide suyu, plevra) şeklindedir.

Klinik izolatların hepsi API 32GN otomatize sistemi (bioMerieux, Marcy-l'Etoile, France) (CLSI, 2012) kullanılarak tanımlanmıştır.

Antibiyotik duyarlılık testi için; imipenem, meropenem, piperasilin/tazobaktam, seftazidim, sefepim, amikasin, siprofloksasin ve sefoperazon-sulbaktam antibiyotikleri kullanılmıştır. İzolatların antimikrobiyal duyarlılıkları VITEK (bioMerieux, Craponne, Fransa) yöntemi ile MİK değerleri belirlendi. Yapılamayan bazı suşların duyarlılık dereceleri disk difüzyon yöntemi ile belirlendi ve her iki testin sonuçları Avrupa Klinik Sınır Değer Tablosuna (EUCAST, 2014) göre duyarlı (S), orta duyarlı (I) ve dirençli (R) olarak değerlendirildi (Tablo 5). CLSI ve EUCAST onaylı standart sınır değerleri bulunmayan sefoperazon-sulbaktam için sefoperazon zon çapları esas alınmış; ≤15 mm olan suşlar dirençli, ≥21 mm olanlar duyarlı olarak değerlendirilmiştir (Şirin vd., 2015).

Tablo 5. Avrupa klinik sınır değer tablosu (EUCAST, 2014)

Antibiyotikler	MİK sınır değeri (mg/L)		Etki Mekanizması	Zon çapı sınır değeri (mm)	
	S ≤	R >		S ≥	R <
İmipenem (IMP)	4	8	Karbapenem	20	17
Meropenem (MEM)	2	8	Karbapenem	24	18
Piperasilin/Tazobaktam (PTZ)	16	16	β-laktamaz inhibitörü	18	18
Seftazidim (CAZ)	8	8	3. kuşak sefalosporin	16	16
Sefepim (CEP)	8	8	4. kuşak sefalosporin	19	19
Amikasin (AK)	8	16	Aminoglikozid	18	15
Siprofloksasin (CIP)	0,5	1	Florokinolon	25	22
Sefoperazon/Sulbaktam (SCP)	-	-	β-laktamaz inhibitörü	21	15

2.2.2. *P. aeruginosa* İzolatlarının Saklanması ve Total DNA İzolasyonu

EMB besiyerine tek koloni düşürme yöntemiyle ekimi yapılmış *P. aeruginosa* izolatlarından 3 ml antibiyotiksiz LB besiyerine birer koloni seçilip aktarıldı ve gece boyu 37°C’de çalkalamalı inkübatörde kültür yapıldı. Üreme gözlenen bakteri kültürlerinden 800’er µl alınarak % 20’lik gliserol stoklar hazırlandı. Total DNA izolasyonu kaynatma yöntemi ile elde edildi. Bakteriyel süspansiyonların 1500 µl’si 10000 rpm’de 1 dk santrifüj edildi. Pelletler 1000’er µl distile suda çözülerek 10 dk kaynatıldı. Daha sonra 14,000 rpm’de 10 dk santrifüjün ardından süpernatant yeni bir ependorfa aktarıldı.

2.2.3. *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarının 16 S rDNA Dizi Analizi

Moleküler tanı ile suşları tanımlamada 16S rDNA yapıldı. 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') forward ve 1492L (5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3') reverse (Macrogen, Amsterdam, Hollanda) oligonükleotidleri kullanılarak *P. aeruginosa* izolatları için 16 S rDNA gen bölgesi PZR yöntemi ile çoğaltıldı. Son hacim 50 µl olacak şekilde PZR reaksiyonu hazırlandı. Bir örnek için; 1,5 ünite Go Taq DNA polimeraz (Promega, ABD), 10 µl 5X DNA polimeraz tamponu (Promega, ABD), 3 µl 1,5 mM MgCl₂, 2,5 µl 4 mM dNTP karışımından, her bir primerden 2 µl (25 pmol/µl), 5 µl DNA ve 25,5 steril deiyonize su kullanıldı. PZR amplifikasyonu 2 dk 94°C’de, 45 s 94°C, 60 s 55°C’de, 60 s 72°C’de (35) döngü ve son sentez 10 dk 72°C’de gerçekleştirildi. Amplifiye edilen ürünler, % 1’lik agaroz jelde yürütülerek UV’de görüntülendi. PZR ürünleri dizi analizi için Macrogen firmasına (Amsterdam, Hollanda)

gönderildi ve sekans sonuçları BLAST programı (NCBI GenBank database) kullanılarak değerlendirildi (URL-14, 2016).

2.2.4. β -Laktamaz Direnç Genlerinin Varlığının Araştırılması

Çalışmada β -laktam grubu antibiyotiklere ve β -laktamaz inhibitörlere dirençli olan suşların direnç kaynağının belirlenmesi amacıyla β -laktamaz direnç genlerinin varlığı PZR yöntemi ile araştırıldı. Bu amaçla Tablo 6'da verilen primerler kullanıldı.

Primerler ticari olarak temin edilmiş ve firma önerisi doğrultusunda sulandırılarak solusyonları hazırlanmıştır (Sambrook vd., 1987).

Tablo 6. PZR’de kullanılan primerler ve ürün büyüklükleri

Primerler		Nükleotid sekans (5’- 3’)	Ürün (bp)	Tm (°C)	Kaynaklar
TEM	F R	AGTATTCAACATTTYCGTGT TAATCAGTGAGGCACCTATCTC	847	55	Cicek et al., 2013
SHV	F R	ATGCGTTATATTCGCCTGTG TTAGCGTTGCCAGTGCTC	843		Hanson vd., 2002
CTX-M1	F R	GCGTGATACCACTTCACCTC TGAAGTAAGTGACCAGAATC	260		Xu, vd., 2005
CTX-M2	F R	TGATACCACCACGCCGCTC TATTGCATCAGAAACCGTGGG	341		Xu, vd., 2005
GES	F R	ATGCGCTTCATTCACGCAC CTATTTGTCCGTGCTCAGGA	863		Moubareck vd., 2009
VEB	F R	ATTTCCCGATGCAAAGCGT TTATTCCGGAAGTCCCTGT	542	48	Bu çalışma
PER-2	F R	ATGAATGTCATCACAAAATG ATAATAGCTTCATTGGTTC	860	46	Bu çalışma
PER-1-3-4-5	F R	ATGAATGTCATTATAAAAGC ATGATAGCTTCATTGGTTC	860		Bu çalışma
PER-6	F R	ATGAATGTCATCGCAAAGG ATAATGGCTTCATTGGTTC	860		Bu çalışma
KPC	F R	ATGTCACTGTATCGCCGTCT TTTTAGAGCCTTACTGCC	893	57	Schechner vd., 2009
IMP	F R	CATGGTTTGGTGGTCTTGT ATAATTTGGCGGACTTTGGC	488	54	Jeon vd., 2005
VIM	F R	ATTGGTCTATTTGACCGCGTC TGCTACTCAACGACTGAGCG	780	57	Jeon vd., 2005
NDM-1	F R	GAGATTGCCGAGCGACTTG CGAATGTCTGGCAGCACACTT	497	54	Bu çalışma
OXA-51	F R	TAATGCTTTGATCGGCCTTG TGGATTGCACTTCATCTTG	353	52	Woodford vd., 2006
OXA-23	F R	GATCGGATTGGAGAACCAGA ATTTCTGACCGCATTTCAT	501		Woodford vd., 2006
OXA-40	F R	GGTTAGTTGGCCCCCTAAA AGTTGAGCGAAAAGGGGATT	246		Woodford vd., 2006
OXA-58	F R	AAGTAT TGGGGCTTGTGCTG CCCCTCTGCGCTCTACATAC	599		Woodford vd., 2006
OXA-48	F R	GCGTGGTTAAGGATGAACAC CATCAAGTTCAACCAACCG	442	57	Bu çalışma
GIM-1	F R	TCGACACACCTTGGTCTGAA AACTTCCAACCTTGCCATGC	477	52	Matthew vd., 2007
SPM-1	F R	AAAATCTGGGTACGCAAACG ACATTATCCGCTGGAACAGG	271		Matthew vd., 2007
SIM-1	F R	TACAAGGATTTCGGCATCG TAATGGCCT GTTCCCATGTG	570		Matthew vd., 2007
CMY	F R	GACAGCCTCTTTCTCCACA TGGAACGAAGGCTACGTA	1000	52	Zhao vd., 2003
5’-CS* 3’-CS	F R	GGCATCCAAGCAGCAAG AAGCAGACTTGACCTGA	Değişken	56	Lévesque vd., 1995
hep51** hep74	F R	GATGCCATCGCAAGTACGAG CGGGATCCCGGACGGATGCACGATTTG TA	Değişken	55	White vd., 2001

CS: Korunmuş bölge (Conserved segment) (Sınıf 1 integron değişken bölge primeri)
hep: Sınıf 2 integron değişken bölge primeri, *Sınıf 1 integron, **Sınıf 2 integron

P. aeruginosa izolatlarında β -laktamaz direnç genleri ve integronların araştırılması PZR yöntemi ile yapıldı. Bir örnek için hazırlanan PZR reaksiyon karışımının bileşenleri ve miktarları Tablo 7’de verildi.

Tablo 7. PZR reaksiyon karışımının bileşenleri ve miktarları

Reaksiyon bileşeni	Bir örnek için
1. Tampon (10X)	5 μ l
2. MgCl ₂ (25 mM)	3 μ l
3. dNTP karışımı (4 mM)	2,5 μ l
4. Reverse Primer (10 pmol)	2 μ l
5. Forward Primer (10 pmol)	2 μ l
6. Taq DNA polimeraz (5 U/ μ l)	0,2 μ l
7. gDNA	5 μ l
8. dH ₂ O	30,3 μ l
Reaksiyonun toplam hacmi	50 μl

2.2.5. İntegronların PZR ile Araştırılması

P. aeruginosa izolatlarında Sınıf 1 ve Sınıf 2 integron varlığı PZR metoduyla araştırıldı. PZR’ler son hacim 50 μ l olacak şekilde 5 μ l 10X Tampon (Thermo Fisher Scientific, ABD), 3 μ l 25 mM MgCl₂ (Thermo Fisher Scientific, ABD), 2,5 μ l 4 mM dNTP karışımı (Thermo Fisher Scientific, ABD), 2 μ l her bir primer stoğundan (20 pmol/ μ l), 0,2 μ l 5 U/ μ l Taq DNA polimeraz (Thermo Fisher Scientific, ABD) ve son hacim steril deiyonize su ile 50 μ l’ye tamamlanarak hazırlandı. İntegronlar için amplifikasyon döngü şartları 94°C’de 3 dk, 94°C’de 45 s, 72°C’de 3 dk (34 döngü) ve son sentez 72°C’de 5 dk gerçekleştirildi. PZR amplifikasyonu için kullanılan primer bağlanma sıcaklığı Sınıf 1 için 56°C ve Sınıf 2 için 55°C kullanılmıştır.

2.2.6. Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntüleme

Amplifikasyon ürünlerinin değerlendirilmesi agaroz jel elektroforezi ile yapıldı. 5 μ g/ml etidyum bromür içeren % 1’lik agaroz jel hazırlandı. Her bir tepkime tüpünden 8 μ l alındı ve 3 μ l yükleme tamponu ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklendi. İlk ve son kuyucuklara 3 μ l 100/500 bp DNA markır (Thermo Fisher Scientific, ABD) yüklendi. Örnekler 100 voltta markır iyice açılana kadar yürütüldü. Jel UV transilluminatörde gözlemlendikten sonra jel görüntüleme cihazında fotoğrafı çekildi.

PZR ürünlerinin oluşturduğu bantların büyüklükleri, 100/500 bp DNA markırının oluşturduğu bantlar ile kıyaslanarak Tablo 6'da belirtilen bantlar olduğu doğrulanarak direnç genlerinin varlığı belirlendi.

2.2.7. Kompetent Hücrelerin Hazırlanması

Transformasyon (serbest DNA aracılığı ile genetik bilgi aktarımı) işleminde kullanılmak üzere kompetent hücre hazırlanmıştır. Çalışmada kullanılan *E. coli* DH5a suşlarına ait kompetent hücreler Frozen Competent Cells metodu kullanılarak hazırlandı. Bunun için önce *E. coli*'nin DH5a suşunun gliserol stoğundan LB-Agar'a ekim yapıldı ve 37°C'de 200 rpm'de 1 gece inkübe edildi. Elde edilen kolonilerden bir tane seçilerek 3 ml LB'ye aktarıldı. Hazırlanan kültür 37°C'de 200 rpm'de çalkalayıcı inkübatörde bir gece boyunca üretildi. Üreyen kültürden 500 µl alınarak 50 ml LB besiyerine tekrar ekim yapıldı. Çalkalayıcı inkübatörde 37°C'de 200 rpm'de OD₆₀₀'de 0,2-0,4 oluncaya kadar üretildi. Kültür 2 falkon tüpüne bölünüp buz üzerinde 15 dk bekletildi. 3000 rpm'de +4°C'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatantı uzaklaştırılan hücre pelleti 7,5 ml soğuk FSB (Frozen storage buffer=soğuk depolama tamponu) tamponunda çözüldükten sonra 2 saat buzda bekletildi. Daha sonra 6000 rpm'de 10 dk santrifüjlendi. Pellet tekrar 2 ml soğuk FSB tamponunda çözülüp 100 µl hacimlerde steril ependorflara bölünerek -80°C'de saklandı.

2.2.8. PZR Sonucunda Pozitif Çıkan Örneklerin pGEM-T/Easy-1 Vektörüne Klonlanması ve Plazmit İzolasyonu

β-laktamaz ve integron içeren PZR ürünleri pGEM-T/Easy-1 vektörüne (Promega, ABD) firmanın önerdiği protokolde modifikasyon yapılarak ligasyonu gerçekleştirildi. Ligasyon reaksiyonu son hacim 3 µl olacak şekilde 0,15 µl pGEM-T/Easy-1 vektörü (10 ng), 1,5 µl 10X T4 ligaz tamponu (Promega, ABD) ve 0,15 µl T4 DNA ligaz (Promega, ABD) ile hazırlandı, 16°C'de gece boyu inkübe edildi. 3 µl hacimde hazırlanan ligasyon ürünü steril deiyonize su ile 10 µl'ye tamamlandı ve 5 µl'si *E. coli* DH5a kompetent hücrelerine kimyasal yöntemle transforme edildi (Sambrook vd., 1987). Mavi-beyaz koloni yöntemine göre transformatların seçimi yapıldı. Bunun için ampisilinli (50 µg/ml) LB agar besiyerlerine 40 µl IPTG (100 mM stok) 40 µl X-Gal (40 mg/ml stok) yayıldı. 37°C'lik inkübatörde gece boyu inkübe

edildi. Gece boyu yapılan inkübasyon ardından elde edilen beyaz kolonilerden birkaç tane seçilerek 3'er ml ampisilinli (50 µg/ml) LB'ye ekim yapıldı ve bir gece çalkalamalı inkübatörde üretildi. Kültürler 14000 rpm'de 3 dk santrifüj edildi ve bakteri pelletinden GeneJET Plazmit Miniprep kitindeki (Thermo Fisher Scientific, ABD) protokole göre plazmit DNA izole edildi. Bu plazmitler *EcoRI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesildi, PZR ürünü ile birlikte % 1'lik agaroz jelde yürütülüp pozitif olanlar tespit edildi. Pozitif olarak değerlendirilenler DNA baz dizin analizi için Macrogen'e (Hollanda) firmasına gönderilerek sekans analizi hizmet karşılığı yapıldı.

Örneklere ait DNA baz dizin analizi sonuçları EXPASY (URL-13, 2016) ve NCBI-BLAST (URL-14, 2016) programları kullanılarak değerlendirildi.

2.2.9. Tekrarlanan Palindromlara Dayalı PZR (REP-PZR)

REP-PZR *P. aeruginosa* izolatlarının genotiplendirilmesinde kullanıldı. PZR işlemi REP 1 (5'-III GCG CCG ICA TCA GGC-3') ve REP 2 (5'-ACG TCT TAT CAG GCC TAC-3') primerleri kullanılarak gerçekleştirildi. PZR için tek bir reaksiyon: 5 µl 10X Tampon (Thermo Fisher Scientific, ABD), 3 µl 25 mM MgCl₂ (Thermo Fisher Scientific, ABD), 2,5 µl 4 mM dNTP karışımı (Thermo Fisher Scientific, ABD), 2 µl her bir primer stoğundan (20 pmol/µl), 0,2 µl 5 U/µl Taq DNA polimeraz (Thermo Fisher Scientific, ABD) ve son hacim steril deiyonize su ile 50 µl'ye tamamlanarak hazırlandı. Amplifikasyon döngü şartları 94°C'de 3 dk'dan sonra 30 döngü olarak, 94°C'de 45 s, 45,8°C'de 1 dk 72°C'de 8 dk ve son sentez 72°C'de 16 dk'da gerçekleştirildi. PZR ürünleri % 1,4'lük agaroz jelde 1 kb markır (Thermo Fisher Scientific, ABD)'la yürütüldü. REP-PZR yöntemi ile oluşan DNA fragmentleri arasındaki klonal ilişkiyi belirlemek için Mega 7,0 programında Neighbor-Joining metodu kullanılarak dendrogram yapıldı.

2.2.10. Konjugasyon

Genlerin aktarılıp aktarılmadığını belirlemek amacıyla konjugasyon deneyi yapıldı. Çalışmada alıcı hücre olarak *E. coli* K-12 J53-2 (met pro Rif^r) kullanıldı. MBL VIM-38 pozitif olan ayrıca *VIM-38*, *AAC(6')-Ib*, *EmrE*, *aadA1* genlerini taşıyan Sınıf 1

integron pozitif *P. aeruginosa* izolatu verici hücre olarak kullanıldı. Pozitif kontrol daha önce yapılan bir çalışmada konjugatif olarak belirlenen *E. coli* KD8 izolatu (Ozgumus vd., 2009) kullanıldı. Verici ve alıcı hücreler antibiyotik içermeyen 3 ml LB besiyerine aynı miktarda ekildi ve çalkalayıcı etüvde 37°C’de 18-24 saat boyunca üretildi. Verici ve alıcı hücreleri içeren kültürler eşit hacimde (1:1) karıştırıldıktan sonra 35°C’ye ayarlı etüvde inkübe edildi. Transkonjugantların seçimi için ekimleri yapılacak selektif besiyeri olarak 100 µg/ml rifampisin ve verici bakterinin dirençli olduğu antibiyotiği içeren (ampisilin) EMB agar kullanıldı (Ozgumus vd., 2008).

2.2.11. Bazı Bitki Ekstrelerinin β -Laktamaz Direnç Genleri ve İntegron Gen Kasetlerini Taşıyan *P. aeruginosa* İzolatları Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

2.2.11.1. Çalışmada Kullanılan Bitkilerin Temini ve Teşhisi

Çalışmada kullanılan bitki örnekleri Trabzon ilinin Of ilçesinden temin edilmiştir. Bitkiler Türkiye florasındaki teşhis anahtarına göre teşhis edilmiştir (Davis, 1965). Bu amaçla bölgede kolay bulunabilen ve ayrıca geleneksel tıpta da kullanılan toplam 15 bitkinin farklı (meyve, yaprak, çiçek) kısımları seçildi.

Antibiyogramda dirençli olarak bulunan ve PZR yapılan direnç geni araştırmasında direnç geni belirlenen izolatlar arasında farklı direnç genleri ve gen kasetleri içeren izolatlar arasından temsilen seçilen 9 *P. aeruginosa* izolatına karşı seçilen bitkilerin metanol ekstraktlarının test edilmesi planlandı.

PZR yöntemi ile tespit edilen dirençli izolatlar üzerinde etkileri incelenen bitkiler Tablo 8’de verilmiştir.

Tablo 8. Çalışmada antipseudomonal aktivitesi incelenen bitkilerin familya ve tür adları ile test edilen kısımları

Familya	Bitki Türleri	Türkçesi	Kısımları
Rosaceae	<i>Prunus divaricata</i> Ledeb.	Yunus eriği	Meyve
	<i>Duchesnea indica</i> (Andrews) Focke	Hint çileği	Meyve, yaprak
Tiliaceae	<i>Tilia cordata</i> Miller	Ihlamur	Çiçek, yaprak
Punicaceae	<i>Punica granatum</i> L.	Nar	Çiçek, yaprak, meyve
Ebenaceae	<i>Diospyros kaki</i> L.	Trabzon hurması	Meyve, yaprak
Grossulariaceae	<i>Ribes rubrum</i> L.	Frenk üzümü	Meyve, yaprak
Equisetaceae	<i>Equisetum arvense</i> L.	Atkuyruğu	Yaprak
Vitaceae	<i>Vitis vinifera</i> L.	Asma	Yaprak, taze sürgün
Platanaceae	<i>Platanus orientalis</i> L.	Çınar	Yaprak
Phytolaccaceae	<i>Phytolacca americana</i> L.	Şekeriotu	Yaprak
Plantaginaceae	<i>Plantago major</i> L.	Damar otu	Yaprak
Liliaceae	<i>Smilax excelsa</i> L.	Anadolu saparnası	Yaprak
Rutaceae	<i>Citrus lemon</i> (L.)	Limon	Yaprak
	<i>Citrus paradisi</i> Macfad	Greyfurt	Yaprak
	<i>Citrus japonica</i> Thunb.	Kamkat	Yaprak

2.2.11.2. Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması

Taze toplanmış bitkilerin yaprak, meyve veya sapsarı rondo yardımıyla iyice parçalandı. Öğütülmüş bitkilerden 10 g hassas terazide tartıldıktan sonra erlenlere aktarıldı. Üzerini kapatacak şekilde metanol ilave edildi. İlave edilen miktar not edildi. Bu şekilde hazırlanan erlenler 27-28 °C’de 2 saat boyunca çalkalamalı inkübatörde bekletildi. Daha sonra özütler Whatman 1 filtre kağıdı (Macherey-Nagel, Almanya)’ndan süzüldü. Yıkama amaçlı erlenlere bir miktar daha metanol eklendi. Eklenen metanol miktarı not edildi. Erlenler 15-20 dk 27-28 °C’de bekletildikten sonra süzüntüdeki çözücü evaporatör yardımıyla uzaklaştırıldı. Kuru ekstrakt ağırlıkları; *D. kaki* meyvesi 1700 mg, yaprağı ise 990 mg, *P. granatum* meyve 1410 mg, yaprak 1000 mg ve çiçek 1316,3 mg, *P. divaricata* meyve 1050 mg, *D. indica* 380 mg, *Phytolacca americana* 680 mg, *V. vinifera* taze sürgün 142 mg, *R. rubrum* meyve 121 mg ve yaprak 126 mg, *T. cordata* çiçek 120 mg, yaprağı ise 119 mg, *S. excelsa* yaprak 132 mg, *P. major* yaprak 110 mg, *E. arvense* yaprak 366,5 mg, *P. orientalis* yaprak 135 mg, *C. lemon* yaprak 130 mg, *C. paradisi* yaprak 110 mg, *C. japonica* meyve 141 mg olarak kuru ekstrakt ağırlıkları tartılarak belirlendi. Bu işlemlerin ardından elde edilen kuru ekstrakt kullanılmak üzere 100 mg/ml olacak şekilde DMSO’da çözüldü ve -20 °C’de muhafaza edildi.

