ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PCR KISITLAMA FRAGMAN UZUNLUĞU POLİMORFİZMİ VE VİRÜLANS FAKTÖRÜ GENİNİN DNA SIRASI ANALİZİNE DAYANAN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*'UN MOLEKÜLER ÇALIŞMASI

Rana Hasan Ali ALI

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2022

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Rana Hasan Ali ALI tarafından hazırlanan **"PCR Kısıtlama Fragman Uzunluğu Polimorfizmi ve Virülans Faktörü Geninin DNA Sırası Analizine Dayanan *Staphylococcus aureus*'un Moleküler Çalışması"** adlı tez çalışması 05/01/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman **:** Dr. Öğr. Üyesi İlkay ÇORAK ÖCAL

Eş Danışman **:** Dr. Najeeb Muhammed HUSEYİN

Jüri Üyeleri **:**

Başkan **:** Dr. Öğr. Üyesi Pınar ARSLAN
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye **:** Dr. Öğr. Üyesi Selin ÖZKAN KOTİLOĞLU
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi

Üye **:** Dr. Öğr. Üyesi İlkay Çorak ÖCAL
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. İbrahim ÇİFTÇİ

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum "**PCR Kısıtlama Fragman Uzunluğu Polimorfizmi ve Virülans Faktörü Geninin DNA Sırası Analizine Dayanan *Staphylococcus aureus*'un Moleküler Çalışması**" konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan "Bilimsel İntihal Tespit Programı"yla tarandığını, "intihal içermediğini" beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim (05/01/2022).

Rana Hasan Ali ALI

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

PCR KISITLAMA FRAGMAN UZUNLUĞU POLİMORFİZMİ VE VİRÜLANS FAKTÖRÜ GENİNİN DNA SIRASI ANALİZİNE DAYANAN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*'UN MOLEKÜLER ÇALIŞMASI

Rana Hasan Ali ALI

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi İlkay ÇORAK ÖCAL
Eş Danışman: Dr. Najeeb Muhammed HUSEYİN

Çalışma *S.aureus* bakterisinin varlığını araştırmak için Ramadi şehrinde 165 klinik numuneden 100 örnek toplanmıştır. İzolasyon kaynağına göre deriden 45, yaradan 32, kandan 17 ve idrardan 6 numune alınmıştır. Sonuçlar, *S.aureus*'un deri örneklerinde en yüksek yüzdesinin %45 olduğunu göstermektedir. Çalışmada Amikasin, Amoksisilin, Ampisilin, Eritromisin, Gentamisin, Klindamisin, Kloramfenikol, Penisilin, Sefoksitin, Siprofloksasin, Trimetoprim ve Vankomisin olmak üzere 12 çeşit antibiyotik için seçilen bakteri izolatlarına ve seçilen patolojik izolatlara karşı duyarlılık testi yapılmıştır. Test sonuçları Penisilin için %99, Ampisilin için %91 ve Trimetoprim için %85 ile bu antibiyotiklerin üç tipine oldukça dirençli olduğunu göstermektedir. Çalışmadaki diğer antibiyotikler için izolatların dirençleri farklılık göstermekle birlikte Vankomisin'e %99 Kloramfenikol'e %79 duyarlı olduğu görülmektedir. Çalışmada ayrıca izolatların genetik dizisini incelemek amacıyla, seçilen bakteri izolatları mecA ve pvl'den genomik DNA ekstrakte edilmiştir. MecA geninin analiz edilen 100 örneğin 64'ünde bulunduğu ve orantısal olarak %64'e tekabül ettiği ortaya çıkmıştır. Kısıtlama Fragman Uzunluğu Polimorfizmi (RFLP) yaklaşımı, PCR alanlarının genetik içeriğinin çeşitliliğini doğrulamak için kullanılmakla birlikte coa ve spa genlerinin amplifikasyonu, coa geni ve spa geninin varlığı, bu genlerin spesifik primerleri kullanılarak ayrılmış *S. aureus* suşlarında araştırılmıştır. Her iki gen için 575 bp bandının görülmesi amaçlanmıştır. Sonuç olarak her birinin iki amplifikasyon paternine sahip olduğu ve genlerin farklı PCR ürün boyutlarına sahip olduğu belirlenmiştir. Coa geni için sırasıyla 405, 810 ve 891 bp değerleri gözlenirken, Spa geni için 240, 1200 ve 1296 bp değerleri görülmüştür.

2022, 66 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: *Staphylococcus aureus*, Antibiyotik direnci, Virülans faktörleri, Ramadi, Iraq

ABSTRACT

Master of Science Thesis

MOLECULAR STUDY OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* BASED ON PCR RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM AND DNA SEQUENCE ANALYSIS OF THE ONE OF VIRULENCE FACTOR GENE

Rana Hasan Ali ALI

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

Advisor: Asst. Prof. Dr. İlkay ÇORAK ÖCAL
Co-Advisor: Dr. Najeeb Muhammed HUSEYİN

The current study involved collecting 100 of 165 clinical samples in the city of Ramadi to investigate the presence of S.aureus bacteria. According to the isolation source, 45 samples were taken from the skin, 32 from the wound, 17 from the blood and 6 from the urine. The results show that the highest percentage of S.aureus in skin samples is 45%. In the study, susceptibility tests were performed against selected bacterial isolates and selected pathological isolates for 12 types of antibiotics, namely Amikacin, Amoxicillin, Ampicillin, Erythromycin, Gentamicin, Clindamycin, Chloramphenicol, Penicillin, Cefoxitin, Ciprofloxacin, Trimethoprim and Vancomycin. Test results show that it is highly resistant to all three types of these antibiotics, with 99% for Penicillin, 91% for Ampicillin and 85% for Trimethoprim. Although the resistance of the isolates differed for other antibiotics in the study, it was observed that they were 99% sensitive to Vancomycin and 79% to Chloramphenicol. In the study, genomic DNA was also extracted from selected bacterial isolates mecA and pvl in order to examine the genetic sequence of the isolates. It turned out that the MecA gene was present in 64 of 100 samples analyzed, corresponding to 64% proportionally. While the Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) approach is used to confirm the diversity of the genetic content of the PCR domains, the amplification of the coa and spa genes, the presence of the coa gene and the spa gene were investigated in S. aureus strains that separated these genes using specific primers. It was aimed to see the 575 bp band for both genes. As a result, it was determined that each of them has two amplification patterns and the genes have different PCR product sizes. While 405, 810 and 891 bp values were observed for the Coa gene, respectively, 240, 1200 and 1296 bp values were observed for the Spa gene.

