



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI

***PSEUDOMONAS AERUGINOSA* İZOLATLARINDA
BİYOFİLM ÜRETİMİ İLE ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİK
İLİŞKİSİNİN KARŞILAŞTIRMALI DEĞERLENDİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Servet EKSELLİ

**Samsun
Aralık-2019**



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI

***PSEUDOMONAS AERUGINOSA* İZOLATLARINDA
BİYOFİLM ÜRETİMİ İLE ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİK
İLİŞKİSİNİN KARŞILAŞTIRMALI DEĞERLENDİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ


Servet EKSELLİ

**Danışman
Prof. Dr. Alper ÇİFTÇİ**


**Samsun
Aralık-2019**

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Servet EKSELLİ tarafından Prof. Dr. Alper ÇİFTÇİ Danışmanlığında hazırlanan “*Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında biyofilm üretimi ile antibiyotik dirençlilik ilişkisinin karşılaştırmalı değerlendirilmesi” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 27/12/2019 tarihinde yapılan sınav ile Veterinerlik Mikrobiyolojisi Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Alper ÇİFTÇİ 
Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Veterinerlik Mikrobiyolojisi ABD

Üye : Prof. Dr. Timur GÜLHAN 
Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Veterinerlik Mikrobiyolojisi ABD

Üye : Doç. Dr. Elçin GÜNAYDIN 
Hitit Üniversitesi Alaca Avni Çelik Meslek Yüksekokulu

ONAY

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

.... / /

Prof. Dr. Ahmet UZUN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans Tez çalışmalarım süresince tüm sabrı ile değerli bilgi ve önerileriyle bana yol gösteren Veterinerlik Mikrobiyolojisi Anabilim Dalı öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Alper ÇİFTÇİ, Prof. Dr. Timur GÜLHAN, Doç. Dr. Arzu FINDIK ve Prof. Dr. Oktay GENÇ ile Araş.Gör. Merve Gizem SEZENER, Vet. Hek. Volkan Enes ERGÜDEN, Vet. Hek. Serhan AKGÖZ'e ve bilgisine danıştığım, desteğini esirgemeyen tüm meslektaşlarıma ve aileme destekleri için teşekkür ederim.

Bu çalışma, PYO.VET.1904.19.002 proje numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

***PSEUDOMONAS AERUGINOSA* İZOLATLARINDA BİYOFİLM ÜRETİMİ İLE ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİK İLİŞKİSİNİN KARŞILAŞTIRMALI DEĞERLENDİRİLMESİ**

Amaç: Çalışmada çeşitli klinik örneklerden izole edilen 48 adet *Pseudomonas aeruginosa* izolatında biyofilm varlığının, antibiyotik dirençliliklerinin ve rol oynayan ilişkili genlerin belirlenmesi ile aralarındaki ilişkinin karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi amaçlandı.

Materyal ve metod: Çalışmada *P.aeruginosa* izolatlarının identifikasyonları PCR ile doğrulandı. Antibiyotik direnç durumları Kirby-Bauer Disk Difüzyon metodu ile 8 antibiyotik için belirlendi. İzolatların biyofilm oluşturmaları *in vitro* olarak Kongo Red Agar, Modifiye Tüp Aderans ve Mikroplak yöntemleri ile araştırıldı. Her üç yöntemle de biyofilm pozitif olduğu belirlenen izolatların filogenetik yakınlıkları RADP-PCR ile saptandı. İzolatların *pelA*, *lasI*, *lasR*, *rhlI*, *rhlR*, *PA0756*, *PA0757*, *PA2070* ve *PA5033* gen varlıkları PCR ile incelendi.

Bulgular: İzolatların enrofloksasine %16,67, seftriaksona %60,42, amoksisilin + klavulanik asite %100, siprofloksasine %10,42, meropeneme %29,17, kolistine %4,17, gentamisine %12,5 ve azitromisine karşı %97,9 oranında dirençli olduğu belirlendi. Biyofilm oluşturma oranları CRA metoduna göre %83,33, Christensen Yöntemine göre %93,75 ve Mikroplak Yöntemine göre %64,58 olarak hesaplandı. Tüm izolatların *pelA*, *lasI*, *rhlI* ve *rhlR* genlerine sahip olduğu görüldü. İzolatların %97,92'sinde ise *lasR* geni belirlendi. İzolatların 46 (%95,83) tanesinin *PA0756* ve *PA0757*, 45 (%93,75) izolatın ise *PA2070* ve *PA5033* genlerine sahip olduğu saptandı. Her üç yöntem ile biyofilm pozitiflik görülen izolatların filogenetik yakınlıkları %56-93 olarak hesaplandı.

Sonuç: Klinik izolatu *P. aeruginosa* suşlarında biyofilm üretiminin ve çoklu antibiyotik direncinin yüksek olduğu, genetik düzeyde incelenen genlerin tek başına biyofilm oluşumundan ve buna bağlı antibiyotik direncinden sorumlu olmadığı saptandı.

Anahtar Kelimeler: antibiyotik direnç; biyofilm; *las*; *pelA*; *Pseudomonas aeruginosa*; *rh*

Servet EKSELLİ, Yüksek Lisans Tezi
Ondokuz Mayıs Üniversitesi-Samsun, Aralık-2019

ABSTRACT

THE COMPARATIVE EVALUATION OF BIOFILM PRODUCTION AND ANTIBIOTIC RESISTANCE IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ISOLATES

Aim: In this study, it was aimed to investigate the biofilm formation, antibiotic resistance profiles, the genes which play roles for biofilm and antibiotic resistances of 48 *P.aeruginosa* isolates isolated from different clinical samples.

Material and methods: The identification of the *P.aeruginosa* isolates were confirmed with PCR. The antibiotic resistances against 8 antibiotics were determined by Kirby-Bauer Disc Diffusion method. The biofilm formations of the isolates were investigated in vitro with Congo Red Agar, Modified Tube Adherence and Micro plate Methods. The isolates which were found as positive with three methods were genotyped with RAPD-PCR. *pelA*, *lasI*, *lasR*, *rhII*, *rhlR*, *PA0756*, *PA0757*, *PA2070* and *PA5033* genes were investigated with using PCR.

Results: The antibiotic resistance rates of the isolates among enrofloxacin, ceftriaxone, amoxicilline-clavulanic acid, ciprofloxacin, meropenem, colistin, gentamycin, and azithromycin were found as 16,67%, 60,42%, 100%, 10,42%, 29,17%, 4,17%, 12,5 % and %97,9, respectively. The biofilm formation ratios were determined as 83,33% with CRA, 93,75% with Christensen method and 64,58% with micro plate method. *pelA*, *lasI*, *rhII* and *rhlR* were carried by all the isolates. *lasR* gene was found in %97,92 of the isolates. Fortysix (95,83%) of the isolates carried *PA0756* and *PA0757*. Fortyfive (93,75%) of the isolates were found as positive for *PA2070* and *PA5033* genes. The phylogenetic relations of the biofilm positive isolates were calculated as 56-93%.

Conclusion: The biofilm formation and multiple antibiotic resistance rates were found as high in the clinical isolates of *P. aeruginosa*. The widespread and advanced studies thought to be performed for the lightening of this situation and biofilm related antibiotic resistances.

Key words: antibiotic resistance; biofilm; *las*; *pelA*; *Pseudomonas aeruginosa*; *rh*

Servet EKSELLİ, Master Thesis

Ondokuz Mayıs University-Samsun, December-2019

SİMGELER VE KISALTMALAR

AMC	: Amoksisilin/klavulanik Asit
ATM	: Azitromisin
C	: Kolistin
CIP	: Siprofloksasin
CRA	: Kongo kırmızılı agar
CTX	: Seftriakson
ÇİD	: Çoklu ilaç direnci
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ENR	: Enrofloksasin
EPS	: Ekzopolisakkarit
ERIC	: Tekrarlayan enterobakteriyel intergenik konsensus
FTS	: Fizyolojik tuzlu su
GEN	: Gentamisin
İBL	: İndüklenebilir beta-laktamaz
LPS	: Lipopolisakkarit
MHA	: Mueller-Hinton agar
MRP	: Meropenem
OD	: Optik dansite
PBP	: Penisilin bağlayıcı protein
PBS	: Fosfatla tamponlanmış tuz solüsyonu
PFGE	: Değişken alanlı jel elektroforezi
QS	: Quorum-Sensing
R	: Rough
RAPD	: Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA
TSA	: Triptik Soy Agar
TSB	: Triptik Soy Broth
UPGMA	: Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages
UV	: Ultraviyole

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
2.1.1. Tarihçe ve Taksonomi	4
2.1.2. Etiyoloji	5
2.1.3. Epidemiyoloji ve Patogenez	6
2.1.4. Klinik Bulgular	7
2.1.5. Antibiyotik Dirençliliği	8
2.1.6. <i>P.aeruginosa</i> ve Biyofilm	11
2.1.7. Biyofilm ve Antibakteriyel Direnç İlişkisi	14
3. MATERYAL VE METOT	16
3.1. Bakteri Materyali	16
3.2. İzolatların PCR İle İdentifikasyonları	16
3.3. Antibiyotik Direnç Profilinin Belirlenmesi	17
3.4. Biyofilm Üretiminin <i>İn Vitro</i> Olarak Belirlenmesi	17
3.4.1. CRA Yöntemi	17
3.4.2. Modifiye Tüp Aderans (Christensen) Yöntemi	18
3.4.3. Mikroplak Yöntemi	18
3.5. Biyofilm ve Antibiyotik Direnç ile İlişkili Genlerin Araştırılması	19
3.5.1. <i>pelA</i> Geni Varlığının Araştırılması	19
3.5.2. <i>lasI</i> , <i>lasR</i> , <i>rhlI</i> ve <i>rhlR</i> Genlerinin Varlığının Araştırılması	20
3.5.3. <i>PA0756</i> , <i>PA0757</i> , <i>PA2070</i> ve <i>PA5033</i> Genlerinin Varlıklarının Araştırılması	21

3.6. Genotiplendirme	21
4. BULGULAR	23
4.1. Bakteri Materyali	23
4.2. İzolatların PCR ile İdentifikasyonları	23
4.3. Antibiyotik Direnç Profilinin Belirlenmesi	25
4.4. Biyofilm Üretiminin <i>İn Vitro</i> Olarak Belirlenmesi	27
4.4.1. CRA Yöntemi	27
4.4.2. Modifiye Tüp Aderans (Christensen) Yöntemi	28
4.4.3. Mikroplak Yöntemi	30
4.5. Biyofilm ve Antibiyotik Direnç ile İlişkili Genlerin Araştırılması	31
4.5.1. <i>pelA</i> Geni Varlığının Araştırılması	31
4.5.2. <i>lasI</i> , <i>lasR</i> , <i>rhlI</i> ve <i>rhlR</i> Genlerinin Varlığının Araştırılması	32
4.5.3. <i>PA0756</i> , <i>PA0757</i> , <i>PA2070</i> ve <i>PA5033</i> Genlerinin Varlıklarının Araştırılması	34
4.6. Genotiplendirme	36
4.7. Sonuçların Toplu Olarak Değerlendirilmesi	37
5. TARTIŞMA	40
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	54
KAYNAKLAR	56
ÖZ GEÇMİŞ	68

1. GİRİŞ

Pseudomonas cinsi yüzyıldan daha önce tanımlanmış ve taksonomik heterojenitelerinden dolayı tamamı birçok açıdan yeniden gözden geçirilerek düzenlenmiştir. *Pseudomonas* cinsi de Pseudomonadaceae ailesi, Pseudomonadales takımı, γ -Proteobacteria sınıfı içinde kalmıştır. *Pseudomonas* türleri tüm dünyaya yayılmış haldedir. Toprakta, suda, bitkilerde ve çürüyen organik maddelerde bulunurlar fakat insan, hayvan ve bitkiler için fırsatçı patojendirler. Psödomonaslar zorunlu aerobik, sporsuz, kapsülsüz, çomak şekilli, bir veya daha çok flagellası bulunan bakterilerdir. Psödomonasların birçok cinsleri bulunmasına rağmen veteriner hekimlik için önemli olan türü *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeruginosa*)'dır.

P.aeruginosa çok sayıda hayvan türünde oportunistik infeksiyonlar meydana getirmektedir. *P.aeruginosa* sağlıklı hayvanların dışkı ve derilerinde yaşayabilmekte ve oportunistik karaktere sahip olması nedeni ile hayvanın immun sistemini baskılayan veya normal florayı bozan tüm predispoze faktörler infeksiyon oluşumuna neden olabilmektedir. Birçok hayvanda sporadik infeksiyona neden olan etken inek, koyun, keçi, domuz, köpek, kedi, sürüngen hayvanlarda oportunistik olarak çok çeşitli hastalıklara neden olmaktadır. Organizma ender olarak hasarsız dokuları infekte ettiğinden fırsatçı patojenlere somut bir örnektir, buna rağmen konak savunması bozulduğunda infekte olmayan neredeyse hiçbir doku kalmaz. *P. aeruginosa* ile ilişkili hastalıklardan bazıları; koyunlarda yapağı çürüğü, sığırlarda mastit ve abort, atlarda metrit ve kornea ülseri, köpeklerde otitis eksterna, vizonlarda hemorojik pnömoni, kanatlılarda embriyo ölümleri, kafes yılanlarında nekrotik stomatit, botriyomikoz, septisemi, üriner sistem infeksiyonu, yara infeksiyonu ve çeşitli hayvanlarda apse oluşumlarıdır.

Pseudomonas aeruginosa, genelde hayvan patojeni olarak kabul edilir ve duyarlı konaklarda hastalık yapabilme özelliği ve antibiyotiklere dirençliliği ile dikkat çeker. Doğal direnç, genellikle dış membran lipopolisakkaridi ve kapsülü tarafından sağlanan geçirgenlik bariyerleri nedeniyle oluşur. Doğal yaşama ortamı toprak olduğu ve bu ortamda diğer bakteri küflerle birlikte yaşadığı için, doğal olarak ortaya çıkan çeşitli antibiyotiklere karşı direnç gelişmiştir. Ayrıca, *P. aeruginosa* transfer edilebilir antibiyotik direncinin devamını

sağlar. *Pseudomonas* türlerine karşı etkili antibiyotikler florokinolonlar, gentamisin, amikazin, tobramisin ve imipenemdir ancak bunlar dahi tüm suşlar üzerine etkili değildir.

Günümüzde çeşitli infeksiyöz hastalıklarının patogeneğinde mikroorganizmaların vejetatif formlarının yanı sıra biyofilm yapılarının da önemli rol oynadığı bilinmektedir (Costerton ve ark., 1999). Biyofilmler doğal çevrede sıkça rastlanabilen bir mikrobiyal yaşam formudur. Mikroorganizmaların yaşamları üzerine olumsuz etkiler oluşturan çevresel koşullardan korunmak ve yaşamsal faaliyetleri sürdürebilmek için oluşturdukları mikroekosistem olarak da tanımlanmaktadır (Marcinkiewicz ve ark., 2013). Günümüzde infeksiyon hastalıklar, etkin antibiyotik terapileriyle tedavi edilmektedir. Ancak bu yaklaşım çoğunlukla bakteriyel biyofilmlerin söz konusu olduğu durumlarda etkin bir çözüm sağlayamamaktadır. Biyofilm içerisindeki bakteriler, birtakım antijenler sentezleyerek antikor üretimini tetikleyebilirler; ancak antikorlar çoğu kez biyofilm içerisindeki bakterileri öldürmek için yeterli etkinliği gösterememektedirler. Bunun sonucunda, biyofilm çevresindeki dokuda immün kompleks hasarı meydana gelmektedir. Yeterli hücresel ve humoral bağışıklığı olan bireylerde dahi biyofilmler, immün sistemce alt edilemeyebilirler. Antibiyotik terapiler, biyofilmlerden açığa çıkan vejetatif hücrelerin semptomlarını tersine çevirebilirken, biyofilmlerin yok edilmesinde etkin olamamaktadır. Sürekli antibiyotik terapisine rağmen tekrarlayan semptomların görülmesi sonucunda cerrahi müdahaleyle biyofilmin vücuttan uzaklaştırılması gerekmektedir.

Biyofilm yapısı mikroorganizmaların kendi ürettikleri organik ekzopolisakkaritlerden (EPS) oluşmaktadır. Mikroorganizmalar canlı veya cansız bir yüzeye tutunmaları sonrasında biyofilm oluşturmakta ve bu yapı mikroorganizmaya konak savunmasından kaçış, antibiyotiklere direnç açısından avantaj sağlamaktadır. Doğal çevrede bulunan su arıtma tesisleri, endüstriyel su soğutma kuleleri gibi cansız ortamlarda biyofilm oluşumu, mikroorganizmaya pek çok dezenfektana, pH değişimine ve kuruluğa karşı dayanıklılık sağlamaktadır (Høiby ve ark., 2011).

Biyofilmler, çevresel ve endüstriyel ortamlarda bulunabilmekte ve klinik olarak da sorunlara neden olabilen yapılardır (Costerton ve ark., 1999). Mikrobiyal biyofilm oluşumu üzerine uzun yıllardır bir çok araştırma yapılmış ve araştırmalar sonucunda günümüzde kronik doku hasarıyla seyreden pek çok bakteriyel infeksiyonda biyofilmlerin rol oynadığı

bildirilmiştir (Høiby ve ark., 2011). İntravenöz kateterler, implantlar, kalp kapakçıkları, kontakt lensler gibi tıbbi araç ve biyomateryaller üzerinde oluşan biyofilmler sonucu gelişen infeksiyonların tedavisinde başarı şansı azalmaktadır (Lindsay ve von Holy, 2006). Kronik bakteriyel infeksiyonların %80'inden fazlası biyofilmler ile ilişkilendirilmiş, nozokomiyal infeksiyonların da %65'inden biyofilm yapısının sorumlu olduğu çalışmalarla ortaya konulmuştur.

Bu tez çalışması çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş olan ve Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonunda mevcut olan *P. aeruginosa* izolatlarında biyofilm varlığının ve antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi ile beraber her 2 fenotipik determinantta rol oynayan ilişkili genlerin saptanarak, aralarındaki ilişkinin karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Pseudomonas aeruginosa*

2.1.1. Tarihçe ve Taksonomi

Pseudomonas cinsi içerisinde yer alan bakteriler Gram negatif, sporsuz, hareketli bakterilerdir. Psödomonaslar ilk defa 1850 yılında Sedillot tarafından tanımlanmıştır. Sedillot, Fransız askerlerin yaralarında mavi-yeşil renkli oluşumları tanımlamış ve bu oluşumlar 1882 yılında *Bacillus pyocyaneus* ve sonrasında da *Pseudomonas pyocyanea* olarak isimlendirilmiştir. Bu renk oluşumuna neden olan piyosiyanın ilk defa 1862 yılında Lucke tarafından belirlenmiştir. Gessard'ın 1882 yılında saf kültür olarak izolasyonu sonrasında, 1897 yılında Hirschman ve Kreibich ve 1925 yılında Osler patojen bir bakteri olarak tanımlamışlardır. *Pseudomonas* türleri Dooren de Jong tarafından 1926 yılında çeşitli organik bileşiklerini karbon ve enerji kaynağı olarak kullanımına bağlı olarak sınıflandırılmıştır. Buchanon ve ark. tarafından 1966 yılında *Pseudomonas* türleri fenotipik özelliklerine göre sınıflandırılmıştır. 1960'lı yıllarda DNA hibridizasyon yöntemi ile genotipik olarak sınıflandırılma yapılmış fakat taksonomik heterojenitelerinden dolayı 1984 yılında Palleroni tarafından rRNA homolojilerine göre psödomonaslar gruplandırılmıştır (Brooks ve ark., 2007). Migula tarafından 1990 yılında Yunanca'da yalancı anlamına gelen "pseudos" ve birim anlamına gelen "monas" kelimelerinin birleştirilmesi ile *Pseudomonas* olarak adlandırılmıştır (Pitt ve Simpson, 2006).

Pseudomonas cinsi bakteriler rRNA homolojilerine göre Grup I-V olmak üzere beş büyük tür kümesi içerisinde gruplandırılmaktadır. Grup I, floresan ve nonfloresan olmak üzere 2 alt grup içermektedir. Floresan alt grubu *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens* *P. putida* ve nonfloresan alt grubu da *P. stutzeri* *P. mendocina* türlerini kapsamaktadır. Grup II; *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia cepacia* ve *Ralstonia pickettii* türlerini içermektedir. Grup III *Comamonas*, *Acidovorax*, *Delftia* ve *Hydrogenophoga* türlerini; Grup IV *Brevundimonas* türlerini ve Grup V ise *Stenotrophomonas maltophilia* ve *Xanthomonas* türlerini kapsamaktadır. Bu

gruplandırılmada *Pseudomonas* türleri birçok farklı cins altında yeniden sınıflandırılmıştır. *Pseudomonas*'a ilaveten bu cinslerden ikisi, *Burkholderia* ve *Stenotrophomonas*, veteriner hekimliğinde önemlidir (Erdem, 1999; Brooks ve ark., 2007).

2.1.2. Etiyoloji

P. aeruginosa 1,5- 3 µm boy ve 0,5- 0,8 µm genişlikte olan, Gram negatif, hemolitik, sporsuz, kapsülsüz, hareketli, düz veya hafif eğri, uçları yuvarlak ve basil şekilli bakterilerdir. Bakteri hareketini genellikle bir ucunda yer alan tek ve bazen de iki-üç adet flagellası ile gerçekleştirmektedir. Çok hareketli olmalarına rağmen, uzun süre beklemiş kültürlerde ve antiseptik maddelerin bulunduğu ortamlarda hareketlerini ve pigmentlerini kaybettikleri, R (rough) formuna dönüştükleri ve kısa veya çok uzun olacak şekilde deforme oldukları bildirilmiştir. Optimum üreme pH: 7.2 ve 37-41⁰C'de gerçekleşmektedir (Özan, 1996).

P.aeruginosa zorunlu aerop özellikte olup, glikoz ve bazı karbonhidratları parçalayarak asit oluşturmasına rağmen sakkarozu etkisi yoktur. Oksidaz pozitif olması bağırsak florasında yer alan diğer bakterilerinden ayırt edilmesini sağlamaktadır. Katalaz ve L-arjinin dihidrolazı pozitif özellikte iken; indol, lizin ve ornitin dekarboksilazı negatiftirler. H₂S üretimi, metil kırmızısı ve Voges Proskauer yönünden de negatif özelliktedirler. Nitratları nitrite indirir.

P. aeruginosa kanlı agarda beta hemoliz yapar. Optimal üreme sıcaklığı 37⁰C'dir ve 37⁰C de % 1'lik trifenil tetrazolium kloridli besiyerlerinde kırmızı pigmentli koloni oluştururlar (Palleroni, 1984). Bakterinin piyoverdin, piyosiyenin, piyorubin ve piyomelanin pigmentleri bulunmaktadır. Piyosiyenin su ve kloroform ile çözünebilir, floresans vermeyen, mavi renkte bir pigmenttir. Piyoverdin de su ve kloroformda çözünebilir, 254 nm dalga boyundaki UV ışınları ile floresans oluşturan ve yeşilimsi renk veren bir pigmenttir. Piyorubin kırmızı, piyomelanin ise kahverengi renkte pigmentlerdir. Piyosiyenin pigmentinin oluşması piyorubin ve piyomelanin pigmentlerinin varlığı nedeniyle baskılanabilmektedir (Palleroni, 1984). Katı besiyerinde sahip oldukları piyosiyenin pigmenti mavi-yeşil renkte, piyoverdin pigmenti yeşil-sarı renkte ve piyorubin pigmenti de kırmızı-kahve renkte koloni oluşumuna yol açar. İnfeksiyonlardan izole

edilen *P.aeruginosa* suşlarında genellikle piyosiyanın pigmenti bulunmaktadır ve bakteri bu pigment nedeniyle “*aeruginosa*” olarak adlandırılmıştır. Patojen suşlarda piyosiyanın oluşumuna bağlı olarak yeşil pigmentin görülmesi ve yapısında bulunan 2-aminoasetofenon dolayısı ile kültürde aromatik koku bulunmaktadır. Bu özellikler bakterinin tanımlanmasında önemli kriterlerdir (Erdem, 1999; Winn ve ark., 2006).