2.2.11.3. Bitki Ekstraktlarının Agar Kuyucuk Difüzyon Yöntemi ile Direnç Geni İçeren *P. aeruginosa*'ya Karşı Antimikrobiyal Aktivite Tayini

Özütlerin antimikrobiyal aktivite gösterip göstermediğinin belirlenmesi için agar kuyucuk difüzyon yöntemi kullanıldı (Perez vd., 1990; Ahmad vd., 1998). Test edilecek *P. aeruginosa*'lar bir gecelik kültürlerinden Mueller-Hinton sıvı besiyeri içinde (MHB), canlandırıldı, yaklaşık olarak 0,5 McFarland bulanıklıkta olacak şekilde (10^6 - 10^7 cfu/ml hücre konsantrasyonunu ihtiva eden) bakteri süspansiyonu hazırlandı. Mueller-Hinton Agar besiyerinin yüzeyine steril eküvyon çubuk yardımıyla homojen bir şekilde yayma ekimi yapıldı. Ekimleri tamamlanan besiyerleri üzerinde, steril cam boru yardımıyla 2 cm aralıklarda, aseptik şartlarda 5 mm çapında kuyucuklar açılıp her bir kuyucuğa hazırlanan bitki stok özütlerinden 100 µl koyuldu. Standart kontrol ilaç olarak ampisilin (10 µg) ve standart çözücü kontrolü olarak DMSO kullanıldı. Petriler 24 saat, 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kullanılan özütlerin etrafında üremenin olmadığı zon inhibisyon olarak belirlendi. Oluşan bu zonların çapları bir cetvel yardımıyla milimetrik olarak ölçüldü ve inhibisyon değeri belirlendi. İnhibisyon değerleri 15 mm'den büyük olmadıkları için minimal inhibisyon (MİK) veya minimal bakterisit (MBC) konsantrasyon değerleri araştırılmadı.

3. BULGULAR

3.1. Mikrobiyolojik Özellikleri

3.1.1. İzolatların Servislere Göre Dağılımı

Çalışmada yoğun bakım ünitelerinin çeşitli birimlerinde yatan hastalardan izole edilen toplam 91 *P. aeruginosa* izolatı kullanıldı (Tablo 9).

Tablo 9. Çalışmada kullanılan *P. aeruginosa* izolatlarının elde edildikleri yoğun bakım üniteleri ve oransal dağılımı

Yoğun Bakım Üniteleri	Sayı	%
Dahiliye YBÜ	28	30,8
Pediyatri YBÜ	6	6,6
Genel Cerrahi YBÜ	13	14,3
Anestezi YBÜ	15	16,5
Göğüs Hastalıkları YBÜ	6	6,6
Beyin Cerrahi YBÜ	10	10,9
Göğüs Cerrahisi YBÜ	6	6,6
Yanık YBÜ	4	4,4
Pediyatri Yenidoğan YBÜ	3	3,3
Toplam	91	100

YBÜ: Yoğun Bakım Ünitesi

3.1.2. İzolatların Materyallere Göre Dağılımı

Çeşitli yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalardan farklı izolatların 13 tanesi (% 14,3) cilt ve yumuşak doku örneklerinden, 48'i (% 52,8) solunum yolu örneklerinden, 27'si (% 29,7) kan akımı örneklerinden ve 3'ü (% 3,3) de genitoüriner örneklerinden izole edilmiştir (Tablo10).

Tablo 10. Çalışma izolatlarının izole edildiği materyallere göre dağılımı

Materyal	Sayı	%	
Cilt ve Yumuşak Doku	Apse	2	2,2
	Diren	1	1,1
	Yara sürüntü	9	9,9
	Doku	1	1,1
	Toplam	13	14,3
Solunum Yolu	Bronkoalveolar lavaj sıvısı	9	9,9
	Endotrakeal aspirat	34	37,4
	Plevral mayi	5	5,5
	Toplam	48	52,8
Kan Akımı	Kan	23	25,3
	Katater	4	4,4
	Toplam	27	29,7
Genitoüriner Sistem	İdrar	3	3,3
	Toplam	3	3,3

3.1.3. İzolatların Antibiyotik Duyarlılıkları

İzolatların 8 farklı antibiyotiğe karşı (imipenem, meropenem, piperasilin/tazobaktam, seftazidim, sefepim, sefoperazon/sulbaktam, amikasin ve siprofloksasin) duyarlılık testleri tam otomatize VİTEK ve disk difüzyon metodları kullanılarak belirlendi (Tablo 11).

Tablo 11. *P. aeruginosa* izolatlarının antimikrobiyal duyarlılık sonuçları

İzolat No	IMP	MEM	PTZ	CAZ	FEP	AK	CIP	SCP
PA1	R	R	S	R	R	S	S	S
PA3	R	R	S	S	S	S	S	S
PA4	R	R	S	S	S	S	S	R
PA6	S	R	S	S	S	S	S	S
PA7	R	R	I	S	S	S	S	R
PA9	I	I	S	S	S	S	S	S
PA11	S	R	S	R	S	R	S	S
PA12	R	R	S	S	S	S	S	S
PA13	R	S	S	S	S	S	S	I
PA18	S	S	S	S	S	S	S	I
PA20	R	R	S	R	R	R	R	R
PA22	S	I	R	S	S	S	S	S
PA23	S	R	S	S	S	S	I	S
PA24	R	R	S	S	S	S	S	S
PA25	I	R	R	I	R	R	R	-
PA26	S	S	S	S	S	S	S	I
PA29	S	S	S	S	S	S	S	I
PA30	R	R	S	S	S	S	S	S
PA31	S	S	S	S	S	S	S	S
PA32	S	S	R	R	S	S	S	I
PA34	R	R	S	S	S	S	S	S
PA35	S	S	S	S	S	S	S	S
PA36	I	R	R	R	I	S	R	R
PA37	S	I	S	R	S	S	S	I
PA38	S	S	S	S	S	S	S	I
PA39	S	S	S	S	S	R	I	-
PA41	S	S	S	S	S	S	S	S
PA42	R	R	S	S	S	S	R	S
PA43	R	R	S	S	S	S	R	S
PA44	R	R	S	S	S	S	R	S
PA45	S	S	S	S	S	S	S	S
PA48	R	R	S	S	S	I	I	S
PA50	S	R	I	R	S	S	R	R
PA51	R	R	S	R	R	I	R	S
PA53	R	R	S	S	S	S	S	S
PA56	R	R	S	R	I	S	R	R
PA57	R	R	I	R	S	S	S	I
PA60	R	R	S	S	S	S	S	S
PA61	S	I	S	S	S	S	S	I
PA63	R	R	R	R	R	S	S	R
PA64	R	R	S	S	S	S	S	S
PA65	R	I	S	S	S	S	S	S
PA66	S	S	R	R	R	I	R	R
PA70	R	R	S	S	S	S	S	S
PA72	R	R	S	S	S	S	S	S
PA74	S	S	S	S	S	S	S	-
PA76	R	R	S	S	S	S	S	S
PA77	S	S	R	R	R	S	S	R
PA78	R	R	S	S	S	S	S	S
PA80	R	R	S	S	I	R	R	R
PA81	R	R	R	R	S	R	R	R
PA83	S	R	I	S	S	S	S	I
PA84	S	I	S	R	S	S	S	S

Tablo 11 (devam). Çalışma izolatlarının antimikrobiyal duyarlılık sonuçları

PA85	S	S	S	S	S	S	S	S
PA86	R	R	S	S	S	S	S	S
PA87	R	R	S	I	S	S	S	S
PA88	R	R	S	S	S	S	S	S
PA89	R	R	R	S	S	R	R	R
PA90	S	S	S	S	S	S	S	-
PA92	R	R	S	S	S	S	S	S
PA93	S	S	S	S	S	S	S	S
PA94	S	S	S	S	S	S	S	S
PA95	S	S	I	-	S	S	R	-
PA96	S	S	S	S	S	S	S	S
PA97	S	S	I	S	S	S	S	S
PA98	R	R	R	S	S	S	R	I
PA103	R	R	R	S	S	R	R	I
PA104	R	R	S	S	S	S	S	I
PA105	R	R	S	S	S	S	S	S
PA106	I	R	S	S	S	S	S	I
PA107	R	R	S	I	I	I	R	I
PA108	R	R	R	I	S	S	S	I
PA111	R	R	S	S	S	I	R	I
PA112	S	R	S	S	S	S	S	S
PA114	R	R	S	S	S	S	S	I
PA116	S	S	S	S	S	S	S	S
PA119	R	R	I	S	S	R	S	R
PA121	R	R	S	I	I	S	R	S
PA126	I	S	S	R	I	S	R	I
PA127	S	S	S	S	S	S	S	S
PA130	R	R	S	S	S	S	S	S
PA133	R	R	S	I	I	I	R	I
PA134	R	R	S	S	S	S	S	S
PA136	R	R	I	S	S	S	S	-
PA137	S	S	S	S	S	S	S	S
PA139	S	I	S	S	S	S	R	-
PA140	R	R	R	R	I	S	S	R
PA141	R	R	S	S	S	S	R	S
PA142	S	S	S	S	S	S	S	I
PA144	S	S	S	S	S	S	R	-
PA145	S	R	S	S	S	S	S	S

IMP: İmipenem, MEM: Meropenem, PTZ: Pipersilin/Tazobaktam, CAZ: Seftazidim, FEP: Sefepim, AK: Amikasin, CIP: Siprofloksasin, SCP: Sefoperazon/Sulbaktam, S: Duyarlı (sensitive), R: Dirençli (resistant), I: Orta duyarlı (intermediate), PA: *P. aeruginosa*

Antibiyotik direnç profilleri Tablo 12’de verilmiştir. Toplam 91 suşun 49’u (% 53,85) imipeneme, 57’si (% 62,6) meropeneme, 24’ü (% 26,4) siprofloksasine, 17’si (%18,7) seftazidime, 13’ü (% 14,2) piperasilin/tazobaktama, 13’ü (% 14,2) sefoperazon/sulbaktama dirençli olduğu gözlemlendi. En yüksek direnç meropeneme gözlenirken en düşük direnç sefepime karşı gözlemlendi.

Tablo 12. Antibiyotik Direnç Oranları

Antibiyotikler	Antibiyotik Dirençleri		
	Sayı (%) Dirençli	Sayı (%) Orta duyarlı	Sayı % Duyarlı
İmipenem	49 (53,85)	5 (5,5)	37 (40,65)
Meropenem	57 (62,6)	7 (7,7)	27 (29,7)
Piperasilin/Tazobaktam	13 (14,2)	8 (8,8)	70 (77)
Seftazidim	17 (18,7)	6 (6,6)	68 (74,7)
Sefepim	7 (7,7)	8 (8,8)	76 (83,5)
Sefoperazon/Sulbaktam	13 (14,2)	21 (23,1)	47 (51,6)
Amikasin	9 (9,9)	6 (6,6)	76 (83,5)
Siprofloksasin	24 (26,4)	3 (3,3)	64 (70,3)

P. aeruginosa izolatlarında disk difüzyon yöntemi ile antibiyotik direnç ve duyarlılık zon çapları Şekil 20’de görüldüğü gibi görsel olarak da teyit edilmiştir.



Şekil 20. *P. aeruginosa* izolatlarında disk difüzyon yöntemi ile antibiyotik direnç profilinin belirlenmesi.

Günümüzde kullanılan birçok tedavi yönteminde birden fazla antibiyotiğin kullanıldığı kombinasyon tedavisi uygulanabilmektedir. Dolayısıyla bir izolatın çoklu direnç profilini saptama bu noktada da önemlidir. Çalışmada orta duyarlı olan suşlar çoklu direnç belirlenirken dirençli olarak kabul edilmiş ve sadece dirençliler dikkate alınmıştır. Tekli ve çoklu antibiyotik direnç profillerine sahip *P. aeruginosa* izolatları Tablo13’te görülmektedir.

Tablo 13. *P. aeruginosa* izolatlarının çoklu antibiyotik direnç oranları (n=91)

Direnç tipi	Direnç saptanan antibiyotikler	Suş numaraları	n (%)
Tek antibiyotiğe direnç	SCP	18, 26, 29, 38, 142	5 (5,5)
	MEM	6, 145	2 (2,2)
	PTZ	97	1 (1,1)
	CIP	144	1 (1,1)
İki antibiyotiğe direnç	IMP+MEM	3, 9, 12, 24, 30, 34, 53, 60, 64, 65, 70, 72, 76, 78, 86, 88, 105, 106, 130, 134	20 (22)
	IMP+SCP	13	1 (1,1)
	MEM+SCP	61	1 (1,1)
	MEM+CIP	23, 139	2 (2,2)
	MEM+PTZ	22	1 (1,1)
	MEM+CAZ	84	1 (1,1)
	PTZ+CIP	95	1 (1,1)
	Üç antibiyotiğe direnç	IMP+MEM+SCP	4, 7, 104, 114
PTZ+CAZ+SCP		32	1 (1,1)
MEM+CAZ+SCP		37	1 (1,1)
MEM+PTZ+SCP		83	1 (1,1)
IMP+MEM+CAZ		87	1 (1,1)
IMP+MEM+PTZ		136	1 (1,1)
IMP+MEM+CIP		42, 43, 141	3 (3,3)
MEM+CAZ+AK		11	1 (1,1)
Dört antibiyotiğe direnç	IMP+MEM+CAZ+FEP	1	1 (1,1)
	PTZ+CAZ+FEP+SCP	77	1 (1,1)
	IMP+MEM+AK+CIP	48	1 (1,1)
Beş antibiyotiğe direnç	MEM+PTZ+CAZ+CIP+SCP	50	1 (1,1)
	IMP+MEM+CAZ+FEP+CIP	51	1 (1,1)
	IMP+MEM+CAZ+CIP+SCP	56	1 (1,1)
	IMP+MEM+PTZ+CAZ+SCP	57	1 (1,1)
	IMP+MEM+PTZ+CIP+SCP	108	1 (1,1)
	IMP+MEM+AK+CIP+SCP	111	1 (1,1)
	IMP+MEM+PTZ+AK+SCP	121	1 (1,1)
	IMP+CAZ+FEP+CIP+SCP	126	1 (1,1)
Altı antibiyotiğe direnç	IMP+MEM+PTZ+CAZ+FEP+SCP	63, 140	2 (2,2)
	PTZ+CAZ+FEP+AK+CIP+SCP	66	1 (1,1)
	IMP+MEM+FEP+AK+CIP+SCP	80	1 (1,1)
	IMP+MEM+PTZ+AK+CIP+SCP	89, 103	2 (2,2)
Yedi antibiyotiğe direnç	IMP+MEM+CAZ+FEP+AK+CIP+SCP	20, 107, 133	3 (3,3)
	IMP+MEM+PTZ+CAZ+FEP+CIP+SCP	36	1 (1,1)
	IMP+MEM+PTZ+CAZ+AK+CIP+SCP	81	1 (1,1)
	IMP+MEM+PTZ+CAZ+FEP+AK+CIP	25	1 (1,1)
TOPLAM			72 (79,12)

IMP: İmipenem, MEM: Meropenem, PTZ: Pipersilin/Tazobaktam, CAZ: Seftazidim, FEP: Sefepim, AK: Amikasin, CIP: Siprofloksasin, SCP: Sefoperazon/Sulbaktam, n: Sayı

3.1.4. *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarının Antibiyotik Direnç Oranları

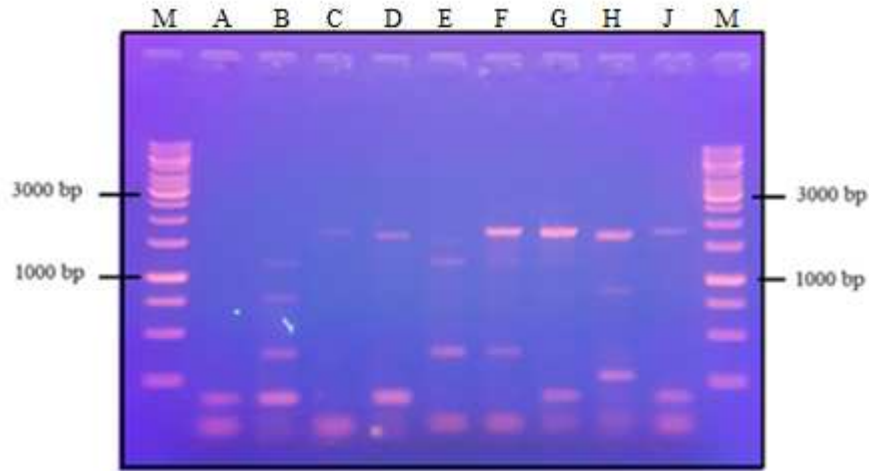
P. aeruginosa izolatlarının çoğunda karbapenemlere yüksek oranda direnç gözlemlendi (imipeneme % 53,8 ve meropeneme % 62,6). Direnç oranları, piperasilin/tazobaktam için % 14,3, seftazidim için % 18,7, sefepim için % 7,7 sefoperazon/sulbaktam için % 14,3, amikasin için % 9,9 ve siprofloksasin için % 26,4 olarak belirlendi.

3.2. *P. aeruginosa* İzolatlarının 16 S rDNA Gen DNA Dizi Analizi

Çalışmaya dahil edilen 91 klinik *P. aeruginosa* izolatları için 16S rDNA bölgesi çoğaltıldı. Çoğaltılan yaklaşık 1500 bp'lik bölge BLAST programı kullanılarak değerlendirildi. Yapılan değerlendirme sonucunda suşların % 99 *P. aeruginosa*'ya benzediği tespit edildi. Biyokimyasal yöntemlerle tanımlanan *P. aeruginosa* suşlarına ait 16S rDNA PZR ampliconlarının DNA dizi analizi sonuçlarına göre de doğruluğu onaylandı.

3.3. Moleküler Tiplendirme ve Klonal İlişki

REP-PZR yöntemi ile 91 *P. aeruginosa* izolatının klonal ilişkisine bakıldı. REP-PZR'ye özel primer çifti ile yapılan PZR ile çoğaltılan DNA örnekleri 1 kb markır ile birlikte % 1,4 agaroz jel elektroforezinde yürütüldü (Şekil 21). Elde edilen DNA bantlarının ve bu bantların büyüklüklerine göre izolatlar arasında kökenlerinin veya kaynaklarının bir olabileceği ya da benzer biyotipte olabileceği araştırıldı.

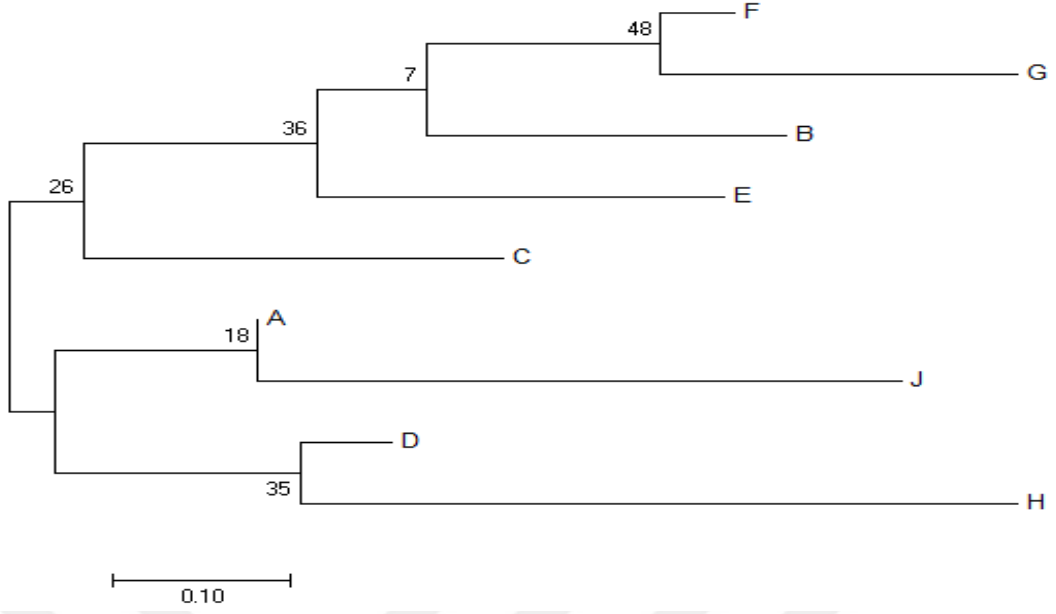


Şekil 21. REP-PZR agaroz jel görüntüsü. A, B, C, D, E, F, G, H, J: Genotip grupları, M: Markır

REP-PZR yöntemi ile oluşan DNA fragmentleri arasındaki klonal ilişkiyi belirlemek için Mega 7,0 programı kullanılarak Neighbor-Joining metoduyla dendrogram yapıldı (Şekil 22). REP-PZR sonuçlarına göre izolatlar 9 genotipe ayrıldı. Genotip grupları A, B, C, D, E, F, G, H, J olarak kodlandı (Tablo14). Dendrogramda F, G, B, E, C ve A, J, D, H genotiplerinden oluşan iki ana grubun olduğu belirlendi. A, J, D, H grubu ise A, J ve D, H olmak üzere iki gruba ayrıldı. İzolatlar arasında en yaygın genotipler grup A içerisinde yer almakta olduğu belirlendi. β -laktamaz direnç genleri ve Sınıf 1 integron gen kasetlerin en çok gözlemlendiği izolatın A grubunda yer alan izolatlar olduğu sonucuna varıldı.