2022, 66 pages

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Antibiotic tesistance, Virulence factors, Ramadi, Iraq

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Hayatımdaki tüm zorluklara göğüs geren, hayatımın her aşamasında bana destek olan, çalışmalarımın her aşamasında yakın ilgi ve önerileriyle bana rehberlik eden, hiçbir şeyden vazgeçmeyen en değerlilerim olan annem ve babama teşekkür ederim. Beni her zaman destekleyen tez danışman hocalarım Dr. Öğr. Üyesi İlkay ÇORAK ÖCAL ve Dr. Najeeb Muhammed HUSEYİN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Rana Hasan Ali ALI

Çankırı, Ocak 2022

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **iii**
SİMGELER DİZİNİ ..... **vi**
KISALTMALAR DİZİNİ ..... **vii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **viii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **ix**
1. GİRİŞ **1**
2. LİTERATÜR ÖZETİ **3**
2.1 *Staphylococcus aureus* ve Genel Özellikleri **3**
2.1.1 Sınıflandırma **3**
2.1.2 Epidemiyoloji **4**
2.1.3 Antibiyotik direnci **6**
2.1.4 Genom yapısı ve özellikleri **7**
2.2 Metisiline Dirençli *S. aureus* **9**
2.2.1 Epidemiyoloji **9**
2.2.2 Patofizyoloji **12**
2.2.3 Virülans faktörleri **13**
2.2.4 Metisilin Direnci **15**
2.3 Metilline Dirençli *S. aureus* İçin Tanı ve Tarama Yaklaşımları **15**
2.3.1 MRSA kaynakları **15**
2.3.2 Teşhis ve tarama yaklaşımları **16**
3. MATERYAL VE METOT **20**
3.1 Numunelerin Toplanması **20**
3.2 Malzemeler **20**
3.2.1 Ekipman ve aparat **21**
3.2.2 Kimyasal malzemeler **22**
3.2.3 Kültürel medya **23**
3.2.4 Kitler **24**
3.2.5 Antibiyotik **24**

3.3 Bakteri İzolatları.....25
3.4 Antibiyotik Duyarlılığının Araştırılması 25
3.5 DNA Ekstraksiyonu ile PCR.....26
3.6 Coa Gen ve Spa Gen PCR Ürünlerinin RFLP Denetimleri.....29
3.7 Yöntemler 30
3.7.1 Kültür ortamı.....30
3.7.2 Tanımlama testleri.....31
4. BULGULAR 35
KAYNAKLAR 46
ÖZGEÇMİŞ.....66

SİMGELER DİZİNİ

°C	Santigrat
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
mL	Mililitre

KISALTMALAR DİZİNİ

MRSA	Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*
MSA	Manitol tuzlu agar
PFGE	Darbeli alan jel elektroforezi
RFLP	Kısıtlama fragman uzunluğu polimorfizmi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* enfeksiyonunun patogenezi (Gordon and Lowy 2008).....5
Şekil 4.1 Erkek ve Kadın hastaların yaş ortalamaları 36
Şekil 4.2 *S. aureus*'un beta-hemolitik oluşumu.....36
Şekil 4.3 Mannitol tuzlu agar.....37
Şekil 4.4 Koagülaz testi 37
Şekil 4.5 Antibiyotik duyarlılığı 39
Şekil 4.6 Klinik *S. aureus* örneklerinden ekstrakte edilen 162 bp mecA geninin PCR amplifikasyon ürünlerinin %1 agaroz jel elektroforez analizi 40
Şekil 4.7 Klinik *S. aureus* örneklerinden ekstrakte edilen 575 bp pvl geninin PCR amplifikasyon ürünlerinin %1 agaroz jel elektroforez analizi 40
Şekil 4.7 Coa geni PCR ürünlerinin %2 agaroz jel elektroforez analizi.....41
Şekil 4.8 Coa geni PCR ürünlerinin %2 agaroz jel elektroforez analizi.....41
Şekil 4.9 Spa geni PCR ürünlerinin %2 agaroz jel elektroforez analizi 42
Şekil 4.10 Spa geni PCR ürünlerinin %2 agaroz jel elektroforez analizi 42

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 *Staphylococcus aureus'un* taksonomik tanımlaması....4
Çizelge 3.1 Diğer laboratuvar malzemeleri 21
Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan cihazlar ve araçlar 22
Çizelge 3.3 Kimyasalların listesi 23
Çizelge 3.4 PCR ve elektroforez malzemelerinin listesi....23
Çizelge 3.5 Kültür ortamı listesi 24
Çizelge 3.6 Çalışmada kullanılan kitler ve üreticiler....24
Çizelge 3.7 Antibiyotikler....25
Çizelge 3.8 *S. aureus* suşlarının CLSI talimatlarına göre antibiyotik duyarlılıklarının saptanmasında kullanılan antibiyotik diskleri 26
Çizelge 3.9 Kullanılan gen, primer ve referans bilgileri....28
Çizelge 3.10 Çalışmada kullanılan API Staph reaktifleri 34
Çizelge 4.1 Numune ve katılımcı yaş / cinsiyet dağılımı 35
Çizelge 4.2 *S. aureus* izolatlarının test edilen antibiyotiklere duyarlılığı....38

1. GİRİŞ

1950'lerin sonlarında geliştirilmiş olan metisilin, ilk olarak 1960 yılında klinik uygulamada kullanılmış ve Metisilin'e dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) olarak tanımlanmıştır. Günümüzde MRSA, tüm dünyada iyi bilinen bir hastalık ve ölüm kaynağı haline gelmiştir (Hookey *et al*. 1998). Patojenik organizmaların kontrolü, *Staphylococcus aureus'un* doğru ve hızlı tanımlanmasını gerektirmektedir. 1951'den beri, *Staphylococcus aureus* için dünya çapında bir bakteriyofaj tiplendirme şeması üzerinde anlaşmaya varılmış ve çok sayıda atıfta bulunulan izolatın tiplendirilmesi için uygun maliyetli bir yöntem olduğu görülmüş olsa da önemli dezavantajları olduğu görülmektedir. Reaktiflere geniş çaplı erişim kısıtlıdır ve MRSA suşları, bazı durumlarda ve dünyanın belirli bölgelerinde fajlar kullanılarak tiplendirilememektedir (Nada *et al.* 1996).

Diğer yaklaşımlar arasında plazmit analizinin sınırlamaları bulunmaktadır. Söz konusu plazmitler izolatlarda bulunmayabilir. Boyut olarak dalgalanabilir, kolayca kaybolabilir ve birçok organizma çoklu ilaca dirençli olduğundan antibiyogram şemaları sıklıkla bilgi vermemektedir (Totake *et al.* 1998). Araştırmacılar yakın zamanda DNA tabanlı suş tipleme yaklaşımlarını tanımlamıştır. Darbeli alan jel elektroforezi (PFGE) hastane salgınlarını incelemek için kullanılmıştır ve şu anda gen tipleme *S. aureus* suşları için en yetkin yaklaşım olarak kabul edilmektedir. Ancak teknik olarak zor olan PFGE pahalıdır ve bantlama modellerini yorumlamak için üzerinde anlaşmaya varılmış bir standart yoktur. Ayrıca, çoğu ulusal referans merkezi için izolatı yazmak için PFGE kullanmanın pratik olmadığı belirtilmiştir (de Oliveira *et al.* 2018).

Birleşik Krallık'taki mevcut üç EMRSA suşu olan EMRSA-3, EMRSA-15 ve EMRSA-16 ile daha küçük salgın suşlar arasında ayrım yapan koagülaz gen tabanlı bir PCR RFLP yaklaşımı PCR primerleri, 3′ değişken bölgelerden kaçınarak koagülaz geninin bileşenlerini tekrar etmiştir. Koagülaz geninin 3' değişken bölgesinden elde edilen DNA dizi verilerinin karşılaştırılması, filogenetik gruplaşmaların keşfedilmesine ve *Staphylococcus aureus'un* bazı soylarının türetilmesine izin verilmiştir (Bannerman *et al.* 1995).

Koagülaz tiplemesi, *Staphylococcus aureus* klinik izolatlarının moleküler epidemiyolojisinin belirlenmesi için bir yöntemdir. Coa gen amplifikasyonunun uzun süredir *S. aureus* tiplemesi için basit ve doğru bir yaklaşım olduğu düşünülmektedir (Mahmoudi *et al.* 2017).