P. aeruginosa'nın patojenitede rol alan birçok virülens faktörü bulunmaktadır. Bu virülens faktörlerinden flagella, polisakkarit kapsül, fimbria (pilus), lipopolisakkarit yapısal bileşenlerdir. Bakterinin toksin ve enzim niteliğindeki virülens faktörleri de fosfolipaz C (hemolizin), aljinat-biyofilm, sidereforlar (piyoverdin, piyosiyanın, piyoşelin), elastaz (LasB ve LasA), proteaz, lökositin, ekzotoksin A (ADP-ribozil-transferaz), ramnolipid (hemolizin ve lesitinaz aktivitesi), ekzotoksin S ve T, Quorum Sensing, Tip III sekresyon sistemi (S, T, U ve Y ekzoenzimleri) olarak bildirilmektedir. Bakterinin hastalık oluşturabilmesi için bu virulans faktörlerinden birçoğunun bir arada bulunması gerekmektedir (Erdem, 1999; Moore ve Flaws, 2011). *P.aeruginosa*'nın proteoliz ve hidroliz özellikleri sayesinde koagüle serumu, kazeini, fibrini, elastini, kollajenleri, hemoglobini ve jelatini hidrolize etmektedirler (Shaw ve Latty, 1982).

2.1.3. Epidemiyoloji ve Patogenez

P.aeruginosa çok basit gelişim ihtiyaçlarına sahip olmaları nedeniyle çevrede yaygın olarak bulunmaktadır. Nemli ve güneş ışığından uzak yerlerde, toprakta ve yüzeysel sulara uzun yıllar yaşayabilmektedir. Besin ihtiyaçlarını 4-42⁰C gibi geniş bir sıcaklık aralığında sağlayabilmeleri ve birçok antibiyotik/dezenfektana karşı dirençli olmaları nedeniyle de toprak, su, bitki, hayvan ve insanlardan sıklıkla izole edilmektedir (Pollack, 2000). İnfeksiyonlar kontamine yem ve su, aerosoller ve deride bulunan yaralar ile meydana gelir. Bulaşma, arthropod ısırıkları yoluyla da oluşabilir. Zoonotik bulaşma bildirilmemesine rağmen, insandan insana bulaşma olabilmektedir.

P. aeruginosa'nın neden olduğu infeksiyonların patogenezinde sahip olduğu virülens faktörlerinin hepsi rol oynamaktadır. Flagella hareketliliği sağlamanın yanı sıra mütine ve respiratorik epitel hücrelere karşı adezin olarak görev yapmaktadır. Tip 4 pilus, konak dokularına ilk bağlanma aşamasında görev alan esas adezindir. LPS de adezyon ve

invazyonda rol oynamaktadır. LPS'nin lipid A kısmı yangıya ve doku hasarına neden olur. Bakteriye proteinlerden oluşan Tip III sekresyon sistemi, sitotoksinleri konak hücre sitoplazmasına taşıma görevini üstlenmektedir. *P. aeruginosa* toksinleri epitelyal hücre hasarında rol oynamakta ve fagositik hücreleri inhibe edebilmektedir. Sidereforlar tüm bakterilerde olduğu gibi demir kazanımında yani konak dokusundaki gibi düşük oranda demir olan bölgelerde hayatta kalmayı destekleyici rol oynamaktadır. *P. aeruginosa* EPS'leri slime benzeri mukoid/aljinat bir yapı üretebilir ve bu yapı da adezyonu sağlamak için biyofilm oluşumuna neden olmaktadır. Oluşturulan bu yapı aynı zamanda bakteriyi fagositozdan da korumaktadır.

P. aeruginosa'nın patogenezi adezyon, kolonizasyon, invazyon ve infeksiyon oluşumu başlıkları altında incelenmektedir. Adezyon yani konak epitel yüzeyine tutunma genellikle dış membran elemanlarından olan flagella ve tip 4 pilus aracılığı ile olmaktadır. Bakteri yüzey elemanlarından olan LPS yapısında meydana gelen değişiklikler de adezyonu etkilemektedir. *P. aeruginosa* flagellar hareketi sayesinde ortamda hareket eder ve uygun ortam bulduğunda da konak epitel yüzeyine tutunma gerçekleşir. Sonrasında da tip 4 pilusları sayesinde kayma hareketi yaparlar. Pilusların kasılıp gevşeme hareketi ile bakteriler birbirlerine doğru yaklaşır ve kısa süre içerisinde kolonizasyon gerçekleşir. Bu şekilde kolonize olan bakteriler, konağın diğer sistemlerine invaze olarak yani yayılarak infeksiyonlara neden olur. İnvaze olan bakteriler salgıladıkları endotoksin, ekzotoksin, piyosiyenin, piyoverdin, alginat gibi enzim ve toksinleri ile doku hasarına ve sonrasında da infeksiyona neden olur (Vahaboğlu ve Akhan, 2008).

2.1.4. Klinik Bulgular

P. aeruginosa infeksiyonlarında predispozisyon oluşturan nedenler doku bütünlüğünün bozulması, immun yetmezlik ve bilinçsiz antibiyotik kullanımı olarak bildirilmektedir. *P.aeruginosa* sağlıklı hayvanların dışkı ve derilerinde oportunistik olarak bulunabilmektedir. Oportunistik özelliğe sahip olması nedeni ile de hayvanın immun sistemini baskılayan veya normal florayı bozan tüm faktörler infeksiyona predispozisyon yaratarak, infeksiyon oluşmasına neden olmaktadır.

Hastalığın belirtileri, hayvandaki lezyonların derecesine ve dağılımına bağlıdır. Bakteri genellikle doku bütünlüğünün bozulması ile enfeksiyona neden olmakla beraber, ender olarak hasarsız dokuları infekte edebilmesi nedeniyle fırsatçı patojen olarak da tanımlanmaktadır. Hayvanlarda, enfeksiyonlar genellikle sporadik olarak seyretmektedir. Bununla beraber septisemi ile seyreden akut hastalık şekillenebilir. *P. aeruginosa* tüm hayvanlarda yara enfeksiyonları; sığırlarda mastitis, uterinal enfeksiyonlar, enterit, artrit, solunum yolu enfeksiyonları ve botriyomikozis; koyun ve keçilerde pnömoni, mastitis, yapağı çürüğü, akciğerde apse; köpek ve kedilerde otitis eksterna, üriner kanal enfeksiyonları, kornea ülseri, pnömoni, endokarditis ve derin piyoderma; atlarda metritis, abort, kornea ülseri ve apse oluşumu; kanatlı hayvanlarda septisemiye neden olmaktadır. *P. aeruginosa* enfeksiyonlarında görülebilen en tipik lezyonlar, dokularda irin oluşturabilen nodüllerdir. Etkenin sahip olduğu piyosiyon, irinin rengini değiştirebilir ve yeşilimsi mavimsi renk almasına neden olabilir. Bu durum da *P. aeruginosa* enfeksiyonları için patognomonik olarak kabul edilmektedir.

2.1.5. Antibiyotik Dirençliliği

Antibakteriyel bir maddenin bakterinin üremesini durdurucu veya öldürücü etkisine karşı koyabilen bakterinin bu özelliği “antibakteriyel direnç” olarak tanımlanmaktadır. Bakterinin genetik özellikleri nedeniyle bazı antibiyotiklere dirençli olması “doğal/intrinsik direnç” olarak tanımlanmaktadır. Doğal direnç, bakterilerin antibiyotiğin hedeflediği yapıya sahip olmamaları veya ajanın yapısal bir özelliğinden dolayı hedefe ulaşamamasından kaynaklanabilmektedir. Kazanılmış direnç ise bakterinin genetik yapısındaki değişimlere bağlı olarak, kromozomal veya ekstrakromozomal genetik maddelerdeki mutasyonlar sonucunda ortaya çıkabileceği gibi, direnç genlerinin transformasyon, transdüksiyon veya konjugasyon yoluyla başka bakterilerden alınması ile de oluşabilmektedir. Bakterinin sahip olduğu doğal ve kazanılmış direnç mekanizmalarından dolayı tüm dünyada hızla yeni nesil antibakteriyeller geliştirilmesi üzerine çalışmalar önem kazanmıştır (Sanders, 1992; Yüce, 2001).

P. aeruginosa enfeksiyonlarında bakterinin birçok antibiyotiğe direnç geliştirebilmesi nedeniyle tedavisi oldukça güçtür. *P. aeruginosa* suşlarında birçok

mekanizma ile antibiyotiklere direnç gelişebilmektedir. Plazmid kaynaklı ve kromozomal olarak beta-laktamaz üretimi antibiyotiklerin hedef değişikliğine neden olabilmektedir. İnfeksiyon kökenli suşlarda en sık rastlanan direnç mekanizması beta-laktamaz aracılığı ile olmaktadır ve bu mekanizma ile beta-laktam antibiyotiklerin etkinliği azalmaktadır. Ayrıca, bakterinin porin proteinlerinde değişiklik meydana gelebilmekte ve buna bağlı olarak ta dış membran geçirgenliğinde azalma görülebilmektedir. *P. aeruginosa* efluks pompa sistemini kullanarak antibiyotiğin dışa atılmasına neden olabilmektedir. Aminoglikozid modifiye edici enzimler de direnç kazanımının önemli mekanizmalarından birisidir. *P. aeruginosa* suşlarında kromozomal mutasyonlar görülebilmekte ve bakteri plazmidler, integron veya transpozonlar aracılığı ile taşınan gen kazanımları sonucu da direnç geliştirebilmektedir (Gilardi, 1991; Tenover, 2006).

P. aeruginosa infeksiyonlarda klinikte etkili olan ve en sık kullanılan antibiyotikler geniş spektrumlu penisilinler (azlosilin, mezlosilin, tikarsilin, piperasilin), üçüncü kuşak sefalosporinler (sefaperozon, seftazidim), karbapenemler (imipenem, meropenem), monobaktamlar (aztreonam), aminoglikozidler (amikasin, gentamisin), florokinolonlar (siprofloksasin) ve polimiksinler (polimiksin B ve kolistin antibiyotikleridir. İnfeksiyonların tedavisinde erken ve uygun dozda tek antibiyotik kullanımının yanı sıra antibiyotik kombinasyonları da kullanılmaktadır. Genellikle aminoglikozidlerin beta-laktamlar, üçüncü kuşak sefalosporinler, monobaktamlar ya da karbapenemlerle kombine edilerek verilmesi tedavide başarı şansını arttırmaktadır (Pitt ve Simpson, 2006).

P. aeruginosa için tedavide sıklıkla önerilen beta-laktam antibiyotikler piperasilin- tazobaktam, seftazidim, aztreonam, sefepim, karbapenemlerdir (Mayer ve ark., 1995). Beta-laktam antibiyotikler bakterinin hücre duvarı sentezinde selektif olarak inhibitör görevi yaparlar. Bunlar bakterinin üreme fazında aktiftirler ve ilk etkilerini hücre reseptörlerine bağlanarak gösterirler. *P. aeruginosa* suşlarında beta-laktam antibiyotiklere karşı dirençte enzimatik (penisilinaz, GSBL, sefalosporinaz) ve nonenzimatik (pompa sistemleri, porin kaybı) mekanizmalar rol oynamaktadır (Güven ve ark., 2008).

Penisilinler ve sefalosporinler bakterinin penisilin bağlayıcı proteinlere (PBP) bağlanırlar ve bu şekilde hücre duvar sentezini bozarak bakterisidal etki yapar. *P.*

aeruginosa'ya karşı etkili olan penisilinler tikarsilin, karbenisilin, azlosilin, piperasilin, beta-laktam+beta-laktamaz inhibitörü kombinasyonlarıdır. Üçüncü kuşak sefalosporinler, seftazidim, sefepim ve sefoperazon *P. aeruginosa*'ya etkilidir. *P. aeruginosa*'nın ampisilin, amoksisilin, amoksisilin- klavunata direnç gelişimi indüklenebilir kromozomal AmpC beta-laktamaz ve efluks pompa sistemi mekanizmaları yolu ile gerçekleşir (Gilardi, 1991).

Karbapenemler diğer beta-laktamlar gibi PBP'ler ile kovalanarak bağlanırlar ve hücre duvar sentezini inhibe ederler. İmipenem, meropenem ve doripenem *P. aeruginosa*'ya karşı etkili olan karbapenemlerdir. Meropenemin etkinliği imipeneme oranla daha yüksektir ve PBP-3 üzerinden etkisini göstermektedir (White Friedrich ve ark., 1996).

Monobaktam grubu antibakteriyellerden birisi olan aztreonam diğer beta-laktam antibiyotiklerden farklılık göstermektedir. Aztreonamın yapısında diğerlerinden farklı olarak beta-laktam halkasına bağlı başka bir halka bulunmamaktadır. Etkisini PBP-3'e bağlanmak ve böylece hücre duvarı sentezini durdurmak suretiyle gerçekleştirmektedir (Maeda ve ark., 2008; Oie ve ark., 2009).

Beta-laktam halkası içermekte iken tek başlarına antibakteriyel etki göstermeyen beta-laktamaz inhibitörleri, penisilin grubu antibiyotikleri hidrolizden korumaktadır. *P. aeruginosa*'ya en etkili olan beta-laktam+beta-laktamaz inhibitörü kombinasyonları piperasilin-tazobaktam ve tikarsilin-klavulanik asittir (Gilardi, 1991; Jawetz ve ark., 2010).

Aminoglikozid grubu antibiyotikler ribozomların protein sentezini inhibe ederek etkisini göstermektedirler. Bu etki mRNA'nın üzerinde taşıdığı genetik kodun yanlış okunması sonucunda işlevsiz bir protein sentezlenmesi ile gerçekleşir. Gentamisin, netilmisin, tobramisin ve amikasin *P. aeruginosa*'ya etkili önemli aminoglikozidlerdir (Jawetz ve ark., 2010).

Kinolonların konsantrasyon ile ilişkili olan bakterisidal etkileri bulunmaktadır. Kinolonlar, DNA sentezini direk inhibe eden tek antibakteriyeldir. *P. aeruginosa*'ya en etkili olan kinolon siprofloksasindir (Drlica ve Zhao, 1997; Şenol, 2002).

2.1.6. *P. aeruginosa* ve Biyofilm

Biyofilm, bir yüzeye yapışarak bakterilerin uyumlu ve yapısal bütünlük içerisinde yaşadığı kompleks bir organizasyondur (Kumar ve ark., 2011). Biyofilm içerisinde bulunan bakteriler birbirleriyle haberleşerek varlıklarının devamı için gerekli olan yaşamsal işlevlerini yerine getirirler (Vu ve ark., 2009). Biyofilmler sadece yüzeye yapışmış durumda bulunan ve içerisinde mikroorganizmaların bulunduğu homojen bir tabakadan ibaret değildir. Yapılan araştırmalar, birbirlerine yapışmalarını sağlayan, büyüme oranını arttıran ekstraselüler polimerik maddeden oluşmuş matriks içine gömülü belirli bir koordinasyon yeteneğinde olduklarını göstermiştir. Ayrıca gen transkripsiyonları ile fenotipik farklılıklar gösteren bakterilerin oluşturduğu biyolojik sistemler olarak da nitelendirilmektedirler (Donlan, 2002). Biyofilm oluşumu; su aktivitesi, besin ihtiyacı, antimikrobiyal madde içeriği, pH değeri, asidite, oksijen miktarı gibi iç faktörler ile beraber yüzey materyali, yüzey alanı, yüzey düzgünlüğü, ve sınırlı besin maddesi gibi dış faktörlere de bağlıdır (Donlan ve Costerton, 2002; Douglas, 2003).

Biyofilm, bakterinin çevresinde düzensiz bir şekilde dağılan polisakkaritten oluşan bir matrikstir. Biyofilme polisakkaritler bakteri hücre yüzeyine tutunmuş olan ince şeritler halinde ve hücrenin etrafında kompleks bir ağ oluşturmuş şekilde gözlemlenir (Leriche ve ark., 2000; Sutherland, 2001). Matriksin içeriği olan ekzopolisakkaritler hem fiziksel hem de kimyasal özellikler açısından farklılıklar gösterir. Polisakkaritler uzun, ince moleküler zincirlerdir ve $0,5-2,0 \times 10^3$ kDa'luk bir moleküler yapıya sahiptirler. Ayrıca matriksin yoğunluğu ve genişliği hücrenel ve hücrenel olmayan yapılar ile mikroorganizmaların türleri arasında da farklılıklar göstermektedir. Biyofilmlerin yapısının büyük bölümünü (%73 – 98) su oluşturmaktadır (Donlan ve Costerton, 2002). Biyofilmin yapısı mikroskopik olarak incelendiğinde matriksin besin ve oksijen taşınmasını sağlayan 'su kanalları'na sahip heterojen bir yapıya sahip olduğu görülmüştür (Flemming ve Windenger, 2010). Biyofilmin gelişmesi yakın çevredeki besinlerin hücre içine alınımı, atık maddelerin ise hücreden uzaklaştırılması ile ilişkilidir. Ayrıca besin kısıtlanmasından dolayı eksprese olan Quorum-sensing (QS) moleküllerinin salınımı, ortam pH'ı, O₂ perfüzyonu, karbon kaynağı ve ozmolarite de gelişimde çok etkilidir (Bothwell ve ark., 2003; Sakarya, 2005). Son yıllarda bakteriler tarafından salınan ve hücreler arası sinyal iletimini sağlayarak bakterinin

gen ekspresyonunu düzenleyen moleküller aracılığı ile biyofilm yapımının düzenlenebileceğinin gösterilmesi biyofilmin patojenite ve çevreye adaptasyonunda önemini artırmıştır (Sakarya, 2005).

Biyofilmin yapısallığı için gereken biyofilm matriksi; biyofilmi oluşturan mikroorganizmaların türü ile beraber biyolojik ve biyolojik olmayan birçok değişkene bağlıdır. Bu farklı bileşenler, salgılanan ekzopolisakkaritler, proteinler ve DNA'lardır. Ekzopolisakkaritler % 50-70 oranında organik karbon içerirler. Bakteriye türlerin farklılığına bağlı olarak ekzopolisakkaritlerin tipi ve miktarı çeşitlilik göstermektedir (Starkey ve ark., 2004). Bakteriye virülense etkilerinden ötürü ekstraselüler polisakkaritler uzun yıllardır çalışılmakta olan bir konudur. Hücre dışı polisakkaritler, kapsüller polisakkaritler ya da ekzopolisakkaritler şeklinde sınıflandırılmaktadır. Bakteri kültürleri santrifüj edildikten sonra, hücreye bağlantılı şekilde kalan ekstraselüler polisakkaritler "kapsül" olarak adlandırılırken, üst sıvı içerisinde kalan hücre dışı polisakkaritler ise "ekzopolisakkaritler" olarak adlandırılmaktadır. Biyofilm çalışmalarında bazı polisakkaritlerin izolasyonunun zor olması, biyofilmin kimyasal kompozisyonunun anlaşılmasına engel teşkil etmektedir.

P. aeruginosa suşlarının, mukoid olmayan biyofilm üreticisi suşlardan farklı olarak daha kompleks ve farklı bir matriks oluşturdukları saptanmıştır. Bu farklılıklardan biri, mukoid suşlardaki matriks yapısında bulunan ekzopolisakkaritlerin temel bileşeni olan O-asetilli aljinattır (Nivens ve ark., 2001). EPS'nin biyofilmin yapısına ve biyofilmi oluşturan bakterilerin hayatta kalabilme kabiliyetlerine önemli katkılar sağladığı, deneysel koşullarda biyofilmden EPS'nin uzaklaştırılması halinde bakterilerin antimikrobiyel ajanlara karşı daha duyarlı hale gelmeleriyle anlaşılmıştır (Watnick ve Kolter, 2000).

Biyofilm araştırmalarında model olarak en çok tercih edilen mikroorganizmalardan biri olan *P. aeruginosa*'nın flagellar hareket yetersizliği sergileyen ve tip IV pilusunu sentezleyemeyen mutant suşlarında yüzeye etkileşim gerçekleşse dahi, bu aşamadan sonra biyofilm tabakasının temelini teşkil eden mikrokolonizasyon aşamasının gerçekleşmediği bilinmektedir. *P. aeruginosa* biyofilm modeline göre; biyofilm oluşum aşamalarını ilk tutunma ve mikrokoloni oluşumu, biyofilm gelişimi ve hücrelerin biyofilmden ayrılması olarak özetlemek mümkündür (Costerton ve ark., 1999).

Biyofilm oluşumunun ilk aşaması olan yüzeye tutunma sırasında bazı genlerin düzeylerinde artış olduğuna yönelik kanıtlar mevcuttur. Tutunmadan sonra mikrokoloniler, biyositlere dirençli ekzopolisakkarit kaplı topluluklar halinde farklılaşırlar. Gram negatif bakterilerde quorum sensing çalışmaları bakterilerce salınan asilhomoserin lakton sinyallerinin kritik hücresel yoğunlukta, spesifik bazı genlerin ifadesini teşvik ettiğini göstermiştir. *P. aeruginosa*'da iki tip quorum sensing mekanizması tanımlanmıştır. Bunların bir tanesi *lasR-lasI* sistemi olup, bu mekanizma hücre dışı virülens faktörlerinin ifadesini düzenler. Bu sistem aynı zamanda sekonder metabolitlerin üretimini düzenleyen *rhIR/rhII* sistemini de kontrol eder. *rhII* butirilhomoserin laktonunun üretimini katalizler ve *lasI*, 3-oksododekanoil homoserin laktonun sentezini yönlendirir. Doğal tip, *lasI* ve *rhII* mutantları cam bir yüzeyde kolonize olup mikrokoloni oluşturabilir; fakat doğal tip ve *rhII* mutant tip, kalın-biyosit dirençli biyofilmler oluştururken, *lasI* mutantlarının oluşturduğu biyofilmler ince ve farklılaşmamış bir şekilde kalarak zayıf deterjanlarla (sodyum dodezil sülfat) uzaklaştırılabilirler. *lasI* mutantlarına 3-oksododekanoil homoserin laktonun ilavesiyle bu mutantlarda biyofilm oluşumu yeniden görülmüştür. Bu durumun en iyi örneği; *P. aeruginosa*'nın silikon üreter kateterleri üzerindeki biyofilmlerinde asilhomoserin laktonun saptanmasıdır. *P. aeruginosa* biyofilmlerinde, yüzeye tutunma ve yüzeydeki agregasyon için spesifik hücre bileşenlerine gereksinim duyulmaktadır. Bu biyofilmlerin olgunlaşması için de hormon benzeri bir bileşene ihtiyaç duyulduğu saptanmıştır (Costerton ve ark., 1999).

Bağlı bir topluluk içindeki bir bakterinin farklı bölgelerde kolonize olabilmesi için birtakım dağılma mekanizmalarına gereksinimi vardır. Bunun yanında, biyofilm içerisindeki bakteriler vejetatif faza da geçebilmektedir. *P. aeruginosa*'da bu durum aljinatı sindiren bir enzimle gerçekleştirilmektedir (Costerton ve ark., 1999).

Biyofilm organizasyonunun anlaşılmasında en ideal model olarak kabul edilen *P. aeruginosa* biyofilmi, bir substrata tutunmuş vaziyettir ve biyofilmin üzerinde besinlerin sürekli akış halinde olduğu bir sulu faz vardır. Tutunmuş hücreler mikrokolonilerin oluşumu için ekzopolisakkarit üretir ve biyofilmin yayılabilmesi için mikroorganizmalar yüzey boyunca yavaşça göç ederek mantar şeklini andıran yapılar oluştururlar. Primitif dolaşım sistemine paralellik gösteren su dolu kanallar, mikrokoloniler arasında

oluşturularak besinsel gereksinimlerin giderilmesine ve toksik atıkların uzaklaştırılmasına olanak sağlar. Bu kompleks ve organize yaşamsal yapının nasıl düzenlendiğine ilişkin sorular hala güncelliğini korumakta ve yeni çalışmalara kaynak teşkil etmektedir (Costerton ve ark., 1999).