Tablo 14. Genotip grupları oluşturan izolat tablosu

Genotip Gruplar	İzolat Numaraları
A grubu	1-3-4-6-7-9-13-18-20-22-23-24-25-29-31-32-34-35-36-38-39-41-42-43-44-45-50-51-57-60-61-64-65-66-78-80-81-83-85-87-89-90-92-93-94-95-96-98-103-105-106-107-111-112-114-116-119-121-126-127-133-134-137-139-140-141-142-144-145
B grubu	12-37-56
C grubu	30-53-130
D grubu	11-26
E grubu	48-63
F grubu	70-72-76-86-88-108-136
G grubu	74-84
H grubu	77
J grubu	97-104

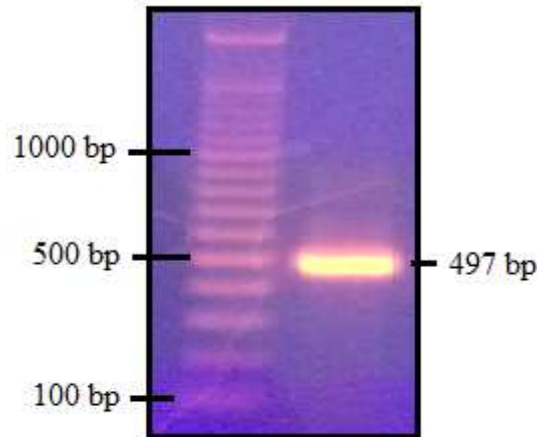


Şekil 22. REP-PZR analizi sonucu Neighbor-Joining metoduyla oluşturulan *P. aeruginosa* izolatları arasındaki genetik ilişkiyi gösteren dendrogram.

3.4. β-Laktamaz Genlerinin Moleküler Yöntemler ile Araştırılması

3.4.1. *bla*_{NDM-1} Geninin PZR ile Araştırılması

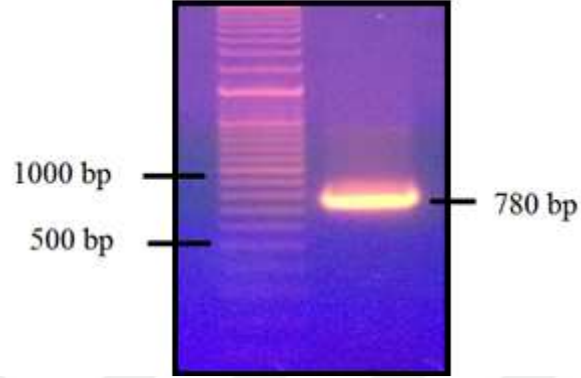
91 *P. aeruginosa* izolatında *bla*_{NDM-1} genlerine özgül primer çifti kullanılarak yapılan PZR sonucunda 13, 34, 87, 95, 112, 126 nolu izolatlarda 497 bp büyüklüğünde PZR ürünü elde edildi (Şekil 23).



Şekil 23. *bla*_{NDM-1} geninin % 1'lik agaroz jel elektrofores görüntüsü.

3.4.2. *bla*_{VIM} Geninin PZR ile Araştırılması

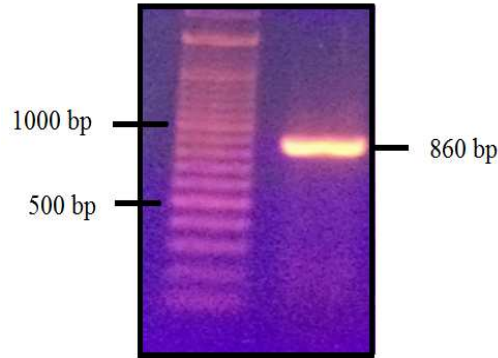
*bla*_{VIM} genlerine özgül primer çifti kullanılarak yapılan PZR sonucunda 20, 119, 140 nolu izolatlarda 780 bp büyüklüğünde PZR ürünü elde edildi (Şekil 24).



Şekil 24. *bla*_{VIM} geninin % 1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü

3.4.3. *bla*_{PER} Geninin PZR ile Araştırılması

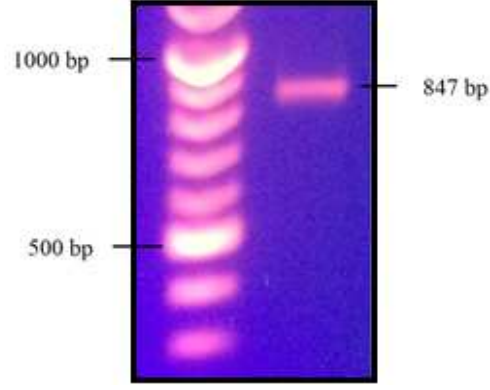
*bla*_{PER} genlerine özgül primer çifti kullanılarak yapılan PZR sonucunda 20, 51, 66 nolu izolatlarda 860 bp büyüklüğünde PZR ürünü elde edildi (Şekil 25).



Şekil 25. *bla*_{PER} geninin % 1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü

3.4.4. *bla*_{TEM} Geninin PZR ile Araştırılması

*bla*_{TEM} genlerine özgül primer çifti kullanılarak yapılan PZR sonucunda 11, 22, 84, 90 nolu izolatlarda 847 bp büyüklüğünde PZR ürünü elde edildi (Şekil 26).



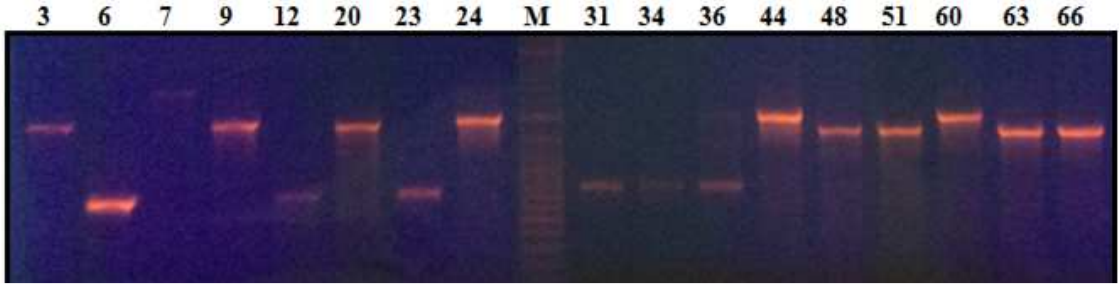
Şekil 26. *bla*_{TEM} geninin % 1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü

Primer tablosunda yer alan *bla*_{NDM-1}, *bla*_{VIM}, *bla*_{PER}, *bla*_{TEM} dışında araştırılan diğer β -laktamaz genleri hiçbir izolatta tespit edilmedi.

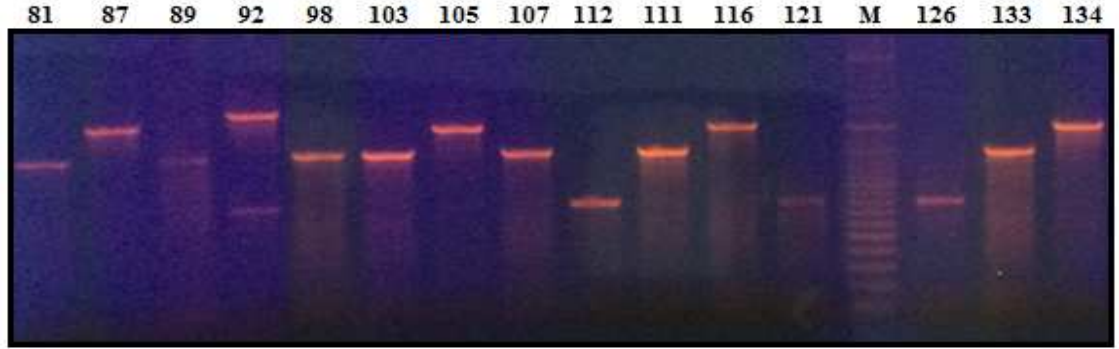
β -laktamaz taşıyan izolatlar PZR ile belirlendikten sonra bu izolatların β -laktamazların hangi aleli olduğunu tespit etmek için örnekler DNA dizi analizine gönderildi.

3.5. İntegronların Moleküler Yöntemlerle Araştırılması

P. aeruginosa izolatlarında PZR yöntemiyle Sınıf 1 ve Sınıf 2 integronların varlığı araştırıldı. Hiçbir izolatta Sınıf 2 integron tespit edilmezken 33 izolatta Sınıf 1 integron tespit edildi (Şekil 27 ve 28).

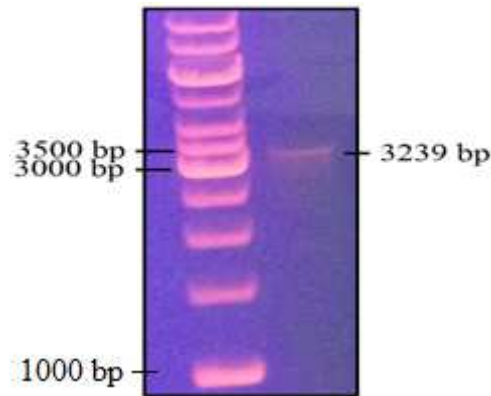


Şekil 27. Sınıf 1 integronların DNA markır ile % 1'lik agaroz jeldeki görüntüsü



Şekil 28. Sınıf 1 integronların DNA markır ile % 1'lik agaroz jeldeki görüntüsü

P. aeruginosa izolatlarının Sınıf 1 integronları PZR ile tarandıktan sonra % 1'lik agaroz jelde 1 kb markır (Thermo Fisher Scientific, ABD)'la yürütüldü. Sonrasında bunlardan PA140 nolu izolattaki fragmentin diğerlerine oranla daha büyük olduğu gözlemlendi (Şekil 29). Bu ve diğer integron pozitif izolatların hangi direnç genini kodladığını belirlemek için örnekler DNA dizi analizine gönderildi.



Şekil 29. Sınıf 1 integron pozitif PA140 nolu izolattın 1 kb (Thermo Fisher Scientific, ABD) markır'la % 1'lik agaroz jel görüntüsü.

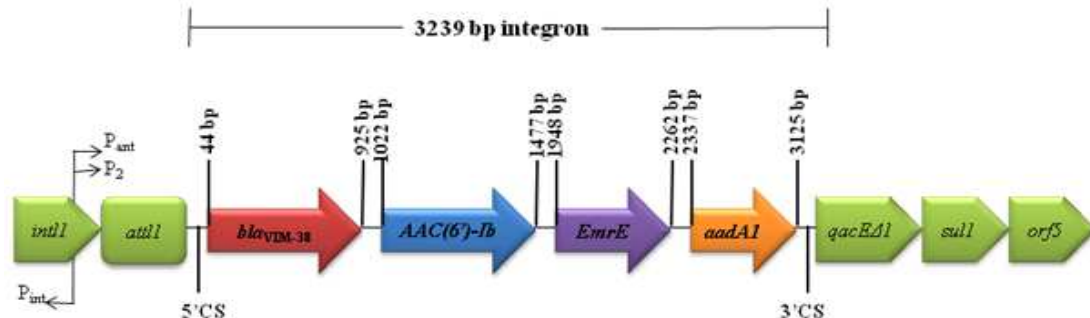
3.6. PZR ile Tespit Edilen β -Laktamaz Direnç Genlerinin ve İntegronların Baz Dizini Analizi

NDM-1, VIM, PER ve TEM tipi β -laktamaz ve integron örnekleri DNA dizi analizi ile elde edilen baz dizinleri ExPasy Translate Tool ve Protein-BLAST programları kullanılarak değerlendirildi. Örneklerin sekans sıraları ExPasy translate tool programıyla aminoasit sıralarına dönüştürüldü. Aminoasit dizilimine göre karşılaştırma işlemi BLAST programında yapılarak sonuçlar değerlendirildi. Buna göre β -laktamaz pozitif örneklerin 6 tanesi NDM-1, 1 tanesi VIM-2, 2 tanesi VIM-38, 3 tanesi PER-1 ve 4 tanesi ise TEM-1 olduğu tespit edildi. Sınıf 1 integron pozitif çıkan 33 izolattın BLAST değerlendirmesi sonucunda *AacA4*, *AacA4/OXA-2* benzeri, *AAC(6')-Ib/AacA4/AadA7e*, *AacA4/"AAC6'IB"*, *GcuD/AAC(6')-I/QacK*, *AacA4/AadA1*, *VIM-38/AAC(6')-Ib/EmrE/aadA1* Sınıf 1 integron gen kaset dizileri PZR ve baz dizini analizi ile belirlendi. İzolat numarasına göre taşıdıkları β -laktamaz direnç genleri ve integron gen kasetleri Tablo 15'te verildi.

PZR ile 140 nolu izolattın en büyük integron olduğu belirlendi. Sekans değerlendirmesi sonucunda *bla_{VIM-38}/AAC(6')-Ib/EmrE/aadA1* gen kaset dizisini taşıdığı belirlenen 3,239 bp büyüklüğündeki bu integronun literatüre bakıldığında yeni bir gen kaseti olduğu görüldü. Şekil 30'da integronun genel yapısı, Şekil 31'de bu çalışmada tanımlanan en uzun Sınıf 1 integronun yapısı verildi (Beriş vd., 2016).



Şekil 30. Sınıf 1 integronun korunmuş yapısı (Beriş vd., 2016).



Şekil 31. Bu çalışmada tanımlanan yeni Sınıf 1 integron gen kasetinin yapısı.

Tablo 15. β -laktamaz direnç genleri ve integron gen kasetleri

Suş Numaraları	Klinik örnek	Antibiyotik direnç profili	Direnç genleri	Gen kasetleri
PA3	Kan	IMP, MEM		<i>AacA4</i> , <i>OXA-2</i> benzeri
PA6	Yara	MEM		<i>AacA4</i>
PA7	ETA	IMP, MEM, SCP		<i>AAC(6')-Ib</i> , <i>AacA4</i> , <i>AadA7e</i>
PA9	ETA	IMP, MEM		<i>AacA4</i> , <i>OXA-2</i> benzeri
PA11	Kan	MEM, CAZ, AK	<i>TEM-1</i>	
PA12	ETA	IMP, MEM		<i>AacA4</i>
PA13	Apse	IMP	<i>NDM-1</i>	
PA20	ETA	IMP, MEM, CAZ, FEP, AK, CIP, SCP	<i>VIM-2</i> , <i>PER-1</i>	<i>AacA4</i> , <i>OXA-2</i> benzeri
PA22	Kan	MEM, PTZ	<i>TEM-1</i>	
PA23	ETA	MEM, CIP		<i>AacA4</i>
PA24	Plevral mayi	IMP, MEM		<i>AacA4</i> , <i>OXA-2</i> benzeri
PA31	Kan	-		<i>AacA4</i> , " <i>AAC6'IB</i> "
PA34	Kan	IMP, MEM	<i>NDM-1</i>	<i>AacA4</i> , " <i>AAC6'IB</i> "
PA36	Plevral mayi	PTZ, CAZ, FEP, CIP, SCP		2017 bp= <i>AacA4</i> , <i>OXA-2</i> benzeri,
				1496 bp= <i>GcuD</i> , <i>AAC(6')-I</i> , <i>QacK</i>
				826 bp= <i>AacA4</i> , " <i>AAC6'IB</i> "
PA44	ETA	IMP, MEM		<i>AacA4</i> , <i>OXA-2</i> benzeri
PA48	Yara	IMP, MEM		<i>AacA4</i> , <i>AadA1</i>
PA51	BAL	IMP, MEM, CAZ, FEP, CIP	<i>PER-1</i>	<i>AacA4</i> , <i>AadA1</i>
PA60	ETA	IMP, MEM		<i>AacA4</i> , <i>OXA-2</i> benzeri
PA63	Yara	IMP, MEM, PTZ, CAZ, FEP, SCP		<i>AacA4</i> , <i>AadA1</i>
PA66	ETA	PTZ, CAZ, FEP, CIP, SCP	<i>PER-1</i>	<i>AacA4</i> , <i>AadA1</i>
PA81	BAL	IMP, MEM, PTZ, CAZ, AK, CIP, SCP		<i>GcuD</i> , <i>AAC(6')-I</i> , <i>QacK</i>
PA84	Diren	CAZ	<i>TEM-1</i>	
PA87	Yara	IMP, MEM	<i>NDM-1</i>	<i>AacA4</i> , <i>OXA-2</i> benzeri
PA89	Plevral mayi	IMP, MEM, PTZ, AK, CIP, SCP		<i>GcuD</i> , <i>AAC(6')-Ib</i> , <i>QacK</i>
PA90	Katater	-	<i>TEM-1</i>	
PA92	Yara	IMP, MEM		3044 bp: <i>AAC(6')-Ib</i> , <i>AacA4</i> , <i>AadA7e</i> 677 bp: <i>AacA4</i>
PA95	ETA	CIP	<i>NDM-1</i>	
PA98	BAL	IMP, MEM, PTZ, CIP		<i>GcuD</i> , <i>AAC(6')-I</i> , <i>QacK</i>
PA103	Plevral mayi	IMP, MEM, PTZ, AK, CIP		<i>GcuD</i> , <i>AAC(6')-I</i> , <i>QacK</i>
PA105	Kan	IMP, MEM		<i>AacA4</i> , <i>OXA-2</i> benzeri
PA107	BAL	IMP, MEM, CIP		<i>GcuD</i> , <i>AAC(6')-I</i> , <i>QacK</i>
PA111	BAL	IMP, MEM, CIP		<i>GcuD</i> , <i>AAC(6')-I</i> , <i>QacK</i>
PA112	İdrar	MEM	<i>NDM-1</i>	<i>AacA4</i>
PA116	İdrar	-		<i>AacA4</i> , <i>OXA-2</i> benzeri
PA121	Kan	IMP, MEM, CIP		<i>AacA4</i>
PA126	ETA	CAZ, CIP	<i>NDM-1</i>	<i>AacA4</i>
PA133	Yara	IMP, MEM, CIP		<i>GcuD</i> , <i>AAC(6')-I</i> , <i>QacK</i>
PA134	Kan	IMP, MEM		<i>AacA4</i> , <i>OXA-2</i> benzeri

Tablo 15 (devam). β -laktamaz direnç genleri ve integron gen kasetleri

PA140	Kan	IMP, MEM, PTZ, CAZ, SCP	VIM-38	VIM-38, AAC(6')-Ib, EmrE, AadA1
-------	-----	----------------------------	--------	------------------------------------

PA: *P. aeruginosa*, BAL: Bronkoalveolar lavaj, ETA: Endotrakeal aspirat, IMP: İmipenem, MEM: Meropenem, PTZ: Pipersilin/Tazobaktam, CAZ: Seftazidim, FEP: Sefepim, AK: Amikasin, CIP: Siprofloksasin, SCP: Sefoperazon/Sulbaktam, *AacA4*: Aminoglikozid 6'-N-asetiltransferaz, *AadA1*: Aminoglikozid 3'-adeniltransferaz, *AAC(6')-Ib*: Aminoglikozid 6'-N-asetiltransferaz, *AadA7e*: Aminoglikozid adeniltransferaz benzeri protein, *OXA-2* benzeri: Sınıf D β -laktamaz, *GcuD*: OrfD tipi kabul edilen protein, *AAC(6')-I*: aminoglikozid N-asetiltransferaz *AAC(6')-II"*, *QacK*: Kuaterner amonyum bileşeni efluks SMR taşıyıcı *EmrE*: Çoklu ilaç taşıyıcı, *AAC6'IB*: 6'-N-aminoglikozid asetiltransferaz, VIM-38: Verona integron sınıf B β -laktamaz (metallo- β -laktamaz), NDM-1: New Delhi sınıf B β -laktamaz (metallo- β -laktamaz), PER-1: *Pseudomonas* genişlemiş direnç Sınıf A β -laktamaz, TEM-1: Temoniera Sınıf A β -laktamaz, (-): Duyarlı

3.7. Konjugasyon

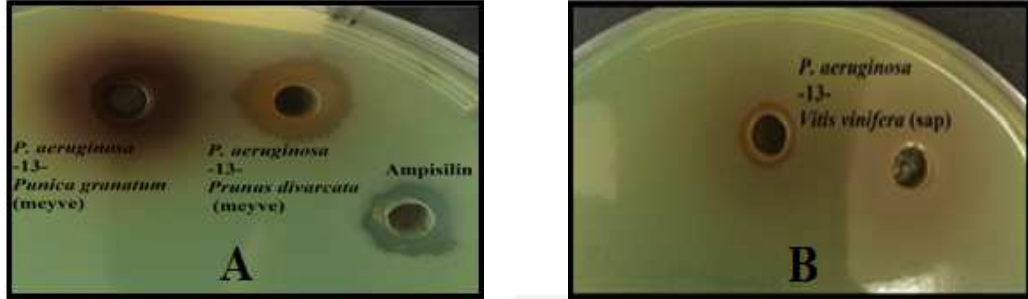
Konjugasyon deneyi sadece yeni gen kasetini taşıyan 140 nolu izolatta yapıldı. Kullanılan pozitif kontrol suşunda konjugasyon deneyi başarıyla gerçekleştirildi. *bla*_{VIM-38/AAC(6')-Ib/EmrE/aadA1} gen kaset dizisini barındıran *P. aeruginosa* izolatı ile yapılan konjugasyon deneyleri sonucunda ampisilin ve rifampisinli EMB'de üreyen *E. coli* K-12 J53-2 (met pro Rifr) transkonjugantları tespit edilmedi. *E. coli* K-12 J53-2 (met pro Rifr) alıcı hücrelerine *bla*_{VIM-38/AAC(6')-Ib/EmrE/aadA1} genleri aktarılamadığı belirlendi.