Bu çalışmada MRSA suşlarında virülans faktör genlerinin PCR-RFLP tekniği ile saptanmasına odaklanılmıştır. MRSA, hastane kaynaklı, toplum kökenli veya hayvan kaynaklı olup olmadığına göre kaynaklarına göre sınıflandırılmıştır. Daha sonra tanı ve tarama yaklaşımları tartışılmıştır. MRSA tanı ve taramasına yönelik yaklaşımlar fenotipik yaklaşımlar ve genotipik yaklaşımlar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Gentopik yaklaşımlarda çeşitli PCR yöntemleri hakkında bilgi verilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, *Staphylococcus aureus'un* klinik örneklerinin farklı antibiyotiklere karşı artan direncini göstermektedir. *Staphylococcus aureus'un* genel olarak yüksek antibiyotik direncine sahip olduğu görülmektedir. pvl geni, dünyanın diğer yerlerine kıyasla Irak'ta nispeten yüksek bir sıklıkta ortaya çıkmaktadır.

Staphylococcus aureus çok yaygın olan ve sıklıkla enfeksiyonlara neden olan toksik bir bakteridir. Bu nedenle *Staphylococcus aureus'un* virülans faktörlerinin tespiti ve özellikle tanı ve teşhis yöntemlerine yönelik çalışmaların artarak devam etmesi gerekmektedir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 *Staphylococcus aureus* ve Genel Özellikleri

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) yaygın bir kommensal bakteridir. Dünyadaki insanların yaklaşık %30'u *S. aureus* tarafından kolonize edilmiştir ve bu bakteri insan vücuduna sıklıkla burun deliklerinden girmektedir (Sakr *et al*. 2018). *S. aureus* ifade ettiği birçok faktör ile yüksek kolonizasyon göstermekle birlikte enfeksiyona neden olmaktadır (Kadıoğlu *et al*. 2008). *S. aureus'un* konakçının hücrelerine ve dokularına yapışması, epitel ve endotel hücrelerini istila etmesi, bir biyofilm oluşturması ve konakçının bağışıklık tepkisinden kaçınması, bunların tümü bakterinin yüzey proteinlerinden kaynaklanmaktadır (Foster *et al*. 2014). Salgılanan yüzey proteinleri, komplemana müdahale ederek konağın bağışıklık hücrelerinin tepkisini engellemektedir ve sitolitik toksinler, nötrofillere ve diğer hücre tiplerine zarar vermektedir (Otto 2014). *S. aureus* tarafından ifade edilen çeşitli virülans faktörleri hücre yoğunluğuna bağlı olarak reaksiyona girerken, iki bileşenli sinyal iletim sistemi de çevresel etkilere yanıt veren yardımcı gen düzenleyici (Agr) tarafından kontrol edilmektedir (Tan *et al.* 2018).

Daha önce Micrococcaceae familyasının bir üyesi olarak bilinen *S. aureus*, aslında Staphylococcaceae familyasının bir üyesidir ve renkli kolonilerin oluşmasından kaynaklanmaktadır (Lindsay 2014). Suşların çoğu, gıdalarda yetiştirildiklerinde enterotoksinler salgılayarak tipik zehirlenme gıda kaynaklı hastalıklara neden olmaktadırlar. Bu bakterinin gıdalarda ve gıda işletmelerinde bulunması hijyen eksikliğinin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Ma *et al*. 2002). Mevcut çalışmada deneysel aşamada odaklanılan MRSA, hem hastane (HA-MRSA) hem de toplum (CA-MRSA) kökenli olarak görünmektedir (Tristan *et al*. 2007).

2.1.1 Sınıflandırma

S. aureus, Alman bilim adamı Friedrich Julius Rosenbach tarafından 1884 yılında tanımlanmıştır (Shiroma *et al*. 2015). *S. aureus'un* taksonomik tanımlaması Çizelge 2.1'deki gibi gösterilmektedir.

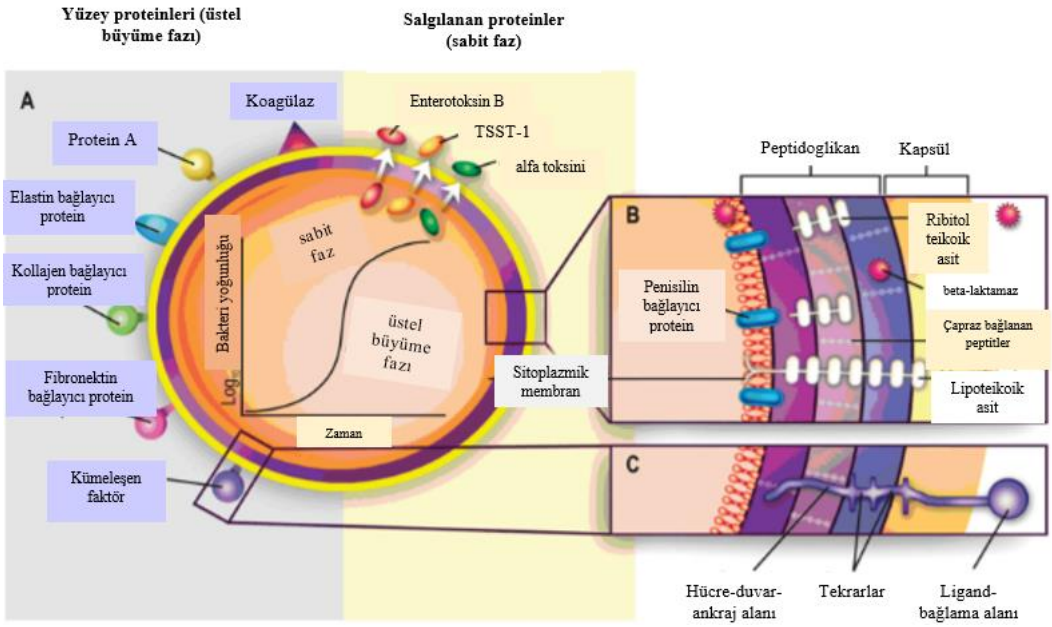
Çizelge 2.1 *Staphylococcus aureus'un* taksonomik tanımlaması

Regnum	Bakteriler
Divisio	Firmicutes
Classis	Bacilli
Ordo	Bacillales
Familia	Staphylococcaceae
Genus	*Staphylococcus*
Species	*Staphylococcus aureus*

S. aureus, düzensiz dağılımda üzüm benzeri salkımlar oluşturan, birden fazla düzlemde bölünen, spor yapmayan, hareketsiz ve küresel bir bakteridir. Bazı Staphylococcus türleri, in vitro veya in vivo olarak kapsüller oluşturabilmektedir. *S. aureus'un* hücre duvarı, immünoloji ve tanıda önemli olan Protein-A'yı içermektedir. Peptidoglikan tabakasına kovalent olarak bağlanan bu madde bakteriyi fagositoza karşı korumaktadır. Hücre duvarındaki diğer bir madde ise peptidoglikan ve sitoplazmik zarla ilişkili olan teikoik asit adı verilen bir polisakkarittir (Becker *et al*. 2014).