Bakteriler, canlı veya cansız yüzeylerde biyofilm oluşturduklarında birçok avantaja sahip olurlar. Biyofilm bakterileri vejetatif bakterilerden nem, ısı, pH değişiklikleri ve UV ışığına maruziyet gibi çevresel değişimlere göre daha dayanıklıdırlar. Ayrıca biyofilm besinleri konsantre eder ve atıkların kolayca atılımını sağlar. Biyofilmdeki bakterilerin kümeleşmesi, hücreler arası etkileşimleri kolaylaştırır. Biyofilm yapısı, bakteriyi konak savunma mekanizmasına karşı dirençli hale getirir. Çünkü EPS ile çevrelenmiş hücre kümelerinin oluşturduğu biyofilm yapısı büyük olduğu için fagositoz olamayacaktır ve böylece konağın bağışıklık sistemi tarafından yakalanamayacaktır. Klinik açıdan avantajı ise, biyofilm bakterileri antibiyotiklere karşı vejetatif bakterilere kıyasla binlerce kat daha dirençli olmalarıdır (Ceri ve ark., 1999; Wand ve ark., 2012). Öncelikle EPS matriksin, antimikrobiyal maddeleri absorbe ettiği veya difüzyonunu engellediği düşünülürken, artık çoğu antibiyotiğin biyofilm tabakasını kolayca penetre ettiği kanıtlanmıştır. Bu olayın en olası açıklaması biyofilmlerdeki bakterilerin fenotipik değişiklikler geçirmesi kendisini korumasına ve antibiyotiklere karşı dirençli olmasında rol oynamaktadır. Birçok antibiyotik hızla bölünen bakterileri hedeflediği için, biyofilmin derin tabakalarında bulunan, azalmış metabolik ve bölünme hızları sergileyen bakterilere antibiyotikler etkili olamamaktadır. Bu sebeple, antibiyotiğin etkisi ile biyofilmlerin yüzeyine yakın olan bakterilere mikrobisidal etki gösterirken biyofilmin derinlerinde kalan bakteriler ise hayatta kalarak tekrar gelişmeleri için ortam oluştururlar (Çiftçi ve ark., 2005).

2.1.7. Biyofilm ve Antibakteriyel Direnç İlişkisi

Günümüzde birçok infeksiyöz hastalık etkin antibiyotik terapileriyle tedavi edilebilmektedir. Ancak bu yaklaşım çoğunlukla bakteriyel biyofilmlerin söz konusu olduğu durumlarda etkin bir çözüm sağlayamamaktadır. Medikal aletlerin yüzeylerinde ve bu yüzeylerdeki ölü dokularda biyofilm gelişebilir. Aynı zamanda endokardit tablosunda

görüldüğü gibi canlı dokular üzerinde de biyofilm oluşabilir. Biyofilmler yavaş gelişirler ve infekte bireylerde ileri semptomlar üretirler. Biyofilm içerisindeki bakteriler, birtakım antijenler sentezleyerek antikor üretimini tetikleyebilirler; ancak antikorlar çoğu kez biyofilm içerisindeki bakterileri öldürmek için yeterli etkinliği gösterememektedirler. Bunun sonucunda, biyofilm çevresindeki dokuda immün kompleks hasarı meydana gelmektedir. Yeterli hücrel ve humoral bağışıklığı olan bireylerde dahi biyofilmler, immün sistemce alt edilemeyebilirler. Antibiyotik terapiler, biyofilmlerden açığa çıkan vejetatif hücrelerin semptomlarını tersine çevirebilirken, biyofilmlerin yok edilmesinde etkin olamamaktadır. Sürekli antibiyotik terapisine rağmen tekrarlayan semptomların görülmesi sonucunda cerrahi müdahaleyle biyofilmin vücuttan uzaklaştırılması gerekmektedir (Costerton ve ark., 1999).

Doğal ve endüstriyel çevrelerde gelişen biyofilmlerin bakteriyofaj, amipler ve çeşitli kimyasal biyosidlere karşı duyarlı oldukları bilinmektedir. Tıbbi alanda ise, hareketsiz bakteriyel hücreler konak savunma mekanizmalarına karşı koyabilmekte ve vejetatif formda olan bakterilere oranla, antibiyotiklere çok daha fazla direnç göstermektedirler (Amorena ve ark., 1999).

Biyofilmlerin bu dirence multiple (çoklu) mekanizmalar aracılığıyla sahip oldukları düşünülmektedir. Antimikrobiyal ajanın biyofilmin tüm tabakaları boyunca penetrasyon göstermemesi. Biyofilm matriksi içerisindeki polimerik maddelerin antibiyotik diffüzyonunu güçleştirdiği bilinmektedir. Bu durum yeterli antibiyotik konsantrasyonuna asla ulaşmaması anlamına gelmektedir. Biyofilm içerisindeki hücrelerden en azından bir kısmı besin yetersizliği yaşamakta ve bu nedenle yavaş büyüme fazına girmek zorunda kalmaktadırlar. Yavaş büyüyen veya büyüme göstermeyen hücreler birçok antimikrobiyal maddeye karşı duyarlı değildirler ve birçoğu hayatta kalabilmektedirler. Biyofilm içerisindeki bakteriler arasında direnç genlerinin değişimi söz konusudur (Çiftçi ve ark., 2005).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Bakteri Materyali

Tez çalışmasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kültür Koleksiyonu'nda bulunan ve çeşitli klinik vakalardan izole edilmiş olan 48 adet *Pseudomonas aeruginosa* izolatu incelendi.

İzolatların canlandırılması %7 koyun kanı içeren Triptik Soy Agar (TSA)'da yapıldı. Bu amaçla gliserinli Triptik Soy Broth (TSB) içerisinde bulunan bakterilerden 0,1 ml alınarak, %7 koyun kanı içeren TSA'ya inokule edildi. Besiyerleri 37°C'de 24 saat aerobik koşullarda inkübe edildi ve inkübasyon süresi sonunda üreyen koloniler PCR ile tanımlanarak ve çalışmanın diğer aşamalarında kullanılmak üzere TSA'da subkültüre edildi.

3.2. İzolatların PCR İle İdentifikasyonları

Canlandırılan izolatlardan DNA ekstraksiyonu yapılması için izolatlar TSA'ya ekilerek, 37°C'de 24 saat aerobik koşullarda inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda izolatlardan DNA ekstraksiyonu gerçekleştirildi.

DNA ekstraksiyonu kaynatma metodu ile yapıldı. Bu amaçla TSA'da üreyen saf kolonilerden bir koloni alınarak, 500 µl steril distile su içerisinde süspanse edildi. Hazırlanan süspanسیونlar 100°C'ye ayarlanmış su banyosunda 10 dakika kaynatıldı ve ardından 10.000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı DNaz-RNaz ari tüplere alınarak, Nano-Drop spektrofotometre ile DNA konsantrasyonları belirlendi. Ekstrakte edilen DNA'ların konsantrasyonları 10 mg/ml olacak şekilde steril distile su ile ayarlandı. Elde edilen DNA'lar PCR çalışmalarında hedef DNA olarak kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

İzolatların identifikasyonları Spilker ve ark. (2004) tarafından bildirilen yöntemin optimizasyonu ile gerçekleştirildi. PCR'da PA-SS oligonükleotid primerleri kullanıldı (Tablo 1). PCR reaksiyonu karışımı toplam 25 µl olacak şekilde DNaz/RNaz'dan ari distile su, 1XPCR buffer, 2 mM MgCl₂, 0.25 µM dNTP, her bir primerden (PA-SS) 0.40 µM, 1U Taq polimeraz enzimi ve 2 µl kalıp DNA eklenerek oluşturuldu. Amplifikasyon koşulları

olarak thermalcycler cihazı 95°C’de 2 dakika başlangıç denatürasyonu, 94°C’de 20 s denatürasyon, 58°C’de 20 s primer bağlanması, 72°C’de 40 s uzama aşaması içeren toplam 25 döngü ve son uzama aşaması 72°C’de 5 dk olacak şekilde ayarlandı.

Amplikonların görüntülenmesi amacıyla 1X TBE buffer içerisinde %1,5’luk agaroz ve etidium bromid (2 µg/ml) içeren jel hazırlandı. Amplifikasyon ürünleri %1,5’luk agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntüledi. Görüntüleme sonrasında 956 bp’lik bant görülmesi *P. aeruginosa* için pozitif olarak değerlendirildi.

3.3. Antibiyotik Direnç Profilinin Belirlenmesi

İzolatların 6 antibiyotik grubuna ait 8 antibiyotik (Florokinolon: enrofloksasin ve siprofloksasin; Betalaktam: seftriakson ve amoksisilin + klavulanik asit; Karbapenem: meropenem; Polimiksin: kolistin; Aminoglikozit: gentamisin; Macrolide: azitromisin) için duyarlılıklarının belirlenmesinde Kirby-Bauer Disk Difüzyon metodu kullanıldı (CLSI, 2018). Bu amaçla %0,9’luk fizyolojik tuzlu su (FTS) ve Mueller-Hinton Agar (MHA) kullanıldı. TSA’da saf olarak üreyen izolatlardan FTS içerisinde 0,5 McFarland yoğunluğunda süspansiyonlar hazırlandı. Süspansiyonlardan 0.1 ml alındı ve MHA yüzeyine yayma ekimle inokülasyonları gerçekleştirildi. Besiyeri üzerine azitromisin (30 µg), gentamisin (10 µg), kolistin (10 µg), meropenem (10 µg), siprofloksasin (5 µg), amoksisilin+klavulanik asit (20+10 µg), seftriakson (30 µg) ve enrofloksasin (5 µg) içeren diskler yerleştirildi ve 37°C’de 24 saat aerobik koşullarda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda inhibisyon zon çapları ölçülerek, EUCAST (2018) ve CLSI (2018)’de bildirilen değerlere göre izolatların antibiyotik duyarlılıkları değerlendirildi.

3.4. Biyofilm Üretiminin *In Vitro* Olarak Belirlenmesi

İzolatların biyofilm oluşturma durumları *in vitro* olarak Kongo Red Agar (CRA), Modifiye Tüp Aderans (Christensen) ve Mikroplak yöntemleri ile araştırıldı.

3.4.1. CRA Yöntemi

CRA yöntemi için 1 000 mL distile su içerisinde 10 gram agar, 50 gram glikoz, 37 gram Brain-Heart Infusion Broth, 0,8 gram Kongo red boyası olacak şekilde Kongo Red Agar hazırlandı. TSA’da saf olarak üreyen kolonilerden tek koloni alınarak, CRA’ya

ekimleri yapıldı. Besiyerleri 37°C'de 24-48 saat aerobik koşullarda inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda kolonilerde oluşan renk değişimlerine göre değerlendirilme yapıldı. Siyah-gri renk oluşumu görülen izolatlar biyofilm üretimi yönünden pozitif, pembe-kırmızı renkli koloniler ise negatif olarak değerlendirildi (Kart ve ark., 2011; Atshan ve ark., 2012).

3.4.2. Modifiye Tüp Aderans (Christensen) Yöntemi

Modifiye tüp aderans (Christensen) yöntemi ile biyofilm varlığı Christensen ve ark. (1985) tarafından belirtilen yöntemle yapıldı. Bu amaçla %3 glikoz içeren TSB hazırlandı. Besiyerlerinin kontaminasyon kontrolleri yapıldıktan sonra TSA'da saf ve taze olarak üreyen izolatlar, tek koloni olacak şekilde sıvı besiyerlerine inoküle edildi. Besiyerlerinin 37°C'de 24 saatlik aerobik inkübasyonu sonrasında tüp içerikleri boşaltılarak fosfatla tamponlanmış tuz solüsyonu (PBS) ile yıkandı. Yıkama sonrasında her bir tüpe 10'ar ml safranin eklenerek 5 dk süreyle tüpün iç çeperiyle karışması sağlandı. Tüp içerisindeki boya dökülerek tüpler ters çevrildi ve kurutma kâğıdının üzerinde bir gece kurumaya bırakıldı. Tüplerin iç çeperindeki rengin koyuluğu ve kalınlığına göre izolatların biyofilm oluşturma kapasiteleri çok güçlü (+++), güçlü (++) ve zayıf (+) olarak değerlendirildi. Renk değişiminin olmaması da biyofilm negatif olarak değerlendirildi. Ayrıca; besiyerinin havayla temas ettiği kısımda boya kalıntısı olabildiği için bu durum da negatif olarak değerlendirildi.

3.4.3. Mikroplak Yöntemi

Spektrofotometrik mikroplak yöntemi ile biyofilm varlığı Stepanović ve ark. (2000)'nın bildirdiği yöntem ile incelendi. Yöntemde 96 kuyucuklu düz tabanlı steril mikroplaklar kullanıldı. Christensen metodu için hazırlanmış olan bakteri süspansiyonu içeren besiyerlerinden steril koşullarda her bir izolat için üç kuyucuk olmak üzere 200'er µl inoküle edilerek, 37°C'de 24 saat aerobik koşullarda inkübe edildi. Negatif kontrol olarak steril PBS kullanıldı. İnkübasyon sonunda mikroplak ters çevrilerek kuyucuklarda bulunan içerik boşaltıldı. Her bir kuyucuk PBS ile yıkandıktan sonra biyofilmin fizyasyonunu sağlamak amacıyla 200'er µl metanol eklendi ve 1 dk bekledi. Sonrasında içerik dökülerek uzaklaştırıldı. Her bir kuyucuğa 200'er µl kristal viyoleto eklenerek, 5 dk oda sıcaklığında

inkübe edildi. Kuyucuklar boşaltılarak, biyofilm yapısına katılmayan diğer hücre veya maddelerin uzaklaştırılması amacıyla steril PBS ile yıkandı. Mikroplak oda ısısında 30 dk kurutularak, üzerine %96'lık etanol eklendi ve boyanın çözünmesi sağlandı. Mikroplak içeriğinin 500 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçümleri yapıldı. Her bir kuyucuk için optik dansite (OD) değeri belirlendi. Negatif kontrol olan kuyucukların ortalaması ile her bir izolata ait üç kuyucuğun ortalamaları alınarak biyofilm oluşumunun varlığı saptandı.

3.5. Biyofilm ve Antibiyotik Direnç ile İlişkili Genlerin Araştırılması

İzolatlarda biyofilm ve biyofilm ile ilişkili antibiyotik direnç genleri PCR ile araştırıldı. Bu kapsamda biyofilm üretiminden sorumlu olan *PelA*, quorum sensing genleri olan *lasI*, *lasR*, *rhII*, *rhIR* ile biyofilme bağlı antibiyotik direncinden sorumlu olan *PA0756*, *PA0757*, *PA2070* ve *PA5033* gen varlıkları araştırıldı.

PCR'da hedef DNA olarak kaynatma metodu ile hazırlanarak, -20°C'de saklanan hedef DNA'lar kullanıldı.

Çalışmada kullanılan oligonükleotid primerlerin baz dizilimleri Tablo 1'de sunuldu.

3.5.1. *pelA* Geni Varlığının Araştırılması

Biyofilm üretiminden sorumlu olduğu bildirilen *PelA* geninin belirlenmesi Colvin ve ark. (2011)'nin bildirdiği yöntemin optimizasyonu ile PCR gerçekleştirildi. Bu amaçla DNaz/RNaz içermeyen distile su, 1XPCR buffer, 3 mM MgCl₂, 0,2 µM dNTP, her bir primerden 0,4 µM, 1U Taq polimeraz enzimi ve 2 µl kalıp DNA içeren toplam 25 µl PCR reaksiyonu karışımı oluşturuldu. Amplifikasyon koşulları olarak thermalcycler cihazı 94°C'de 2 dk başlangıç denatürasyonu, 95°C'de 15 s denatürasyon, 45°C'de 1 dk primer bağlanması, 72°C'de 45 s uzama aşaması içeren toplam 34 döngü ve son uzama aşaması 72°C'de 7 dakika olacak şekilde ayarlandı.

Amplikonların görüntülenmesi amacıyla 1X TBE buffer içerisinde %2,5'luk agaroz içeren jel hazırlandı. Amplifikasyon ürünleri etidium bromid (2 µg/ml) içeren %2,5'luk agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntüledi.

Görüntüleme sonrasında 118 bp'lik bant görülmesi *PelA* gen varlığı için pozitif olarak değerlendirildi.

Tablo 1. Çalışmada PCR için kullanılan oligonükleotid primerler

Primer	Dizilim	Amplikon büyüklüğü (bp)	Kaynak	
<i>lasI</i>	F CGTGCTCAAGTGTTCAAGG	295	Lima ve ark. (2018)	
	R TACAGTCGGAAAAGCCCAG			
<i>lasR</i>	F AAGTGGAAAATTGGAGTGGAG	130		
	R GTAGTTGCCGACGACGATGAAG			
<i>rhlI</i>	F TTCATCCTCCTTTAGTCTTCCC	155		
	R TTCCAGCGATTTCAGAGAGC			
<i>rhlR</i>	F TGCATTTTATCGATCAGGGC	133		
	R CACTTCCTTTTCCAGGACG			
<i>PelA</i>	F CCTTCAGCCATCCGTTCTTCT	118		Colvin ve ark. (2011)
	R TCGCGTACGAAGTCGACCTT			
<i>PA0756</i>	F TGCCAAGGCTGTAGGTGAAC	1130		
	R CGAGCTGCGGATGATCTTCCA			
<i>PA0757</i>	F TTCCCGCCGCCGACCGCGAGC	1011		Manohar ve ark. (2018)
	R GCCGACAAAGTCCAACAGG			
<i>PA2070</i>	F ATGGCGCTCGTCGTGCTTCT	1355		
	R GCCGGTCACCTCGATTGCTT			
<i>PA5033</i>	F ACCATCACCGCTGCCTATCC	1320		
	R ACCACGTTGCCGAAGCTGT			
<i>PA-SS</i>	F GGGGGATCTTCGGACCTCA	956	Spilker ve ark. (2004)	
	R TCCTTAGAGTGCCCCACCCG			
ERIC2	AAGTAAGTGAAGTGGGGTGAGCG	değişken	Versalovic ve ark. (1991)	

3.5.2. *lasI*, *lasR*, *rhlI* ve *rhlR* Genlerinin Varlığının Araştırılması

İzolatlarda quorum sensing genleri olan *lasI*, *lasR*, *rhlI*, *rhlR* gen varlıkları Lima ve ark. (2018)'nin bildirdiği yöntemin optimizasyonu ile araştırıldı.

Her bir gen için ayrı ayrı olmak üzere toplam 25 µl olacak şekilde PCR reaksiyonu karışımı hazırlandı. Karışım DNaz/RNaz'dan arı distile su, 1X (NH₄)₂SO₄ PCR buffer, 3 mM MgCl₂, 0,2 µM dNTP, her bir primerden 0,2 µM, 1U Taq Polimeraz enzimi ve 2 µl kalıp DNA eklenerek oluşturuldu. Amplifikasyon koşulları olarak thermalcycler cihazı 94°C'de 2 dk başlangıç denatürasyon, 94°C'de 1 dk denatürasyon, 52°C'de 1 dk primer bağlanması, 72°C'de 90 s uzama aşaması içeren toplam 30 döngü ve son uzama aşaması olarak 72°C'de 7 dakika olacak şekilde ayarlandı.

Amplikonların görüntülenmesi amacıyla 1X TBE buffer içerisinde %2'lik agaroz içeren jel hazırlandı. Amplifikasyon ürünleri etidium bromid (2 µg/ml) içeren %2'lik

agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntüledi. Görüntüleme sonrasında 295, 130, 155, 133 bp'lik bant görülmesi sırasıyla *lasI*, *lasR*, *rhlI*, *rhlR* gen varlıkları için pozitif olarak değerlendirildi.

3.5.3. PA0756, PA0757, PA2070 ve PA5033 Genlerinin Varlıkların Araştırılması

İzolatlarda biyofilme bağlı antibiyotik direncinden sorumlu olan *PA0756*, *PA0757*, *PA2070* ve *PA5033* gen varlıkları Manohar ve ark. (2018)'nın bildirdiği yöntemin optimizasyonu ile araştırıldı. Her bir gen için ayrı ayrı olmak üzere toplam 25 µl olacak şekilde PCR reaksiyonu karışımı hazırlandı. Karışım DNaz/RNaz'dan arı distile su, 1X PCR buffer, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 µM dNTP, her bir primerden 0.2 µM, 1U Taq Polimeraz enzimi ve 2 µl kalıp DNA eklenerek oluşturuldu. Amplifikasyon koşulları olarak thermalcycler cihazı 94°C'de 2 dk başlangıç denatürasyon, 94°C'de 30 s denatürasyon, 58°C'de 45 s primer bağlanması, 72°C'de 90 s uzama aşaması içeren toplam 35 döngü ve son uzama aşaması 72°C'de 7 dakika olacak şekilde ayarlandı.

Amplikonların görüntülenmesi amacıyla 1X TBE buffer içerisinde %1'lik agaroz içeren jel hazırlandı. Amplifikasyon ürünleri etidium bromid (2 µg/ml) içeren %1'lik agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntüledi. Görüntüleme sonrasında 1130, 1011, 1355, 1320 bp'lik bant görülmesi sırasıyla *PA0756*, *PA0757*, *PA2070* ve *PA5033* gen varlıkları için pozitif olarak değerlendirildi.

3.6. Genotiplendirme

Her üç yöntemle de biyofilm pozitif olduğu belirlenen izolatların filogenetik yakınlıklarının belirlenmesi amacıyla ERIC-2 primeri kullanılarak Versalovic ve ark. (1991)'nin bildirdiği yöntemle göre RADP-PCR gerçekleştirildi.

RAPD-PCR için toplam 25 µl olmak üzere DNaz/RNaz'dan arı distile su, 1X PCR buffer, 2,5 mM MgCl₂, 0.2 µM dNTP, 0.25 µM primer, 1U Taq Polimeraz enzimi ve 2 µl kalıp DNA eklenerek PCR karışımı oluşturuldu. Amplifikasyon koşulları olarak thermalcycler cihazı 94°C'de 5 dk başlangıç denatürasyonu, 94°C'de 1 dk denatürasyon, 36°C'de 1 dk primer bağlanması, 72°C'de 3 dk uzama döngüsünden toplam 40 döngü ve son uzama aşaması 72°C'de 7 dakika olacak şekilde ayarlandı.

Amplikonların görüntülenmesi amacıyla 1X TBE buffer içerisinde %1,5'luk agaroz içeren jel hazırlandı. Amplifikasyon ürünleri etidium bromid (2 µg/ml) içeren %1,5'luk agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntülendi. Görüntüleme sonrasında oluşan bantlar kaydedildi. Oluşan bantların UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages) metodunu kullanan görüntü analiz programı ile değerlendirmesi yapıldı ve dendrogramları çizildi.

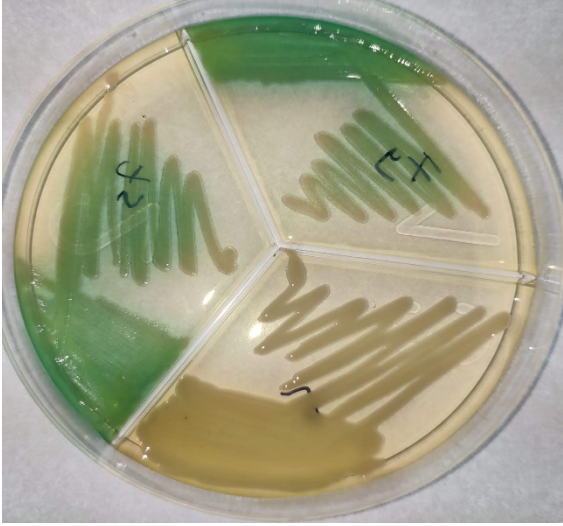


4. BULGULAR

4.1. Bakteri Materyali

Tez çalışmasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kültür Koleksiyonu'nda bulunan ve çeşitli klinik vakalardan izole edilmiş olan 48 adet *Pseudomonas aeruginosa* izolatu incelendi.