3.8. Bitki Ekstrelerinin Anti Pseudomonal Aktivitelerinin Araştırılması

Çalışmada direnç genleri taşıyan ve bir dizi antibiyotiklere dirençli olan toplam 91 adet *P. aeruginosa* suşuna karşı bitki ekstraktlarının etkinliği araştırıldı. 100 mg/ml'de hazırlanan özütlerden 100 μ l hacimde kuyucuklara ilave edilmesiyle 37°C'de gece boyu inkübasyon sonucunda elde edilen zon çapları; direnç profilleri, direnç genleri, gen kasetleri bilgilerinin de yer aldığı Tablo 16'da verildi.

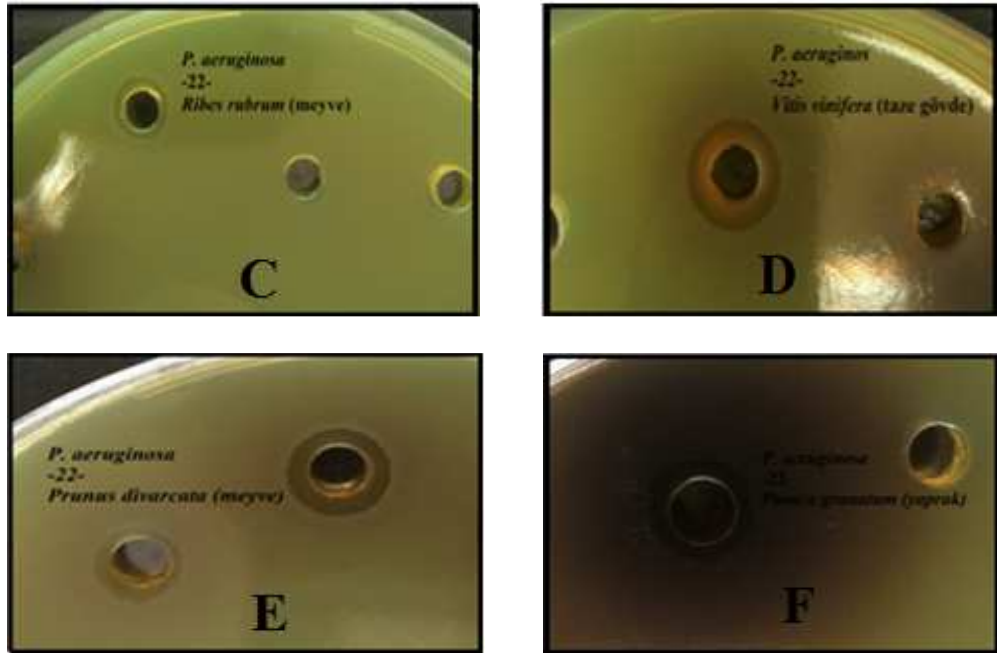
Deney, metanolde ekstrakte edilen on beş bitkiden sadece beş tanesinin (*P. granatum*, *P. divaricata*, *V. vinifera*, *R. rubrum*, *D. indica*) *P. aeruginosa*'ya karşı anti pseudomonal aktivite gösterdiği belirlendi. Bu suşlar sırasıyla PA13, PA22, PA36, PA48, PA51, PA92, PA112, PA140 suşlarıdır.

Çalışmada PA13 nolu *P. aeruginosa* suşuna karşı *P. granatum* (meyve), *P. divaricata* (meyve) ve *R. rubrum* meyve kısımları ile *V. vinifera*'nın taze sürgünlerinden elde edilen metanol ekstraktların 10 mg/ml konsantrasyonda 7-12 mm aralığında etkili oldukları gözlemlendi (Şekil 32).



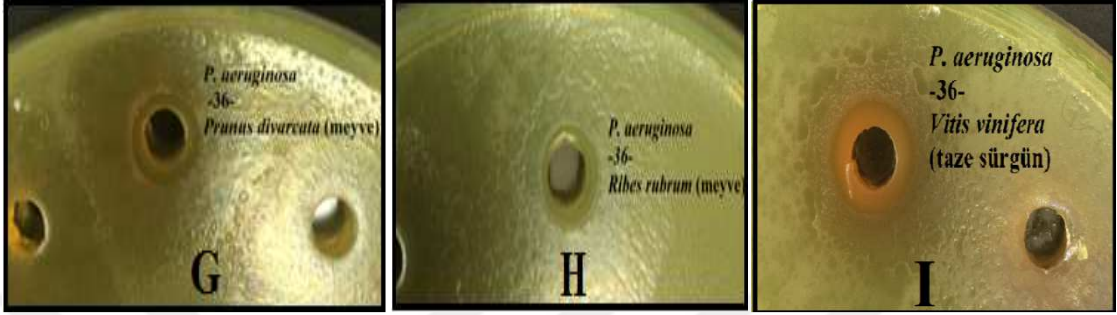
Şekil 32. *P. granatum* (A), *P. divaricata* (A), *V. vinifera* (B) ekstraktlarının PA13 nolu *P. aeruginosa* suşu üzerindeki inhibisyon etkisi.

Çalışmada PA22 nolu *P. aeruginosa* suşu üzerinde *R. rubrum* (meyve), *P. divaricata* (meyve) ve *P. granatum* (yaprak) kısımları ile *V. vinifera*'nın taze sürgünlerinden elde edilen metanol ekstraktların 10 mg/ml konsantrasyonda 7-11 mm aralığında etkili oldukları belirlendi (Şekil 33).



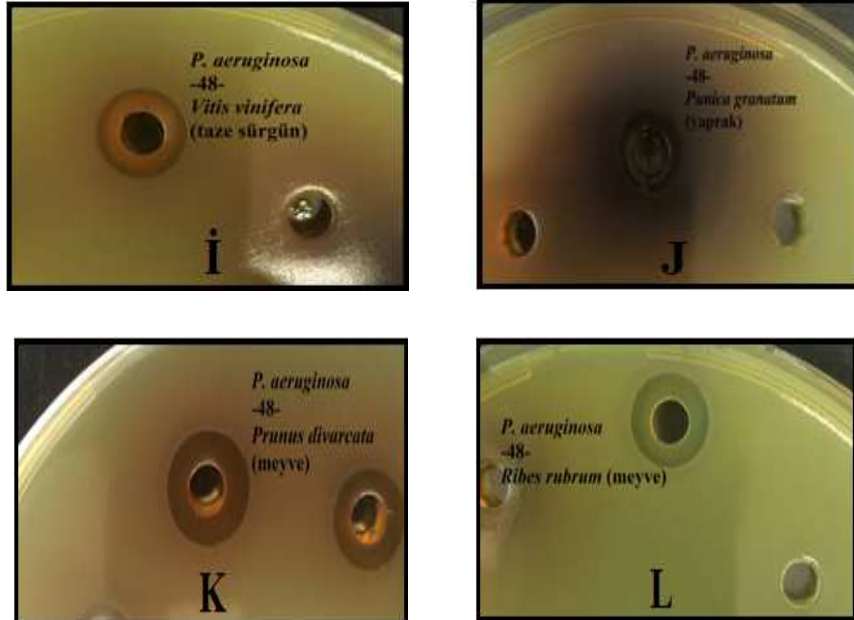
Şekil 33. *R. rubrum* (C), *V. vinifera* (D), *P. divaricata* (E), *P. granatum* (F) ekstraktlarının PA22 nolu *P. aeruginosa* suşu üzerindeki inhibisyon etkisi.

Çalışmada PA36 nolu *P. aeruginosa* suşuna karşı *P. divaricata* (meyve), *R. rubrum* (meyve), *V. vinifera* (taze sürgün) ve *P. granatum* (yaprak) kısımlarının metanol ekstraktlarının 10 mg/ml konsantrasyonda 8-12 mm aralığında etkili oldukları tespit edildi (Şekil 34).



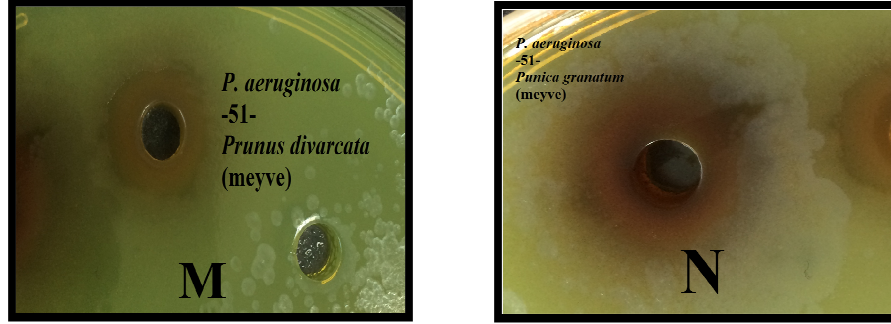
Şekil 34. *P. divaricata* (G), *R. rubrum* (H), *V. vinifera* (I) ekstraktlarının PA36 nolu *P. aeruginosa* suşu üzerindeki inhibisyon etkisi.

Çalışmada PA48 nolu *P. aeruginosa* suşuna karşı *V. vinifera* (taze sürgün), *P. granatum* (yaprak), *P. divaricata* (meyve) ve *R. rubrum* (meyve) kısımlarının metanol ekstraktlarının 10 mg/ml konsantrasyonda 10-12 mm aralığında etkili oldukları gözlemlendi (Şekil 35).



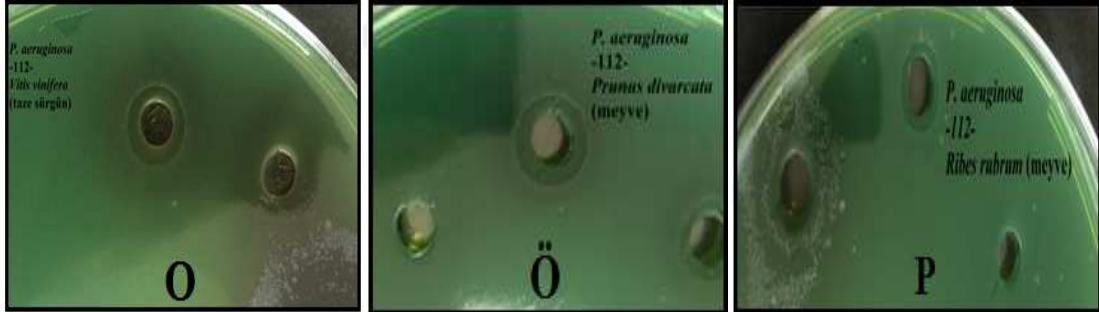
Şekil 35. *V. vinifera* (İ), *P. granatum* (J), *P. divaricata* (K), *R. rubrum* (L) ekstraktlarının PA48 nolu *P. aeruginosa* suşu üzerindeki inhibisyon etkisi.

Çalışmada PA51 nolu *P. aeruginosa* suşuna karşı *V. vinifera* (taze sürgün), *P. granatum* (yaprak), *P. divaricata* (meyve) kısımlarının metanol ekstraktlarının 10 mg/ml konsantrasyonda 6-12 mm aralığında etkili oldukları belirlendi (Şekil 36).



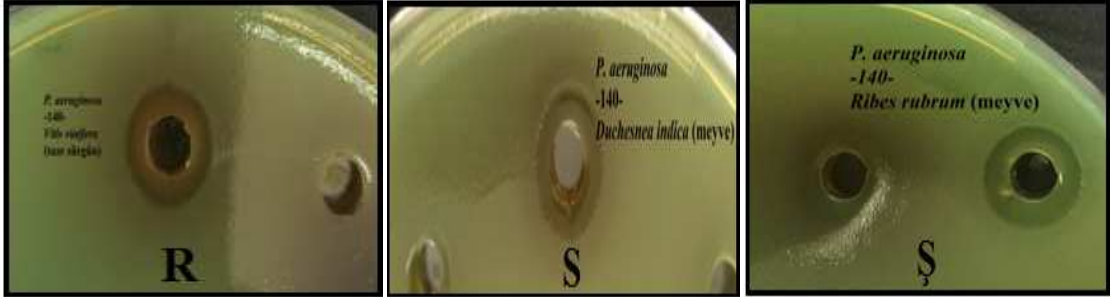
Şekil 36. *P. divaricata* (M), *P. granatum* (N) ekstraktlarının PA51 nolu *P. aeruginosa* suşu üzerindeki inhibisyon etkisi.

Çalışmada PA112 nolu *P. aeruginosa* suşuna karşı *V. vinifera* (taze sürgün), *P. divaricata* (meyve), *R. rubrum* (meyve) kısımlarının metanol ekstraktlarının 10 mg/ml konsantrasyonda 7-10 mm aralığında etkili oldukları gözlemlendi (Şekil 37).



Şekil 37. *V. vinifera* (O), *P. divaricata* (Ö), *R. rubrum* (P) ekstraktlarının PA112 nolu *P. aeruginosa* suşu üzerindeki inhibisyon etkisi.

Çalışmada PA140 nolu *P. aeruginosa* suşuna karşı *V. vinifera* (taze sürgün), *R. rubrum* (meyve), *P. granatum* (yaprak) ve *D. indica* (meyve) kısımlarının metanol ekstraktlarının 10 mg/ml konsantrasyonda 11-12 mm aralığında etkili oldukları tespit edildi (Şekil 38).



Şekil 38. *V. vinifera* (R), *D. indica* (S), *R. rubrum* (Ş) ekstraktlarının PA140 nolu *P. aeruginosa* suşu üzerindeki etkisi.

Tablo 16. Agar kuyucuk yöntemi ile oluşan zon çapları (mm)

<i>P. aeruginosa</i> izolatları		Agar Kuyucuk Yöntemi ile Oluşan Zon Çapları (mm)									
		ÖZÜTLER					PK				
Direnç geni	Gen kaset dizisi	<i>D. indica</i>	<i>P. divaricata</i>	<i>P. granatum</i>	<i>R. rubrum</i>	<i>V. vinifera</i>	Amp	DMSO	NK		
13	<i>NDM-1</i>	-	M ²	Y ³	M ⁴	TS ⁵	10	-	-		
20	<i>VIM-2, PER-1</i>	-	-	-	-	-	-	-	-		
22	<i>TEM-1</i>	-	10	8	7	11	-	-	-		
36	2017 bp: <i>AacA4, OXA-2</i> benzeri	-	8	8	9	12	-	-	-		
	1496 bp: <i>GcuD, AAC(6')-I, QacK</i>	-	-	-	-	-	-	-	-		
	826 bp: <i>AacA4, "AAC6'IB"</i>	-	12	10	12	11	-	-	-		
48	<i>AacA4, AadA1</i>	-	12	10	12	11	-	-	-		
51	<i>PER-1</i>	-	12	8	-	6	-	-	-		
92	3044 bp: <i>AAC(6')-Ib, AacA4, AadA7e</i>	-	-	-	-	-	-	-	-		
	677 bp: <i>AacA4</i>	-	-	-	-	-	-	-	-		
112	<i>NDM-1</i>	-	10	-	7	10	-	-	-		
140	<i>VIM-38</i>	11	-	11	12	11	-	-	-		
ATCC 27853		-	8	-	-	8	25	-	-		

M: Meyve, Y: Yaprak, Ç: Çiçek, PK: Pozitif kontrol, NK: Negatif kontrol, (-): Test edilen konsantrasyonda etki yok, Kullanılan konsantrasyon ^{1,2,3,4,5}: 100mg/ml

4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

P. aeruginosa, bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde kanser, diyabet, kistik fibrosiz, deri ve yara enfeksiyonları, nozokomiyal üriner sistem enfeksiyonları gibi ciddi ve hayatı tehdit eden enfeksiyonların en iyi bilinen etkenlerinden biridir. Doğal direnç mekanizmalarına sahip olmalarının yanı sıra çoklu antibiyotik direnci geliştirebilen *P. aeruginosa* tedavisi de ciddi problemler yaratmaktadır (Strateva ve Yordanov, 2009).

Bu çalışmada yoğun bakım ünitelerinde yatan immün süpresif hastalaradan izole edilen 91 *P. aeruginosa*'nın antibiyotik direncinin kökeni araştırıldı. Edilen örneklerin klinik dağılımı; solunum yolu örneklerinde endotrakeal aspirat % 34, bronkoalveolar lavaj % 9,9, plevral mayi % 5,5, kan akımı örneklerinden kan % 23, katater % 4,4 ve cilt ve yumuşak doku örneklerinden yara sürüntü % 9,9 olarak temin edilmiştir. Ülkemizde yapılan birçok çalışmada *P. aeruginosa* suşlarının benzeri örneklerden izole edilen ve çeşitli açılardan incelenen çok sayıda çalışma olduğu belirlenmiştir (Cesur vd., 2002; Çiftçi vd., 2005; Dündar ve Tamer, 2009; Ersöz vd., 2004; Gündüz vd., 2004).

P. aeruginosa'nın birçok antibiyotiğe doğal dirençli olması ve kullanımda olan antimikrobiyal ajanlara karşı direnç geliştirebilmesi nedeniyle *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisi oldukça güçtür. Geniş spektrumlu penisilinler, karbapenemler (imipenem, meropenem), monobaktamlar (aztreonam), aminoglikozidler (amikasin), üçüncü kuşak sefalosporinler (seftazidim, sefoperazon), florokinolonlar (siprofloksasin) *Pseudomonas* türlerine etkili olan ve yaygın kullanılan antibiyotiklerdir.

Türkiye'de yapılmış bir çalışmada *P. aeruginosa* suşlarında direnç oranları imipenem % 57, meropenem % 51, siprofloksasin % 47, amikasin % 33 olarak belirtilmiştir (Kalem vd., 2008). Yücel vd. (2006) tarafından yapılan bir çalışmada yoğun bakım hastalarından temin edilen enfeksiyon etkeni ya da kolonizan olarak düşünülen 265 *P. aeruginosa* suşunun örneklere göre dağılımının; 59 (% 22) trakeal aspirat, 58 (% 22) idrar, 41 (% 15) yara, 38 (% 14) balgam, 32 (% 12) bronkoalveolar lavaj sıvısı, 21 (% 8) kan, 16 (% 6) diğer şeklinde olduğu saptanmıştır. Bu suşların

antibiyotik direnci incelendiğinde % 26 amikasin, % 31 imipenem, % 40 seftazidim, % 34 sefepim, % 42 gentamisin, % 35 aztreonam, % 30 siprofloksasin, % 29 piperasilin/tazobaktam direnci var olduğu bildirilmiştir. Tunçoğlu vd. (2009) tarafından yapılan çalışmada, 179 *P. aeruginosa* izolatının klinik örneklerle göre % 36'sı yara, % 32'si idrar, % 13'ü balgam, % 6'sı bronkoalveolar lavaj, % 6'sı trakeal aspirat, % 4'ü plevral sıvı, % 3'ü kandan olmak üzere dağılım gösterdiği bildirilmiştir. İzolatların % 39,1'i sefepim, % 22,9'u seftazidim, % 18,4'ü piperasilin, % 44,7'si aztreonam, % 9,5'i meropenem, % 7,8'i imipenem, % 5,6'sı amikasin, % 16,2'si gentamisin, % 22,9'u siprofloksasin direnci taşıdığı belirlenmiştir. Cesur vd. (2002) tarafından yapılan bir çalışmada hastanede yatan hastalara ait çeşitli klinik örneklerden izole ettikleri ve klasik mikrobiyolojik yöntemlerle tanımlanan 255 *P. aeruginosa* izolatının direnç oranlarını imipenem % 38, meropenem % 49, sefepim % 63, seftazidim % 55, aztreonam % 51 olarak bildirmişlerdir. 2012-2015 yılları arasında mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen toplam 298 *P. aeruginosa* izolatının dahil edildiği bir çalışmada, direnç oranları piperasilin/tazobaktam % 42,6, seftazidim % 29,6, gentamisin % 28,3, siprofloksasin % 27, sefepim % 25, meropenem % 24,6, imipenem 19,5, amikasin % 12 ve kolistin % 3 olarak bildirilmiştir (Tümer vd., 2015). 2008-2009 yılları arasında yapılmış diğer bir çalışmada 87 *P. aeruginosa* suşunun % 75 trakeal aspirat, % 8 yara, % 7 kan, % 4 idrar, % 6 diğer örneklerinden izole edildiler. *P. aeruginosa* suşlarının ve antipsödomonal antibiyotiklere karşı direnç oranları; amikasine % 11, siprofloksasine % 38, seftazidime % 47, levofloksasine % 51, meropeneme % 60, piperasilin/tazobaktama % 66, imipenem ve gentamisine % 71, aztreonama, % 72, piperasiline % 74, sefepime % 76 olarak bildirilmiştir (Berктаş vd., 2011).