2.1.2 Epidemiyoloji

Dünya genelinde insan popülasyonunun yaklaşık %20 - %30'u kalıcı taşıyıcı konumunda iken, popülasyonun geri kalanında düşük düzeyde taşıyıcılar gözlenmektedir (van Belkum *et al*. 2009). *S.aureus* gibi temas, sıvı damlama vasıtasıyla cilde aktarılan bakteriler taşıyıcıdır ve vücudun diğer bölgelerinde bulunabilmektedir. Sağlık çalışanlarının burun bölgelerinde bu bakterinin bulunma olasılığı oldukça yüksektir. Hastanelerde görülen bulaşma özellikle taşıyıcı sağlık personelinin el teması ile bulaşmaktadır. Taşıma, invaziv enfeksiyonlar için ciddi bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir (Kluytmans *et al.* 1997, Wertheim *et al.* 2004). Şekil 2.1 metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* enfeksiyonunun patogenezini göstermektedir (Gordon and Lowy 2008).



Şekil 2.1 Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* enfeksiyonunun patogenezi (Gordon and Lowy 2008)

S. aureus kaynaklı toksinler birçok hastalığa neden olmaktadır (Fraser and Proft 2008). Diğer bir örnek ise Toksik Şok Sendromu (TSS) vakalarıdır. TSS, SeaA veya SeaC eksprese eden bakteriler tarafından süperantijen toksinin kolonizasyonundan kaynaklanan bir enfeksiyondur (Fraser and Proft 2008). *S. aureus'un* neden olduğu bu hastalıklarda çeşitli ve farklı belirtiler bildirilmektedir. Bu semptomlar yaygın ve bilinen semptomlar olabileceği gibi lokalize veya özelleşmiş semptomlar olabilmektedir (Ladhani *et al*. 1999).

S. aureus'un neden olduğu ve iltihaplanmaya neden olan enfeksiyonlar yüzeysel veya derin olarak ortaya çıkmaktadır. Yüzeysel enfeksiyonlar impetigo, piyoderma ve yara enfeksiyonları olarak görülürken, derin enfeksiyonlar daha çok apse, septik artrit, osteomiyelit ve endokardit olarak görülmektedir. Ayrıca sistemik enfeksiyonlara birincil veya ikincil bakteriyemi teşhisi konmaktadır (Becker *et al*. 2015). *S. aureus'un* neden olduğu lokalize bir enfeksiyon, gerektiğinde invaziv bir enfeksiyona dönüşebilir ve doğru müdahale yapılmaz ise *S. aureus* konakçı organizmayı istila edebilmektedir. Bununla birlikte, konağın bağışıklık sistemiyle ilgili bir sorun olduğunda, enfeksiyon riski büyük ölçüde artmaktadır (Ladhani *et al.* 1999).

S. aureus tipik olarak kanlı agar üzerinde pigmentli sarı, pürüzsüz, tamamen kabarık ve hemolitik koloniler oluşturmaktadır (Sendi and Proctor 2009, Proctor *et al.* 2006). Ayrıca, çeşitli otomatik test sistemleri ticari olarak mevcuttur. Bu teşhis ve test araçlarından bazıları, antimikrobiyal duyarlılık testlerine dayanmaktadır (Becker *et al.* 2015).

Moleküler ve dizileme arasında en iyi bilinen ve en çok tercih edilen yöntem multilokus dizi analizi (MLST) olarak adlandırılmaktadır. MLST yaklaşımında yeni temel gen üzerindeki alelik varyasyonlar incelenmekte olup genetik popülasyon yapısı tanımlanmaktadır (Enright and Spratt 1999, Feil and Enright 2004). Ayrıca bu yaklaşımda aynı dizilere sahip her *S. aureus* suşuna benzersiz bir dizi tipi (ST) atanmaktadır. Daha sonra belirli bir algoritma dahilinde ST tanımlaması yapılmaktadır. Ancak bir sonraki bölümde detaylı olarak ele alınan ve çalışmamızın deneysel kısmında da vurgulanan sıklık analizi için varyasyon kapasitesinin yetersiz olduğu bilinmelidir. Bu bağlamda darbeli alan jel elektroforezi ile g-DNA'nın gözlemlenmesinde dahi güçlüklerin olduğu görülmektedir. Bu durumlar MRSA salgın sürveyansı için belirgin zorluklar olarak görünmektedir ve epidemiyolojik çalışmalara engel teşkil etmektedir (Murchan *et al.* 2003, Shopsin *et al.* 1999, Frenay *et al.* 1996, Tenover *et al.* 1995).

2.1.3 Antibiyotik direnci

Dünya genelinde son yarım yüzyılda Nozokomiyal MRSA insidansının belirgin şekilde arttığı görülmektedir (Becker *et al.* 2015). Hastane (HA) MRSA suşlarını inceleyen çalışmalar da mevcuttur (DeLeo and Chambers 2009). Literatürde genellikle çoklu antibiyotik dirençli farklı suşlardan HA-MRSA suşları ile yatay gen transferi (De) ile sınıf I, II, III veya IV stafilokok kaset kromozomunun (SCCmec) edinimi arasında bir ilişki olduğu değerlendirilmektedir (De Lencastre *et al.* 2007, Malachowa and DeLeo 2010).

Hastane kaynaklı MRSA'ya ek olarak, toplumdan edinilmiş (CA) MRSA suşlarının da sağlık tesisleri dışında cilt ve yumuşak doku enfeksiyonlarına neden olduğu bulunmuştur (DeLeo and Chambers 2009, DeLeo *et al.* 2010, Otto 2010). Baskın suşların coğrafi bölgeye göre farklılık gösterdiği bildirilmektedir (Chua *et al.* 2011, Malachowa and DeLeo 2010, Otto 2010).

Bu suşların minimum inhibitör konsantrasyon değeri 4–8 µg/mL aralığında değişmekte olup, söz konusu suşlar "vankomisin orta duyarlı *Staphylococcus aureus* suşları" (VISA) olarak adlandırılmaktadır (Howden *et al*. 2010). Bunlar genellikle heterojen VISA adı verilen öncüler olarak daha düşük minimal inhibitör konsantrasyonlarda görünürler (Courvalin 2006, Severin *et al.* 2004).

S. aureus için ilaç tedavileri arasında, PBP2a'yı hedefleyen yeni β-laktamlar geliştirmek için çalışmalar devam etmektedir. Çünkü bu bakteri zaten çoğu antibiyotiğe direnç geliştirmiş suşlara sahiptir (Llarrull *et al*. 2009).

2.1.4 Genom yapısı ve özellikleri

Çekirdek genom, tüm genomun dörtte üçünü oluşturmaktadır ve büyüme ve hayatta kalma için gerekli olan işlevleri yerine getirmektedir. Ayrıca genom, *S. auerus*'un karakteristik virülans faktörlerinden sorumlu genleri içermektedir (Holden *et al.* 2010, Lindsay *et al.* 2006).