İzolatlar %7 koyun kanı içeren TSA'da canlandırıldı. İzolatların hepsi kanlı agarda saf olarak üredi ve çalışmanın diğer aşamalarında kullanılmak üzere TSA'da subkültüre edildi (Şekil 1).



Şekil 1. İzolatların canlandırılması sonucunda TSA'da üreyen koloniler

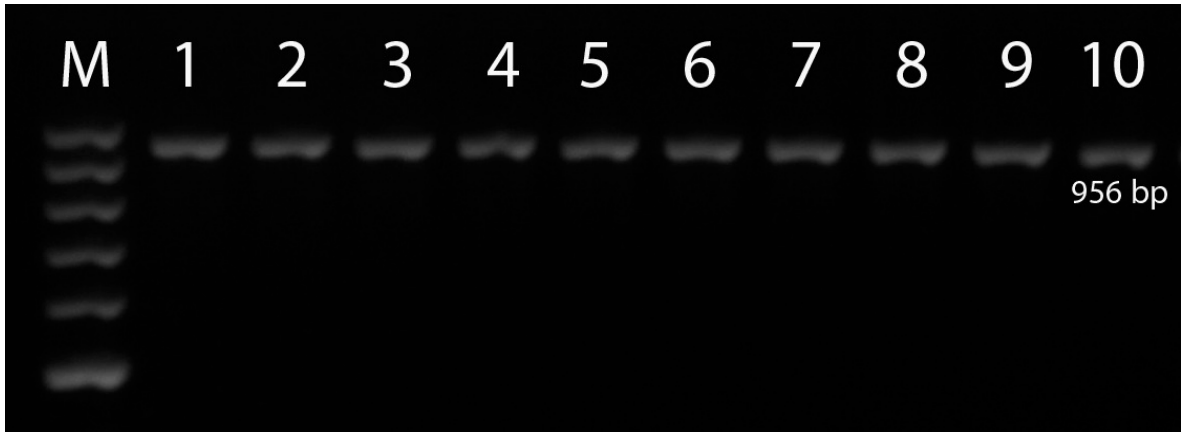
4.2. İzolatların PCR İle İdentifikasyonları

TSA'da üretilen izolatların DNA ekstraksiyonları kaynatma metoduyla yapılarak, nano-drop spektrofotometre ile konsantrasyon ölçümleri yapıldı. Ekstraksiyon sonrası ölçülen DNA konsantrasyonları Tablo 2'de sunuldu. Tüm DNA'ların konsantrasyonları 10 mg/ml olacak şekilde steril distile su ile eşitlendi.

Tablo 2. Çalışmada kullanılan izolatların ekstraksiyon sonrası ölçülen DNA konsantrasyonları

İzolat	DNA konsantrasyonu (mg/ml)	İzolat	DNA konsantrasyonu (mg/ml)
1	656	25	498,1
2	213,6	26	345,2
3	334,6	27	536,4
4	234	28	263,9
5	576,9	29	260,9
6	130	30	416
7	207,5	31	155,2
8	482	32	483,2
9	484	33	380
10	1131,7	34	313,1
11	318,5	35	233,5
12	313,4	36	336,4
13	270,6	37	447,8
14	168,8	38	887,3
15	231,7	39	955,1
16	253,5	40	390,8
17	238,9	41	174,7
18	115,9	42	47,1
19	61,8	43	237,3
20	367,7	44	272,1
21	353,6	45	1040,8
22	126,5	46	428,9
23	564,5	47	249,8
24	254,6	48	117,8

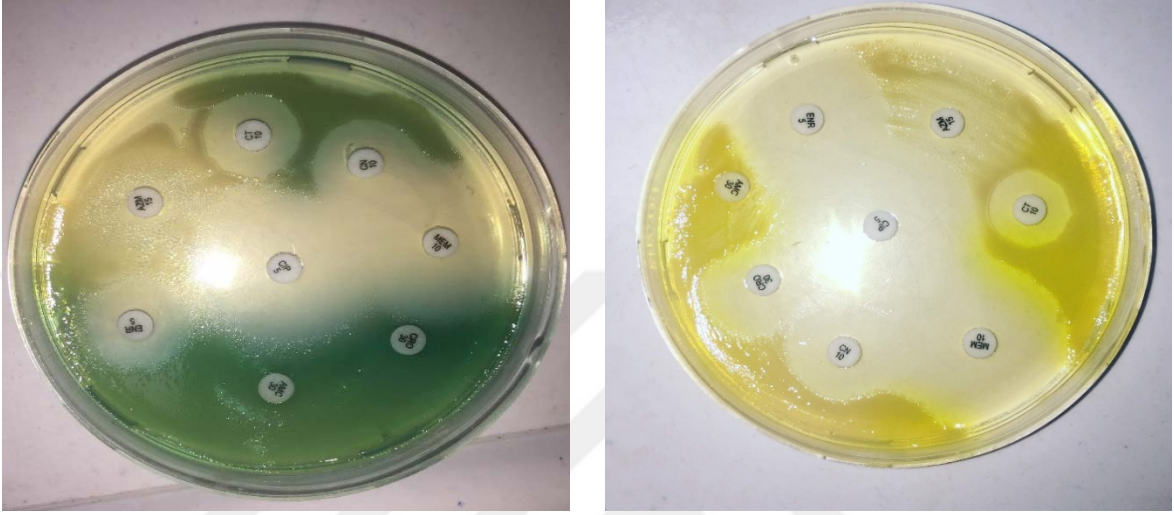
PCR ile identifikasyon sonucunda 48 izolatın da 956 bp’de bant oluşturduğu görüldü ve izolatlar *P. aeruginosa* olarak identifiye edildi (Şekil 2).



Şekil 2. PA-AS spesifik PCR sonucu görüntülenen bantlar. 1-10: Pozitif örnekler;M: marker (100-1000 bp)

4.3. Antibiyotik Direnç Profilinin Belirlenmesi

P. aeruginosa izolatlarına yapılan Kirby-Bauer Disk Difüzyon Metodu ile antibiyogram (Şekil 3) sonucunda oluşan inhibisyon zon çapları değerlendirildi.



Şekil 3. Kirby-Bauer Disk Difüzyon Metodu sonucunda MHA'da oluşan inhibisyon zonları

İzolatların enrofloksasine %16,67, seftriaksona %60,42, amoksisilin + klavulanik asite %100, siprofloksasine %10,42, meropeneme %29,17, kolistine %4,17, gentamisine %12,5 ve azitromisine karşı %97,9 oranında dirençli olduğu belirlendi (Tablo 3 ve 4).

Çoklu antibiyotik dirençliliklerine göre incelendiğinde, 22 izolatın (%45,83) 3'ten fazla antibiyotik grubuna direnç gösterdiği ve çoklu dirençli olduğu belirlendi (Tablo 5).

Tablo 3. İzolatların antibiyotiklere karşı dirençlilik/duyarlılık profilleri

	Antibiyotik							
	ATM	GEN	C	MRP	CIP	AMC	CTX	ENR
R (n)	47	6	2	14	5	48	29	8
I (n)	0	0	0	0	0	0	7	8
S (n)	1	42	46	34	43	0	12	32

*S: duyarlı, I: orta derecede dirençli, R: dirençli, ATM: azitromisin, GEN: gentamisin, C: kolistin, MRP: meropenem, CIP: siprofloksasin, AMC: amoksisilin/klavulanik Asit, CTX: seftriakson, ENR: enrofloksasin

Tablo 4. İzolatların Kirby-Bauer Disk Difüzyon Metoduna göre dirençlilik/duyarlılık sonuçları

İzolat No	ATM	GEN	C	MRP	CIP	AMC	CTX	ENR
1	R	S	S	S	S	R	I	S
2	R	R	S	S	S	R	I	S
3	R	S	S	S	S	R	R	S
4	R	S	S	S	S	R	S	S
5	R	S	S	S	S	R	R	I
6	R	S	S	S	S	R	R	I
7	R	S	S	S	S	R	S	S
8	R	S	S	S	S	R	R	S
9	R	S	S	S	S	R	R	S
10	R	S	S	S	S	R	I	S
11	R	S	S	S	S	R	R	S
12	R	S	S	S	S	R	S	S
13	R	S	S	S	S	R	S	S
14	R	S	S	R	S	R	R	S
15	R	S	S	S	R	R	R	R
16	R	S	S	S	S	R	R	R
17	R	S	S	R	S	R	R	S
18	R	S	S	S	S	R	R	S
19	R	S	S	R	S	R	I	S
20	R	R	S	S	S	R	R	S
21	R	S	S	R	S	R	R	S
22	R	R	S	S	S	R	R	S
23	R	S	S	S	S	R	R	S
24	R	S	S	S	R	R	I	R
25	R	S	S	S	S	R	R	S
26	R	S	S	S	S	R	S	I
27	R	S	S	S	S	R	R	S
28	R	S	S	S	S	R	R	I
29	R	S	S	S	S	R	S	S
30	R	R	S	S	S	R	S	I
31	R	R	S	S	S	R	S	I
32	S	S	R	S	S	R	R	S
33	R	S	S	S	S	R	S	S
34	R	S	S	S	S	R	S	S
35	R	S	S	R	S	R	S	S
36	R	S	S	S	S	R	S	S
37	R	S	S	R	R	R	R	R
38	R	S	S	R	S	R	R	S
39	R	S	R	R	S	R	R	S
40	R	S	S	S	S	R	R	I
41	R	S	S	S	S	R	R	S
42	R	S	S	R	S	R	R	R
43	R	S	S	R	S	R	R	R
44	R	S	S	S	S	R	R	I
45	R	S	S	R	S	R	I	S
46	R	S	S	R	R	R	R	R
47	R	R	S	R	S	R	R	S
48	R	S	S	R	R	R	I	R

*S: duyarlı, I: orta derecede dirençli, R: dirençli, ATM: azitromisin, GEN: gentamisin, C: kolistin, MRP: meropenem, CIP: siprofloksasin, AMC: amoksisilin/klavulanik Asit, CTX: seftriakson, ENR: enrofloksasin

Tablo 5. İzolatların çoklu antibiyotik direnç profilleri

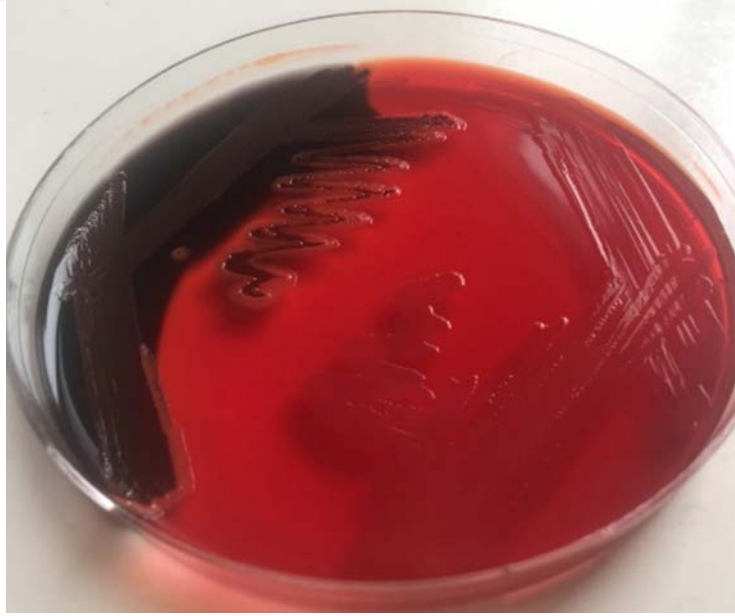
Direnç saptanan antibiyotik (n)	<i>P. aeruginosa</i>	
	n	%
4	7	14,58
3	15	31,25
2	26	54,17

4.4. Biyofilm Üretiminin *In Vitro* Olarak Belirlenmesi

İzolatların biyofilm oluşturma durumları CRA, Modifiye Tüp Aderans (Christensen) ve Mikroplak yöntemleri ile araştırıldı.

4.4.1. CRA Yöntemi

Biyofilm aktivitelerinin araştırılması amacıyla TSA'da saf olarak üreyen kolonilerden alınarak CRA'ya tek koloni ekimleri yapıldı ve 37°C'de 24-48 saat aerobik koşullarda inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda 40 izolatın (%83,33) CRA metoduna göre biyofilm aktivitesine sahip olduğu, 8 izolatın (%16,67) ise negatif olduğu belirlendi (Şekil 4, Tablo 6).



Şekil 4. CRA Metoduna göre biyofilm aktivitesine sahip olan (siyah renkli) ve biyofilm üretmeyen (pembe renkli) koloniler

Tablo 6. İzolatlarda biyofilm varlığının belirlenmesi için uygulanan CRA sonuçları

İzolat No	CRA'da Biyofilm Aktivitesi	İzolat No	CRA'da Biyofilm Aktivitesi
1	+	25	-
2	+	26	+
3	-	27	+
4	-	28	+
5	+	29	+
6	+	30	+
7	+	31	+
8	+	32	+
9	+	33	+
10	+	34	+
11	+	35	+
12	-	36	+
13	+	37	+
14	-	38	+
15	+	39	+
16	+	40	+
17	+	41	+
18	+	42	+
19	+	43	-
20	+	44	+
21	+	45	+
22	+	46	+
23	+	47	+
24	-	48	-

* -: negatif sonuç; +:pozitif sonuç

4.4.2. Modifiye Tüp Aderans (Christensen) Yöntemi

TSA'da saf ve taze olarak üreyen izolatların tek koloni olarak sıvı besiyerlerine inoküle edilmeleri ve 37⁰C'de 24 saatlik aerobik inkübasyonun sonunda uygulanan boyama sonucunda 25 izolatın çok güçlü, 14 izolatın güçlü, 6 izolatın zayıf derecede biyofilm üretme yeteneğine sahip olduğu ve 3 izolatın ise biyofilm üretme yeteneğinin olmadığı belirlendi (Şekil 5, Tablo 7).



Şekil 5. Christensen Metoduna göre biyofilm aktivitesi sonuçları. +++ : çok güçlü pozitif; ++: güçlü pozitif; +: zayıf pozitif; -: negatif

Tablo 7. Christensen Metoduna göre biyofilm aktivitesi sonuçları

İzolat No	Biyofilm aktivitesi	İzolat No	Biyofilm aktivitesi
1	++	25	+++
2	++	26	+++
3	+	27	+++
4	-	28	+++
5	++	29	+++
6	++	30	+++
7	+++	31	-
8	+	32	+++
9	++	33	++
10	++	34	++
11	-	35	+++
12	+++	36	++
13	+++	37	+++
14	++	38	+++
15	+	39	+++
16	+++	40	+++
17	+++	41	+++
18	++	42	+++
19	+	43	+++
20	+++	44	+++
21	++	45	+
22	+	46	++
23	+++	47	+++
24	+++	48	++

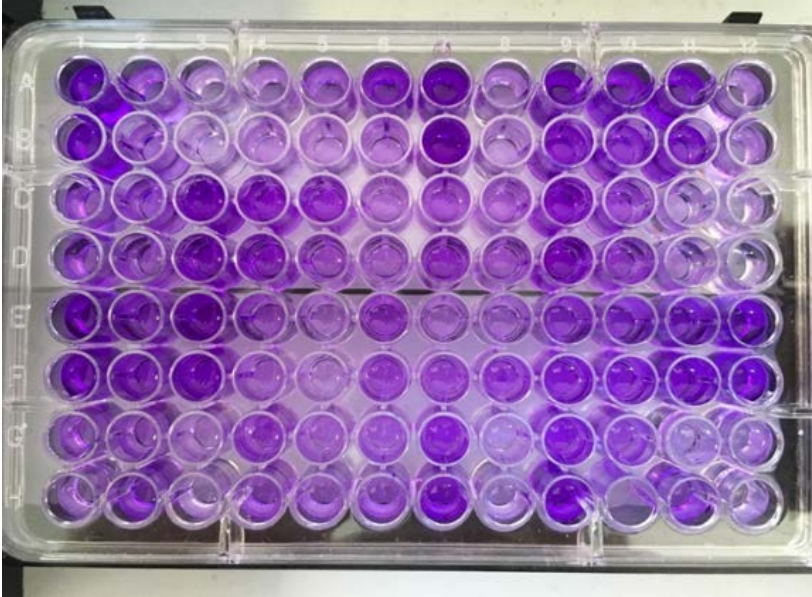
+++ : çok güçlü pozitif; ++: güçlü pozitif; +: zayıf pozitif; -: negatif.

4.4.3. Mikroplak Yöntemi

Kullanılan 96 kuyucuklu steril mikroplağa izolatların inokülasyonu ve 37°C’de 24 saat aerobik koşullarda inkübasyonundan sonra 500 nm’de optik dansiteleri ölçüldü.

Hesaplama yapılırken izolatların aritmetik ortalamaları alındı ve standart sapması (SS) hesaplandı. Hesaplama sonucunda 500 nm’deki ölçümlerin standart sapması 0,125 olarak bulundu. Negatif kontrolün OD değeri 0,3 olarak ölçüldü. Negatif kontrole 2 SS eklenerek eşik değeri 0,550 olarak hesaplandı. Eşik değerinin üzerindeki OD değerleri pozitif olarak değerlendirildi (Şekil 6).

Bu yöntem ile 500 nm’de yapılan ölçümlere göre hesaplandığında 31 izolatın pozitif, 17 izolatın ise negatif olduğu belirlendi (Tablo 8).



Şekil 6. Mikroplak yöntemine göre ölçümleri yapılan mikroplak görüntüsü

Tablo 8. Mikroplak metoduna göre biyofilm aktivitesi sonuçları

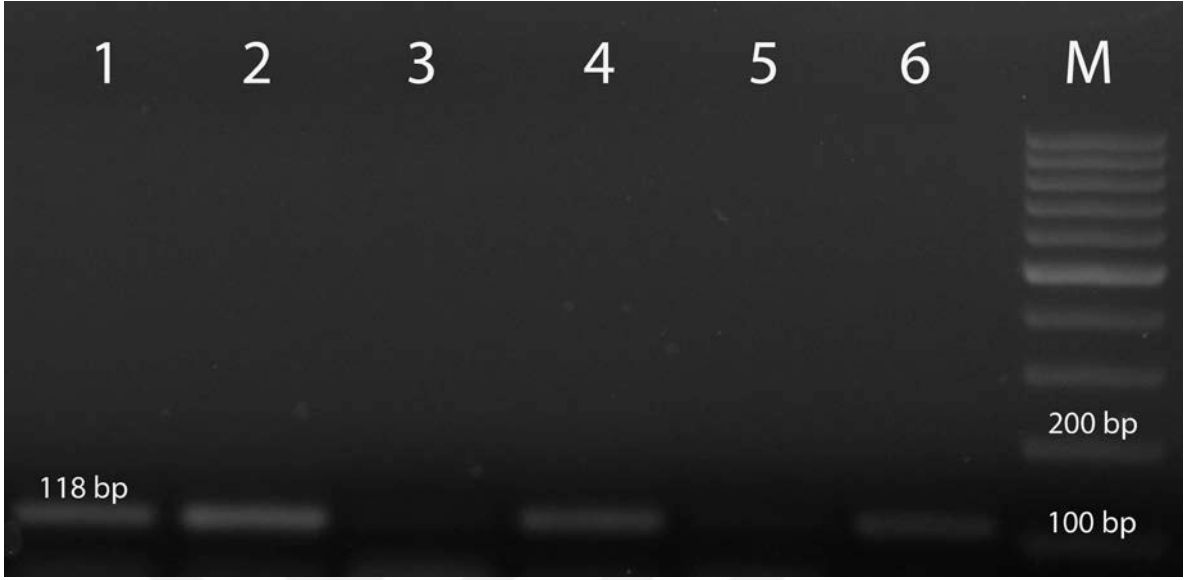
İzolat No	500 nm'de Ortalama OD Değerleri	Değerlendirme Sonucu	İzolat No	500 nm'de Ortalama OD Değerleri	Değerlendirme Sonucu
1	2,694	Pozitif	25	3,699	Pozitif
2	0,723	Pozitif	26	1,047	Pozitif
3	2,742	Pozitif	27	0,796	Pozitif
4	0,508	Negatif	28	1,338	Pozitif
5	0,609	Pozitif	29	0,285	Negatif
6	0,775	Pozitif	30	0,514	Negatif
7	1,403	Pozitif	31	0,706	Pozitif
8	0,806	Pozitif	32	0,251	Negatif
9	0,236	Negatif	33	2,230	Pozitif
10	3,058	Pozitif	34	2,249	Pozitif
11	3,392	Pozitif	35	1,099	Pozitif
12	0,292	Negatif	36	1,570	Pozitif
13	0,402	Negatif	37	1,356	Pozitif
14	1,718	Pozitif	38	0,897	Pozitif
15	0,582	Pozitif	39	1,159	Pozitif
16	0,833	Pozitif	40	0,465	Negatif
17	0,484	Negatif	41	1,691	Pozitif
18	0,979	Pozitif	42	0,374	Negatif
19	0,315	Negatif	43	1,508	Negatif
20	0,464	Negatif	44	0,513	Negatif
21	0,986	Pozitif	45	0,339	Negatif
22	0,471	Negatif	46	0,166	Negatif
23	0,919	Pozitif	47	1,350	Pozitif
24	0,561	Pozitif	48	1,188	Pozitif

4.5. Biyofilm ve Antibiyotik Direnç ile İlişkili Genlerin Araştırılması

İzolatlarda biyofilm ve biyofilm ile ilişkili antibiyotik direnç genleri PCR ile araştırıldı. Bu kapsamda biyofilm üretiminden sorumlu olan *PelA*, quorum sensing genleri olan *lasI*, *lasR*, *rhII*, *rhIR* ile biyofilme bağlı antibiyotik direncinden sorumlu olan *PA0756*, *PA0757*, *PA2070* ve *PA5033* gen varlıkları araştırıldı.

4.5.1. *pelA* Geni Varlığının Araştırılması

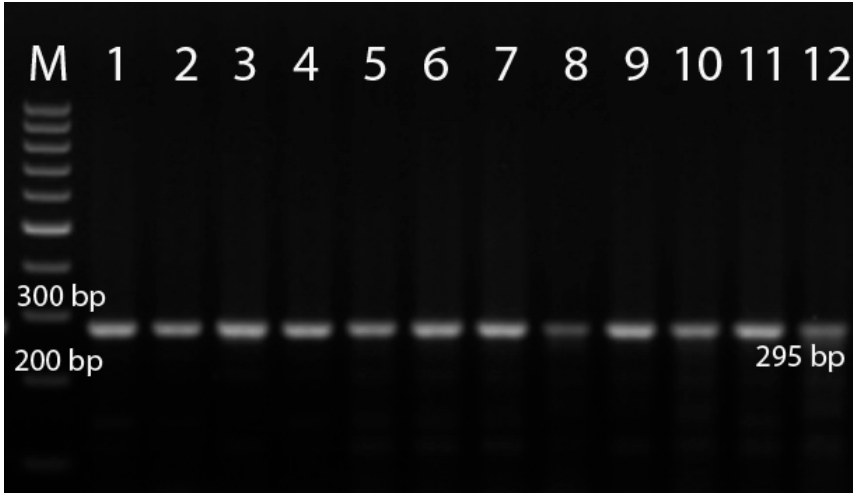
Optimize edilen PCR protokolüne göre izolatların tümünde 118 bp'de bant oluşumu görüldü ve izolatlarının tümünün *PelA* genine sahip olduğu belirlendi (Şekil 7).