Duman vd. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada trakeal aspirat, balgam, yara, kan, dren, beyin omurilik sıvısı ve katater örneklerinden izole edilen 307 *P. aeruginosa* izolatında % 1,3 amikasin, % 12,4 gentamisin, % 11,4 imipenem, % 8,5 seftazidim, % 10,4 sefepim, % 7,5 sefoperazon/sulbaktam, % 21,8 piperasilin, % 5,2 piperasilin/tazobaktam, % 7,8 aztreonam, % 7,2 siprofloksasine direnç bildirilmiştir. Özdemir vd. (2009) tarafından yapılan bir çalışmada hastane enfeksiyonu tanısı alan hastaların 53 trakeal aspirat, 54 yara, 20 bronkoalveolar lavaj sıvısı, 14 kan, 13 idrar, 3 katater, 2 beyin omurilik sıvısı klinik örneklerinden izole edilen 159 *P. aeruginosa*

suşunda amikasinine (% 24), gentamisine (% 52), imipeneme (% 54), seftazidime (% 36), sefepime (% 43), sefoperazon/sulbaktama (% 32), piperasiline (% 23), aztreonama (% 48) ve siprofloksasine (% 44) oranlarında direnç bildirilmiştir. 2008-2009 yıllarında kan kültürlerinden izole edilen 92 *P. aeruginosa* suşunda amikasinine ve piperasilin/tazobaktama % 18, piperasiline % 25, siprofloksasine % 28, imipeneme % 30, seftazidime % 32, gentamisine % 35, sefepime % 41, sefotaksime % 91 olarak direnç saptanmıştır (Dağı vd., 2011). Ekşi vd. (2007) tarafından yapılan bir çalışmada yatan ve ayakta takip edilen hastalara ait çeşitli klinik örneklerden izole edilen 51 *P. aeruginosa* suşunda piperasilin/tazobaktam ve imipenem % 7,8, siprofloksasin % 9,8, piperasilin % 21,6, seftazidim ve sefepim % 23,5, gentamisin % 27,5, seftriakson % 29,4, aztreonam % 33,3, sefotaksim % 56,9, trimetoprim/sulfometaksozol % 82,3 oranlarında direnç bildirilmiştir. Eyigör vd. (2009) tarafından yapılmış bir çalışmada izole *P. aeruginosa* klinik izolatların dağılımı 36'sı yara yeri, 20'si balgam, 19'u idrar, 11'i kan ve 8'i diğer örneklerden olmak üzere 94 *P. aeruginosa* izolatu test edilmiş amikasinine en düşük direnç (% 1) belirlenirken, en yüksek direnç (% 16) siprofloksasine karşı bildirilmiştir. Öztürk vd. (2010) tarafından 97 *P. aeruginosa* suşunda amikasinine % 4, siprofloksasine % 14, piperasilin/tazobaktama % 21, imipenem ve seftazidime % 23, gentamisine % 25, piperasiline % 28, sefoperazon/sulbaktama % 34, fosfomisine % 37, sefepime % 87, amoksisilin/klavulanik aside % 98 oranında direnç saptanmıştır. Nozokomiyal enfeksiyon etkeni olarak izole edilen 110 *P. aeruginosa* suşunda seftazidime % 3, sefepime % 4, amikasin ve piperasiline % 6 ve siprofloksasine % 8 oranında direnç gözlenmiştir (Mansur vd., 2013). Ak vd. (2016) tarafından çeşitli klinik örneklerden izole edilen 151 *P. aeruginosa* izolatının antibiyotik direnç oranları amikasinine % 3, gentamisin ve seftazidime % 9, piperasilin/tazobaktama % 7, levofloksasine % 13, imipeneme % 8 ve meropeneme % 5 olarak belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında incelenen *P. aeruginosa* suşları imipenem % 53,8, meropenem % 62,6, siprofloksasin % 26,4, seftazidim % 18,7, piperasilin/tazobaktam % 14,3, sefoperazon/sulbaktam % 14,3 amikasin % 9,9, sefepim % 7,7 antibiyotiklere direnç oranları bulunmuştur. Diğer çalışmalar içinde bu çalışmada belirlenen % 62,6 oranında meropenem direnci en yüksek direnç oranı, % 7,7 oranındaki sefepim direnci ise en düşük direnç oranı olarak tespit edildi. Bu çalışmada elde edilen direnç oranlarının Türkiye'de ve dünyada belirlenen direnç oranlarından farklılık göstermediği belirlendi.

Sheikh vd., (2014) tarafından İran'da yapılmış olan çalışmada 223 *P. aeruginosa* izolatının izolatların % 58,7'si imipeneme, % 31,8 meropeneme, % 13,5 doripeneme ve % 74,4 ertapenem'e dirençli olduğu bildirilmiştir. Tüm *P. aeruginosa* izolatları arasında % 44,4'ü çoklu ilaç dirençli, % 13,45'i karbapenemlere karşı dirençli tespit edilmiştir. *P. aeruginosa* suşlarında karbapenem direncinin gelişimi, çoklu antibiyotiğe direnç gelişiminin önemli bir göstergesi olarak yorumlanabilir. Yapılan çalışmalara göre izolatların antibiyotiklere direnç oranları ülkelere, coğrafik bölgelere, hastaneden hastaneye hatta bölümlere göre değişebilmektedir. Bu farklılıkların nedeni her zaman açıklanamasa da hastaneler veya ülkelerin antibiyotik kullanım politikaları, enfeksiyon kontrol önlemleri gibi faktörlerden kaynaklanabileceği bildirilmektedir (Öztürk vd., 2010).

Bu çalışmada kullanılan antibiyotiklerin tümüne duyarlı 19 adet suş (PA9, PA26, PA31, PA35, PA38, PA41, PA45, PA61, PA74, PA85, PA90, PA93, PA94, PA96, PA97, PA116, PA127, PA137, PA142) var olduğu gözlemlendi (Tablo 13). Bu suşların muhtemelen normal flora üyesi *P. aeruginosa* olduğu ve henüz direnç geliştirmemiş olduklarından dolayı kontaminant olabilecekleri düşünülmektedir. Bunun yanı sıra 10 izolatta tek bir antibiyotiğe karşı (SCP % 5,5, MEM % 2,2, PTZ % 1,1 ve CIP % 1,1) direnç var olduğu, geri kalan 63 izolatta ise 2-7 farklı antibiyotiğe karşı çoklu antibiyotik direnci gözlenmiştir (Tablo 13). En fazla iki antibiyotiğe karşı direnç % 22 oranında IMP ve MEM birlikteliğinde gözlenmiştir. Bu durum benzer grup antibiyotik olduklarından ve etki mekanizmalarının benzer olmasından dolayı olduğu düşünülmektedir. En sık gözlenen çoklu direnç sırasıyla 3 farklı antibiyotiğe birlikte direnç 13 suшта gözlenirken (PA4, PA7, PA11, PA32, PA37, PA42, PA43, PA83, PA87, PA104, PA114, PA136, PA141) bunu sırasıyla 5 farklı antibiyotik birlikteliğine 8 izolat (PA50, PA51, PA56, PA57, PA108, PA111, PA121, PA126) ve 7 farklı antibiyotik birlikteliğine karşı 6 izolatta (PA20, PA25, PA36, PA81, PA107, PA133) gözlenmiştir. Bu sonuçlar muhtemel direnç genlerinin varlığını ve antibiyotik direncinin genetik yollarla (konjugasyon, transformasyon ve transdüksiyon meydana gelmiş olabileceğini göstermektedir. Ayrıca çoklu antibiyotik direnci olan suşların potansiyel hastane kaynaklı (Nozokomial) enfeksiyon etkeni olabileceklerini de göstermektedir.

Malkoçoğlu vd. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada karbapenem dirençli toplam 84 *P. aeruginosa* izolatında bla_{KPC} , bla_{NDM} , bla_{IMP} , bla_{VIM} , bla_{OXA-48} ve bla_{GES} genlerinin varlığını polimeraz zincir reaksiyonu ile araştırmış, karbapenemazları kodlayan VIM-1, VIM-2, GES-5 direnç genlerinin varlığını göstermiştir. Er vd. (2015) tarafından yapılan çalışmada çeşitli antibiyotiklere dirençli 195 *P. aeruginosa*'da PER, GES, KPC, VIM, IMP ve OXA enzimlerini kodlayan direnç genlerinin varlığı araştırılmış ve 5 izolatta OXA-10, 4 izolatta OXA-14, 4 izolatta VIM-2, 2 izolatta IMP-1 ve 26 izolatta ise GES-1 gen bölgesi varlığı gözlenirken PER ve KPC genlerinin belirlenemediği bildirilmiştir.

Güney Çin'de 4 hastaneden toplanmış 51 seftazidim dirençli klinik *P. aeruginosa* izolatında 9 CTX-M tipi genişlemiş spektrumlu β -laktamaz (GSBL), 1 izolat VIM-2 ayrıca, 14 izolatta yeni bir OXA-10 varyantı OXA-246'nın varlığı bildirilmiştir (Qing vd., 2014). 2011-2012 yılları arasında Litvanya'nın Kaunas kentinde bir hastanede toplanmış 73 karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatlarının % 26'sında kazanılmış β -laktamaz direnci tespit edilmiş ve bunların 16'sı VIM-2, 1'i PER-1 ve 2'si GES enzimi içerdiği belirlenmiştir (Mikucionyte vd., 2016). Zafer vd. (2014) tarafından metallo β -laktamaz (MBL) ve GSBL prevalansının araştırıldığı çalışmada % 27'si MBL ve % 7,4'ü GSBL direnci taşıyan 122 *P. aeruginosa* izolatında, bla_{VIM-2} (% 58,3), bla_{OXA-10} (% 41,7), bla_{VEB-1} (% 10,4), bla_{NDM} (% 4,2), bla_{IMP-1} benzeri % (2,1) oranlarında direnç genlerinin varlığı tespit edilmiştir. İran'da 223 *P. aeruginosa* izolatıyla yapılan bir çalışmada IMP (% 11,7) ve VIM (% 0,4) genleri tespit edilmiştir (Sheikh vd., 2014). MBL direnç genlerinin araştırıldığı bir çalışmada karbapenem dirençli 96 tane *P. aeruginosa* izolatından 27'sinde (% 28,1) IMP, 5'inde (% 5,2) VIM ve 3'ünde (% 3,1) hem VIM hem de IMP pozitifliği bildirilmiştir (Shirani ve Roshandel, 2016).

Bu tez çalışmasında ise 91 *P. aeruginosa* izolatından 9'unda % 9,9 MBL ve 7'sinde % 7,7 oranında ise GSBL direnç genleri tespit edildi. Direnç genleri belirlenen izolatların 4'ünde bla_{TEM-1} , 3'ünde bla_{PER-1} , 1'inde bla_{VIM-2} , 2'sinde bla_{VIM-38} , 6'sının bla_{NDM-1} genleri taşıdığı PZR ve baz dizin analizi yöntemiyle belirlendi. Bir izolatta (PA20) VIM-2/PER-1 birlikteliği tespit edildi. Metallo β -laktamaz genlerinin tespit edildiği izolatların antibiyotik direnç profillerine bakıldığında, birçoğunun karbapenem

direnç taşıdığı bildirilmektedir. *P. aeruginosa*'da karbapenem direncinde etkili olan faktörler plazmit ya da integron aracılı karbapenemazlar, efluks sistemlerinin ifadesinde artış, porin ifadesinde azalma ve kromozomal sefalosporinaz aktivitesi varlığı gözlenmektedir (Meletis vd., 2012). Çalışılan suşların bazılarında metallo β -laktamaz geni olmasına rağmen karbapenem direncinin olmaması dirençte farklı mekanizmaların rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Karbapenem dirençli bir *P. aeruginosa* tehdidi, ülkemiz için büyük bir risk oluşturabilir. Karbapenemaz genleri dirençli suşların gelişmesinde ve yayılmasında hayati bir rol oynamaktadır.

İntegronlar, gen kasetlerini yakalama, ifade etme ve değiştirme özelliğine sahip bölgeye özgü rekombinasyon sistemi içeren genetik yapılardır. Antibiyotik direncini kodlayan genler plazmitler, kromozomlar veya transpozonlar üzerinde yerleşmiş integron isimli hareketli genetik elementler tarafından taşınmaktadır. Bu sayede integronlardaki gen kasetlerine ait antibiyotik direnç genlerinin Gram negatif bakteriler arasında yayılması beklenen bir etkidir. Bu durum enfeksiyonların tedavisini zorlaştırmaktadır.

Çin'de yapılmış bir çalışmada Sınıf 1 pozitif integronların oranları *P. aeruginosa*'da % 40,8 (40/98), *Acinetobacter*'de % 52,8 (56/106) bildirilmiştir (Xia vd., 2016). Çin'de yapılmış başka bir çalışmada 118 imipenem dirençli *P. aeruginosa* izolatında 51 tanesi Sınıf 1, 20 tanesi Sınıf 2 ve 3 tanesi ise hem Sınıf 1 hem de Sınıf 2 integron pozitifliği saptanmıştır. *P. aeruginosa*'da *dfrA1-sat1-aadA1* ile Sınıf 2 integronları ilk kez rapor etmişlerdir. Sınıf 1 ve 2 integronları taşıyan klinik *P. aeruginosa* izolatları aynı anda ilk kez tanımlanmıştır (Xu vd., 2009). Güney Kore'de 29 hastaneden toplanan ve % 34,3'ü karbapenem direnci taşıyan 431 klinik *P. aeruginosa* suşunda, IMP-6, VIM-2, IMP-10 ve GES-24 taşıyıcılığı ve bu genlerin, kromozom üzerinde 6 farklı türden Sınıf 1 integron üzerine yerleşmiş oldukları tespit edilmiştir (Hong vd., 2016). 2011-2013 yılları arasında 56 imipenem dirençli *P. aeruginosa* izolatıyla yapılmış çalışmada, izolatların % 42,9'unda 1054 bp büyüklüğünde (*int11-aacA56-qacEA1-sul1*) ve 1160 bp büyüklüğünde (*int1-aacA4-aacC1d-ISKpn4-gcuE-qacEA1-sul1*) Sınıf 1 integron tespit edilmiş *bla*_{VIM-2} geni Sınıf 1 integron gen kaset dizisinde bulunmuştur (Rojo-Bezares vd., 2016). İran'da 98 *P. aeruginosa* izolatıyla yapılmış bir çalışmada Sınıf 1 ve 2 integronlar sırasıyla % 57,2 ve

% 30,6 oranlarında bulunmuş 12 (% 12,2) izolatta ise her iki integron pozitifliği bildirilmiştir. Aynı çalışmada izolatların sefotaksim, aztereonam, imipenem, tobramisin, tikarsilin, siprofloksasin ve kloksasiline direncinin integronların varlığı ile anlamlı derecede ilişkili olduğu gözlemlenmiştir (Goudarzi vd., 2016).

Türkiye’de farklı hastanelerden toplanan 205 *P. aeruginosa* suşunun kullanıldığı bir çalışmada Sınıf 1 integronlarına entegre edilen *aadA* geni en sık bulunmuştur ve onu *aac* genleri ve *bla_{OXA}* ailesi genleri izlemiştir. Sınıf 1 integronların değişken bölgelerinin dizi analizi ile beş gen kaset dizisini *aadA1*, *aac(3)-Id-orf-aac(3’)-Ia*, *aac(3)-Ie-bla_{OXA-10}-aadA1*, *aadA6*, *aac(6’)-I-orf-aadA2* olarak göstermişlerdir (Cicek vd., 2013b). Ertekin, (2012) tarafından yapılan çalışmada farklı klinik örneklerden izole edilen toplam 50 *A. baumannii* suşu ile yapılmış çalışmada izolatların % 34’ünde (17/50) Sınıf 1 integron varlığı bildirilmiştir. Klinik örneklerden izole edilen 60 *P. aeruginosa* ve 77 *A. baumannii* izolatlarında Sınıf 1 ve 2 integron taşıyıcılığının araştırıldığı bir çalışmada, tüm integron pozitif *P. aeruginosa* suşlarında seftazidim, gentamisin ve siprofloksasine karşı direncin yaygınlığı bildirilmiştir. Yapılan DNA sekans analizlerinde integronların değişken bölgelerinin iki tür gen kaset dizisinin (*bla_{OXA-30}-aadA1* ve *bla_{OXA-11}-cmIA7*), *P. aeruginosa* soyları tarafından taşındığı *bla_{OXA-11}-cmIA7* gen dizisi *P. aeruginosa*’nın bir integron gen kasetinde varlığı ilk kez bildirilmiştir (Mengelolu vd., 2014).

Eraç vd. (2013) tarafından yapılan 73 *P. aeruginosa* izolatının da dahil olduğu 169 Gram negatif bakterinin kullanıldığı bir çalışmada PER-1 prevalansı araştırılmıştır. Seftazidim dirençli izolatların 33 (% 19,5)’ünde PER-1 belirlenmiş ve bu oranın % 23,3 *P. aeruginosa* PER-1 pozitif olarak tespit edilmiştir. İzolatların % 52,7’sinde Sınıf 1 integron pozitif sonuç elde edilmiş ve bu oranın % 49,3’ünü *P. aeruginosa* izolatlarının oluşturduğu bildirilmiştir.

Bu çalışmada imipenem (% 53,8), meropenem (% 62,6), piperasilin/tazobaktam (% 14,3), seftazidim (% 18,7), sefepim (% 7,7), sefoperazon/sulbaktam (% 14,3), amikasin (% 9,9), siprofloksasin (% 26,4) direncine sahip Sınıf 1 ve Sınıf 2 integronları, araştırılan 91 *P. aeruginosa* izolatının 33 (% 36,3)’ünde PZR ve baz dizin analizi ile belirlenen *AacA4*, *AacA4/OXA-2* benzeri, *AAC(6’)-Ib/AacA4/AadA7e*,

AacA4/AAC6'IB", *GcuD/AAC(6')-I/QacK*, *AacA4/AadA1*, *VIM-38/AAC(6')-Ib/EmrE/aadA1* Sınıf 1 integron gen kaset dizilerinin yedi farklı tipte olduğu tespit edildi. Bu profiller arasında, AAC gen ailesi (aminoglikozidlere direnç kazandırır) Sınıf 1 integron gen kasetlerinde en sık bulunmuştur. İzolatların hiçbirinde Sınıf 2 integron tespit edilemedi. *P. aeruginosa*'da 3,239 bp büyüklüğünde olan *bla_{VIM-38}/AAC(6')-Ib/EmrE/aadA1* yeni gen kaset dizisi tespit edildi (Beriş vd., 2016). VIM-38 ikinci kez Türkiye'de farklı izolasyon zamanlarında ve farklı hastanelerden izole edilen *P. aeruginosa* izolatlarında bulundu. Bu çalışmada Türkiye'de Sınıf 1 integronları ve bir gen kasetini barındıran VIM üreten çoklu ilaç dirençli *P. aeruginosa* suşlarının ortaya çıktığı görülmektedir. Özellikle de *bla_{VIM-38}* MBL geninin Türkiye'de *P. aeruginosa* izolatları arasında yayıldığı görülmektedir. Sonuç olarak, *P. aeruginosa*'da Sınıf 1 integronların varlığı antibiyotiklere karşı direncin artmasına önderlik etmektedir.

Yapılan çalışmalarda *P. aeruginosa*'da Sınıf 1 integron taşıyıcılığı Sınıf 2'ye göre daha yüksek bulunmuştur (Xia vd., 2016; Xu vd., 2009; Goudarzi vd., 2016). Literatürle uyumlu olarak bu çalışmada Sınıf 1 integron tespit edilirken Sınıf 2 integron tespit edilmedi. Karbapenemlere dirençli *P. aeruginosa* izolatlarında Sınıf 1 integron taşıyıcılığı birçok çalışmada gösterilmiştir (Xu vd., 2009; Hong vd., 2016; Rojo-Bezares vd., 2016). Mirnejad vd., (2013) tarafından yapılan bir çalışmada % 53,8 imipenem, % 62,6 meropenem direnci tespit edilen izolatlarda Sınıf 1 integron taşıyıcılığı belirlendi. Diğer bir çalışmada integron taşıyıcılığı ve antibiyotik duyarlılık profili istatistiksel olarak analiz edilmiş ve gentamisin, piperasilin/tazobaktam, imipenem, meropenem, ampisilin/sulbaktam ve tobramisin dirençleriyle integron varlığı ilişkisi anlamlı bulunmamıştır. Antibiyotik direncinde integron dışında farklı direnç mekanizmalarının da buna neden olabileceği belirtilmiştir. Tez çalışmasında integronlarda tespit edilen direnç genlerinin antibiyotik duyarlılık profilleri ile bazı izolatlarda uyum gözlenirken bazılarında gözlenmedi. Bu bağlamda Mirnejad ve arkadaşlarının belirttiği şekilde çalışılan izolatlarda antibiyotik direncinde farklı mekanizmalarının etkili olabileceği düşünülmektedir.

Son zamanlarda patojenik mikroorganizmalara karşı artan antibiyotik direnç problemi yeni antibiyotik ajanlar için bitkisel ürünlerin araştırılmasına yol açmıştır. Eskiden beri, halk arasında geleneksel olarak bazı bitkilerin çeşitli hastalıkların

tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir. Geleneksel tıbbın bu sistemi gelişmiş ülkelerin çoğunda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu bitkiler aktif bileşenlere sahiptir ve bu bileşenler onlara tıbbi değer kazandırır.

Oskay vd. (2009) tarafından yapılan bir çalışmada geleneksel tıpta kullanılan 19 bitki türünün etanol ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesi, çoklu ilaç dirençli klinik izolatlar (*P. aeruginosa* sulfametoksazol ve novobiosin dirençli) karşı agar kuyucuk difüzyon metoduyla test edilmiş *P. aeruginosa*'da *V. vinifera* için 24 mm, *P. granatum* için 16 mm, çaplarında anti bakteriyel aktivite gösterilmiştir. *V. vinifera*'nın yaprak kısmının sıcak su ekstraktları ile yapılmış antimikrobiyal aktivitenin agar disk difüzyon metoduyla araştırıldığı bir çalışmada *P. aeruginosa* ATCC 2435 izolatında 23,7 mm zon çapı belirlenmiştir (Ahmad vd., 2014). *P. granatum*'un 6 çeşitinin meyvelerinden elde edilen ekstraktların kullanıldığı bir çalışmada, *P. aeruginosa*'ya karşı 19-21 mm arasında inhibisyon zonu tespit edilmiştir (Duman vd., 2009).