Çekirdek genlerdeki farklılıkların çoğu, amino asit dizisinde değişikliklere neden olan eş anlamlı veya eş anlamlı olmayan tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP'ler) sonucudur. SNP'ler, ekspresyonu değişmeyen yedi temel referans genindeki (temizlik genleri) alelik varyasyondan filogeniyi tahmin eden Çok Lokus Dizi Tipleme (MLST) tekniğinde kullanılmaktadır (Enright and Spratt 2004, Feil and Enright 2004). Geleneksel olarak, farklı MLS klonal kompleks sayılarına sahip on baskın insan *S.aureus* suşu tarif edilmiştir. Bunları şu şekilde sıralamak mümkündür (Chua *et al*. 2011):

- *CC1*
- *CC5*
- *CC8*
- *CC12*
- *CC15*
- *CC22*
- *CC25*

- *CC30*
- *CC45*
- *CC51*

Farklı suşlarda yüzey proteinlerinden dolayı farklılıklar olduğu da bildirilmiştir (Foster *et al*. 2014, Shopsin *et al*. 1999). *S.aureus'un* genom özelliklerine bakıldığında da beş farklı türde mobil genetik element (MGE) olduğu görülmektedir. Bu mobil veya diğer bir deyişle mobil genetik elemanlar şu şekilde sıralanabilir (Malachowa *et al*. 2010):

- Plazmitler
- Transpozonlar
- Lizojenik Evreler
- Patojenite adaları
- Stafilokok Kaset Kromozomu

Stafilokokal kaset kromozomu (SCC) olarak adlandırılan MGE, tüm MRSA suşlarında bulunur ve mecA genini taşır. Bu gen, β-laktam antibiyotiklere direnç sağlayan penisilin bağlayıcı protein 2a'yı kodlar (Malachowa *et al.* 2010). Bugüne kadar on bir farklı SCC tipi tanımlanmıştır (De Lencastre *et al.* 2007, García-Álvarez *et al.* 2011). Sahip oldukları ortak mecA geni ve segmente özel stafilokok kaseti olarak sıralamak mümkündür (De Lencastre *et al*. 2007).

Tüm SCC-mec elemanları, konakçı kromozomal gen orfX içinde aynı birleşme yerinde bulunur. I – VII aralığındaki SCC-mec elemanları HA-MRSA ile ilişkilidir ve daha büyük, daha karmaşıktır. Buna karşılık, IV – VII aralığındaki SCC-mec elemanları CA-MRSA ile ilişkilidir (Malachowa *et al.* 2010).

MRSA suşları, mecA geninin zayıf indüksiyonu nedeniyle metisilin ve oksasiline karşı düşük direnç gösterir. mecRmercI düzenleyici genlerdeki delesyon mutasyonları, bitişik IS elemanları ile ilişkilidir ve sınıf B ve C lokuslarındaki mutasyonlardan kaynaklandığı kabul edilir (García-Álvarez *et al.* 2011). Bununla birlikte, mecRmercI düzenleyici genlerin A sınıfı lokuslarda intakt iken, *S. aureus'ta* D sınıfı lokusların bulunmadığına

dikkat edilmelidir. Burada, ayırt edici lokuslar E sınıfı lokuslardır. E sınıfı lokusu, A, B, C ve D sınıflarından önemli ölçüde farklı olan bir mecA geni taşır. Bu genin dizi kimliği %70 civarında olmasına rağmen, geleneksel yaklaşımlarla tespit edilmesi zor görünmektedir (García-Álvarez *et al*. 2011). Stafilokokal kaset kromozom elemanları, metisilin direnci dışındaki işlevleri kodlayabilir ve konakta *S. aureus'un* hayatta kalma şansını büyük ölçüde artırabilir (Joshi *et al.* 2011, Malachowa *et al.* 2010).

2.2 Metisiline Dirençli *S. aureus*

Birinci bölümde detaylı olarak anlatılan *S. aureus,* toplamda 52 tür ve 28 alt türü içeren strofilokok ailesinin klinik olarak en çok bilinen üyesidir. (Wertheim *et al.* 2005, Becker *et al.* 2017). MRSA, bir süpervirüs olarak da bilinen *S.aureus* grubu bakterisidir.

MRSA, yakın zamanda keşfedilen bir bakteri suşudur. Öyle ki ilk MRSA suşu 1961 yılında İngiltere'de tanımlanmıştır. Bu tarih antibiyotik metisilinin klinik uygulamaya girmesinden çok kısa bir süre sonrasına denk gelmektedir. Metisilin 1959 yılında Beecham tarafından geliştirilmiştir (Dutfield 2009). MRSA'nın tarihsel gelişimi aşağıda epidemiyoloji başlığı altında detaylandırılmıştır.

Metisilin ilk zamanlarda yaygın olarak kullanılmasına rağmen günümüzde toksik etkileri nedeniyle insanlarda kullanımı durdurulmuş ve yerini daha stabil antibiyotiklere bırakmıştır (Faoagali *et al*. 1992). Ancak metisilin kullanımı ortadan kalkmış olsa da MRSA terimi kullanılmaya devam etmektedir. İlk MRSA suşunun tanımlanmasının ardından HA-MRSA, hastanelerde ve sağlık tesislerinde meydana gelen salgınların çoğunun ana nedeni olmuştur (Chambers and DeLeo 2009).

2.2.1 Epidemiyoloji

Yukarıda da bahsedildiği gibi MRSA ilk olarak 1960'ların başında rapor edilmiş olsa da aslında geçmişinin 1940'lara kadar uzandığı görülmektedir. Bu tarih, metisilinin ortaya çıkışından yaklaşık yirmi yıl öncesi anlamına gelmektedir (Jevons 1961, Harkins *et al*.

2017). Bu duruma açıklama olarak, MRSA'nın ortaya çıkışının ana etkisi olarak metisilin gelişmesi yerine penisilinin aşırı ve yaygın kullanımı hipotezi öne sürülmüştür (Harkins *et al*. 2017, Tenover *et al*. 1995). Ancak 1960'lı yıllarda metisilin etkisi ile MRSA'nın neden olduğu hastalıklar dünyada büyük bir artış göstermiş ve adeta bir salgın haline gelmiştir (Diekema *et al*. 2001, Enright *et al*. 2000, Monecke *et al*. 2011).

MRSA'nın dağılımı ve MRSA ile ilişkili hastalıkların insidansı coğrafi konuma göre değişir. Örneğin, Amerika ve Asya'da prevalans oldukça yüksek iken, Kuzey Avrupa ve İskandinavya'da MRSA prevalansı oldukça düşüktür (Diekema *et al*. 2001).

Avrupa ülkelerinin sürveyans verilerine bakıldığında MRSA prevalansının Avrupa'dan artma eğiliminde olduğu görülmektedir (Gagliotti *et al*. 2011). Avrupa'daki bu büyük farklılığın temel nedeninin enfeksiyonlarla mücadelede tercih edilen yol ve yöntemler ile antibiyotik kullanımındaki farklılıklar olduğu tahmin edilmektedir (Köck *et al*. 2010). Avrupa'da MRSA prevalansı 2000'li yılların başına kadar büyük bir artış gösterse de bu dönemden sonra azalmaya başlamıştır (Gagliotti *et al*. 2011). MRSA prevalansındaki bu azalma, gelişmiş toplumlarda hastalık kontrol yaklaşımlarının değişmesiyle ilişkilidir. Ancak bu düşüşün MRSA organizmalarındaki değişikliklerle ilişkili olduğu düşünülmektedir (Nielsen *et al*. 2012, Rolain *et al*. 2015). Nozokomiyal MRSA prevalansındaki azalmanın yanı sıra hayvancılıkla ilgili olgular da dikkat çekmektedir. Özellikle çiftlik hayvanlarından kaynaklandığı düşünülen MRSA ile ilgili vakalar, hayvan çiftliklerinde çalışan kişilerde tespit edilmektedir (van Cleef *et al*. 2011, Larsen *et al*. 2015). Bununla birlikte, bu tür MRSA vakalarında insandan insana bulaşma çok nadirdir (Hetem *et al*. 2013).