Şekil 7. *PelA* spesifik PCR sonucu görüntülenen bantlar. 1-6: Pozitif örnekler; M: marker (100-1000 bp)

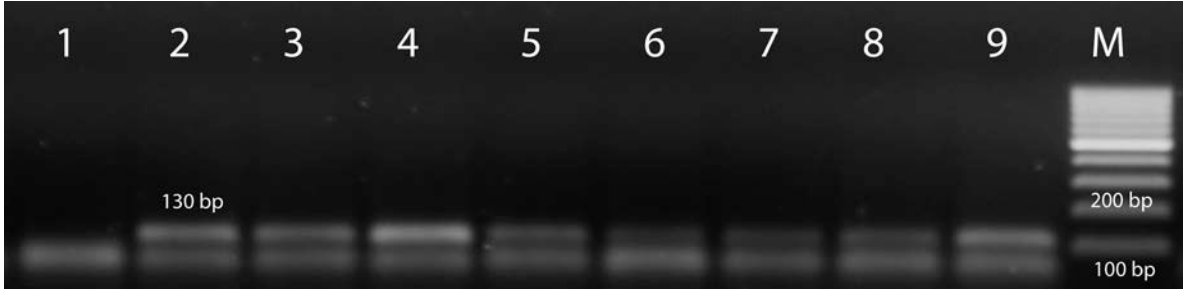
4.5.2. *lasI*, *lasR*, *rhlI* ve *rhlR* Genlerinin Varlığının Araştırılması

Optimize edilen PCR sonucunda *lasI* primeri ile tüm izolatların 295 bp’de bant oluşturduğu belirlendi. Tüm izolatların *lasI* genine sahip olduğu görüldü (Şekil 8).



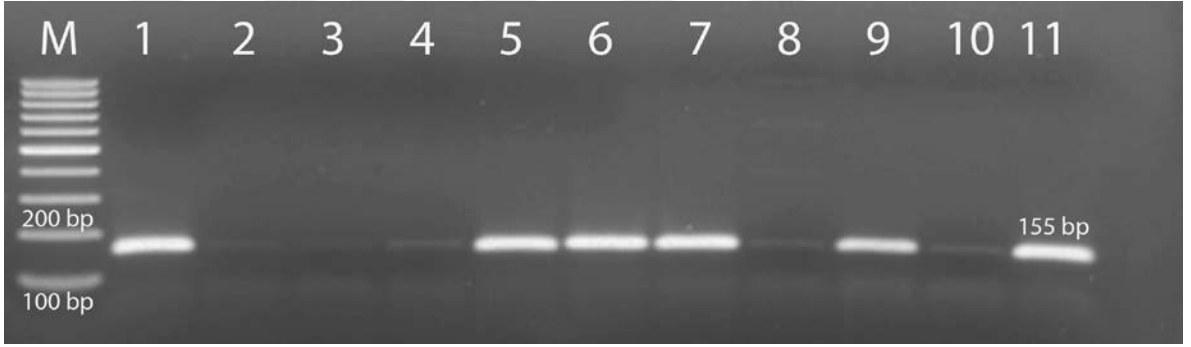
Şekil 8. *lasI* spesifik PCR sonucu görüntülenen bantlar. 1-12: Pozitif örnekler; M: marker (100-1000 bp)

lasR primerinin kullanıldığı PCR protokolünde 47 izolatın 130 bp’de bant oluşturduğu ve *lasR* genine sahip olduğu belirlendi. Bir izolat ise negatif sonuç verdi (Şekil 9).



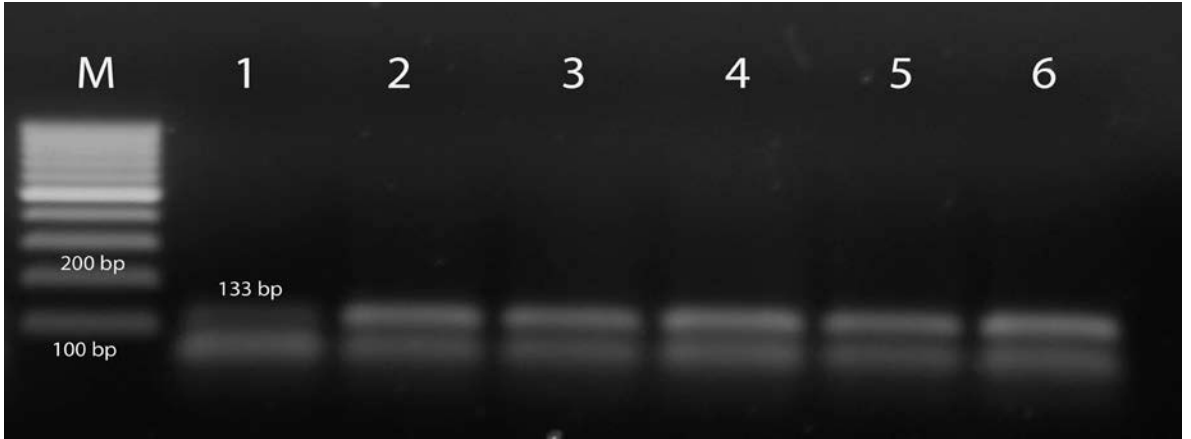
Şekil 9. *lasR* spesifik PCR sonucu görüntülenen bantlar. 1-9: Pozitif örnekler; M: marker (100-1000 bp)

rhII primerleri kullanılarak yapılan PCR çalışmasında izolatların tümünün 155 bp’de bant oluşturduğu belirlendi (Şekil 10).



Şekil 10. *rhII* spesifik PCR sonucu görüntülenen bantlar. 1-11: Pozitif örnekler; M: marker (100-1000 bp)

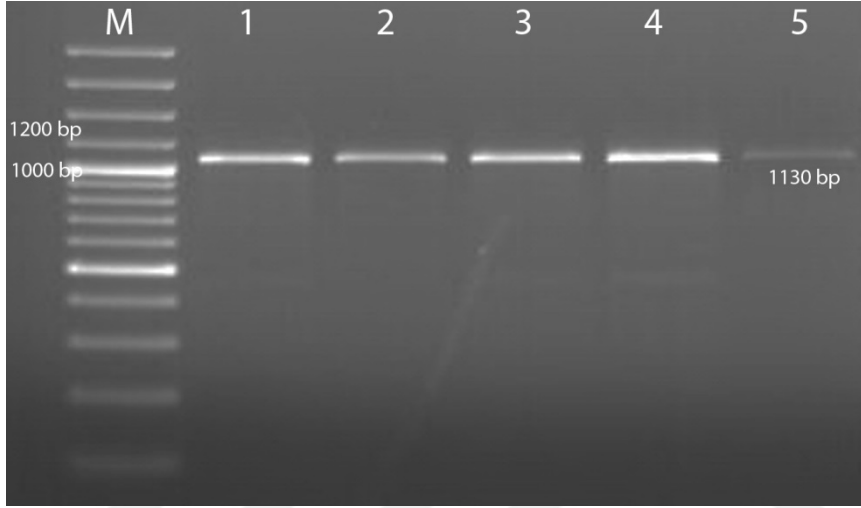
rhIR primerlerinin kullanıldığı PCR koşullarında izolatların tümünün 133 bp’de bant oluşturduğu belirlendi (Şekil 11).



Şekil 11. *rhIR* spesifik PCR sonucu görüntülenen bantlar. 1-6: Pozitif örnekler; M: marker (100-1000 bp)

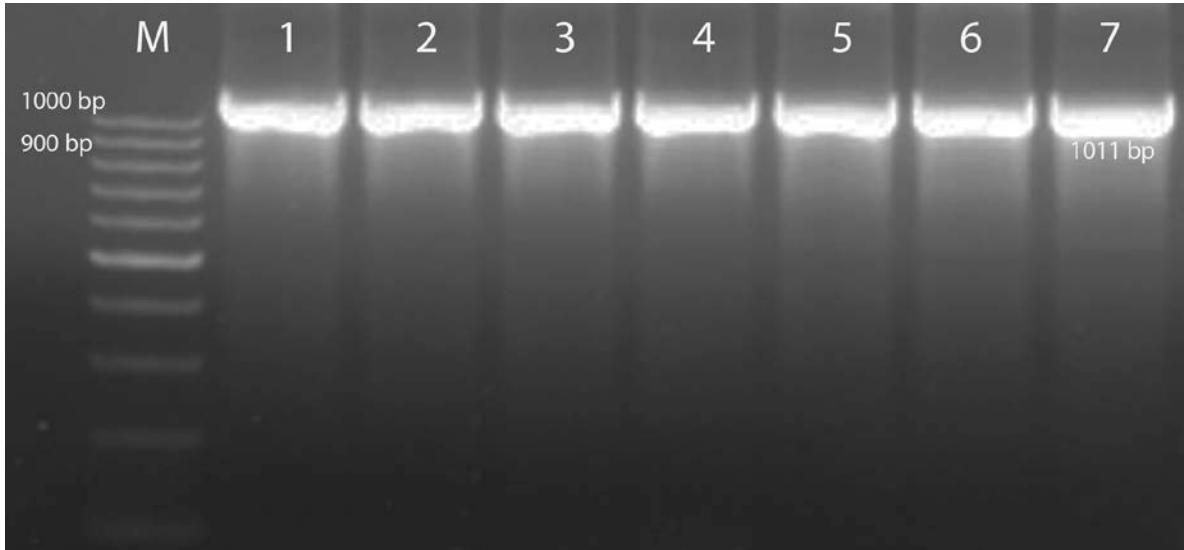
4.5.3. PA0756, PA0757, PA2070 ve PA5033 Genlerinin Varlıkların Araştırılması

PA0756,PA0757,PA2070 ve PA5033 gen varlıkları için optimize edilen PCR sonucunda izolatların 46 tanesinin 1130 bp’de spesifik bant oluşturduğu ve PA0756 genine sahip olduğu tespit edildi (Şekil 12).



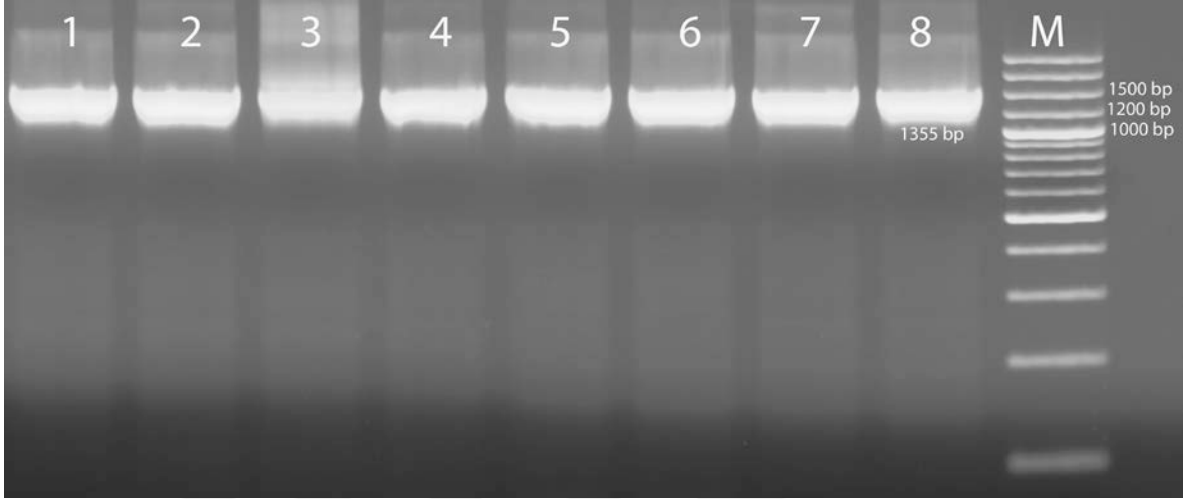
Şekil 12. PA0756 spesifik PCR sonucu görüntülenen bantlar. 1-5: Pozitif örnekler; M: marker (100-3000 bp)

İzolatların 46 tanesinin 1011 bp’de spesifik bant oluşturduğu ve PA0757 genine sahip olduğu tespit edildi (Şekil 13).



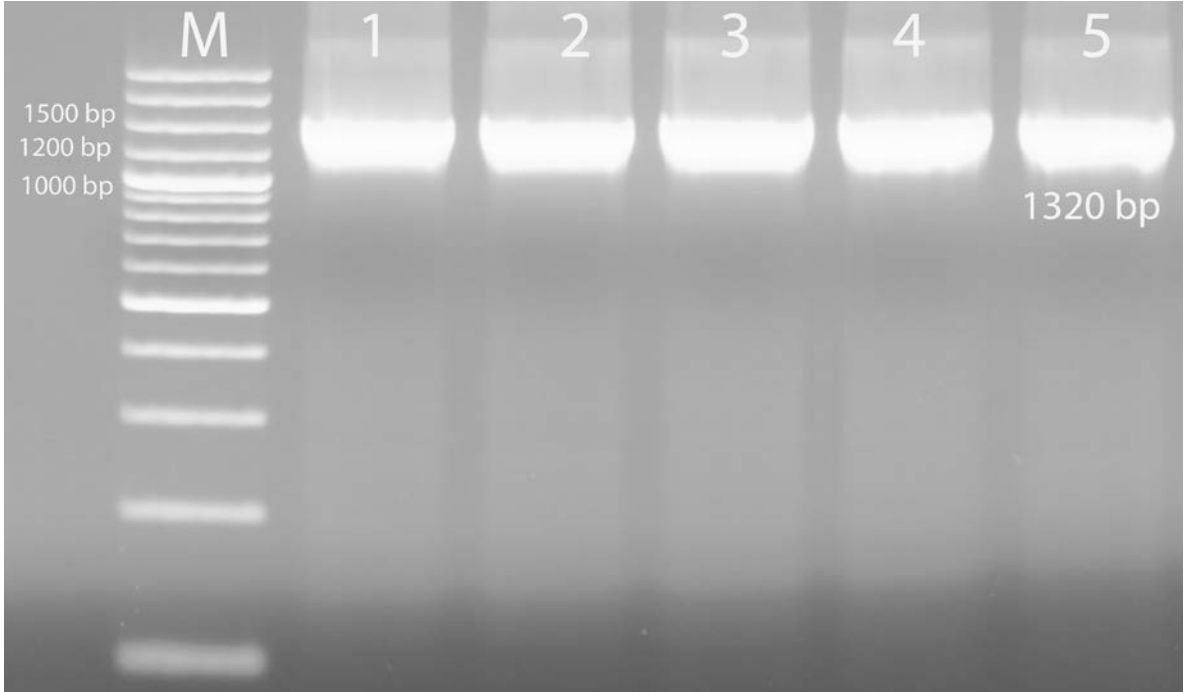
Şekil 13. PA0757 spesifik PCR sonucu görüntülenen bantlar. 1-7: Pozitif örnekler; M: marker (100-1000 bp)

İzolatların 45 tanesinin 1355 bp'de spesifik bant oluşturarak *PA2070* genine sahip olduğu belirlendi (Şekil 14).



Şekil 14. *PA2070* spesifik PCR sonucu görüntülenen bantlar. 1-8: Pozitif örnekler; M: marker (100-3000 bp)

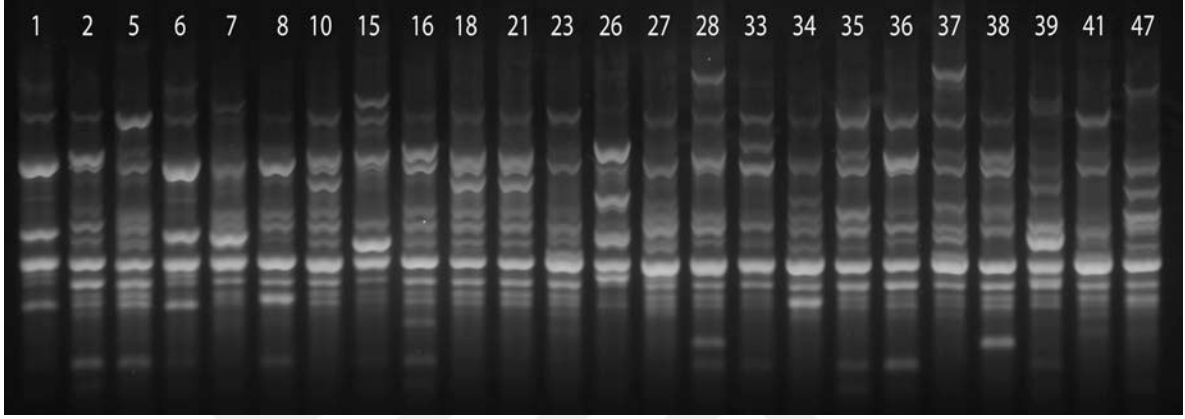
İzolatların 45 tanesinin 1320 bp'de bant oluşturarak *PA5033* genine sahip olduğu tespit edildi (Şekil 15).



Şekil 15. *PA5033* spesifik PCR sonucu görüntülenen bantlar. 1-5: Pozitif örnekler; M: marker (100-3000 bp)

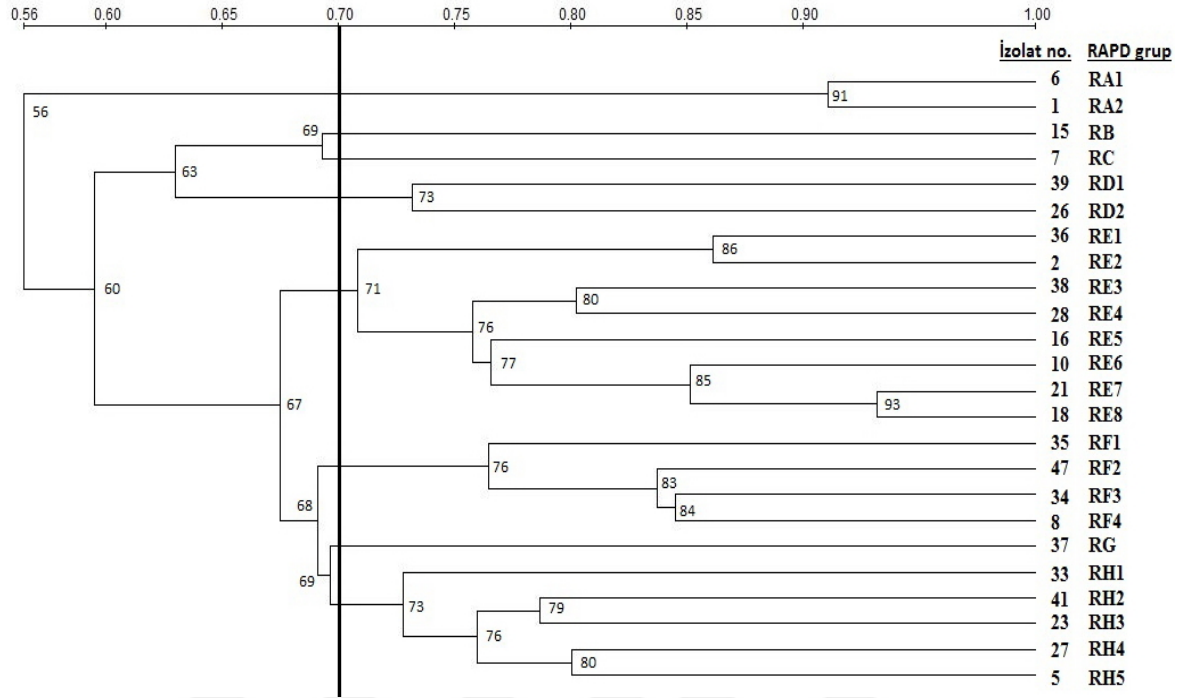
4.6. Genotiplendirme

Her üç yöntemle de biyofilm pozitif olduğu belirlenen 24 adet izolatın filogenetik yakınlıklarının belirlenmesi için ERIC-2 primerinin kullanıldığı RADP-PCR gerçekleştirildi (Şekil 16).



Şekil 16. Biyofilm pozitif izolatların RAPD-PCR sonucu görüntülenen bantları

RAPD-PCR sonucunda elde edilen bant profiline göre çizilen dendrograma göre her üç yöntem ile biyofilm pozitiflik görülen izolatların filogenetik yakınlıkları belirlendi. Buna göre izolatların %56 ile %93 arasında benzerlik gösterdikleri saptandı (Şekil 17). %70 eşik değeri göz önüne alınarak yapılan değerlendirme sonucunda izolatların 8 grup içerisinde yer aldığı görüldü. Bu gruplardan 5 tanesi küme (RA, RD, RE, RF, RH) oluştururken, 3 tanesi ise tekli grup (RB, RC, RG) oluşturduğu belirlendi.



Şekil 17. Biyofilm pozitif izolatların filogenetik yakınlıkları

4.7. Sonuçların Toplu Olarak Değerlendirilmesi

Tez çalışmaları kapsamında elde edilen bulgular toplu olarak Tablo 9’da sunuldu.

Tablo 9. Tez çalışmaları kapsamında elde edilen bulguların toplu sunumu

İzolot no.	Biyofilm			Direnc saptanan antibiyotik sayısı	PCR								
	CRA	Christensen	Mikroplak		<i>pelA</i>	<i>lasI</i>	<i>lasR</i>	<i>rhII</i>	<i>rhlR</i>	<i>PA756</i>	<i>PA757</i>	<i>PA2070</i>	<i>PA5033</i>
1	+	+	+	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	-	+	+	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	-	-	-	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	-	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	+	-	+	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	-	+	-	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	+	+	-	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	-	+	+	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	+	+	+	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	+	+	+	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	+	+	-	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18	+	+	+	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	+	+	-	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	+	+	-	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	+	+	+	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22	+	+	-	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23	+	+	+	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24	-	+	+	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25	-	+	+	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
26	+	+	+	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tablo 9'un devamı. Tez çalışmaları kapsamında elde edilen bulguların toplu sunumu

İzolot no.	Biyofilm			Direç saptanan antibiyotik sayısı	PCR									
	CRA	Christensen	Mikroplak		<i>pelA</i>	<i>lasI</i>	<i>lasR</i>	<i>rhII</i>	<i>rhIR</i>	PA756	PA757	PA2070	PA5033	
27	+	+	+	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
28	+	+	+	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
29	+	+	-	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
30	+	+	-	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
31	+	-	+	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
32	+	+	-	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
33	+	+	+	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
34	+	+	+	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
35	+	+	+	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
36	+	+	+	2	+	+	-	+	+	+	+	-	+	
37	+	+	+	6	+	+	+	+	+	-	+	+	-	
38	+	+	+	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
39	+	+	+	5	+	+	+	+	+	+	+	-	+	
40	+	+	-	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
41	+	+	+	3	+	+	+	+	+	+	-	+	+	
42	+	+	-	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
43	-	+	-	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
44	+	+	-	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
45	+	+	-	3	+	+	+	+	+	-	+	-	+	
46	+	+	-	6	+	+	+	+	+	+	-	+	-	
47	+	+	+	5	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
48	-	+	+	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

5. TARTIŞMA

Psödomonaslar, Pseudomonadaceae ailesi, Pseudomonadales takımı, γ -Proteobacteria sınıfı içerisinde sınıflandırılmaktadırlar. *Pseudomonas* türleri insan, hayvan ve bitkiler için fırsatçı patojendirler. Psödomonasların birçok türü bulunmasına rağmen veteriner hekimlik için önemli olan türü *P. aeruginosa*'dır. *P. aeruginosa* çok sayıda hayvan türünde oportunistik infeksiyonlar meydana getirmektedir. *P. aeruginosa* sağlıklı hayvanların dışkı ve derilerinde yaşamakta ve oportunistik karaktere sahip olması nedeni ile hayvanların immun sistemini baskılayan veya normal florayı bozan tüm predispoze faktörler infeksiyon oluşmasına neden olur. Birçok hayvanda sporadik infeksiyona neden olan etken inek, koyun, keçi, domuz, köpek, kedi, sürüngen hayvanlarda oportunistik olarak çok çeşitli hastalıklara neden olmaktadır. *P. aeruginosa* ile ilişkili olarak koyunlarda yapağı çürüğü, sığırlarda mastit ve abort, atlarda metrit ve kornea ülseri, köpeklerde otitis eksterna, vizonlarda hemorojik pnömoni, kanatlılarda embriyo ölümleri, kafes yılanlarında nekrotik stomatit, botriyomikoz, septisemi, üriner sistem infeksiyonu, yara infeksiyonu ve çeşitli hayvanlarda apse oluşumları meydana gelmektedir. Tez çalışmasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kültür Koleksiyonu'nda bulunan ve çeşitli klinik vakalardan izole edilmiş olan 48 adet *P. aeruginosa* izolatında biyofilm varlığı ile antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi ve her iki fenotipik determinantta rol oynayan ilişkili genlerin belirlenerek, aralarındaki ilişkinin karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi amaçlandı.