Bu çalışmada 15 adet bitkinin meyve, yaprak ve taze sürgün kısımlarından hazırlanan metanol ekstraktları β -laktamaz direnç geni ve integron gen kaseti içeren ve içermeyen bir grup *P. aeruginosa*'ya karşı test edildi. Bitki ekstraktlarının etkisini araştırmak için bu çalışmada tespit edilen NDM-1, TEM-1, PER-1, VIM-38 ve PER-1/VIM-2 pozitif suşlarla *AacA4*, *AacA4/OXA-2* benzeri, *AAC(6')-Ib/AacA4/AadA7e*, *AacA4/AAC6'IB*", *GcuD/AAC(6')-I/QacK*, *AacA4/AadA1*, *VIM-38/AAC(6')-Ib/EmrE/aadA1* direnç gen kasetlerini taşıyan suşlar seçildi. *R. rubrum* (meyve), *P. divaricata* (meyve), *D. indica* (meyve), *P. granatum* (yaprak) ve *V. vinifera* (taze sürgün) metanol ekstraktlarının direnç genleri ve direnç gen kasetlerini taşıyan klinik *P. aeruginosa* suşları üzerinde etkileri belirlendi. Özütlerin hepsinin dirençli izolatlar üzerine etkili olmadığı gözlemlendi. Yapılan bir kısım çalışmalarda standart ve dirençli klinik *P. aeruginosa* izolatlarında *V. vinifera* için yaklaşık 24 mm zon çapında antimikrobiyal aktivite gözlemlendiği belirtildi (Oskay vd., 2009; Ahmad vd., 2014). Bu çalışmada ise dirençli klinik *P. aeruginosa* izolatlarında *V. vinifera* için 6-12 mm zon çapında etki gösterdiği belirlendi. Ayrıca *P. granatum* için literatürde yaklaşık 16-21 mm zon çapında antibakteriyel aktivite gözlenirken (Oskay vd., 2009; Duman vd., 2009) bu çalışmada ise 8-12 mm zon çapında etki gösterdiği tespit edildi. Pakistan'da standart bakterilerle yapılmış bir çalışmada *D. indica*'nın n-bütanol fraksiyonunun *P.*

aeruginosa izolatları üzerine 13 mm çapında zon oluşturduğu bildirilmiştir (Khuda vd., 2012). Bu tez çalışmasında *D. indica*'nın metanol ekstraksiyonunun dirençli klinik *P. aeruginosa* izolatu üzerine etkisi 11 mm olarak belirlendi. Bitkiler taninler, terpenoidler, alkaloidler ve flavonoidler gibi fenolik bileşiklerin çeşitli gruplarını içermektedirler. Fenolik bileşikler bakteriler, mantarlar ve diğer mikroorganizmalara karşı güçlü antimikrobiyal potansiyele sahiptirler. Bitkilerin yetiştiği coğrafi koşullar o bitkinin fitokimyasal içeriğine etki edebilmektedir (Keskin ve Toroglu, 2011). Farklı dirence sahip izolatlar karşı aynı bitkilerin antimikrobiyal etkisi değişiklik gösterebilir. Ayrıca antimikrobiyal aktivitede yer alan etki mekanizmalarının farklılığını, etken maddenin birinde hedef bölgesi varken diğerinde olmaması veya etken maddenin hedef bölgesinin mutasyona uğradığı ihtimalini düşündürebilir.

Bu doktora tez çalışması neticesinde aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

1. Çalışmaya dahil edilen *P. aeruginosa* izolatlarının % 69,23'ü çoklu ilaç dirençli bulundu. β -laktam antibiyotikler içinde en yüksek direnç karbapenemlerde (meropenem % 62,6 ve imipenem % 53,8) gözlemlendi.
2. 91 *P. aeruginosa* izolatında % 9,9 MBL ve % 7,7 oranında ise GSBL kodlayan genler tespit edildi. Bunların *bla*_{TEM-1} (4 izolatta), *bla*_{PER-1} (3 izolatta), *bla*_{VIM-2} (1 izolatta) *bla*_{VIM-38} (2 izolatta) *bla*_{NDM-1} (6 izolatta) genleri olduğu PZR ve baz dizin analizi ile belirlendi. Bir izolatta VIM-2/PER-1 birlikteliği gözlemlendi.
3. REP-PZR ile tüm izolatlar 9 farklı genotip grupta toplandı. A grubu içerisinde yer alan 69 suş (% 75,82) ile en yaygın genotip grubunu oluşturduğu tespit edildi. H grubu ise tek 1 (% 1,1) suş içerip, en az bulunan genotip olarak belirlendi.
4. Sınıf 1 ve Sınıf 2 integronları araştırılan 91 *P. aeruginosa* izolatınının 33 (% 36,3)'ünde Sınıf 1 integron gen kaseti tespit edildi. Sınıf 2 integron, izolatların hiçbirinde tespit edilemedi.

5. *AacA4*, *AacA4/OXA-2* benzeri, *AAC(6')-Ib/AacA4/AadA7e*, *AacA4/"AAC6'IB"*, *GcuD/AAC(6')-I/QacK*, *AacA4/AadA1*, *VIM-38/AAC(6')-Ib/EmrE/aadA1* Sınıf 1 integron gen kaset dizileri PZR ve baz dizin analizi ile belirlendi.

6. *P. aeruginosa*'da 3,239 bp büyüklüğünde olan *bla_{VIM-38}/AAC(6')-Ib/EmrE/aadA1* gen kaset dizisini içeren yeni bir integron gen kaseti Türkiye'de ilk kez tespit edildi.

7. Konjugasyon deneyleri ile *bla_{VIM-38}/AAC(6')-Ib/EmrE/aadA1* kodlayan genleri *E. coli* K-12 J53-2 (met pro Rif^r) alıcı hücrelerine aktarılamadı. Bu sonuç genin konjugatif olmadığını düşündürmektedir.

8. *R. rubrum* (meyve), *P. divaricata* (meyve), *D. indica* (meyve), *P. granatum* (yaprak) ve *V. vinifera* (taze sürgün) metanol özütlerinin direnç genleri ve direnç gen kasetlerini taşıyan klinik *P. aeruginosa* suşları üzerine etkili olduğu gözlemlendi.

5. ÖNERİLER

Yeni alel olabileceği düşünülen genler tekrar klonlanarak ürünleri analiz edilebilir. Çalışma sonucunda yeni bir gen kaseti tespit edilen *P. aeruginosa* izolatının konjugasyon deneyi yapıldı. Diğer Sınıf 1 integron pozitif ve β -laktamaz direnç geni taşıyan izolatlarla konjugasyon deneyleri yapılabilir.

Çalışmada kullanılan bitki ekstraktlarının antibakteriyel, antioksidan, antiviral, antifungal ve sitotoksik biyoaktivite testlerine bakılabilir. Biyoaktif bileşenlerinin ayrılması ve saflaştırılmaları yapılabilir.

Çalışmada kullanılan ve/veya başka bitkilerin etanol/kloroform/hegzan ekstraktlarının dirençli izolatlar üzerinde antimikrobiyal etkilerine de bakılabilir. Çalışmada kullanılan bitkilerle farklı direnç profili gösteren klinik izolatlarda antimikrobiyal aktivite deneyleri yapılabilir. Kinetik deneyleri yapılarak antimikrobiyal etkisi gözlenen bitki özütlerinin hangi enzime etki ettiği ve bu etkinin moleküler mekanizması açıklanabilir. Bitki özütünün çalışılacak enzimler için IC_{50} değeri hesaplanarak çeşitli ilaçların IC_{50} değerleri ile karşılaştırılarak etkinliği hakkında daha kesin sonuçlar elde edilebilir.

KAYNAKLAR

- Abraham, E.P. and Chain, E., 1940.** An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Reviews Infectious Diseases*, 10, 677-678.
- Ahmad, W., Khan, M.I., Waqar, M., Khan, M.A., Khan, A., Ramazan, R., Wali, S., Ahmad, F., Khan, N., Yousaf, S., Zeb, M., Khan, A. U., Rahman, M.U. and Faisal, S., 2014.** *In vitro* antibacterial activity of *Vitis vinifera* leaf extracts against some pathogenic bacterial strains, *Advances in Biological Research*, 8 (2), 62-67.
- Ak, S., Yıldız, F., Gündüz, A. ve Köroğlu, M., 2016.** *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotiklere duyarlılıklarının Vitek 2 otomatize sistemi ile değerlendirilmesi. *Gazi Medical Journal*, 27, 62-64.
- Akiba, T., Koyama, K., Ishiki, Y., Kimura, S. and Fukushima, T., 1960.** On the mechanism of the development of multiple-drug-resistant clones of *Shigella*. *Japanese Journal of Microbiology*, 4, 219-227.
- Akkurt, L., Havuz, G.S., Uyar, Y., Karadağ, A. ve Esen, Ş., 2002.** 1999-2000 yıllarında yoğun bakım ünitelerinden izole edilen bakterilerde antibiyotik direnci. *Antibiyotik ve Kemoterapi Derneği Dergisi*, 16 (1), 14-17.
- Albus, A.M., Pesci, E.C. and Runyen-Janecky, L.J., 1997.** Vfr controls quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 179, 3928-3935.
- Ambler, R.P., 1980.** The structure of beta-lactamases. *Philosophical Transactions of Royal Society London B Biological Sciences*, 289, 321-331.
- Ananthan, S. and Subha, A., 2005.** Cefoxitin resistance mediated by loss of a porin in clinical strains of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 23, 20-23.
- Andersson, D.I. and Hughes, D., 2010.** Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nature Reviews Microbiology*, 8, 260-271.
- Anibal, P.C., Peixoto, I.T.A., Foglio, M.A. and Höfling, J.F., 2013.** Antifungal activity of the ethanolic extracts of *Punica granatum* L. and evaluation of the morphological and structural modifications of its compounds upon the cells of *Candida* spp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(3), 839-848.
- Arakawa, H., Takasaki, M., Tajima, N., Fukamachi, H. and Igarashi, T., 2014.** Antibacterial activities of Persimmon extracts relate with their hydrogen peroxide concentration. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 37(7), 1119-1123.
- Arakawa, Y., Murakami, M., Suzuki, K., Ito, H., Wacharotayankun, R., Ohsuka, S., Kato, N. and Ohta, M., 1995.** A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene *bla*IMP. *Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39, 1612-1615.

- Arnold, R.S., Thom, K.A., Sharma, S., Phillips, M., Kristie, J.J. and Morgan, D.J., 2011.** Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. Southern Medical Journal, 104, 40-45.
- Aron', G.M. and Irvn, J.D., 1980.** Inhibition of *Herpes Simplex* virus multiplication by the pokeweed antiviral protein. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 17(6), 1032-1033.
- Aşık, G., Özdemir, M., Kurtoğlu, M.G., Yağci, S., Öksüz, L., Gül, M., Koçoğlu, M.E., Sesli, Çetin, E., Seyrek, A., Berктаş, M., Ayyildiz, A. ve Çiftci, İ.H., 2014.** Detection of the frequency of PER-1 type extended-spectrum β -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Turkey: a multicenter study. Turkish Journal of Medical Sciences, 44(6), 1041-1046.
- Ban, J.Y., Cho, S.O., Koh, S.B., Song, K.S., Bae, K. and Seong, Y.H., 2006.** Protection of b amyloid protein (25-35)-induced neurotoxicity by methanol extract of *Smilaxis chiniae* rhizome in cultured rat cortical neurons. Journal of Ethnopharmacology, 106, 230-237.
- Barlow, M., 2009.** What antimicrobial resistance has taught us about horizontal gene transfer. Methods Molecular Biology, 532, 397-411.
- Bauernfeind, A., Casellas, J.M., Goldberg, M., Holley, M., Jungwirth, R., Mangold, P., Rohnisch, T., Schweighart, S. and Wilhelm, R., 1992.** A new plasmidic cefotaximase from patients infected with *Salmonella typhimurium*. Infection, 20, 158-163.
- Bauernfeind, A., Grimm, H. and Schweighart, S., 1990.** A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. Infection, 18, 294-298.
- Berктаş, M., Güdücüoğlu, H., Çıkman, A., Parlak, M. ve Yaman, G., 2011a.** Nozokomiyal *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında indüklenabilir beta-laktamaz Aktivitesi, Fırat Tıp Dergisi; 16(3), 125-128.
- Berктаş, M., Çıkman, A., Parlak, M., Yaman, G. ve Güdücüoğlu, H., 2011b.** Nozokomiyal kökenli *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarında antibiyotiklere direnç. Van Tıp Dergisi: 18 (4),192-196.
- Berthelot, P., Grattard, F. ve Mahul, P., 2001.** Prospective study of nosocomial colonization and infection due to *Pseudomonas aeruginosa* in mechanically ventilated patients. Intensive Care Medicine, 27, 503-512.
- Beşli, Y., 2013.** Metallo Beta Laktamaz Üreten Klinik *P. aeruginosa* İzolatlarının Epidemiyolojik Analizi. Uzmanlık Tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, Türkiye, 151 s., 16, 17, 22, 23.
- Bilgehan, H., 2004.** Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Barış Yayınları, 4. Baskı, 467.

- Booth, N. and McDonald, L.E., 1991.** Journal of veterinary pharmacology and therapeutics, 14(2), 213-215.
- Boucher, Y., Labbate, M., Koenig, J. and Stokes, H., 2007.** Integrons: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria. Trends in Microbiology, 15, 301-309.
- Bush, K., Jacoby, G.A. and Medeiros, A.A., 1995.** A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 39, 1211-1233.
- Carattoli, A., 2001.** Importance of integrons in the diffusion of resistance. Veterinary research, 32, 243-259.
- Castanheira, M., Toleman, M.A., Jones, R.N., Schmidt, F.J. and Walsh, T.R., 2004.** Molecular characterization of a beta-lactamase gene, *bla*GIM-1, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 48, 4654-4661.
- Cesur, S., Albayrak, F., Birengel, S., Kolcu, Z. ve Tekeli, E., 2002.** Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının karbapenem ve diğer betalaktam antibiyotiklere duyarlılıkları, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 32(3-4), 203-206.
- Chen, G.X.J., Xu, S.X. and Zhang, R.Q., 2007.** Chemical constituents of the leaves of *Diospyros kaki* and their cytotoxic effects. Journal of Asian Natural Products Research, 9(4), 347-353.
- Chen, T., Li, J., Cao, J., Xu, Q., Komatsu, K. and Namba, T., 1999.** A new flavanone isolated from rhizoma *Smilacis glabrae* and the structural requirements of its derivatives for preventing immunological hepatocyte damage. Planta Medica, 65, 56-59.
- Cicek, A.C., Saral, A., Duzgun, A.O., Cizmeci, Z., Kayman, T., Balci, P.Ö., Dal, T., Firat, M., Yazici, Y., Sancaktar, M., Ozgumus, O.B. ve Sandalli, C., 2013b.** Screening of class 1 and class 2 integrons in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* collected from seven hospitals in Turkey: A Multicenter Study. Open Journal of Medical Microbiology, 3, 227-233.
- Cornaglia, G., Giamarellou, H. and Rossolini, G.M., 2011.** Metallo- β lactamases: a last frontier for β -lactams? Lancet Infectious Diseases, 11, 381-393.
- Cricco, J.A., Orellano, E.G., Rasia, R.M., Ceccarelli, E.A. and Vila, A.J., 1999.** Metallo-b-lactamases: does it take two to tango? Coordination Chemistry Reviews, 519-535.
- Cuzon, G., Naas, T. and Nordmann, P., 2011.** Functional characterization of Tn4401, a Tn3-based transposon involved in *bla*KPC gene mobilization. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 55, 5370-5373.

- Çiftçi, A. ve Aksoy, A., 2015.** Antibiyotiklere karşı oluşan direnç mekanizmaları. Türkiye Klinikleri Journal of Veterinary Sciences Pharmacology Toxicol-Special Topics, 1(2), 1-10.
- Çiftçi, H.İ., Çetinkaya, Z., Aktepe, O.C., Arslan, F. ve Altındış, M., 2005.** Klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 35(2), 98-102.
- Dağı, H.T., Arslan, U., Fındık, D. ve Tuncer, İ., 2011.** Kan kültürlerinden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotiklere direnç oranları. Antibiyotik ve Kemoterapi Dergisi, 25(2), 107-110.
- Datta, N. and Kontomichalou, P., 1965.** Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae. Nature, 239-244.
- Davis, P.H., 1965.** Flora of Turkey and The East Aegean Islands. Edinburgh University Press, ISBN: 0 85224 159 3, 800 s.
- Delcour, A.H., 2009.** Outer membrane permeability and antibiotic resistance. Biochimica Biophysica Acta, 1794, 808-816.
- Delmas, J., Leysse, D., Dubois, D., Birck, C., Vazeille, E., Robin, F. and Bonnet, R., 2010.** Structural insights into substrate recognition and product expulsion in CTX-M enzymes. Journal of Molecular Biology, 400, 108-120.
- Dhanavade, M.J., Jalkute, C. B., Ghosh, J. S. and Sonawane, K.D., 2011.** Study antimicrobial activity of lemon (*Citrus lemon* L.) peel extract, British Journal of Pharmacology and Toxicology, 2(3), 119-122.
- Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U. and Hacker, J., 2004.** Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. Nature Reviews Microbiology, 2, 414-424.
- Drawz, S.M. and Bonomo, R.A., 2010.** Three decades of beta-lactamase inhibitors. Clinical Microbiology Reviews, 23, 160-201.
- Driscoll, J.A., Brody, S.L. and Kollef, M.H., 2007.** The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. Drugs, 67, 351-368.
- Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M. and Mérillon, J.M., 2009.** Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. Journal of Agricultural of Food Chemistry, 57, 1768-1774.
- Duman, Y., Kuzucu, Ç., Kaysadu, H. ve Tekerekoğlu, M.S., 2012.** Bir yıllık sürede izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılığının araştırılması. İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi; 1, 41-45.

- Duman, D.A., Ozgen, M., Dayisoğlu, K.S., Erbil, N. and Durgac, C., 2009.** Antimicrobial activity of six pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties and their relation to some of their pomological and phytonutrient characteristics. *Molecules*, 14, 1808-1817.
- Dündar, D. ve Tamer, G.S., 2009.** Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antimikrobiyal direnci: Üç yıllık değerlendirme, *Antibiyotik ve Kemoterapi Derneği Dergisi*, 23(1), 17-21.
- Ekşi, F., Bayram, A., Balcı, İ. ve Özer, G., 2007.** *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında indüklenebilir beta-laktamaz aktivitesinin ve antibiyotiklere direncin araştırılması. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 37(3), 142-146.
- El-Salabi, A., Borra, P.S., Toleman, M.A., Samuelson, Ø. and Walsh, T.R., 2012.** Genetic and biochemical characterization of a novel metallo-beta-lactamase, TMB-1, from an *Achromobacter xylosoxidans* strain isolated in Tripoli, Libya. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 56, 2241-2245.
- El-Salabi, A., Toleman, M.A., Weeks, J., Bruderer, T., Frei, R. and Walsh, T.R., 2010.** First report of the metallo-beta-lactamase SPM-1 in Europe. *Antimicrob Agents Chemotherapy*, 54, 582.
- Er, H., Altındış, M., Aşık, G. ve Demir, C., 2015.** Molecular epidemiology of beta-lactamases in ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates, *Mikrobiyoloji Bülteni*, 49(2),156-165.
- Eraç, B., Hoşgör-Limoncu, M., Emertcan, Ş., Taşlı, H. ve Aydemir, Ş., 2013.** Prevalence of *bla*PER-1 and integrons in ceftazidime-resistant gram-negative bacteria at a university hospital in Turkey. *Japanese journal of infectious diseases*, 66, 146-148.
- Eraksoy, H., 2014.** Karbapeneme dirençli *Pseudomonas aeruginosa*, Editör Görüşü, *Klinik Dergisi*, 27, 37-37, DOI: 10.5152/kd.2014.11.
- Ersöz, G., Otağ, F., Bayındır, İ., Kandemir, Ö., Aslan, G. ve Kaya, A., 2004.** Nozokomiyal *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında antibiyotik direnci ve karbapenemlere dirençli suşlar için meropenemin MİK değerleri, *Antibiyotik ve Kemoterapi Dergisi*, 18(1), 28-31.
- Ertekin, N., 2012.** Klinik Örneklerden İzole Edilen *A. baumannii* Suşlarında Antibiyotik Direncinde Rol Oynayan İntegronların Varlığı ve Tiplendirilmesi. Uzmanlık Tezi. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi. Sağlık bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye, 85 s, 29.
- Eyigör, M., Telli, M., Tiryaki, Y., Okulu, Y. ve Aydın, N., 2009.** Yatan hastalardan izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. *Antibiyotik ve Kemoterapi Dergisi*, 23(3), 101-105.

- Fennell, J., Vellinga, A., Hanahoe, B., Morris, D., Boyle, F., Higgins, F., Lyons, M., O'Connell, K., Keady, D. and Cormican, M., 2012.** Increasing prevalence of ESBL production among Irish clinical Enterobacteriaceae from 2004 to 2008: an observational study. *BioMedCentral Infectious Disease*, 12, 116.
- Fisher, K. and Phillips, C., 2008.** Potential antimicrobial uses of essential oils in food: Is citrus the answer? *Trends Food Science Technology*, 19, 156-164.
- Fluit, A. and Schmitz, F., 1999.** Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 18, 761-770.
- Fluit, A.C. and Schmitz, F.J., 2004.** Resistance integrons and super integrons. *Clinical Microbiology and Infection*, 10, 272-288.
- Gales, A.C., Menezes, L.C., Silbert, S. and Sader, H.S., 2003.** Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52, 699-702.
- Garza-Ramos, U., Tinoco, P., Silva-Sanchez, J., Morfin-Otero, R., Rodriguez-Noriega, E., Leon-Garnica, G., Sader, H.S. and Jones, R.N., 2008.** Metallo-beta-lactamase IMP-18 is located in a class 1 integron (In96) in a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa* from Mexico. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31, 78-80.
- Girlich, D., Karim, A., Poirel, L., Cavin, M.H., Verny, C. and Nordmann, P., 2000.** Molecular epidemiology of an outbreak due to IRT-2 beta-lactamase producing strains of *Klebsiella pneumoniae* in a geriatric department. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45, 467-473.
- Gorinstein, S., Bartnikowska, E., Kulasek, G., Marina, Z.M., Soo, S.K., Samkeun, L. and Byeongjin, C., 2007.** Antifungal activity of Plumbagin purified from the leaves of *Nepenthes Ventricosa* X *maxima* against phytopathogenic fungi. *The Plant Pathology Journal*, 23(2), 113-115.
- Goudarzi, M., Fazeli, M., Azad, M., Seyedjavadi, S.S., Mousavi, R., Rashidan, M. and Azargashb, E., 2016.** Carriage of class 1 and class 2 integron in multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in Tehran Hospitals, Iran. *West Indian Medical Journal*, 65(1), 32-39.
- Gründemann, C., Lengen, K., Sauer, B., Garcia-Käufer, M., Zehl, M. and Huber, R., 2014.** *Equisetum arvense* (common horsetail) modulates the function of inflammatory immunocompetent cells. *The official journal of the International Society for Complementary Medicine Research*, 14, 283.
- Gül, M., Şensoy, A., Çetin, B., Korkmaz, F. ve Seber, E., 2004.** Hastane infeksiyonu etkeni *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında seftazidime duyarlılığın E-test ve

disk diffüzyon yöntemleri ile araştırılması. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 34,33-36.