MRSA, Amerika Birleşik Devletleri hastanelerinin acil servislerine cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları ile başvuran hastalarda en sık görülen birincil neden olarak tanımlanmaktadır (Talan *et al*. 2011, Moran *et al*. 2006). Ayrıca toplum kaynaklı MRSA ile hastane kaynaklı MRSA arasındaki ayrımın Amerika Birleşik Devletleri'nde daha az fark edilir hale geldiğine dikkat edilmelidir (Seybold *et al.* 2006, Popovich *et al.* 2008). Özellikle Güney Amerika'da, Kolombiya'da toplumdan edinilmiş MRSA klonu, Amerika Birleşik Devletleri'nde toplumdan edinilmiş MRSA salgınındaki suşun bir varyantı olarak

tanımlanmıştır (Planet *et al.* 2015). Ayrıca Güney Amerika'daki MRSA klonunun Avrupa'ya da yayıldığını ve bu durumun çalışmalarla belgelendiğini de belirtmek gerekir (Von Dach *et al*. 2016). Çalışmalar, 2000'li yılların başından beri Amerika Birleşik Devletleri'nde hastane kaynaklı MRSA insidansının %54 oranında azaldığını göstermektedir (Dantes *et al.* 2013, Styers *et al.* 2006). Ayrıca Amerika Birleşik Devletleri'nde MRSA farkındalığını artırmak için halkı bilinçlendirme faaliyetlerine önem verildiğini ve bu bakteri ile mücadele için çok yönlü stratejiler uygulandığını da belirtmek gerekir. Bu önlemler sonucunda Amerika Birleşik Devletleri'ndeki MRSA enfeksiyonlarının son yirmi yılda sağlık kurumlarında yaklaşık %50 oranında azaldığı bildirilmiştir (Jain *et al*. 2011). Ancak Amerika Birleşik Devletleri'nde MRSA kontrol önlemleri zorunlu hale getirilmiş ve mali yaptırımlarla desteklenmiştir (Lee *et al.* 2012).

Asya kıtasına bakıldığında nispeten farklı bir Grafik ortaya çıkıyor. MRSA, Asya Kıtasındaki çoğu hastanede endemik hale gelmiştir ve dünyadaki en yüksek MRSA prevalansı Asya ülkelerinde görülmektedir (Chen and Huang 2014). Asya'daki bazı ülkelerde *S. aureus'un* neden olduğu kan dolaşımı enfeksiyonlarının yarısının nedeninin MRSA olduğu bilinmektedir (Chen and Huang 2014). Özellikle Japonya ve Güney Kore'de MRSA prevalansının yüksek olduğu bilinmektedir. 2011 yılında yapılan bir çalışmada, Güney Kore'deki klinik izolatların %70'inden fazlasında MRSA tespit edildiği bildirilmiştir (Chen and Huang 2014, Mendes *et al*. 2013). Tayvan gibi az gelişmiş ülkelerde, hastane kaynaklı MRSA prevalansı zirveye ulaşmıştır (Lai *et al*. 2013). Bu tepe değer 1990'ların sonlarında kaydedilmesine rağmen, MRSA'nın Asya'da ve ayrıca Avrupa ve Amerika'da prevalansı 2000'li yılların başından itibaren azalmaya başlamıştır (Mendes *et al*. 2013, Lai *et al*. 2013).

Avustralya verilerine baktığımızda hastane kaynaklı S.aureus vakalarının yaklaşık %30'unun MRSA'dan kaynaklandığı görülmektedir. (Coombs 2019). Yukarıda listelenen dünyanın diğer bölgelerinde olduğu gibi, Avustralya'da da MRSA insidansı 2000'li yılların başından beri düşüş eğiliminde olmuştur. Bu kıtadaki düşüşün yerel ve ulusal önlemlerle ilgili olduğu düşünülmektedir (Mitchell *et al.* 2014). Avustralya'da toplumdan edinilen MRSA suşları arasında, özellikle kıta aborjinleri arasında bölgeye özgü bir klon tanımlanmıştır (Williamson *et al.* 2014).

Afrika kıtası için yayınlanan çalışmalara bakıldığında ise verilerin kapsam ve kalite olarak farklılık gösterdiği dikkat çekmektedir. Afrika kıtasında çok az ülke için MRSA verileri yayınlanmıştır (Falagas *et al.* 2013). Afrika'da MRSA prevalansının genel olarak %50'nin altında olduğu tahmin edilmekte ve bazı ülkelerde bu değerin %25'in altına düştüğü bildirilmektedir (Falagas *et al*. 2013). Diğer bölgelerin aksine Afrika kıtasında 2000'li yılların başından itibaren MRSA prevalansı artmıştır (Falagas *et al*. 2013, van Rensburg *et al*. 2012, Brink *et al*. 2007). Bu artışın nedeni antibiyotik kullanımındaki farklılıklar, HIV enfeksiyonu insidansındaki artış ve enfeksiyon kontrol mekanizmalarındaki farklılıklar gibi faktörlere dayanmaktadır (Zervou *et al*. 2014).

2.2.2 Patofizyoloji

Daha az yaygın olarak, MRSA enfeksiyonu, sağlık profesyonelleri tarafından enfeksiyon kontrol uygulamalarının yetersiz uygulanması, kateterlerin veya yaraların kontaminasyonu ile ilişkili olarak kolonizasyon olmadan ortaya çıkar (Sim *et al*. 2013). MRSA kolonizasyonunun birincil yeri burundur. Ancak boğazda ve perinede de kolonizasyon meydana gelebilir (Eriksen *et al.* 1995, Kluytmans *et al.* 1997).

İnsanların yaklaşık %15'inin kalıcı taşıyıcı olduğu bilinmektedir. Diğer bir deyişle, bireylerin yaklaşık %15'i sürekli kolonizedir. Aralıklı kolonizasyon insanların %70'inde görülür. *S. aureus* enfeksiyonu bu gruptaki bireylerde tekrar tekrar ortaya çıkabilir, ancak kendiliğinden iyileşebilir. İnsanların yaklaşık %15'inde *S. aureus* hiç görülmez veya saptanmaz. Bu bireyler taşıyıcı değildir (Eriksen *et al.* 1995). Daha önce yapılan çeşitli çalışmalarda da benzer sonuçların elde edildiği görülmektedir (Höffler *et al.* 1978).

Stafilokoklar sporsuz, genellikle kapsüllü, fakültatif anaerobik bakterilerdir. Optimum üreme sıcaklıkları 30-37 °C'dir (Emonts *et al*. 2008). Anilin boyalarla iyi boyanırlar. Grubun bir özelliği olarak bu küreler salkım oluşturur ve üzüm salkımı gibi görünür. Stafilokokların bu görünümleri daha çok katı kültürlerden hazırlanan preparatlarda görülmektedir (Krismer *et al*. 2017). Sıvı ortamdan hazırlanan preparatlarda kümelenmeler nadiren görülür. Aşırı dispersiyon ile hazırlanan preparasyonlarda etken, küçük kümeler, kısa zincirler, çiftler halinde veya tek tek görülür. Stafilokoklar 24-48

saat içinde katı besiyerinde bol miktarda çoğalır ve genellikle 1-2 mm çapında yuvarlak, dışbükey ve parlak koloniler oluşturur (O'Brien *et al*. 2002). Kolonilerde (özellikle patojenik *S. aureus*'ta) pigment ve hemoliz görülebilmektedir (Lucet *et al*. 2009). Kolonilerin rengi beyazdan limon sarısına kadar değişir. MacConkey agarda büyüyebilirler. Patojenik stafilokoklar kültürlerde +4 °C'de 2-3 ay, -20 °C'de 3-6 ay yaşayabilirler. Öte yandan, yaklaşık 30 dakika boyunca 60 °C'ye dayanabilirler. %9'luk sodyum klorür ve sakaroz konsantrasyonlarına toleranslıdırlar. %2 fenolde 15 dakikada inaktive olurlar (Burian *et al.* 2010, Weidenmaier *et al.* 2008).