P. aeruginosa infeksiyonlarının teşhisinde klasik kültür yöntemlerinin yanı sıra moleküler bazlı teknikler de kullanılmaktadır. *P. aeruginosa* için en sık kullanılan moleküler yöntem olan PCR için *gyrB*, *toxA*, *16S-23S rDNA*, *16S rDNA*, *oprI*, *oprL*, *algD*, *GDP* ve *fliC* genlerini hedef alan oligonükleotit primerler kullanılmaktadır. Bu PCR yöntemleri *P. aeruginosa*'yı doğrudan klinik numunelerde mükemmel spesifite ve sensitivite ile tespit edebilmektedir. Spilker ve ark. (2004), 16S rDNA genini hedef alan primeri kullanmışlar ve yöntem optimizasyonu için yaptıkları çalışma sonucunda PA-SS primerinin hassas ve özgün olduğunu bildirmişlerdir. Tez çalışmasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kültür Koleksiyonu'nda bulunan ve çeşitli klinik vakalardan izole edilmiş olan 48 adet *P. aeruginosa* izolatının identifikasyonları Spilker ve ark. (2004) tarafından bildirilen yöntemin optimizasyonu

ile gerçekleştirildi. PCR'da PA-SS oligonükleotid primerleri kullanıldı. PCR ile identifikasyon sonucunda 48 izolatin da 956 bp'de bant oluşturduğu görüldü ve izolatlar *P. aeruginosa* olarak tanımlandı.

P. aeruginosa suşlarında çoklu ilaç direncinin (ÇİD) öneminden dolayı antimikrobiyal duyarlılık testleri yapılması önemli kabul edilmektedir. Antimikrobiyal duyarlılık testi için sıklıkla kullanılan yöntemler sıvı besiyeri mikrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemleridir. *P. aeruginosa* için yapılan çalışmalarda, sıvı besiyeri mikrodilüsyon ve agar dilüsyon testi sonuçlarıyla E-test ve disk difüzyon testi sonuçlarının uyumlu sonuçlar verdiği gösterilmiştir. Bu testlerde dikkat edilmesi gereken husus, kalite kontrol standartları ve duyarlı/dirençli sınır değerlerinin saptanması için Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü tarafından belirlenen (CLSI) prosedürlere uyulmasıdır. Bu çalışmada antibiyotik duyarlılık testleri CLSI kriterlerine göre gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bulgular EUCAST ve CLSI'de bildirilen zon çapları dikkate alınarak değerlendirildi (Cusack ve ark., 2019).

Anti-pseudomonal penisilinler, aminoglikozitler, sefepim, seftazidim, siprofloksasin, meropenem ve imipenem *P. aeruginosa* infeksiyonlarında tercih edilen antibiyotiklerdir. *P. aeruginosa* infeksiyonlarının tedavisinde erken ve uygun dozda tek antibiyotik kullanımının yanı sıra antibiyotik kombinasyonları da kullanılmaktadır. Çalışmalar hem aminoglikozitlerin hem de florokinolonların beta-laktamlarla veya karbapenemlerle kombine halde test edildiklerinde sinerjistik etkili olduğunu göstermiştir. Genellikle aminoglikozitlerin beta-laktamlar, üçüncü kuşak sefalosporinler, monobaktamlar ya da karbapenemlerle kombine edilerek verilmesi tedavide başarı şansını arttırmaktadır. *P. aeruginosa* suşlarının çoğunluğu penisilinlere, ampisilin, amoksisilin-klavulanik asit, ampisilin-sulbaktam, tetrasiklinler, makrolidler, rifampin, kloramfenikol, trimetoprim-sülfametoksazol, dar ve genişletilmiş spektrumlu sefalosporinler ve sefiksim, sefpodoksim gibi oral geniş spektrumlu sefalosporinlere karşı direnç göstermektedir. Tedavide tek antibiyotik kullanımı da direnç oluşturabilmektedir. *gyrA* geninde veya porinleri kodlayan genlerdeki mutasyon, penisilin bağlayan proteinler, eflux pompasının aşırı ekspresyonu ve kromozomal olarak kodlanmış beta-laktamazlar gibi birçok farklı mekanizma beta-laktamlara, karbapenemlere, aminoglikozitlere ve florokinolonlara karşı dirence neden olmaktadır (Tenover, 2006). Bu çalışmada *P. aeruginosa* izolatlarına yapılan Kirby-Bauer Disk

Difüzyon Metodu ile antibiyogram sonucunda izolatların enrofloksasine %16,67, seftriaksona %60,42, amoksisilin + klavulanik asite %100, siprofloksasine %10,42, meropeneme %29,17, kolistine %4,17, gentamisine %12,5 ve azitromisine karşı %97,9 oranında dirençli olduğu belirlendi. Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi (UAMDSS) raporlarında yer alan ve 2012 yılında yapılan bir araştırmada toplam 1209 *P. aeruginosa* suşunun antibiyotik duyarlılık durumları belirlenmiştir. Bu araştırmada en yüksek direncin seftazidime (%37,2) ve en düşük direncin ise amikasine (%9,8) karşı olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, araştırmada aminoglikozit grubu antibiyotiklerin *P. aeruginosa*'ya karşı en etkili antibiyotikler olduğu saptanmıştır. Siprofloksasin %23,3 direnç oranı ile *P. aeruginosa*'ya karşı en etkili olan ikinci antibiyotik olarak belirlenmiştir. İmipeneme karşı direncin %30,6 ve meropenem direnç oranının da %27 olduğu görülmüş ve beta-laktam antibiyotiklere direnç benzer oranlarda belirlenmiştir. UAMDSS ile 30 ülkenin dâhil olduğu EARS-Net (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network) tarafından yayımlanan 2012 verilerinin karşılaştırılması sonucunda ülkemizde piperasilin/tazobaktama, seftazidime ve florokinolonlara karşı direncin Avrupa ortalamasının üzerinde olduğu görülmüştür. Bu rapora göre Türkiye kökenli suşlarda antibiyotiklere direnç oranlarının Avrupa direnç ortalamalarından yüksek olduğu görülmektedir.

Kinolon grubu antibiyotiklerin *P. aeruginosa*'ya karşı konsantrasyona bağımlı olarak bakterisidal etkileri bulunmaktadır. Kinolonlar DNA sentezini direk inhibe eden tek antibakteriyeldir. *P. aeruginosa*'ya en etkili olan kinolon grubu antibiyotik siprofloksasindir. Levofloksasin ise sınırlı antibakteriyel etki göstermektedir. *P. aeruginosa* dahil hastane kökenli Gram negatif bakterilere en etkili kinolonlardan birisi olarak bilinen siprofloksasin tek başına veya diğer ilaçlarla kombine olarak tedavide sıklıkla kullanılmaktadır (Ustaçelebi ve ark., 1999). Karlowsky ve ark. (2004), Amerika ve Avrupa'da *P. aeruginosa* suşlarında kinolonlara karşı direncin arttığını bildirmişlerdir. Coşar ve ark. (2009)'nın yaptığı çalışmada siprofloksasin duyarlılığı % 60,8 bulunurken, Falagas ve ark. (2006) % 66,7 ve Sader ve ark. (2002) % 65,7 oranlarında duyarlılıklar bulmuşlardır. Yapılmış olan diğer çalışmalarda da siprofloksasin direnç oranları Aktepe ve ark. (2010) % 33, Çiftçi ve ark. (2005) %35, Fidan ve ark. (2005) %15, Ekincioğlu ve Perçin (2013) %21, ve Eyigör ve ark. (2009) %16 olarak bildirilmiştir. Grenada'da köpeklerin otitis, deri hastalıkları, yara ve

apselerinden izole edilen 44 *P. aeruginosa* suşu ile yapılan bir çalışmada, suşların 6 antibiyotiğe karşı disk difüzyon testiyle direnç durumları belirlenmiştir. Çalışmada gentamisine %9,8, enrofloksasine %15,8 ve neomisine %41,8 oranında direnç varlığı bildirilmiştir. Tetrasikline karşı direnç % 85,3 oranında iken tüm izolatların amoksisilin klavulanik asit ve sefalotine direnç gösterdiği belirlenmiştir (Hariharan ve ark., 2009). Bu çalışmada *P. aeruginosa* izolatlarının kinolon grubu antibiyotiklerden enrofloksasin ve siprofloksasine karşı direnç durumları incelendi ve izolatların enrofloksasine %16,67 ve siprofloksasine %10,42 oranında dirençli olduğu belirlendi. Bu verilere göre çalışmamızda belirlenen siprofloksasin direnç oranı ülkemizde son yıllarda yapılmış olan çalışmalara göre daha düşük ya da benzer olarak değerlendirildi.

Beta-laktam grubu antibiyotikler üreme fazındaki bakteriye karşı etki göstermektedirler. Bu antibiyotikler hücre reseptörlerine bağlanarak bakteri hücre duvarının sentezinde seçici inhibitörler olarak görev yaparlar. *P. aeruginosa* suşlarının beta-laktam antibiyotiklere karşı gösterdiği dirençte enzimatik (penisilinaz, GSBL, sefalosporinaz) ve nonenzimatik (pompa sistemleri, porin kaybı) mekanizmalar rol oynamaktadır. İndüklenebilir kromozomal AmpC Beta-laktamaz ve efluks pompa sistemi mekanizmaları da ampisilin, amoksisilin, amoksisilin-klavulonata karşı direnç gelişiminde rol oynarlar. Wolska ve ark. (2001) tarafından yapılan bir çalışmada klinik örneklerden izole edilen 20 *P. aeruginosa* suşunda indüklenebilir beta-laktamaz (İBL) varlığı araştırılmış ve %72 oranında direnç bildirilmiştir. Dunne ve Hardin (2005) hastane infeksiyon etkenlerinden olan 134 *P. aeruginosa* suşunu incelemişler ve %85,8 oranında direnç saptamışlardır. Türkiye’de yapılan çalışmalarda Oldacay ve ark. (2003) *P. aeruginosa* suşlarındaki İBL üretimini %60, Çelik ve ark. (2007) %82 ve Berktaş ve ark. (2011) da %74 olarak bildirmişlerdir. *P. aeruginosa* suşlarında seftazidim duyarlılığını araştıran Karray ve ark. (1993) tarafından yapılan bir çalışmada %23 oranında direnç belirlenmiştir. Cheng ve ark. (1996) tarafından yapılan çalışmada %71 oranında yüksek bir direnç durumu bildirilmiştir. Türkiye’de yapılan çalışmalarda seftazidim direnç durumu Birengel ve ark. (2001) tarafından %46,6, Yücesoy ve ark. (1996) tarafından %51, Aydoğan ve ark. (2000) tarafından %53, Cesur ve ark. (2002) tarafından da %54,9 olarak bildirilmiştir. Bu çalışmada *P. aeruginosa* izolatlarının beta-laktam grubu antibiyotiklerden seftriakson ve amoksisilin-klavulonik asite karşı direnç

durumları incelendi ve izolatların seftriaksona %60,4, amoksisilin-klavulonik asite %100 oranında dirençli olduğu belirlendi.

Karbapenem grubu antibiyotikler Penisilin Bağlayıcı Protein (PBP)'ler ile kovalent bağlanarak hücre duvar sentezini inhibe ederler. Geniş spektrumlu olmalarının yanı sıra AmpC ve genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz enzimlerine karşı dirençlidirler. Karbapenemler indüklenmiş bakteri topluluklarında AmpC mutantların seçimine engel olmaktadır. İmipenem ve meropenem *P. aeruginosa*'ya karşı en etkili karbapenemlerdir. Meropenem etkinliği imipeneme oranla daha yüksektir. *P. aeruginosa* için meropenemin hedefi penisilin bağlayan protein-3 (PBP-3)'dür (White-Friedrich, 1996). Karbapenemler, genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz ve AmpC enzimlerine dayanıklı olmaları, etki spektrumlarının oldukça geniş olması, bakteriyel membrandan hızla geçebilmesi gibi özellikleri nedeniyle özellikle çoklu dirençli Gram negatif bakteri infeksiyonlarında ilk sırada kullanılan antibiyotik grubudur. Ancak, geniş etki spektrumları nedeniyle karbapenemlerin özellikle ampirik tedavide yaygın olarak kullanılması, bu antibiyotiklere karşı direnç oranlarının artmasına neden olmuştur. Son yıllarda karbapenem dirençli *P. aeruginosa* infeksiyonları tüm dünyada sıklığı artan, önemli bir sağlık problemi olarak bildirilmektedir. Tüm dünyada olduğu gibi, Türkiye'de de *Pseudomonas* suşlarının diğer beta-laktamlara artan direnci nedeniyle karbapenemler ilk seçenek olarak düşünülmektedir. Son zamanlarda *Pseudomonas* izolatlarında karbapenemaz üretimindeki artış, bu antibiyotiklere karşı direnci de beraberinde getirebilmektedir (Çakır ve ark., 2003). Tunçoğlu ve ark. (2009)'nın yaptığı çalışmada beta-laktam antibiyotikler içinde karbapenemler *P. aeruginosa* izolatlarına en etkili antibiyotikler olarak belirlenmiştir. European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS)'nin 2007 verileri Avrupa'da *P. aeruginosa* için karbapenem direncinin artmakta olduğunu göstermiştir. Danimarka, Hollanda, Finlandiya, İsveç ve İsviçre gibi ülkelerde % 10 iken Türkiye, Hırvatistan, Almanya, İtalya, Çek Cumhuriyeti ve Yunanistan'da % 25 civarında olduğu rapor edilmiştir (Keskin ve ark., 2012). Karbapenem direncini Aktepe ve ark. (2010) %25, Göktaş ve ark. (2010) %27, Ertürk ve ark. (2012) %21, Akduman ve ark. (2013) %23, Cesur ve ark. (2002) %49, Çiftçi ve ark. (2005) %15, Tunçoğlu ve ark. (2009) %9, Özyurt ve ark. (2010) % 19, Gültepe ve ark. (2014) %33 olarak bildirmişlerdir. Bu çalışmada *P. aeruginosa* izolatlarının karbapenem grubu antibiyotiklerden meropeneme

karşı direnç durumları incelendi ve izolatların meropeneme %29,17 oranında dirençli olduğu belirlendi. Çalışmada elde edilen direnç oranı ülkemizde belirlenen direnç oranları ile uyumlu olarak değerlendirildi.

Aminoglikozit grubu antibiyotikler ribozomların protein sentezini inhibe ederek, mRNA'nın üzerinde taşıdığı genetik kodun yanlış okunmasına neden olur. Bu sayede işlevsiz bir protein sentezlenir. *Pseudomonas* suşlarında aminoglikozit direnci ile ilgili çeşitli direnç mekanizmaları saptanmıştır. En önemli mekanizma bakteriyel aminoglikozit fosfotransferaz, aminoglikozit asetiltransferaz, aminoglikozit adeniltransferaz enzimleri ile aminoglikozitlerin modifikasyonudur (Strateva ve Yordanov, 2009). *P. aeruginosa*'ya etkili önemli aminoglikozitler; gentamisin, netilmisin, tobramisin ve amikasinidir. Gürbüz ve Akbaş (2015) tarafından yapılan bir çalışmada *P. aeruginosa* izolatlarının gentamisine % 100 oranında dirençli olduğu bildirilmiştir. Keskin ve ark. (2012) da çalışmalarında çeşitli buzağı klinik örneklerinden izole ettikleri *P. aeruginosa* suşlarının tümünün gentamisine dirençli olduğunu rapor etmişlerdir. Kamel ve ark. (2011) sığır ve koyunlarının süt ve idrarlarından izole ettikleri *P. aeruginosa* suşlarının %94,2'sinin gentamisine dirençli olduğunu bildirirken, Hossain ve ark. (2013) gentamisine orta düzeyde direnç tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Yılmaz (1999) tarafından yapılan çalışmada çeşitli klinik örneklerden izole edilen *P. aeruginosa* suşlarının %45,31'inde gentamisin direnci belirlenmiştir. Scott ve ark. (2019) tarafından yapılan çalışmada gentamisine karşı insan kökenli izolatların %15,43 oranında, hayvan kökenli izolatların ise %1,20 oranında direnç gösterdiği belirlenmiştir. Bu çalışmada *P. aeruginosa* izolatlarının aminoglikozit grubu antibiyotiklerden gentamisine karşı direnç durumları incelendi ve izolatların gentamisine %12,5 oranında dirençli olduğu belirlendi. Bu oran diğer araştırmacıların bildirdiği oranlara göre düşük olarak değerlendirildi.

Makrolid grubu antibiyotik olan azitromisin klinik denemelerde *P. aeruginosa* için quorum sensing inhibitörü olan tek antibiyotik olarak belirlenmiştir (Saiman ve ark., 2003). Bir çok çalışmada azitromisinin quorum sensing sinyal moleküllerinin üretimini azalttığı ve bu şekilde *P. aeruginosa*'nın virülensini attenüe ettiği bildirilmektedir (Tateda ve ark., 2001). Köpeklerde özellikle *P. aeruginosa* ile ilişkili solunum yolları infeksiyonlarında tercih edilmekte olan azitromisin, solunum yollarına iyi penetre olmaları sebebiyle uygun seçim olarak görülmektedir. Özellikle azitromisin

olmak üzere makrolidler aynı zamanda biyofilm üreten *P. aeruginosa* suşlarının inhibisyonunda da başarılı olmaktadır. Bu çalışmada *P. aeruginosa* izolatlarının makrolid grubu antibiyotiklerden azitromisine karşı direnç durumları incelendi ve izolatların azitromisine %97,9 oranında dirençli olduğu belirlendi. Saptanan bu yüksek direnç oranı azitromisin ile tedavide dikkatli olunması gerektiğini gösterdi.

Kolistin, siklik yapı içeren polipeptid grubu antibiyotikler içerisinde yer almakta olan polimiksinlerin bir üyesi olarak sınıflandırılmaktadır. Polimiksinler, *Bacillus polymyxa* subspecies *colistinus* tarafından sentezlenen ürünlerdir. Kimyasal olarak polimiksin beş farklı bileşikten (A-E) oluşmaktadır. Fakat, sadece Polimiksin B ve E'nin klinik kullanımı mevcuttur (Falagas ve Falagas, 2005). Polimiksin B ve E ilk defa 1947 yılında bulunmuş ve sonrasında 1962 yılından günümüze kadar Gram negatif bakterilerin sorumlu olduğu infeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır. 1980'li yıllarda böbrek üzerinde ciddi hasara yol açması nedeniyle parenteral kullanımı yerini sadece topikal ve oftalmik yola bırakmıştır (Falagas ve Falagas, 2005; Giamarellou, 2010). Yapılan araştırmalarda kolistinin *P. aeruginosa* kaynaklı sığır mastitis vakalarında en etkili antibiyotiklerden birisi olduğu belirlenmiştir. Polimiksinlerin memeden emilimi zayıf olmasına rağmen 5 mg/kg'lık kas içi enjeksiyonunun sütteki duyarlı bakterileri elimine etmeye yeterli olduğu bildirilmektedir (Preez, 2000). Özellikle son yıllarda hızlı bir şekilde ortaya çıkan Gram negatif bakterilerde ÇİD nedeniyle polimiksin grubu antibiyotikler tekrar gündeme gelmiştir (Li ve ark., 2001; Falagas ve Falagas, 2005). Kolistine karşı direnç mekanizmaları değişik şekillerde oluşabilmektedir ve direnç oluşumu genellikle hücreye bağlanma alanları ve dış membranın polaritesinin azalmasıyla ilişkilendirilmektedir. Ayrıca direnç oluşumunda PmrA-PmrB ve PhoQ-PhoP regülatör sistemleri de rol oynamaktadır. Polimiksinler arasında da çapraz direnç görülmektedir (Li ve ark., 2006; Giamarellou, 2010). Son çalışmalarda kolistine maruz kalmaya bağlı oluşan genetik direnç mekanizmaları açıklanmaya çalışılmaktadır. Yapılan in-vitro çalışmalarında direnç, lipopolisakkarit (LPS) üreten genlerde (*lpxA*, *lpxC* ve *lpxD* veya *pmrA* ve *pmrB*) meydana gelen mutasyonlara bağlı LPS üretim eksikliğinden kaynaklı olduğunu ortaya koymuştur (Adams ve ark., 2009; Moffatt ve ark., 2010). Yapıcı ve ark. (2018) tarafından 2013-2016 yılları arasında izole edilen 626 *P. aeruginosa* izolatının kolistine karşı direnç durumları 2013, 2014, 2015 ve 2016 yıllarında sırasıyla %6,35, %4,97, %5,93 ve %3,97

olarak bulunmuştur. Scott ve ark. (2019) tarafından yapılan çalışmada sahiplerinden izole edilen 37 izolatın ve arkadaş hayvanlardan alınan svap örneklerinden izole edilen 24 izolatın kolistine karşı sırasıyla %22 ve %54 oranında direnç gösterdiği ortaya konulmuştur. Hemorajik pnömonili minklerden izole edilen *P. aeruginosa* izolatına duyarlı olan antibiyotikleri saptamak için yapılan bir çalışmada izolat sadece gentamisin ve kolistine duyarlı bulunmuştur (Salomonsen, 2012). Bu çalışmada *P. aeruginosa* izolatlarının polimiksinler içerisinde yer alan kolistine karşı direnç durumları incelendi ve izolatların kolistine %4,17 oranında dirençli olduğu belirlendi. Bu oran yapılan diğer çalışmalarla uyumluluk göstermektedir.

Geçmişte antibiyotiklerle infeksiyöz hastalıklarının çoğu tedavi edilebiliyor iken, antibiyotiklerin hatalı ve bilinçsiz kullanımları sonucunda yeni keşfedilen her antibiyotiğe karşı kısa sürede direnç gelişmiştir. 1900'lü yılların son çeyreğinde *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ve enterokoklar gibi hastane infeksiyonlarından sık izole edilen patojenlerde ÇİD gösteren suşlar ortaya çıkmaya başlamıştır. Önceleri hastanelerde ortaya çıkan ÇİD gösteren suşlar daha sonra topluma ve çevreye yayılmaya başlamıştır. Sonuç olarak da bu yeni suşların sebep olduğu hastane, toplum ve hayvanlarda klasik antibiyotik tedavisine cevap vermeyen yeni infeksiyonlar tüm dünyada yüksek morbidite ve mortalitenin sebebi haline gelmiştir. *P. aeruginosa* için ÇİD tanımlaması güncel tanımlama ile sefalosporinler, karbapenemler, betalaktam ve betalaktamaz kombinasyonları, florokinolonlar ve aminoglikozitlerden en az üçüne dirençli suşlar için kullanılmaktadır. İnsan, köpek, koyun ve sığırlardan izole edilen *P. aeruginosa* suşlarının pek çok antibiyotiğe dirençli olduğu araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir. *P. aeruginosa*'da ÇİD intrinsik veya kazanılmış direnç şeklinde olabilmektedir. Ampisilin, amoksisilin, amoksisilin- klavulanat, 1. kuşak sefalosporinler, 2. kuşak sefalosporinler, sefotaksim, seftriakson, nalidiksik asit, trimetoprim karşı doğal dirençlidir. Keskin ve ark. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada, çeşitli klinik örneklerden izole edilen *P. aeruginosa* suşlarının tamamının ampisilin, amoksisilin, amoksisilin/klavulanik asit, sefoksitin, siprofloksasin, eritromisin, gentamisin, norfloksasin, oksasillin, penisilin, rifampin, streptomisin, tetrasiklin, trimetoprim-sulfametoksazol ve vankomisine dirençli olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada izolatların 6 antibiyotik grubuna ait 8 antibiyotik (Florokinolon: enrofloksasin ve siprofloksasin;

Betalaktam: seftriakson ve amoksisilin + klavulanik asit; Karbapenem: meropenem; Polimiksin: kolistin; Aminoglikozit: gentamisin; Macrolide: azitromisin) için duyarlılıklarının belirlendi. İzolatların 26 adetinin (%54,17) 2 antibiyotik grubuna, 15 adetinin (%31,25) 3 antibiyotik grubuna ve 7 adetinin (%14,58) 4 antibiyotik grubuna direnç gösterdiği belirlendi. Çoklu antibiyotik dirençliliklerine göre incelendiğinde 22 izolat (%45,83) 3 ve daha fazla antibiyotik grubuna direnç göstermesi nedeniyle ÇİD olarak değerlendirildi.