- Gültepe, B., Iraz, M., Ceylan, A. ve Doymaz, M.Z., 2014.** Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotiklere direnci. Antibiyotik ve Kemoterapi Dergisi, 28(1), 32-36.
- Gündüz, T., Arısoy, A., Algün, Ü. ve Özbakkaloğlu, B., 2004.** *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının aminoglikozidlere in-vitro duyarlılıkları, Antibiyotik ve Kemoterapi Derneği Dergisi, 18(4), 224-227.
- Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M. ve Babaç, M.T., (2012).** Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler). Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını. İstanbul.
- Hall, L.M., Livermore, D.M., Gur, D., Akova, M. ve Akalin, H.E., 1993.** OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 37, 1637-1644.
- Hall, R.M. and Collis, C.M., 1995.** Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. Molecular Microbiology, 15, 593-600.
- Hanson, N.D., 2002.** Unusual *Salmonella entericaserotype* Typhimurium isolate producing CMY-7, SHV-9 and OXA-30b-lactamases. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 49, 1011-1014.
- Herrell, W.E. and Keefer, C.S., 1945.** Penicillin and other antibiotic agents science, 162.
- Higgins, P.G., Dammhayn, C., Hackel, M. and Seifert, H., 2010.** Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. Journal Antimicrobial Chemotherapy, 65, 233-238.
- Hong, D.J., Bae, I.K., Jang, I. H., Jeong, S.H., Kang H.K. and Lee, K., 2015.** Epidemiology and characteristics of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Infection and Chemotherapy, 47(2), 81-97.
- Hong, J.S., Yoon, E.J., Lee, H. Jeong, S.H. and Lee, K., 2016.** Clonal dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* sequence type 235 isolates carrying *blaIMP-6* and emergence of *blaGES-24* and *blaIMP-10* on novel genomic islands PAGI-15 and -16 in South Korea. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 60(12), 7216-7223.
- Irtiza, S., Bhat, G.A, Ahmad, M., Ganaie, H.A., Ganai, B.A. Kamili, A.N., Akbar, S. and Tantry, M.A., 2016.** Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Platanus orientalis*: An Oriental Plant Endemic to Kashmir Planes. Pharmacologia, 7, 217-222.

- Ito, H., Arakawa, Y., Ohsuka, S., Wacharotayankun, R., Kato, N. and Ohta, M., 1995.** Plasmid-mediated dissemination of the metallo-beta-lactamase gene *bla*IMP among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 39, 824-829.
- Jacoby, G.A., Medeiros, A.A., O'Brien, T.F., Pinto, M.E. and Jiang, H., 1988.** Broad-spectrum, transmissible beta-lactamases. *New England Journal Medicine*, 319, 723-724.
- Jeon, B.C., Jeong, S.H. and Bae, I.K., 2005.** Investigation of a nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 b-lactamase in Korea. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 2241-2245.
- Jiang, J. and Xu, Q., 2003.** Immunomodulatory activity of the aqueous extract from rhizome of *Smilax glabra* in the later phase of adjuvant-induced arthritis in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 85, 53-59.
- Jones, R.N., Biedenbach, D.J., Sader, H.S., Fritsche, T.R., Toleman, M.A. and Walsh, T.R., 2005.** Emerging epidemic of metallo-beta-lactamase-mediated resistances. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 51, 77-84.
- Jones, R.N., Sader, H.S. and Fritsche, T.R., 2005.** Comparative activity of doripenem and three other carbapenems tested against Gram-negative bacilli with various beta-lactamase resistance mechanisms. *Diagnostic Microbiology Infectious Disease*, 52, 71-74.
- Jovcic, B., Lepsanovic, Z., Suljagic, V., Rackov, G., Begovic, J., Topisirovic, L. and Kojic, M., 2011.** Emergence of NDM-1 metallo-beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Serbia. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 55, 3929-3931.
- Jung, H.J., Hwang, I.A., Sung, W.S., Kang, H., Kang, B.S., Seuand, Y.B. and Lee, D.G., 2005.** Fungicidal effect of resveratrol on human infectious fungi. *Archives of Pharmacal Research*, 2, 557-560.
- Kalem, F., Gündem, N.S., Fezyioğlu, B., Arslan, U. ve Turncer, İ., 2008.** Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci, *Antibiyotik ve Kemoterapi Derneği Dergisi*, 22(3), 123-126.
- Kalp, M., Totir, M.A., Buynak, J.D. and Carey, P.R., 2009.** Different intermediate populations formed by tazobactam, sulbactam, and clavulanate reacting with SHV-1 beta-lactamases: Raman crystallographic evidence. *Journal of American Chemical Society*, 131, 2338-2347.
- Karatuna, O. ve Yağcı, A., 2008.** *Pseudomonas aeruginosa*'da virülans faktörleri ve quorum sensing. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 38(1), 42-51.
- Karim, A., Poirel, L., Nagarajan, S. and Nordmann, P., 2001.** Plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-3 like) from India and gene

association with insertion sequence ISEcp1. Federation of European Microbiological Societies Letters, 201, 237-241.

- Kendir, G. and Köroğlu, A., 2015.** In vitro Antioxidant Effect of the Leaf and Branch Extracts of *Ribes L. Species* in Turkey. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 2, 108.
- Keramati, N., Zeighami, H., Haghi, F., 2014.** Lots of classes I and II integrons in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-lactamase. Journal of Zanjan University of Medical Sciences, 22(94), 111-119.
- Keskin, D. ve Toroglu, S., 2011.** Studies on antimicrobial activities of solvent extracts of different spices. Journal of Environmental Biology, 32, 251-256.
- Khajuria, A., Praharaj, A.K, Kumar, M., Grover, N., 2013.** Emergence of NDM-1 in the clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in India. Journal of Clinical Diagnostic Research, 7, 1328-1331.
- Khuda, F., Iqbal, Z., Khan, A., Zakiullah, Nasir, F. and Khan, M.S., 2012.** Validation of some of the ethnopharmacological uses of *xanthium strumarium* and *duchesnea indica*. Pakistan Journal of Botany, 44(4), 1199-1201.
- Kitano, K. and Tomasz, A., 1979.** Triggering of autolytic cell wall degradation in *Escherichia coli* by beta lactam antibiotics. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 16, 838-848.
- Knothe, H., Shah, P., Krcmery, V., Antal, M. and Mitsuhashi, S., 1983.** Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. Infection, 11, 315-317.
- Kohanski, M.A. Dwyer, D.J. and Collins, J.J., 2010.** How antibiotics kill bacteria: from targets to networks Published in final edited form as. Nature Reviews Microbiology, 8(6), 423-435.
- Kondo, S., Katayama, R. and Uchino, K., 2005.** Antioxidant activity in meiwa kumquat as affected by environmental and growing factors. Environmental and Experimental Botany, 54, 60-68.
- Koyasako, A. and Bernhard, R.A., 1983.** Volatile constituents of essential oils of kumquat. Journal of food Science, 48, 1807-1810.
- Köse, E.O. and Vural, T., 2009.** Türkiye'ye endemik iki bitki türünden elde edilen etanol ekstraktlarının antimikrobiyal aktiviteleri, İç Hastalıkları Dergisi, 16, 183-189.
- Krisch, J., Galgoczy, L., Papp, T. and Vágvölgyi, C., 2009.** Anticandidal effect of berry juices and extracts from *Ribes species*. Central European Journal of Biology, 4(1), 86-89.

- Kubo, S., Mimaki, Y., Sashida, Y., Nikaido, T. and Ohmoto, T., 1992.** Steroidal saponins from *Smilax riparia* and *S. china*. *Phytochemistry*, 31, 2439-2443.
- Kukrić, Z., Ljiljana, Trivunović, T., Pavičić, S., Žabić, M., Matoš, S. and Davidović, A., 2013.** Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activity of *Equisetum arvense* L. *chemical industry & Chemical Engineering Quarterly*, 19 (1), 37-43.
- Kulkova, N., Babalova, M., Sokolova, J. and Krcmery, V., 2015.** First report of New Delhi metallo-beta-lactamase-1-producing strains in Slovakia. *Microbial Drug Resistance*, 21, 117-120.
- Lauretti, L., Riccio, M.L., Mazzariol, A., Cornaglia, G., Amicosante, G., Fontana, R. and Rossolini, G.M., 1999.** Cloning and characterization of *blaVIM*, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemotherapy*, 43, 1584-1590.
- Leblebicioğlu, H., Usluer, G. ve Ulusoy, S., 2003.** Antibiyotikler. Bilimsel Tıp yayınevi, ISBN: 975-6986-19-0, 572 s., Çevik, İ. (Ç. Ed.), 223.
- Lévesque, C., Piche, L., Larose, C. and Roy, P.H., 1995.** PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 39, 185-291.
- Lewis, K., 2013.** Platforms for antibiotic discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 12, 371-387.
- Lister, P.D., Wolter, D.J. and 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.
- Livermore, D.M. and Woodford, N., 2006.** The beta-lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends Microbiology*, 14, 413-420.
- Livermore, D.M., 1995.** Beta lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 8, 557-584.
- Llarrull, L.I., Testero, S.A., Fisher, J.F. and Mobashery, S., 2010.** The future of the β -lactams. *Current Opinion Microbiology*, 551-557.
- Louis, B. Rice, M.D. and Robert, A. and Bonomo, M.D., 1999.** The red menace: Emerging issues in antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. *Current Infectious Disease Reports*, 1 (4), 338-346.
- Malkoçoğlu, G., Aktaş, E., Bayraktar, B., Otlu, B. ve Bulut, M.E., 2016.** VIM-1, VIM-2, and GES-5 carbapenemases among *Pseudomonas aeruginosa* isolates

at a tertiary hospital in Istanbul, Turkey. Microbial Drug Resistance, DOI: 10.1089/mdr.2016.0012.

- Mansur, A., Ay, S. ve Ersoy, Y., 2013.** Nozokomiyal *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında antibiyotik duyarlılık oranları. Journal of Turgut Ozal Medical Center, 20(2), 138-142.
- Martins, S., Mussatto, S.I., Martinez-Avila, G., Montanez-Saenz, J., Aguilar, C.N. and Teixeira, J.A., 2011.** Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. Biotechnology Advances, 29, 365-373.
- Matthew, J., Ellington, Kistler, J., Livermore, D.M. and Woodford, N., 2007.** Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo- β -lactamases", Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 59, 321-322.
- Mengelöglü, F.Z., Cicek, C.A., Koçoğlu, E., Sandalli, C., Budak, E.E. and Özgümus, O.B., 2014.** Carriage of class 1 and 2 integrons in *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical specimens and a novel gene cassette array: blaOXA-11-cmlA7. Mikrobiyoloji Bülteni, 48(1), 48-58.
- Mikucionyte, G., Zamorano, L., Vitkauskiene, A., López-Causapé, C., Juan, C., Mulet, X. and Oliver, A., 2016.** Nosocomial dissemination of VIM-2-producing ST235 *Pseudomonas aeruginosa* in Lithuania. European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases, 35(2), 195-200.
- Mirnejad, R., Mostofi, S. and Masjedian, F., 2013.** Antibiotic resistance and carriage class 1 and 2 integrons in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from Tehran, Iran. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 3(2), 140-145.
- Mkaddem, M., Bouajila, J., Ennajar, M., Lebrihi, A., Mathieu, F. and Romdhane, M., 2009.** Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of *Mentha (longifolia* L. and *viridis*) essential oils. Journal of food Science, 74, 358-363.
- Moellering, R.C., Eliopoulos, G.M. and Sentochnik, D.E., 1989.** The carbapenems: new broad spectrum beta-lactam antibiotics. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 24, 1-7.
- Moore, N.M. and Flaws, M.L., 2011.** Epidemiology and pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. Clinical Laboratory Science, 24, 43-46.
- Moquet, O., Bouchiat, C., Kinana, A., Seck, A., Arouna, O., Bercion, R., Breurec, S. and Garin, B., 2011.** Class D OXA-48 carbapenemase in multidrug-resistant enterobacteria, Senegal. Emerging Infectious Disease, 17, 143-144.
- Morrison, A.J. and Wenzel, R.P., 1984.** Epidemiology of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. Reviews of Infectious Diseases, 6, 627-640.

- Moubareck, C., Bre'mont, S. and Conroy, M.C., 2009.** GES-11, a novel integron-associated GES variant in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 58, 3579-3581.
- Murray, P.R., Rosenthal, K.S. and Pfaller, M.A., 2010.** Tıbbi Mikrobiyoloji. Atlas Kitapçılık. 6. Baskı, ISBN: 978-975-7175-89-6, 947 s., Başustaoğlu, A.C. (Ç. Ed.), 333.
- Mushtaq, S., Ge, Y. and Livermore, D.M., 2004.** Comparative activities of doripenem versus isolates, mutants, and transconjugants of Enterobacteriaceae and *Acinetobacter* spp. with characterized beta-lactamases. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 48, 1313-1319.
- Mycek, M. J., Harvey, R.A. and Chambe, P.C., 2001.** Farmakoloji. Güneş Kitabevi, ISBN: 975-8531-17-4, 514 s., Zergeroğlu, S., Zergeroğlu, A.M. (Ç. Ed.), 297-307.
- Navarro, M.C., Montilla, M.P., Cabo, M.M., Galisteo, M., Ca'ceres, A., Morales, C. and Berger, I., 2003.** Antibacterial, antiprotozoal and antioxidant activity of five plants used in Izabal for infectious diseases. *Phytotherapy Research*, 17, 325-329.
- Ng, T.B. and Yu, Y.L., 2001.** Isolation of a novel heterodimeric agglutinin from rhizomes of *Smilax glabra*, the Chinese medicinal material tufuling. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 33, 269-277.
- Nicola, G., Tomberg, J., Pratt, R.F., Nicholas, R.A. and Davies, C., 2010.** Crystal structures of covalent complexes of beta-lactam antibiotics with *Escherichia coli* penicillin-binding protein 5: toward an understanding of antibiotic specificity. *Biochemistry*, 49, 8094-8104.
- Nicola, G., Tomberg, J., Pratt, R.F., Nicholas, R.A. and Davies, C., 2010.** Crystal structures of covalent complexes of beta-lactam antibiotics with *Escherichia coli* penicillin-binding protein 5: toward an understanding of antibiotic specificity. *Biochemistry*, 49, 8094-8104.
- Nikaido, H., 1998.** Antibiotik resistance caused by Gram-negative multidrug efflux pumps. *Clinical Infectious Diseases*, 27(1), 32-41.
- Nordmann, P. and Poirel, L., 2002.** Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clinical Microbiology and Infection*, 8, 321-331.
- Nordmann, P. and Guibert, M., 1998.** Extended spectrum β - lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 42, 128-131.
- Ogawa, K., Kawasaki, A., Omura, M., Yoshida, T., Ikoma, Y. and Yano, M., 2001.** 3',5'-Di-C- β -glucopyranosylphloretin, a flavonoid characteristic of the genus *Fortunella*. *Phytochemistry*, 57, 737-742.

- Oksana, S., Marian, B., Mahendra, R. and Hong, B.S., 2012.** Plant phenolic compounds for food, pharmaceutical and cosmetics production. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(13), 2526-2539.
- Okunowo, W.O., Oyedeji, O., Afolabi, L.O. and Matanmi, E., 2013.** Essential oil of grape fruit (*Citrus paradisi*) peels and its antimicrobial activities. *American Journal of Plant Sciences*, 4, 1-9.
- Orhan, D.D., Orhan, N., Özcelik, B. and Ergun, F., 2009.** Biological activities of *Vitis vinifera* L. Leaves. *Article in Turkish Journal of Biology*, 33, 341-348.
- Oskay, M., Oskay, D. and Kalyoncu, F., 2009.** Activity of some plant extracts against multi-drug resistant human pathogens, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 8(4), 293-300.
- Ozgumus, O.B., Tosun, I., Aydin, F. and Kilic, A.O., 2008.** Horizontal dissemination of TEM- and SHV-type beta-lactamase genes-carrying resistance plasmids amongst clonal isolates of Enterobacteriaceae. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 636-643.
- Ozgumus, O.B., Sandalli, C., Sevim, A., Celik-Sevim, E. and Sivri, N., 2009.** Class 1 and class 2 integrons and plasmid-mediated antibiotic resistance in coliforms isolated from ten rivers in Northern Turkey. *The Journal of Microbiology*, 47, 19-27.
- Özdemir, M., Erayman, İ., Dağı, H.T., Baykan, M. and Baysal, B., 2009.** Hastane infeksiyonu etkeni *Pseudomonas* Suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları. *Antibiyotik ve Kemoterapi Dergisi*, 23(3), 122-126.
- Özsoy, N., Can, A., Yanardağ, R. and Akev, N., 2008.** Antioxidant activity of *Smilax excelsa* L. leaf extracts. *Food Chemistry*, 110, 571-583.
- Öztürk, C.E., Albayrak, H.T., Altınöz, A. ve Ankaralı, H., 2010.** *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotiklere direnç ve beta-laktamaz oranları. *Antibiyotik ve Kemoterapi Dergisi*, 24(3), 117-123.
- Palleroni, N.J., 2003.** Prokaryote taxonomy of the 20th century and the impact of studies on the genus *Pseudomonas*: a personal view. *Microbiology*, 149, 1-7.
- Palleroni, N.J., Kunisawa, R., Contopoulou, R. and Doudoroff, M., 1973.** Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 23(4), 333-339.
- Partridge, S.R., Tsafnat, G., Coiera, E. and Iredell, J.R., 2009.** Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *Federation of European Microbiological Societies Reviews*, 33, 757-784.

- Paterson, D.L., 2000.** Recommendation for treatment of severe infections caused by Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs). *Clinical Microbiology and Infection*, 6, 460-463.
- Pechere, J.C. and Kohler, T., 1999.** Patterns and modes of beta-lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Microbiology and Infection*, 5, 15-18.
- Perez, C., Pauli, M. and Bazerque, P., 1990.** An antibiotic assay by the well agar method. *Acta Biologicae et Medicinae Experimentalis*, 15, 113-115.
- Pfaendler, H.R. and Golz, G., 2013.** Fluorescent Carbapenems. United States Patent Application Publication.
- Philippon, A., Arlet, G. and Jacoby, G.A., 2002.** Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46, 1-11.
- Philippon, A., Labia, R. and Jacoby, G.A., 1989.** Extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 33, 1131-1136.
- Pier, G. and Ramphal, R., 2005.** *Pseudomonas aeruginosa*, In “Principles and Practice of Infectious Diseases” G. Mandel, G., Bennett, J.E., Dolin, R. (Ed.), Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia, 2587-2615.
- Pitout, J.D., Nordmann, P., Laupland, K.B. and Poirel, L., 2005.** Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56, 52-59.
- Pitt, T.L. and Simpson, A.J.H., 2006.** *Pseudomonas* and *Burkholderia* spp. In Gillespie, S.H., Hawkey, P.M. (Eds.). ISBN: 9780470849767. Principles and Practice of Clinical Bacteriology, 2, 427-435.
- Pitton, J.S., 1972.** Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics. *Ergebnisse Physiologie*, 65, 15-93.
- Plotkowski, M.C., Costa, A.O., Morandi, V., Barbosa, H.S., Nader, H.B., Bentzmann, S. and Puchelle, E., 2001.** Role of heparan sulphate proteoglycans as potential receptors for non-piliated *Pseudomonas aeruginosa* adherence to non-polarised airway epithelial cells. *Journal of Medical Microbiology*, 50, 183-190.
- Poirel, L., Heritier, C., Tolun, V. and Nordmann, P., 2004.** Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48, 15-22.
- Poirel, L., Girlich, D., Naas, T. and Nordman, P., 2001.** OXA-28, an extended spectrum variant of OXA β -lactamase from *P. aeruginosa* and its plasmid and integron-located gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2, 447-453.
- Pollini, S., Maradei, S., Pecile, P., Olivo, G., Luzzaro, F., Docquier, J.D. and Rossolini, G.M., 2013.** FIM-1, a new acquired metallo-beta-lactamase from a

- Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Italy. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 57, 410-416.
- Qing, Y., Cao, K.Y., Fang, Z.L., Huang, Y.M., Zhang, X.F., Tian, G.B. and Huang, X., 2014.** Outbreak of PER-1 and diversity of β -lactamases among ceftazidime resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates, Journal of Medical Microbiology, 63(3), 386-392.
- Queenan, A.M. and Bush, K., 2007.** Carbapenemases: the versatile β -lactamases. Clinical Microbiology Reviews, 440-458.
- Quinn, J.P., Miyashiro, D., Sahn, D., Flamm, R. and Bush, K., 1989.** Novel plasmid-mediated beta-lactamase (TEM-10) conferring selective resistance to ceftazidime and aztreonam in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 33, 1451-1456.
- Ravikiran, G., Raju, A.D. and Venugopal, Y., 2011.** *Phytolacca Americana*: a review. International journal of research in pharmaceutical and biomedical sciences, 2(3), 942-946.
- Rawlings, N.D., Morton, F.R., Kok, C.Y., Kong, J. and Barrett, A.J., 2008.** MEROPS: the peptidase database. Nucleic Acids Research, 36, 320-325.
- Recchia, G.D. and Hall, R.M., 1997.** Origins of the mobile gene cassettes found in integrons. Trends in Microbiology, 5(10), 389-393.
- Rhomberg, P.R. and Jones, R.N., 2009.** Summary trends for the meropenem yearly susceptibility test information collection program: a 10-year experience in the United States (1999-2008). Diagnostic Microbiology and Infectious, 65, 414-426.
- Rice, L.B., Sahn, D. and Bonomo, R.A., 2007.** Mechanisms of Resistance to Antibacterial Agents. In: Manual of Clinical Microbiology, 9. Eds, Murray, P.H., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Tenover, M.C., Tenover, M.A., Washington, D.C. American Society for Microbiology press, 1114-1145.
- Richmond, M.H. and Sykes, R.B., 1973.** The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. Advances in Microbial Physiology, 9, 31-88.
- Rojas-Bezares, B., Cavalié, L., Dubois, D., Oswald, E., Torres, C. and Sáenz, Y., 2016.** Characterization of carbapenem resistance mechanisms and integrons in *Pseudomonas aeruginosa* strains from blood samples in a French hospital. Journal of Medical Microbiology, 65(4), 311-319.
- Rossolini, G.M. and Mantengoli, E., 2005.** Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. Clinical Microbiology Infection, 4, 17-32.