2.2.3 Virülans faktörleri

S. aureus'un bazı virülans faktörleri doğada proteindir ve hücre duvarındaki peptidoglikana bağlıdır (Boyle-Vavra *et al.* 2015, Spaan *et al.* 2017). Bu proteinler, bakterilerin IgG ve fibrinojen gibi kan proteinlerine veya fibronektin ve kollajen gibi hücre dışı matris proteinlerine bağlanmasına aracılık eder ve enfeksiyon için gerekli kolonizasyonun başlamasına neden olur (Spaan *et al.* 2013, Stapels *et al.* 2014, Peschel and Sahl 2006). Protein A, topaklanma faktörü A ve B, kollajen bağlayıcı protein, fibronektin bağlayıcı protein A ve B, plazmine duyarlı protein, serin aspartat tekrarlayan protein, *S. aureus* yüzey proteinlerine yapışmada rol oynayan yüzey proteinleridir (Laabei *et al*. 2014, Thammavongsa *et al.* 2015). Bu tür hücre dışı matris proteinlerine bağlanan yüzey yapışkanlarına, Yapışkan Matris Moleküllerini Tanıyan Mikrobiyal Yüzey Bileşeni (MSCRAMM) adı verilir (Recker *et al.* 2017). *S. aureus'un* yapışkan yüzey proteinleri için iki olası rol düşünülmüştür. Bunlardan ilki bakteriyi kan veya doku bileşenleri ile kaplayarak bağışıklık sisteminden korumak, ikincisi ise dokuya tutunmasını kolaylaştırmaktır (Kluytmans *et al*. 1995, Von Eiff *et al*. 2001). Ayrıca, *S. aureus'un* plastik yüzeylere yapışmasından yüzey yapışmaları sorumludur. Vücuttaki plastik cihazlar ve kateterler hızla fibronektin, kollajen ve fibrinojen gibi doku proteinleri ile kaplanır ve *S. aureus* biyofilmi için ilk tabakayı oluşturur. Tüm *S. aureus* yüzey yapışkanları proteinli değildir (Vanhommerig *et al.* 2014).

Örneğin, poli–N-süksinil-β-1,6 glukozamin (PNSG), bir polisakkarit yüzey yapışmasıdır (Thammavongsa *et al.* 2015, Laarman *et al.* 2010). Kemotaksi ve fagositozu önleyen ve

yabancı cisimlere yapışmayı sağlayan kapsül yapısı; Organizmanın şeklini ve dayanıklılığını veren peptidoglikan, konakta endojen pirojenlerin üretimini uyararak lökosit kemotaksisine ve apse oluşumuna neden olur (Thomer *et al*. 2016); immünokomplekslerin oluşumuna ve tamamlayıcının aktivasyonuna neden olan protein A; fibronektine bağlanma özelliğinden dolayı mukozal yüzeylere yapışmaya aracılık eden teikoik asit; Kolonizasyona izin veren yüzey proteinleri, *S. aureus'un* virülansını artıran yapısal özelliklerdir (Cheng *et al.* 2011, Painter *et al.* 2014, Kaito *et al.* 2013).

Tuz direncinde en önemli ozmoprotektan maddeler hücre içinde biriken glisin, betain ve prolindir. Yüksek tuzlu ortama maruz bırakıldıktan 3 dakika sonra *S. aureus'un* prolin içeriğinde 21 kat artış olduğu belirlenmiştir (Stewart and Costerton 2001, Vuong *et al*. 2004, Otto 2006). Bu özelliklerinden dolayı tuzlu ve su aktivitesi düşük gıdalarda diğer bakteriler üreyemezken *S. aureus* onların rekabetçi etkilerinden kurtularak daha rahat bir büyüme gösterir. Benzer şekilde, gıdalarda *S. aureus'un* aranması/sayılmasında yüksek tuz konsantrasyonuna sahip ortamlar kullanılarak eşlik eden floranın büyümesi baskılanır (O'Gara and Humphreys 2001, Zimmerli *et al.* 2004).

Biyofilm oluşumu, bakterilerin tıbbi cihazın yüzeyine tutunmasıyla başlar. *S. aureus'un* atl otolizi, bakterilerin plastik veya metal yüzeylere yapışmasını sağlar (Heilmann *et al.* 1997). Otolisinler, hücreler büyüdükçe çevreye sınırlı DNA salınımına neden olan endopeptidazlardır (Zoll *et al.* 2010). Böylece biyomateryalin ilk kolonizasyonu tetiklenir (Houston *et al.* 2011). Yapışma, farklı adhezin proteinleri tarafından da desteklenebilir (Vaudaux *et al.* 1995, Heilmann *et al.* 1996, Mack *et al.* 1994, Vuong *et al.* 2004). PIA, hücre yüzeyinde kısmen deasetillenebilir. Bu, IcaB enzimi aracılığıyla olur ve böylece polimerin yüzey bağlanması için önemli olan pozitif yükler kazanılır (Vuong *et al.* 2004).

MRSA'nın biyofilm oluşumunu destekleyen birçok farklı proteinin varlığından bahsetmek mümkündür. Bunların örnekleri arasında Bap, SasC, Protein A, SasG bulunur (Cucarella *et al.* 2001, Schroeder *et al.* 2009, Merino *et al.* 2009).

2.2.4 Metisilin Direnci

Daha önceki bölümlerde bahsedildiği gibi, 1960'ların başında farklı ilaçlara dirençli çeşitli suşlar tarafından SCCmec kompleksinin edinilmesi ve *S. aureus'un* beta laktam antibiyotik ailesinin birçok üyesine karşı direnç göstermesi, SCCmec kompleksinin çok önemli bir gelişmeydi. Bu bakterinin evrimi (Jevons 1961). Birinci bölümde, antibiyotik direnci başlığı altında detaylı olarak anlatıldığı gibi Metisilin direncinin moleküler mekanizması bu başlık altında tartışılmıştır.

MecA ve mecC adı verilen genler PBP'leri kodlar ve bu genler bakteri kromozomundaki SCCmec kasetlerinde bulunur. MRSA'lar bu gene sahipken MSSA'lar yoktur (Hiramatsu *et al.* 1992). Boyutları 20 kb ile 68 kb arasında değişen 11 tip (Tip I-XI) SCCmec kaseti vardır. Tip I, IV ve V sadece yapısal ve düzenleyici genleri ve rekombinaz genlerini içerir. Bu alt tipler, transpozon elementlerinden ve beta-laktam antibiyotikler dışındaki antibiyotiklere dirençten sorumlu genlerden yoksundur (Zhang *et al.* 2001). HA-MRSA'lar SCCmec kasetlerinde I, II ve III alt tiplerini içerirken CA-MRSA'lar SCCmec kasetlerinde IV ve V alt tiplerini içerir (De Lencastre *et al.* 2007). MRSA'larda mecA geninin varlığı ile ortaya çıkan bu direnç, fenotipik laboratuvar testlerinde homojen direnç ve heterojen direnç olarak iki şekilde karşımıza çıkmaktadır. Homojen direnç, koloniyi oluşturan tüm *S. aureus*'ların mecA genine sahip olması ve bu genin hepsinde aktif olması durumudur. Meydana gelen yüksek direnç çevresel faktörlerle ilgili değildir.