P. aeruginosa da dahil olmak üzere bir çok infeksiyöz hastalığın patogenezinde mikroorganizmaların vejetatif/planktonik formlarının yanı sıra biyofilm yapılarının da önemli rol oynadığı bilinmektedir. Biyofilm infeksiyonlarının görülme sıklığının artmasıyla birlikte biyofilm oluşumunun kontrolü ve engellenmesine yönelik araştırmalar hız kazanmıştır. Biyofilm oluşumunun engellenebilmesi, direncin mekanizmalarının anlaşılabilmesi ve biyofilm infeksiyonları için yeni tedavi stratejilerinin geliştirilebilmesi için biyofilm oluşumunu belirleme yöntemleri, bu yöntemlerin doğru uygulanması ve yeni yöntemlerin geliştirilmesi oldukça önemlidir. Günümüzde gelişen teknolojinin yardımıyla biyofilm oluşumunu saptamada çok sayıda farklı *in vitro* yöntemden ve deney hayvanlarında biyofilm infeksiyonu oluşturulmasına dayalı *in vivo* yöntemlerden faydalanılmaktadır. CRA, tüp aderans, Christensen ve mikropalak yöntemleri biyofilm oluşumunu saptamada sık kullanılan yöntemler olarak öne çıkmaktadır. Kuru ağırlığın ve metabolik aktivitenin saptanmasına dayalı bazı kantitatif yöntemlerle floresan mikroskopisi, konfokal lazer tarama mikroskopisi ve elektron mikroskopisinin kullanıldığı yöntemler de mevcuttur. Kullanılan farklı yöntemlerde çalışılan mikroorganizmanın türüne göre inokulum miktarı, besi yeri, inkübasyon koşulları değişebilmektedir. Bu durum yöntemlerin uygulanmasında modifikasyonları beraberinde getirmekte ve yöntemlerin standardizasyonunu zorlaştırmaktadır. Ayrıca *in vitro* biyofilm modellerinde ortamdaki besin maddelerinin azalması, konak-patojen etkileşiminin olmaması gibi nedenlerle elde edilen sonuçların *in vivo* ortamı tam olarak yansıtamadığı düşünülmektedir. Yassein ve ark. (1995) klinik örneklerden izole ettikleri 50 *P. aeruginosa* suşunun %40'ında biyofilm varlığı tespit etmişlerdir. Delissalde ve Amabile-Cuevas (2004) hastane infeksiyon etkeni olan 162 *P. aeruginosa* izolatının %18'inde biyofilm oluşumu bildirmişlerdir. Moskowitz ve ark. (2005) çeşitli servis ve kliniklerden izole edilen 96 suşun %73'ünde biyofilm

oluşumunu pozitif olarak bildirmişlerdir. Çoban ve ark. (2009) kistik fibrozisli hastalardan izole ettikleri 60 *P. aeruginosa* suşunun %33,3'ünde biyofilm pozitifliği olduğunu bildirmişlerdir. Biyofilm pozitifliği Yıldırım ve ark. (2008) tarafından yapılan çalışmada %45, Çelik ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışmada da %48 olarak tespit edilmiştir. Milivojevic ve ark. (2018) 121 hayvan ve 81 insan kökenli toplam 202 *P. aeruginosa* izolatu üzerinde yaptıkları çalışmada, hayvan izolatlarının %93'ünün ve insan izolatlarının %96'sının *in vitro* koşullarda biyofilm oluşturduklarını bildirmişlerdir. Olejnickova ve ark. (2014) insan katater kaynaklı izolatlarda biyofilm üretim oranının %80-88 arasında değiştiğini saptamışlar ve hayvan izolatları ile ilgili çalışmaların çok sınırlı olduğunu rapor etmişlerdir. Köpek otitis kökenli *P. aeruginosa* izolatlarında da biyofilm oluşturma oranı Pye ve ark. (2013) tarafından %40 olarak belirlenmiş ve bu izolatların tedaviye cevap vermediği bildirilmiştir. Çalışmamızda izolatların biyofilm oluşturma durumları CRA, Christensen ve Mikroplak yöntemleri ile araştırıldı. CRA metoduna göre 40 (%83,33), Christensen Yöntemine göre 45 (%93,75) ve Mikroplak Yöntemine göre 31 (%64,58) izolatın biyofilm üretme yeteneğine sahip olduğu belirlendi. İzolatların %10,42'si sadece CRA, %4,17'si sadece Christensen ve %27,08'i sadece mikroplak yönteminde negatiflik gösterdi. İzolatların %4,17'si CRA ve Christensen yöntemlerinin her ikisi ile negatif sonuç verirken, hiçbir izolat sadece CRA ve Christensen ya da Christensen ve mikroplak yöntemlerinde ortak negatif sonuç göstermedi. Bir (%2,08) izolat yöntemlerin hiçbirisi ile pozitif sonuç vermedi. Bu bulgulara göre yöntemlerin herhangi birisi ile pozitif sonuç verme durumu göz önüne alındığında izolatlardaki biyofilm pozitifliği %97,92 olarak belirlendi.

Bakteriler biyofilm oluşturabilmek amacıyla bitişinde yer alan bakteri hücrelerini biyofilm oluşturma yönünde uyarabilmek için, ortama küçük, diffuze olabilen moleküller yayarlar. Hücreler arasındaki bu iletişim "Quorum Sensing (QS)" adı verilen sistemler ile gerçekleştirilmektedir. *P. aeruginosa*'da çeşitli virülans faktörlerinin üretimi hücreden hücreye sinyal iletim sistemi olan QS ile kontrol edilmektedir. *P. aeruginosa*'da *LasI-LasR*, *RhlI-RhlR* ve *PQS-MvfR* olmak üzere üç ana QS sistemi bulunur. Bu sistemler biyofilm oluşumunu kontrol ederler. *P. aeruginosa*'da bulunan QS sistemi hiyerarşik bir döngü tarafından kontrol edilir. Bu döngüde *rhl* genlerinin ekspresyonu *las* genlerinin regülasyonu altında gerçekleşmektedir (Girard ve Bloemberg, 2008). *LasI-LasR* ve *RhlI-RhlR* QS sistemi *P. aeruginosa*'nın virulansını

kontrol etmede ardışık olarak fonksiyon gösterir. *lasI* ve *rhII* genleri *Als* olarak adlandırılmaktadır. *las* geninin fonksiyonu ilk olarak *lasB* elastaz enzim aktivitesinin bulunmasıyla ortaya çıkmıştır. Bundan dolayı *P. aeruginosa* QS sisteminde *las* geni olarak adlandırılmıştır. *rhl* geni adlandırılmasının nedeni ise ramnolipid üretimindeki büyük rolüdür. *rhl*, ramnolipid üretiminde gerekli olan ramnosil tranferaz enzimi kodlayan *rhlAB* olarak adlandırılan bir operonun ekspresyonunu düzenler. *lasI*; QS'de AI sentaz olan N-(3-oxododecanoyl)-homoserin laktonu (3-oxo-C12-HSL) kodlar. Bu QS sinyali serbest olarak *P. aeruginosa* hücrelerine difuze olabilir. AI'ler belli bir kritik alt sınır konsantrasyonuna ulaştığı zaman, AI'ler LasR proteine bağlanır ve daha sonra LasR-AI kompleks şekillenir. Bu kompleks daha sonra pek çok virülans faktörleri kodlayan genlerle birlikte bir seri hedef genleri tetikler. Populasyon yoğunluğuna bağlı olarak üretilen bu sinyal molekülleri içinde temel olarak *las* sistemi; *rhl* sisteminin çalışmasını uyarması ve kinolon sistemini düzenlemesi sebebi ile anahtar rol oynamaktadır (Karatuna ve Yagci, 2005). Ancak *las* sisteminin çalışmaması durumunda, hiyerarşik bir düzene bağlı olarak QS sistemleri kendi içinde yeniden düzenlemeye gitmekte ve ikincil sistem olan *rhl*, *las* sisteminin yerine geçebilmektedir. Son zamanlarda *las* ve *rhl* düzenleyicileri arasında yeni bir yolun varlığını ortaya konulmuştur (Stepanovic ve ark., 2000). Buna göre rezidüel *rhII* ve *rhlR* transkripsiyonları çevresel faktörlerle kombine olarak *rhl* düzenleyicisinin aktivasyonuna, bu da gecikmeli olmakla birlikte *las* düzenleyicisinin aktivasyonuna neden olabilmektedir. Perez ve ark. (2011) çalışmalarında *P. aeruginosa* izolatlarında her 4 geni de %90,1 oranında belirlediklerini bildirmişlerdir. Bununla beraber, Karatuna ve Yagci (2005) ise *lasI* ve *lasR* genlerini %81,25, *rhII* genini %68,75 ve *rhlR* genini %62,5 oranlarında saptamışlardır. Sabharwal ve ark. (2014) Hindistan'da *P. aeruginosa* ile yaptıkları çalışmada %75 oranında *lasI* ve *lasR* genlerini, %41,6 oranında *rhII*, ve %58,3 oranında *rhlR* genini belirlediklerini bildirmişlerdir. Mısır'da yapılan bir çalışmada da benzer şekilde %48 *lasI* geni, %40 *lasR* ve *rhII* genleri ile %36 *rhlR* geni tespit edilmiştir (Aboushleib ve ark., 2015). Bu çalışmada QS genleri olan *lasI*, *lasR*, *rhII*, *rhlR* araştırıldı. Tüm izolatların *lasI*, *rhII* ve *rhlR* genlerine sahip olduğu görüldü. İzolatların %97,92'sinde ise *lasR* geni belirlendi.

Salgısal polisakkaritler *P. aeruginosa* biyofilmlerinin temel komponentlerinden birisidir. Bakterilerin biyofilm oluşturmalarında yer alan 3 polisakkarit bulunmaktadır.

Bunlar; alginatlar, polisakkarit sentez lokusu ve pellikül (PEL) polisakkaritleridir (Friedman ve Kolter, 2004; Franklin ve ark., 2011). PelA pel biyosentezi için gerekli olan periplazmik olarak yerleşmiş olan proteindir (Colvin ve ark., 2013). *P. aeruginosa* da biyofilm oluşumu için PEL salgılamaktadır ve bu polisakkarit bakteri virülensi ve kalıcılığı için önemli olarak kabul edilmektedir. *P. aeruginosa* da *pelA*, biyofilm matriksinde ekstrasellüler DNA ile hücreler arası elektostatik iletişimi sağlar. Dış membrandan PEL translokasyonu, membranda bulunan bir porin olan PelB ile sağlanmaktadır. PEL ayrıca sadece biyofilm popülasyonunda aminoglikozit direncinde sekonder olarak rol oynamaktadır (Friedman ve Kolter, 2004). *pelA* geni hemen hemen tüm klinik *P. aeruginosa* izolatlarında bulunabilen ve biyofilm üretimine katkı sağlayan genidir. Bununla beraber bu genin varlığı biyofilm üretiminde tek başına yeterli olmamakta ve biyofilm oluşumu birçok başka faktörden de etkilenmektedir (Maita ve Boonbumrung, 2014). Maita ve Boonbumrung (2014) tarafından yapılan bir çalışmada *pelA* geninin klinik izolatların %97,8'inde bulunduğunu bildirmişlerdir. Bu oranın biyofilm oluşturan izolatlarda %99,1 ve oluşturmayanlarda ise %92,9 olduğunu rapor etmişlerdir. Bu çalışmada *P. aeruginosa* izolatlarının hepsinin *pelA* genine sahip olduğu belirlendi. Bu bulgu *pelA* geninin biyofilm oluşumunda tek başına yeterli olmadığı ve başka genlerin de katkıda bulunabileceğini düşündürdü.

Biyofilm varlığı *P. aeruginosa* suşlarında antibiyotik dirençliliğinin daha fazla olmasına neden olmaktadır. *P. aeruginosa*'nın hem planktonik hem de biyofilm oluşturan suşları infeksiyonlara yol açabilmektedir (Jennings ve ark., 2015). Planktonik bakterilere göre biyofilm oluşturan suşların daha fazla dirençli olmaları da tedavide sorunlara yol açmaktadır. Bu dirence ve virülensin artmasına bazı genlerin varlığı ve ekspresyonları neden olmaktadır (Whiteley ve ark., 2001). Aynı zamanda, biyofilm üreten suşlarda antibiyotik direnç düzeylerinin artmasına birçok faktör ve gen neden olmaktadır. Bu faktörler arasında biyofilm oluşturan bakterilerde spesifik antibiyotik direnç gen varlıkları, biyofilmde efluks pompası ekspresyonları ve strese neden olan genler bulunmaktadır. Gen düzeyinde ise *ahpC*, *hcpC*, *hemN*, *ccoP2*, *phzF2*, *oprG* genlerinin biyofilm oluşturan bakterilerde daha fazla bulunduğu belirlenmiştir (Stewart ve ark., 2015). *PA0756* ve *PA0757*'nin iki aşamalı regülatör sistemini kodladığı tahmin edilmektedir. Bu sistem bilgileri hücre dışına göndererek hücreden spesifik bir sinyal yayması ile sonuçlanmaktadır. Planktonik hücelerde *PA0756-0757* tarafından *PA0755*

tarafından kodlanan OpdH porini baskılanmaktadır. OpdH trikarboksilat alımını sağlamaktadır fakat biyofilm oluşumundaki rolü henüz bilinmemektedir. *PA0756-0757* karakterize edilmemiş hipotetik bir protein salgılanmasını kodlamakta ve bu proteinin de biyofilm kaynaklı antibiyotik direncine neden olduğu düşünülmektedir (Mikkelsen ve ark., 2011). *PA2070* ve *PA5033* de henüz fonksiyonu tanımlanamamış hipotetik bir proteini kodlamaktadır. *PA5033* tip 1 sinyal yaymakta ve *PA2070* de *TonB* kaynaklı hemoglobin reseptör ailesinde yer almaktadır. Bununla beraber, her 2 genin de biyofilm kaynaklı antibiyotik direncindeki rolü açık değildir (Zhang ve ark., 2013). Zhang ve ark. (2013) tarafından *P. aeruginosa* PA14 suşu üzerinde tobramycin, gentamicin ve ciprofloxacın antibiyotikleri için yapılan çalışmada *PA0756-0757*, *PA2070*, *PA5033* genlerinin fazla ekspresyonlarının da biyofilm spesifik antibiyotik direncine neden olduğu tespit edilmiştir. Manohar ve ark. (2018) bu genlerin prevalansı üzerinde çalışmışlar ve *P. aeruginosa* izolatlarının %62,5'inde *PA0756*, %62,5'inde *PA0757*, %37,5'inde *PA2070* ve %56,25'inde *PA5033* genini belirlemişlerdir. İzolatların %25'inin her 4 geni, %25'inin üç ve %18,75'inin iki gen içerdiğini saptamışlardır. Araştırmacılar dört geni de içeren suşların gentamisin, siproflaksasin, meropenem ve kolistin direnci ile ilişkisini karşılaştırmışlar ve iki suşun dört antibiyotiğe de dirençli olduğunu, geri kalan suşlardan birisinin meropeneme ve diğerinin de kolistine duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada *PA0756*, *PA0757*, *PA2070* ve *PA5033* gen varlıkları için yapılan PCR sonucunda izolatların 46 (%95,83)'sının *PA0756* ve *PA0757* genlerine, 45 (%93,75)'inin ise *PA2070* ve *PA5033* genlerine sahip olduğu belirlendi. İzolatların hepsinde söz konusu genlerden en az bir tanesinin var olduğu saptandı. Bu genlerden herhangi bir tanesini içermeyen 6 suş antibiyotik duyarlılığı yönünden değerlendirildiği zaman, 2 suşun gentamisin, siproflaksasin, meropenem ve kolistine, 1 suşun gentamisin ve siproflaksasine, 1 suşun gentamisin, siproflaksasin ve kolistine, 1 suşun gentamisin ve kolistine, 1 suşun siproflaksasin ve kolistine duyarlı olduğu belirlendi. Tüm bulgular değerlendirildiği zaman incelenen genler ile antibiyotik dirençlilik arasında bir ilişki kurulamadı.

Patojenlerin dağılımı ve yakınlıkları ile beraber bakteriyel infeksiyonların epidemiyolojisinin belirlenmesi, infeksiyonlardan korunma için etkili kontrol stratejilerinin oluşturulması için temel bir hedeftir (Nazik ve ark., 2007). Bakterilerin tiplendirilmesinde geleneksel serotiplendirme, faj tiplendirme, bakteriyosin tiplendirme

ve biyotiplendirme gibi fenotipik metotlar çevresel faktörlerden daha çok etkilendiği için, son yıllarda PCR tabanlı metotlar ile beraber ribotiplendirme ve değişken alanlı jel elektroforezi (PFGE)'ni de içeren moleküler yöntemler tercih edilmektedir. Genel olarak moleküler metotlar fenotipik metotlara göre daha yüksek ayırım gücü ve güvenilirliğe sahiptir. *P. aeruginosa* suşlarının karakterizasyonu için literatürde birçok metot tanımlanmıştır. Bu metotlardan PFGE spesifite ve sensitivite yönünden “altın standart” olarak kabul edilmektedir. Bununla beraber, pahalı ve zaman alıcı bir yöntemdir. PCR-tabanlı yöntemlerden Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) ve tekrarlayan enterobakteriyel intergenik konsensus (ERIC)- PCR son yıllarda basit, hızlı, duyarlı, ucuz ve kısa zamanda sonuç vermesi yönünden epidemiyolojik çalışmalarda tercih edilen bir yöntemdir. Bu hızlı metot *P. aeruginosa* için ayırım gücü PFGE kadar yüksek olması nedeniyle tavsiye edilmektedir (Mahenthiralingam ve ark., 1996; De Vos ve ark., 1997). Nanvazadeh ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada *P. aeruginosa* izolatları arasında %18 polimorfizm saptadıklarını ve suşların 9 farklı genotipte olduklarını belirlemişlerdir. Akjani ve ark. (2011) *P. aeruginosa* suşlarının 5-11 genotipe ayırdıklarını bildirmişlerdir Nazik ve ark. (2007) ise *P. aeruginosa* suşlarının %43 polimorfizm ile 21 genotip gösterdiklerini saptamışlardır. Lima ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmada *P. aeruginosa* klinik izolatları incelenmiş ve ERIC-PCR ile %24-100 arasında genetik yakınlık olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada her üç yöntemle de biyofilm pozitif olduğu belirlenen 24 adet izolatın filogenetik yakınlıklarının belirlenmesi için ERIC-2 primerinin kullanıldığı RAPD-PCR gerçekleştirildi. RAPD-PCR sonucunda elde edilen bant profilinin temel alındığı dendrograma göre her üç yöntem ile biyofilm pozitiflik görülen izolatların filogenetik yakınlıklarının %56-93 olduğu, %37 polimorfizm gösterdikleri ve 24 farklı genotipte oldukları belirlendi.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bakterilerin biyofilm oluşturmaları ve buna bağlı olarak da antibiyotik direnç oranlarındaki artış güncel bir halk sağlığı sorunu olarak ortaya çıkmaktadır. Özellikle *P. aeruginosa* infeksiyonları bu sorunun en önemli örneklerindedir. Bu tez çalışması çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş olan ve Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonunda mevcut olan *P. aeruginosa* izolatlarında biyofilm varlığının ve antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi ile beraber her iki fenotipik determinantta rol oynayan ilişkili genlerin saptanarak, aralarındaki ilişkinin karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir.

İzolatların biyofilm oluşturma durumları CRA, Christensen ve Mikroplak yöntemleri ile araştırıldı. CRA metoduna göre 40 (%83,33), Christensen Yöntemine göre 45 (%93,75) ve Mikroplak Yöntemine göre 31 (%64,58) izolatın biyofilm üretme yeteneğine sahip olduğu belirlendi. En yüksek pozitifliğin Christensen yöntemi ile belirlendiği ve bu yöntemin *P. aeruginosa* suşlarında biyofilm saptamak için tercih edilebileceği görüldü. İzolatların %50'si yöntemlerin her 3'ü ile de pozitif sonuç verdi. Yöntemlerin herhangi birisi ile pozitif sonuç verme durumu göz önüne alındığında izolatlardaki biyofilm pozitifliği %97,92 olarak belirlendi. Bu bulgular klinik örnek izolatu *P. aeruginosa* suşlarında yüksek oranda biyofilm pozitifliği olduğunu gösterdi.

P. aeruginosa izolatlarının 6 farklı antibiyotik grubuna ait 8 antibiyotik için direnç oranlarının değerlendirilmesi sonucunda, izolatların %45,83'ü 3 ve daha fazla antibiyotik grubuna direnç göstermesi nedeniyle çoklu dirençli olarak değerlendirildi. Bu bulgular çoklu antibiyotik direncinin *P. aeruginosa* suşlarında yüksek oranda olduğunu gösterdi.

Biyofilm pozitifliği ve çoklu antibiyotik direnci karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde, biyofilm pozitif suşlarda çoklu antibiyotik direnci %37,5 iken biyofilm negatiflerde ise %54,17 olarak bulundu. Bu bulgulara göre incelenen suşlarda biyofilm ile antibiyotik direnci arasında bir ilişki belirlenemedi.

İzolatlarda biyofilm üretiminden sorumlu olan *pelA*, quorum sensing genleri olan *lasI*, *lasR*, *rhlI*, *rhlR* ile biyofilme bağlı antibiyotik direncinden sorumlu olan *PA0756*, *PA0757*, *PA2070* ve *PA5033* gen varlıkları ile biyofilm üretimi ve antibiyotik

dirençlilikleri karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde, parametreler arasında bir ilişki tespit edilemedi.

Sonuç olarak, klinik izolatu *P. aeruginosa* suşlarında biyofilm üretiminin ve çoklu antibiyotik direncinin yüksek olduğu belirlendi. Genetik düzeyde ise incelenen genlerin tek başına biyofilm oluşumundan ve buna bağlı antibiyotik direncinden sorumlu olmadığı saptandı. Bu durum farklı ve daha fazla genetik ve fenotipik parametrenin biyofilme bağlı antibiyotik direncinden sorumlu olabileceğini düşündürdü. Bu sonuçlar, ilgili parametrelerin belirlenmesi ve biyofilme bağlı antibiyotik direnç mekanizmalarının aydınlatılması için daha geniş ve ileri düzeyde çalışmalar yapılma gerekliliğini gösterdi.