- Salleh, W.M.N.H.W., Ahmad, F., Yen, K.H. and Sirat, H.M., 2011.** Chemical compositions, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils of *Piper caninum* Blume. International Journal of Molecular Sciences, 12, 7720-7731.
- Salyers, A.A. and Whitt, D.D., 1994.** Bacterial pathogenesis: a molecular approach. American Society for Microbiology Press, 260-268.
- Savage, P.B., 2001.** Multidrug-resistant bacteria: overcoming antibiotic permeability barriers of gramnegative bacteria. Annals of Medicine, 33, 167-171.
- Sawai, T., Mitsuhashi, S. and Yamagishi, S., 1968.** Drug resistance of enteric bacteria. XIV. Comparison of beta-lactamases in gram-negative rod bacteria resistant to alpha-aminobenzylpenicillin. Japanese Journal of Microbiology, 12, 423-434.
- Schechner, V., Straus-Robinson, K., Schwartz, D., Pfeffer, I., Tarabeia, J. and Moskovich, R., 2009.** Evaluation of PCR-based testing for surveillance of KPC-producing carbapenem resistant members of the Enterobacteriaceae family. Journal of Clinical Microbiology, 47(10), 3261-3265.
- Schirra, M., Palma, A., D'Aquino, S., Anggioni, A., Minello, E.V., Melis, M. and Cabras, P., 2008.** Influence of postharvest hot water treatment on nutritional and functional properties of kumquat (*Fortunella japonica* Lour, Swingle cv. Ovale) fruits. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56, 455-460.
- Schwarz, S. and Nobel, W.C., 1999.** Aspects of bacterial resistance to antimicrobials used in veterinary dermatological practice. Veterinary Dermatology, 10, 163-176.
- Shaikh, S., Jamale, F., Shazi, S. Mohd, S., Danish, R. and Kamal, M.A., 2015.** Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. Saudi Journal of Biological Sciences, 22, 90-101.
- Sheikh, A.F., Rostami, S., Jolodar, A., Tabatabaiefar, M.A., Khorvash, F., Saki, A., Shoja, S. and Sheikhi, R., 2014.** Detection of metallo-beta lactamases among carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Jundishapur Journal of Microbiology, 7(11), 12289.
- Shirani, K., B. and Roshandel, F., 2016.** Antibiotic resistance pattern and evaluation of metallo-beta lactamase genes (VIM and IMP) in *Pseudomonas aeruginosa* strains producing MBL enzyme, isolated from patients with secondary immunodeficiency. Advanced Biomedical Research, 5, 124.
- Singh, S. and Joshi H., 2011.** *Diospyros kaki* (Ebenaceae): A Review. Asian Journal of Research Pharmaceutical Sciences, 1(3), 55-58.
- Smith, R.S. and Iglewski, B.H., 2003.** *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing as a potential antimicrobial target. The Journal of Clinical Investigation, 112, 1460-1465.

- Stanisavljevic, I.T., Stojic'evic', S.S., Velic'kovic', D.T., Lazic', M.L. and Veljkovic' V.B., 2008.** Screening the antioxidant and antimicrobial properties of the extracts from plantain (*Plantago Major* L.) Leaves. Separation Science and Technology, 43, 3652-3662.
- Stokes, H., O'Gorman, D., Recchia, G., Parsekhian, M. and Hall, R., 1997.** Structure and function of 59-base element recombination sites associated with mobile gene cassettes. Molecular Microbiology, 26, 731-745.
- Strateva, T. and Yordanov, D., 2009.** *Pseudomonas aeruginosa* -a phenomenon of bacterial resistance. Journal of Medical Microbiology, 58, 1133-1148.
- Subba, M.S., Soumithri, T.C. and Rao, R.S., 1967.** Antimicrobial action of *citrus* oils. Journal of food Science, 32, 225-227.
- Sulton, D., Pagan-Rodriguez, D., Zhou, X., Liu, Y., Hujer, A.M., Bethel, C.R., Helfand, M.S., Thomson, J.M., Anderson, V.E., Buynak, J.D., Ng, L.M. and Bonomo, R.A., 2005.** Clavulanic acid inactivation of SHV-1 and the inhibitor-resistant S130G SHV-1 beta-lactamase. Insights into the mechanism of inhibition. Journal of Biology Chemistry, 280, 35528-35536.
- Şen, A. ve Halkman, A.K., 2006.** Çiğ sütte *Pseudomonas aeruginosa* sayılması için yöntem modifikasyonları üzerine çalışmalar. Orlab On-Line Mikrobiyoji Dergisi, 4(2), 2-13.
- Şirin, M.C., Ağuş, N., Yılmaz, N., Derici, Y.K., Hancı, S.Y., Bayram, A. ve Şamlioğlu, P., 2015.** Yoğun bakım ünitelerinden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* suşlarında antibiyotik direnç profillerinin yıllar içindeki değişimi. Journal of Clinical and Experimental Investigations, 6 (3), 279-285.
- Tenover, F.C., 2006.** Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. American Journal Infection Control, 34, 3-10.
- Tenover, F.C., Mohammed, M.J., Gorton, T.S. and Dembek, Z.F., 1999.** Detection and reporting of organisms producing extended-spectrum beta-lactamases: survey of laboratories in Connecticut. Journal Clinical Microbiology, 37, 4065-4070.
- Toleman, M.A., Simm, A.M., Murphy, T.A., Gales, A.C., Biedenbach, D.J., Jones, R.N. and Walsh, T.R., 2002.** Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the Sentry antimicrobial surveillance programme. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 50, 673-679.
- Tunçoğlu, E., Yenişehirli, G. ve Bulut, Y., 2009.** Klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci. Antibiyotik ve Kemoterapi Derneği Dergisi, 23(2), 54-58.

Tümer, S., Kirişci, Ö., Özkaya, E. ve Çalışkan, A., 2015. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları, Antibiyotik ve Kemoterapi Derneği Dergisi Dergisi, 29(3), 99-104.

URL-1, 2016. <https://www.lahey.org/studies/other.asp> (20 Mart 2016).

URL-2, 2016. <http://integrall.bio.ua.pt/?intro> (25 Eylül 2016).

URL-3, 2016. <http://www.theplantlist.org/> (29 Eylül 2016).

URL-4, 2016. https://en.wikipedia.org/wiki/Cherry_plum (29 Eylül 2016).

URL-5, 2016. <https://www.google.com.tr/search?q=prunus+divaricata> (29 Eylül 2016).

URL-6, 2016. http://www.eol.org/data_objects/32458053 (29 Eylül 2016).

URL-7, 2016. https://en.wikipedia.org/wiki/Tilia_cordata (29 Eylül 2016).

URL-8, 2016. https://tr.wikipedia.org/wiki/Tarla_atkuyru (29 Eylül 2016).

URL-9, 2016. [http://www.tubives.com/index.php? Plantago](http://www.tubives.com/index.php?Plantago) (29 Eylül 2016).

URL-10, 2016. <https://tr.wikipedia.org/wiki/Melocan> (29 Eylül 2016).

URL-11, 2016. <https://www.google.com.tr/search?q=kokulu+üzüm> (29 Eylül 2016).

URL-12, 2016. https://tr.wikipedia.org/wiki/Kırmızı_frenk_üzümü (29 Eylül 2016).

URL-13, 2016. <http://web.expasy.org/translate/> (24 Ekim 2016).

URL-14, 2016. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (24 Ekim 2016).

Ustaçelebi, Ş., 1999. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. ISBN 975-7467-77-4. Güneş Kitabevi, Ankara, 551-558.

Uysal, B., Sözmen, F., Aktaş, Ö., Oksal, B.S. and Köse, E.O., 2011. Essential oil composition and antibacterial activity of the grapefruit (*Citrus paradisi* L.) peel essential oils obtained by solvent-free microwave extraction: comparison with hydrodistillation. International Journal of Food Science and Technology, 46, 1455-1461.

Vahaboglu, H., Coskuncan, F., Tansel, O., Ozturk, R., Sahin, N., Koksall, I., Kocazeybek, B., Tatman-Otkun, M., Leblebicioglu, H., Ozinel, M.A., Akalin, H., Kocagoz, S. and Korten, V., 2001. Clinical importance of extended-spectrum beta-lactamase (PER-1 type) producing *Acinetobacter spp.* and *Pseudomonas aeruginosa* strains. Journal of Medical Microbiology, 50, 642-645.

- Vahaboğlu, H. and Akhan S.Ç., 2002.** *Pseudomonas aeruginosa* ve Diğer *Pseudomonas* türleri. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi'nde Topçu, A.W., Söyletir, G., Doğanay, M. (Ç. Ed.) Nobel Tıp Kitabevi, Cilt 2, 1008-1024.
- Vatl'ák, A., Kolesárová, A., Vukovič, N., Rovná, K., Petrová, J., Vimmerová, V., Hleba, L., Mellen, M. and Kačániová, M., 2014.** Antimicrobial activity of medicinal plants against different strains of Bacteria. *Journal of Microbiology Biotechnology and Food Science*, 3(1), 174-176.
- Vidal, D.R., Garrone, P. and Banchereau, J., 1993.** Immunosuppressive effects of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A on human Blymphocytes. *Toxicon*, 31, 27-34.
- Wachino, J., Yoshida, H., Yamane, K., Suzuki, S., Matsui, M., Yamagishi, T., Tsutsui, A., Konda, T., Shibayama, K. and Arakawa, Y., 2011.** SMB-1, a novel subclass B3 metallo-beta-lactamase, associated with *ISCR1* and a class 1 integron, from a carbapenem-resistant *Serratia marcescens* clinical isolate. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 55, 5143-5149.
- Walsh, T.R., Toleman, M.A., Poirel, L. and Nordmann, P., 2005.** Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clinical Microbiology Reviews*, 18, 306-325.
- Walther-Rasmussen, J. and Hoiby, N., 2006.** OXA-type carbapenemases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57, 373-383.
- Wang, Y., Chen, X., Zhang, Y., Chen, X., 2012.** Antioxidant activities and major anthocyanins of Myrobalan plum (*Prunus cerasifera* Ehrh.). *Journal of food Science*, 77(4), 388-393.
- Watanabe, M., Iyobe, S., Inoue, M. and Mitsushashi, S., 1991.** Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 35, 147-151.
- Weldhagen, G.F., 2004.** Integrons and b-lactams –a novel perspective on resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 23, 556-562.
- Wendel, A.F., Brodner, A.H., Wydra, S., Ressina, S., Henrich, B., Pfeffer, K., Toleman, M.A. and Mackenzie, C.R., 2013.** Genetic characterization and emergence of the metallo-beta-lactamase GIM-1 in *Pseudomonas spp.* and *Enterobacteriaceae* during a long-term outbreak. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 57, 5162-5165.
- White, P.A., McIver, C.J. and Rawlinson, W.D., 2001.** Integrons and gene cassettes in the Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 45, 2658-2661.
- Wick, M.J., Hamood, A.N. and Iglewski, B.H., 1990.** Analysis of the structure-function relationship of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Molecular Microbiology*, 4(4), 527-535.

- Woodford, N., Ellington, M.J. and Coelho, J.M., 2006.** Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. International Journal of Antimicrobial Agents, 27, 351-353.
- Woods, D.E. and Iglewski, B.H., 1983.** Toxins of *Pseudomonas aeruginosa*: new perspectives. Reviews of Infectious Diseases, 5(4), 715-722.
- Wungsintaweekul, B., Umehara, K., Miyase, T. and Noguchi, H., 2011.** Estrogenic and anti-estrogenic compounds from the Thai medicinal plant, *Smilax corbularia* (Smilacaceae). Phytochemistry, 72, 495-502.
- Xia, W., Xu, T., Qin, T., Li, P., Liu, Y., Kang, H., Gu, B. and Ma, P., 2016.** Characterization of integrons and novel cassette arrays in bacteria from clinical isolates in China, 2000-2014. The Journal of Biomedical Research, 30(4), 292-303.
- Xu, L., Ensor, V., Gossain, S., Nye, K. and Hawkey, P., 2005.** Rapid and simple detection of *bla*CTX-M genes by multiplex PCR assay. Journal of Medical Microbiology, 54, 1183-1187.
- Xu, Z., Li, L., Shirliff, M.J., Yamasaki, S. and 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.
- Yang, C., Tang, Q.J., Zhang, L.Z. and Wenying, L., 2008.** Preparative isolation and purification of phenolic acids from *Smilax china* by high-speed counter-current chromatography. Separation and Purification Technology, 61, 474-478.
- Yigit, H., Queenan, A.M., Anderson, G.J., Domenech-Sanchez, A., Biddle, J.W., Steward, C.D., Alberti, S., Bush, K. and Tenover, F.C., 2001.** Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 45, 1151-1161.
- Yong, D., Toleman, M.A., Giske, C.G., Cho, H.S., Sundman, K., Lee, K. and Walsh, T.R., 2009.** Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla*NDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 53, 5046-5054.
- Yücel, M., Yavuz, T., Kaya, D., Behçet, M., Öztürk, C.E. ve Şahin, İ., 2006.** *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının antibiyotiklere direnç oranlarının yıllar içinde değişimlerinin izlenmesi. Antibiyotik ve Kemoterapi Dergisi, 20(3),152-155.
- Zafer, M.M., Agamy, M.H., El-Mahallawy, H.A., Amin, M.A. and El-Din Ashour M.S., 2014.** Antimicrobial resistance pattern and their beta-lactamase encoding

genes among *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cancer patients. Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International, 101635, 8.

- Zareei, Y., Islami, G., Zandi, H., Mousavi, M., Koosha, H. and Akhavan, F., 2014.** The relationship between antibiotic resistance and integrons class in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from 2012 to 2013 in the city of Yazd. Bimonthly Journal of grace, 18(1), 60-67.
- Zhang, Q.F., Zhang, Z.R. and Cheung, H.Y., 2009.** Antioxidant activity of rhizoma *Smmilacis glabrae* extracts and its key constituentastilbin. Food Chemistry, 115, 297-303.
- Zhao, S., Qaiyum, S., Friedman, S., Singh, R. and Foley, S.L., 2003."** Characterization of *Salmonella enterica* serotype newport isolated from humans and food animals". Journal of Clinical Microbiology, 41(12), 5366-5371.
- Zhu, M., Dong, X. and Guo, M., 2015.** Phenolic profiling of *Duchesnea indica* combining macroporous resin chromatography (MRC) with HPLC-ESI-MS/MS and ESI-IT-MS. Molecular Diversity Preservation International (MDPI), 20, 22463-22475.

ÖZGEÇMİŞ

Esmâ AKYILDIZ 1979 yılında Trabzon'un Of ilçesinde doğdu. İlk ve orta öğrenimini Of'ta tamamladı. 2000 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde öğrenime başladı ve 2004 yılında mezun oldu. 2005-2006 yılları arasında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fatih Eğitim Fakültesi'nde tezsiz yüksek lisans eğitimini tamamladı. 2007 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı. 2010 yılında yüksek lisans öğrenimini tamamladı. 2011 yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji ABD'da başladığı doktora öğrenimi halen devam etmektedir. Orta seviyede İngilizce bilmektedir.

Bilimsel Çalışmaları ve Yayınları;

Görev Aldığı Projeler:

Beriş, F.Ş., Akyıldız, E. (Yardımcı Araştırmacı), RTEÜ-BAP (2012.102.03.7) Termofilik *Anoxybacillus flavithermus* Bakterisinin Isıl Kararlı Beta-glukosidaz Geninin Klonlanması, Ekspresyonu ve Biyokimyasal Karakterizasyonu. Devam Ediyor.

Beriş, F.Ş., Akyıldız, E. (Bursiyer), 113Z811 TÜBİTAK KBAG 1001 Projesi. Termofilik Kaynaklı Genler Kullanılarak *E. coli*'de Tetrahidrobiopterin (BH4) Üretimi ve Karakterizasyonu. Devam ediyor.

SCI, SCCI, AHCI İndekslerine Giren Dergilerde Yayınlanan Makaleleri:

Beriş, F.Ş., Akyıldız, E., Düzgün, A.Ö., Coşkun, U.S.S., Sandalli, C. and Cicek, A.C., 2016. " A novel integron gene cassette harboring VIM-38 metallo- β -lactamase in a clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolate ", Annals of Laboratory Medicine, 36, 611-613.

Hakemli Kongre / Sempozyumların Bildiri Kitaplarında Yer Alan Yayınları:

Beriş, F.Ş., Hızal, Ö., Akyıldız, E. ve Baraner, Z., 2012. "BH4 mekanizmasının öncü enzimi GTP siklohidrolaz I'in termofilik *Anoxybacillus flavithermus* bakterisinden klonlanması ve biyokimyasal karakterizasyonu", 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, 3-7 Eylül 2012, İzmir, Türkiye.

- Beriş, F.Ş., Uzun, A., Akyıldız, E., Sandalli, C. ve Karaoğlu, H., 2015.** "Termofilik *Anoxybacillus flavithermus* bakterisine ait β -glukosidaz geninin klonlanması, ekspresyonu ve enzim karakterizasyonu", Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, 21-24 Ağustos 2015, Afyon, Türkiye.
- Beriş, F.Ş., Akyıldız, E., Karaoğlu, H., Turumtay, E.A., Girgin, G. ve Baydar, T., 2015.** "Termofilik *Anoxybacillus flavithermus ptps* geninin ekspresyonu ve gen ürününün biyokimyasal karakterizasyonu", Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, 21-24 Ağustos 2015, Afyon, Türkiye.
- Kaya, E.G., Akyıldız, E., Cicek, A.C., Çalık, F., Timur, D. ve Berk, E., 2015.** "Klinik *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında metallo- β -laktamaz direnç gen taşıyıcılığının araştırılması", Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, 21-24 Ağustos 2015, Afyon, Türkiye.
- Akyıldız, E., Cicek, A.C., Beriş, F.Ş. ve Sandallı, C., 2015.** *Pseudomonas aeruginosa* klinik izolatlarında new delhi metallo- β -laktamaz 6 alelinin (*bla_{NDM-6}*) ilk bildirimi, Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, 21-24 Ağustos 2015, Afyon, Türkiye.
- Kaya, E.G., Akyıldız, E., Sandalli, C., Cicek A.C., Berk, E. and Erçal, B.D., 2015.** "Molecular characterization of metallo- β -lactamase- producing *Pseudomonas aeruginosa*", 7th Eurasia Congress of Infectious Disease, 30 Eylül-3 Ekim 2015, Tiflis, Gürcistan.
- Sandallı, C., Akyıldız, E., Cicek, A.C., Beriş, F.Ş., Düzgün, A.Ö. ve Coşkun, U.S.S., 2016.** "Klinik *Pseudomonas aeruginosa* izolatında VIM-38 metallo-beta-laktamaz taşıyan yeni bir integron gen kasetinin karakterize edilmesi", 12. Antimikrobik Kemoterapi Günleri, 01-03 Nisan 2016, Askeri Müze-Harbiye/İstanbul, Türkiye.
- Sandalli, C., Cicek A.C., Beriş, F.Ş., Akyıldız, E., Düzgün, A.Ö. and Coşkun, U.S.S., 2016.** "Determination of novel integrone include VIM-38 metallo-beta-lactamase in β ", European and Biotechnology Congress, 05-07 May 2016, Riga, Letonya.
- Beriş, F.Ş., Ofluoğlu, E., Akyıldız, E. and Atamov, V., 2016.** "Molecular systematic properties of Rhododendron L. (Ericaceae) taxa distributed in the borders of Kaçkar National Park (Rize)", Symposium on Eurasian Biodiversity, 23-27 Mayıs 2016, Antalya, Türkiye.
- Akyıldız, E., Beriş, F.Ş., Sandallı, C., Cicek, A.C. ve Coşkun, U.S.S., 2016.** Çoklu ilaca dirençli *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarıyla ilişkili integron gen kasetlerinin karakterizasyonu", Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, 18-21 Temmuz 2016, Konya, Türkiye.
- Beriş, F.Ş., Akyıldız, E., Karaoğlu, H., Turumtay, E., Girgin, G. ve Baydar, T., 2016.** "Termofilik *C. clariflavum* bakterisine ait sepiapterin redüktaz'ın klonlanması ve biyokimyasal karakterizasyonu", Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, 18-21 Temmuz 2016, Konya, Türkiye.