KAYNAKLAR

- Aboushleib HM, Omar HM, Abozahra R, Elsheredy A, Baraka K. Correlation of quorum sensing and virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Egypt. J Infect Dev Ctries 2015;9:1091–1099.
- Adams MD, Nickel GC, Bajaksouzian S. Resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii* associated with mutations in the PmrAB two-component system. Antimicrob Agent Chemother 2009;53:3628–3634.
- Akanji BO, Ajele JO, Onasanya A, Oyelakin O. Genetic fingerprinting of *Pseudomonas aeruginosa* involved in nosocomial infection as revealed by RAPD-PCR markers. Biotechnol 2011;10(1):70–77.
- Akduman AE, Karadeniz A, Balıkçı A, Eren TA. Klinik örneklerinden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. Maltepe Tıp Derg 2013; 5(3): 12–16.
- Aktepe OC, Aşık G, Çetinkaya Z. Klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2010;40:225–231.
- Amorena B, Gracia E, Monzon M, Leiva J, Oteiza C, Perez M, Alabart JL, Hernandez-Yago J. Antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* in biofilms developed in vitro. J Antimicrob Chemother 1999;44:43–55.
- Atshan SS, Shamsudin MN, Lung LT, Sekawi Z, Ghaznavi-Rad E, Pei CP. Comparative characterisation of genotypically different clones of MRSA in the production of biofilms. J Biomed Biotechnol 2012; 2012:417–427.
- Aydoğan H, Kucukaraaslan A, Saraçlı MA, Ozyurt M, Başustaoğlu A. GATA Mikrobiyoloji Kliniğinde izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında antibiyotik direnç durumları, [özet p-12/10] XXIX. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Program ve Özet Kitabı, 2000; p.376.
- Berктаş M, Güdücüoğlu H, Çıkman A, Parlak M, Yaman G. Nozokomiyal *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında indüklenebilir beta-laktamaz aktivitesi. Fırat Tıp Derg 2011;16(3):125–128.
- Birengel S, Kurt H, Tekeli E. Nozokomiyal patojenler olarak izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antimikrobiyal dirençlilikleri [özet p-10/26]. X. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi Program Kitabı, 2001; s:271.

- Bothwell MR, Smith AL, Phillips T. Recalcitrant otorrhea due to *Pseudomonas* biofilm. Otolaryng. Head Neck 2003;129:599–560.
- Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA. *Pseudomonas, Acinetobacters, & uncommon Gram-negative bacteria*. In: Jawetz, Melnick, & Adelberg's medical microbiology. Eds: Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, 24th ed. USA: The McGraw-Hill Companies, 2007;p. 263–267.
- Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. The calgary biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. J Clin Microbiol 1999;6(37):1771–1776.
- Cesur S, Albayrak F, Birengel S, Kolcu Z, Tekeli E. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının karbapenem ve diğer beta-laktam antibiyotiklere duyarlılıkları. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2002;33:203.
- Cheng K, Smyth RL, Govan JRW. Spread of beta-lactam resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis clinic. Lancet 1996;348:36.
- Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: A quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. J Clin Microbiol 1985;22(6):996–1006.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 17th informational supplement. Approved Standard MS100-S17. Wayne, PA, USA, 2018; Vol.27, No.1.
- Colvin KM, Gordon VD, Murakami K, Borlee BR, Wozniak DJ, Wong GC, Parsek MR. The Pel Polysaccharide can serve a structural and protective role in the biofilm matrix of *Pseudomonas aeruginosa*. PLoS 2011;7(1):e1001264.
- Colvin KM, Alnabelseya N, Baker P, Whitney JC, Howell PL, Parsek MR. *PelA* deacetylase activity is required for Pel polysaccharide synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 2013;195:2329–2339.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial Biofilms: A common cause of persistent infections. Science 1999;284:1318–1322.
- Coşar M, Tuncer İ, Arslan U. Kan kültürlerinde üreyen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotik direnç profili. İnfeks Derg 2009;23(2):47–50.

- Cusack TP, Ashley EA, Ling CL, Rattanavong S, Roberts T, Turner P, Wangrangsimakul T, Dance DAB. Impact of CLSI and EUCAST breakpoint discrepancies on reporting of antimicrobial susceptibility and AMR surveillance. *Clin Microbiol Infect* 2019;25(7):910–911.
- Çakır FÖ, Yüksek S, Akyan ŞB, Çağlar K. Klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas* izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları. *ANKEM Derg* 2003;17(2):98.
- Çelik İ, Cihangiroğlu M, Akbulut A. Hastane kökenli *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında indüklenebilir beta-laktamaz sıklığı. *Fırat Tıp Derg* 2007;12(4):284–286.
- Çiftçi İH, Çetinkaya Z, Aktepe OC, Arslan F, Altındış M. Klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2005;35(2):98–102.
- Çoban AY, Çiftçi A, Onuk EE, Erturan Z, Çaycı TY, Durupınar B. Kistik fibrozlu hastalardan izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının biyofilm oluşturma yeteneklerinin araştırılması ve bu özelliğin genotip ve antibiyotik duyarlılığı ile ilişkisinin belirlenmesi. *Mikrobiyol Bül* 2009;43:563–573.
- DeVos D, Lim JrA, Pirnay JP, Duinslaeger L, Revets H, Vanderkelen A. Analysis of epidemic *Pseudomonas aeruginosa* isolates by isoelectric focusing of pyoverdine and RAPD-PCR: modern tools for an integrated anti-nosocomial infection strategy in burn wound centres. *Burns* 1997;23(5):379–386.
- Delissalde F, Amabile Cuevas CF. Comparison of antibiotic susceptibility and plasmid content, between biofilm producing and non-producing clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agent* 2004;24(4):405–408.
- Donlan RM, Casterton JW. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002;15(2):167–193.
- Donlan RM. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 2002;8(9):881–890.
- Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trend Microbiol* 2003;11:30–36.
- Drlica K, Zhao X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev* 1997;61:377–392.

- Dunne WM, Hardin DJ. Use of several inducer and substrate antibiotic combinations in a disk approximation assay format to screen for AmpC induction in patient isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp. *Citrobacter* spp. and *Serratia* spp. J Clin Microbiol 2005;43(12):5945–5949.
- Ekincioglu P, Perçin D. Klinik *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının antibiyotiklere duyarlılık durumu. J Health Sci 2013;22(2):141–149.
- Erdem B. Hastane infeksiyonlarına yol açan bakteriler. In: Temel ve klinik mikrobiyoloji. Eds: Ustaçelebi Ş. Ankara: Güneş Basımevi, 1999; p:733–737.
- Ertürk A, Çiçek AÇ, Köksal E. Yoğun bakım ünitesinde yatan hastaların çeşitli klinik örneklerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları. ANKEM Derg 2012;26:1–9.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. 2018; Erişim adresi: <http://www.eucast.org>, Son Erişim Tarihi: 20.11.2019.
- European Antimicrobial Resistance Surveillance System. EARSS Annual Report 2007. Bilthoven, RIVM; October 2007.
- Eyigör M, Telli M, Tiryaki Y, Okulu Y, Aydın N. Yatan hastalardan izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. ANKEM Derg 2009;23(3):101–105.
- Falagas ME, Bakossi A, Pappas DV, Holevas VP, Bauras A, Stamata E. Secular trends of blood isolates in patients from a rural area population hospitalized in tertiary center in a small city in Greece. BMC Microbiol 2006;6:41.
- Falagas ME, Falagas SK. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. Clin Infect Dis 2005;40:1333–1341.
- Fidan I, Çetin Gürelik F, Yüksel S, Sultan N. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci ve metallo-beta-laktamaz sıklığı. ANKEM Derg 2005;19:68–70.
- Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. Nat Rev Microbiol 2010;8:623–633.

- Franklin MJ, Nivens DE, Weadge JT, Howell PL. Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* extracellular polysaccharides, alginate, Pel, and Psl. *Front Microbiol* 2011;2:167.
- Friedman L, Kolter R. Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Mol Microbiol* 2004;51:675–690.
- Giamarellou H. Multidrug-resistant gram-negative bacteria: how to treat and for how long. *Int J Antimicrob Agents* 2010;36:50–54.
- Gilardi GL. *Pseudomonas* and Related Genere. In: *Manuel of Clinical Microbiology*. Eds: Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, 5th ed. Washington DC: ASM Press, 1991;p:448–457.
- Girard G, Bloemberg G. Central role of quorum sensing in regulating the production of pathogenicity factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Fut Microbiol* 2008;3(1):97–106.
- Göktaş U, Yaman G, Karahocagil MK. Anestezi yoğun bakım ünitesinde hastane enfeksiyonu etkenleri ve direnç profilinin değerlendirilmesi. *Turk Yogun Bakım Dern Derg* 2010;8:13–17.
- Gültepe B, Iraz M, Ceylan A, Doymaz MZ. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotiklere direnci. *ANKEM Derg* 2014;28(1):32–36.
- Gürbüz A, Akbaş P. Sığır pnömonik akciğerlerinden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi. *Caucasian J Sci* 2015;2:1–5.
- Güven Ö, Ünver D, Özdemir S. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinin antibiyotiklere duyarlılıkları ve beta-laktam direnç fenotipleri. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2008;38:112–116.
- Hariharan H, Sylvester EB, Matthew V. Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from dogs in Grenada. *West Indian Vet J* 2009;9(2):1–3.
- Høiby N, Ciofu O, Johansen HK. The clinical impact of bacterial biofilms. *Int J Oral Sci* 2011;3(2):55–65.

- Hosain MG, Saha S, Rahman MM, Singha JK, Mamun AA. Isolation, identification and antibiogram study of *Pseudomonas aeruginosa* from cattle in Bangladesh. J Vet Adv 2013;3(7):180–185.
- Jawetz E, Melnick J, Adelberg AE. Tibbi Mikrobiyoloji (O. Ş. Yemen, Çev.). Ankara: Nobel Tıp Kitabevi, 2010.
- Jennings LK, Storek KM, Ledvina HE, Coulon C, Marmont LS, Sadovskaya I, Secor, PR, Tseng BS, Scian M, Filloux A, Wozniak DJ. Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. Proc Natl Acad Sci 2015;112:11353–11358.
- Kamel GM, Ezz elden NA, El-Mishad MY, Ezzat RF. Subceptibility pattern of *Pseudomonas aeruginosa* against antimicrobial agents and some plant extracts with focus on its prevalence in different sources. Glob Vet 2011;6(1):61–72.
- Karatuna O, Yagci A. Analysis of quorum sensing-dependent virulence factor production and its relationship with antimicrobial susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* respiratory isolates. Clin Microbiol Infect 2010;16:1770–1775.
- Karlowsky JA, Jones ME, Draghi DC, Thornsberry C, Sahm DF, Volturo GA. Prevalence and antimicrobial susceptibilities of bacteria isolated from blood cultures of hospitalized patients in the United States in 2002. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2004;10:3–7.
- Karray H, Hammami A, Mahjoubi F, Bouaziz M, Damak J, Jeddi HM. *In vitro* study of the sensitivity to antibiotics of 213 *P.aeruginosa* strains isolated in an intensive care unit of Sfax Hospital. Pathol Biol 1993;41:307.
- Kart YK, Aybar BY, Pehlivanoglu F, Sengoz G. Stafilokok suşlarında slaym faktör pozitifliği, metisilin ve antibiyotik direnci. ANKEM Derg 2011;25(2):89–93.
- Keskin O, Tel OY, Arserim NB. Bir sığırcılık işletmesinde çoklu antibiyotik dirençli *Pseudomonas aeruginosa* epidemisi. Dicle Üniv Vet Fak. Derg 2012;1(5):30–33.
- Kumar MA, Anandapandian KTK, Parthiban K. Production and characterization of exopolysaccharides (EPS) from biofilm forming marine bacterium. Braz Arch Biol Technol 2011;54(2):259–265.
- Leriche V, Sibille P, Carpenter B. Use of an enzyme-linked lectin sorbent assay to monitor the shift in polysaccharide composition in bacterial biofilms. Appl Environ Microbiol 2000;66(5):1851–1856.

- Li J, Turnidge, J, Milne R, Nation RL, Coulthard K. *In vitro* pharmacodynamic properties of colistin and colistin methanesulfonate against *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:781–785.
- Li J, Nation RL, Turnidge JD, Milne RW, Coulthard K, Rayner CR. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Lancet Infect Dis* 2006;6:589–601.
- Lima JLC, Alves LR, Jacomé PRLAo, Neto JPB, Maciel MAVa, deMoraes MMC. Biofilm production by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and structural changes in LasR protein of isolates non biofilm-producing. *Braz J Infect Dis* 2018;22(2):129–136.
- Lindsay D, von Holy A. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *J Hosp Infect* 2006;64:313–325.
- Maeda K, Kobayashi Y, Oie S. Antimicrobial effects of drugs against multi drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Biol Pharm Bull* 2008;31(10):1898–1901.
- Mahenthiralingam E, Campbell ME, Foster J, Lam JS, Speert DP. Random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 1996;34(5):1129–1135.
- Maita P, Boonbumrung K. Association between biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates versus antibiotic resistance and genes involved with biofilm. *J Chem Pharmaceut Res* 2014;6(5):1022–1028.
- Manohar P, Shanthini T, Philip RA, Ramkumar S, Kale M, Ramesh N. Role of biofilm-specific antibiotic resistance genes *PA0756-0757*, *PA5033* and *PA2070* in *Pseudomonas aeruginosa*. *bioRxiv preprint* 2018;1:1–10. <http://dx.doi.org/10.1101/341826>.
- Marcinkiewicz J, Strus M, Pasich E. Antibiotic resistance: a “dark side” of biofilm associated chronic infections. *Pol Arch Med Wewn* 2013;123(6):309–313.
- Mayer KH, Opal SM, Medeiros AA. Mechanisms of antibiotic resistance. In: *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Eds: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, 4th ed. New York: Churchill Livingstone, 1995; p:212–224.

- Mikkelsen H, Sivaneson M, Filloux A. Key two-component regulatory systems that control biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* 2011;13:1666–1681.
- Milivojevic D, Šumonja N, Medic S, Pavic A, Moric I, Vasiljevic B, Senerovic L, Nikodinovic-Runic J. Biofilm-forming ability and infection potential of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from animals and humans. *Pathog Dis* 2018;76(4):fty041.
- Moffatt JH, Harper M, Harrison P. Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:4971–4977.
- Moore NM, Flaws ML. Epidemiology and pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Clin Lab Sci* 2011;24:43–46.
- Moskowitz SM, Jessica MF, Emerson JM, Emerson JC, Gibson RL, Burns JL. Use of *Pseudomonas* biofilm susceptibilities to assign simulated antibiotic regimens for cystic fibrosis airway infection. *J Antimicrob Chemother* 2005;56:879–886.
- Nanvazadeh F, Khosravi AD, Zolfaghari MRPN. Genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients by RAPD-PCR. *Burns* 2013;39:1409–1413.
- Nazik H, Ongen B, Erturan Z, Salcioglu M. Genotype and antibiotic susceptibility patterns of *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from cystic fibrosis patients. *Jpn J Infect Dis* 2007;60:82–86.
- Nivens DE, Ohman DE, Williams J, Franklin MJ. Role of alginate and its O-acetylation in formation of *Pseudomonas aeruginosa* microcolonies and biofilms. *J Bacteriol* 2001;183(3):1047–1057.
- Oie S, Fukui Y, Yamamoto M, Masuda Y, Kamiya A. In vitro antimicrobial effects of aztreonam, colistin, and the 3-drug combination of aztreonam, ceftazidime and amikacin on metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Infect Dis* 2009;10(9):123.
- Oldacay M, Oldacay S, Erdem G. Hastane infeksiyonu etkeni olan *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında kromozomal beta-laktamaz yapımı. *İnfeksi Derg* 2003;17:197–199.

- Olejnickova K, Hola V, Ruzicka F. Catheter-related infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: virulence factors involved and their relationships. *Pathogen Dis* 2014;72:87–94.
- Özan M. Ankara garnizonundaki askeri birliklerin içme sularında membran filtrasyon tekniği ile *Pseudomonas aeruginosa*'nın izolasyonu ve identifikasyonu üzerine araştırmalar. A.Ü. Sağlık Bil. Ens. Bilim Uzmanlığı (Yüksek Lisans) Tezi, Ankara, 1996.
- Özyurt M, Haznedaroğlu T, Baylan O, Hoşbul T, Ardıç N, Bektöre B. Yatan hastalardan izole edilen *Pseudomonas* izolatlarında antibiyotik direnci. *ANKEM Derg* 2010;24(3):124–129.
- Palleroni NJ. *Pseudomonaceae* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol.1, Ed.Krigr,N.R., Holt,J.G., et al.9th ed. The williams and Wilkins Company, Baltimore, 1984;p:114–199.
- Perez LR, Costa MC, Freitas AL, Barth AL. Evaluation of biofilm production by *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered fromcystic fibrosis and non-cystic fibrosis patients. *Braz J Microbiol* 2011;42:476–479.
- Pitt TL, Simpson AJH. *Pseudomonas* and *Bulksolderia* spp. In: Principles and practice of clinical bacteriology. Eds: Gillespie SH, Hawkey PM, 2th ed. UK: John Wiley and Sons Ltd, 2006;p:427–435.
- Pollack M. Mandell: Principles and Practice of Infectious Diseases,5 th ed., Copyright Churchill Livingstone,Inc, 2000;p:543.
- Preez JH. Bovine mastitis therapy and why it fails. *J South Afr Vet Assoc* 2000;71:201–208.
- Pye CC, Yu AA, Weese JS. Evaluation of biofilm production by *Pseudomonas aeruginosa* from canine ears and the impact of biofilm on antimicrobial susceptibility *in vitro*. *Vet Dermatol* 2013;24(4):446–449.
- Sabharwal N, Dhall S, Chhibber S, Harjai K. Molecular detection of virulence genes as markers in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from urinary tract infections. *Int J Mol Epidemiol Genet* 2014;5:125–134.
- Sader HS, Jones RN, Andrade-Baiocchi S, Biedenbach DJ. The SENTRY Participants Group (Latin Amerika). Four-year evaluation of frequency of occurrence and

- antimicrobial susceptibility patterns of bacteria from bloodstream infections in Latin American medical centers. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002;44(3):273–280.
- Saiman L, Marshall BC, Mayer-Hamblett N, Burns JL, Quittner AL, Cibene DA, Coquillet S, Fieberg AY, Accurso FJ, Campbell PW. Azithromycin in patients with cystic fibrosis chronically infected with *Pseudomonas aeruginosa*: a randomized controlled trial. *JAMA* 2003;290(13):1749–1756.
- Sakarya S. Biyofilm yapısı ve infeksiyon hastalıklarının virülans ve tedavisindeki rolü. *Klinik Derg* 2005;18(1):3–8.
- Salomonsen CM. Hemorrhagic pneumonia in mink caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Kgs. Lyngby:Technical University of Denmark (DTU) 2012.
- Sanders CC. Beta-lactamases of gram-negative bacteria: new challenges for new drugs. *Clin Infect Dis* 1992;14(5):1089–1099.
- Scott A, Pottenger S, Timofte D, Moore M, Wright L, Kukavica-Ibrulj I, Jeukens J, Levesque RC, Freschi L, Pinchbeck GL, Schmidt VM, McEwan N, Radford AD, Fothergill JL. Reservoirs of resistance: polymyxin resistance in veterinary-associated companion animal isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Vet Rec* 2019;185(7):206.
- Shaw BG, Latty JB. A numerical taxonomy study of *Pseudomonas* strains from spoiled meat. *J Appl Bacteriol* 1982;52:219–228.
- Spilker T, Coenye T, Vandamme P, LiPuma JJ. PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 2004;42:2074–2079.
- Starkey M, Gray KA, Chang SI, Parsek M. The EPS matrix of bacterial biofilms. *ASM Pres.* 2004; pp:174–191.
- Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods* 2000;40:175–179.
- Stewart PS, Franklin MJ, Williamson KS, Folsom JP, Boegli L, James GA. Contribution of stress responses to antibiotic tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:3838–3847.

- Strateva T, Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa* a phenomenon of bacterial resistance. J Med Microbiol 2009;58(9):1133–1148.
- Sutherland WI. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. Microbiol 2001;147:3–9.
- Şenol E. Siprofloksasin. ANKEM Derg 2002;16(3):382–384.
- Tateda K, Comte R, Pechere JC, Köhler T, Yamaguchi K, Van Delden C. Azithromycin inhibits quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 2001;45(6):1930–1933.
- Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. Amer J Med 2006;119:S3–S10.
- Tunçoğlu E, Yenişehirli G, Bulut Y. Klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci, ANKEM Derg 2009;23(2):54–58.
- Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi (UAMDSS) Erişim adresi: <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/uamdss>, Son Erişim Tarihi: 20.11.2019.
- Ustaçelebi Ş, Mutlu G, Cengiz AT, Tümbay E, Mete Ö. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Güneş Kitabevi, Ankara 1999;s:84.
- Vahaboğlu H, Akhan S. *Pseudomonas aeruginosa* ve diğer pseudomonas türleri. In: Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi. Eds: Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M, 3th ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2008; p:2175–2186.
- Versalovic J, Koeuth T, Lupski R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nuc Acid Res 1991;19(24):6823–6831.
- Vu B, Chen M, Crawford RJ, Ivanova EP. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. Molecule 2009;14:2535–2554.
- Wand ME, Bock LJ, Turton JF, Nugent PG. *Acinetobacter baumannii* virulence is enhanced in *Galleria mellonella* following biofilm adaptation. J Med Microbiol 2012;61:470–477.
- Watnick P, Kolter R. Biofilm city of microbes. J Bacteriol 2000;182(10):2675–2679.

- White Friedrich L, Burgess D, Warkentin D, Bosso J. Comparative *in vitro* pharmacodynamics of imipenem and meropenem against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40(4):904–908.
- Whiteley M, Bangera MG, Bumgarner RE, Parsek MR. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* 2001;413:860.
- Winn WC Jr, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schreckenberger PC, Woods GL. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 6th ed. USA: Philadelphia, Lippincott Williams Wilkins, 2006;p:317–323.
- Wolska MK, Bukowski K, Jakubczak A. Occurrence of beta-lactamase type ESBL and IBL in *Pseudomonas aeruginosa* rods. *Katedra Mikrobiologii Akademii Podlaskiej w Siedlcach*. US National Library of Medicine National Institutes of Health. *Med Dosw Mikrobiol* 2001;53(1):45–51.
- Yapıcı O, Akgüneş A, Akgül S, Ekinci B, Pekintürk NS. Change in the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains which were isolated, over the years. *Med J Mugla Sitki Kocman Univ* 2018;5(1):1–4.
- Yassein M, Khardori N, Ahmady A, Toama M. Modulation of biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* by quinolones. *Antimicrob Agernt Chemother* 1995;39(10):2262–2268.
- Yıldırım N, Sezen Y, Ardıç N, İleri Ç. Farklı klinik örneklerden izole edilen koagülaz-negatif stafilkokların slime faktör üretimlerinin ve bazı antibiyotiklere duyarlılıklarının araştırılması. *İnfek Derg* 2008;22(4):209–214.
- Yılmaz S. Çeşitli Klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antimikrobiyel ajanlara duyarlılığı. *Yüzüncüyıl Üniv Sağ Bil Enst Yüksek Lisans tezi*, Van, 1999.
- Yucesoy M, Biberöglü K, Yuluğ N. İnfeksiyon etkeni Gram negatif bakterilerin antibiyotik duyarlılık paternlerinin E-test ile araştırılması. *İnfek Derg* 1996;10:229.
- Yüce A. Antimikrobik ilaçlara direnç kazanma mekanizmaları. *Klinik Derg* 2001;2:41–46.
- Zhang L, Fritsch M, Hammond L, Landreville R, Slatculescu C. Identification of genes involved in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm-specific resistance to antibiotics. *PLoS ONE* 2013;8(4):e61625.

ÖZ GEÇMİŞ

Adı Soyadı : Servet EKSELLİ
Doğum Yeri : Erbaa/Tokat
Doğum Tarihi : 05.10.1983
Medeni Hali : Evli
Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

Eğitim Durumu :

İlköğretim : Fevzi Çakmak İlkokulu 1990-1994
Ortaöğretim : Erbaa Ortaokulu 1995-1998
Lise : Erbaa Coşkun Önder Yabancı Dil Ağırlıklı Lise 1998-2001
Lisans : Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi 2002-2008

Çalıştığı Kurumlar :

Tarım Ve Orman Bakanlığı, Niksar İlçe Tarım Müdürlüğü 2011-2012
Tarım Ve Orman Bakanlığı, Erbaa İlçe Tarım Müdürlüğü 2012-...

E-posta : servetex50@gmail.com