2.3 Metilline Dirençli *S. aureus* İçin Tanı ve Tarama Yaklaşımları

2.3.1 MRSA kaynakları

MRSA, cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları, pnömoni, toksik şok enfeksiyonları ve bakteriyemi gibi çok çeşitli enfeksiyonlara neden olabilir (Lowy 1998, Epstein *et al.* 2016). Enfeksiyona yönelik klinik yaklaşımlar ve değerlendirmeler, hastane kaynaklı (HA), toplum kaynaklı (CA) ve hayvan kaynaklı (LA) koşullara göre farklılık gösterebilir.

CA-MRSA için en yaygın klinik tanı, genellikle apse ve irin oluşumu ile ilişkili deri ve yumuşak doku enfeksiyonudur. Bu vaka tipi, toplumdan edinilmiş tüm MRSA vakalarının yaklaşık %90'ını oluşturmaktadır (Moran *et al.* 2006, Francis *et al.* 2005, Miller *et al.* 2005, Klevens *et al.* 2007). Bununla birlikte, PVL'nin varlığı suştan suşa değişir, bu da diğer virülans faktörlerinin katkıda bulunduğunu düşündürür (Chambers and DeLeo 2009). CA-MRSA enfeksiyonunda HA-MRSA suşları ile ilişkili geleneksel risk faktörlerinin varlığından bahsetmek mümkün değildir. CA-MRSA enfeksiyonu salgınlarının rapor edildiği popülasyonlar arasında genellikle spor takımları, askeri birimler ve hapishaneler bulunur (Kazakova *et al.* 2005, Aiello *et al.* 2006). Bu gözlemden yola çıkarak, MRSA taşıyıcısı olan kişilerle temas veya ortak kullanım yoluyla etkileşime giren kişilerde CA-MRSA enfeksiyon riskinin önemli ölçüde arttığını söylemek mümkün görünmektedir. Ancak, CA-MRSA ve HA-MRSA arasındaki ayrım giderek ortadan kalkmaktadır. Aslında bazı ülkelerde sağlık kuruluşlarında CA-MRSA suşlarına sıklıkla rastlanmaktadır (Drougka *et al*. 2014).

LA-MRSA, apse ve yara enfeksiyonları dahil cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları ve lokal enfeksiyonlar ile ilişkilidir (Van Alen *et al*. 2017). LA-MRSA esas olarak sığır, at, tavuk, hindi ve özellikle domuz gibi hayvanlarla doğrudan temas eden insanları ve aile üyelerini enfekte eder (van Cleef *et al*. 2011). Ancak çiftlik hayvanları ile teması veya etkileşimi olmayan kişilerde de LA-MRSA vakalarının görüldüğü bildirilmektedir. Bu durumlarda, LA-MRSA'nın yayılmasının çevresel bulaşma yoluyla ve daha az yaygın olarak gıda yoluyla olduğu düşünülmektedir (van Cleef *et al.* 2011).

2.3.2 Teşhis ve tarama yaklaşımları

Stafilokokların hücre zarı üzerinde etkili olduğu bilinen 5 sitotoksin vardır. Bunlardan alfa, beta, delta ve gama toksinleri hemoliz özelliğindedir. Lökosidin adı verilen toksin lökositler üzerinde etkilidir. Eksfolyatif toksin Dermatit'e neden olur. Stafilokoklar ayrıca enterotoksinler de üretebilir. *S. aureus* ve S. epidermidis'in bazı suşlarının enterotoksin üretebildiği bulunmuştur. Serolojik olarak A, B, C, D ve E harfleriyle gösterilen 5 gruba ayrılabilirler (Koupahi *et al*. 2016).

Stafilokoklar, tüm stafilokoklarda katalaz enzimi bulunan çeşitli enzimlere sahiptir. Koagülaz enzimi fibrinojeni fibrine çevirir ve plazmayı pıhtılaştırır. Oluşan fibrin ağı bakterileri fagositozdan korur. Hiyalüronidaz enzimi patojen stafilokokların yaklaşık %90'ında bulunur ve bağ dokusundaki hyaluronik asidi parçalayarak bakterilerin doku içinde yayılmasını sağlar. Fibrinoliz enzimi, patojenik Stafilokokların fibrin pıhtılarını çözmesini sağlar. Penisilinaz enzimleri, penisilinin beta-laktam halkasını parçalayarak penisilin direnci sağlar. Ayrıca DNase, termonükleaz, hyuronidase ve lipaz gibi patojenite ile ilgili enzimlere de sahiptirler (Koupahi *et al.* 2016).

Fenotipik yöntemler olarak fenotipik direnci ortaya çıkaran diğer durum ise beta-laktamaz plazmiti olarak bilinir. Beta-laktamaz enzim üretimi blaZ geni tarafından kodlanır (Penn *et al*. 2013). İki gen tarafından kontrol edilir, antirepresör blaR1 ve baskılayıcı blaI. Ortamdaki beta-laktam, BlaR1'e (transmembran protein) bağlanır ve bakterinin dışarıdan içeriye sinyal iletimini sağlayarak beta-laktamaz enzim sentezinin başlamasında rol oynar. Böylece metisilin direncinin fenotipik tezahüründe etkin rol oynar (Winstanley and Courvalin 2011).

Genotipik yöntemler olarak günümüzde MRSA'nın genotipik yöntemlerle araştırılması denilince akla ilk olarak PCR temelinde şekillenen yaklaşımlar gelmektedir. Bu çalışmada PCR-RFLP yöntemi kullanılmıştır. PCR-RFLP hakkında detaylı bilgi çalışmanın materyal ve yöntem bölümünde verileceği için bu başlık altında farklı PCR yaklaşımlarına yer verilmiştir (Wei *et al.* 2007).

AFLP – PCR yöntemi olarak ÇKUP tekniğinin polimorfizm oranı çok yüksektir ve aynı anda ve etkin bir şekilde birçok lokus taraması yaptığı için parmak izi analizi için çok uygundur. Heterozigot ve homozigot bireyler arasındaki farklar AFLP analizi ile belirlenebilir. ÇKUP tekniğinin en önemli dezavantajları, çoğunlukla baskın belirteçler vermesi ve farklı genetik haritalar arasında aktarımın zor olmasıdır (Mortimer and Arnold 2001). AFLP tekniği, RFLP tekniğinin kesme tanıma bölümlerinin PCR amplifikasyonuna dayalı bir DNA markör tekniğidir. Tüm başlatıcılar aynı zamanda sentetik uçların nükleotid dizisini de taşıdığından, üretim çok özel koşullar altında yapılır. DNA ekstraksiyonu yapılır. DNA, uygun restriksiyon enzimleri ile kesilir. Kör uçlar ve

yapışkan uçlar üreten enzimler kullanılır. Adaptör moleküllerin restriksiyon enzimleri tarafından kesilen DNA moleküllerine bağlanır. Adaptörler, enzim tarafından tanınan baz dizilerinden ve 20 nükleotide kadar bildiğimiz dizilerden oluşur. Kısıtlama enziminin kesim bölgelerine bağlanan adaptörler tarafından oluşturulan yeni DNA fragmanları, amonyum asetat ve saf alkol ile çökeltilir, daha sonra %70 alkol ile yıkanır ve damıtılmış suda süspanse edilir (Zhao *et al.* 2000, Duim *et al.* 1999).

RAPD – AP-PCR yöntemi olarak AP-PCR, rastgele primerler kullanılarak bilinmeyen genomik bölgelerin amplifikasyonuna dayanan klasik bir PCR varyasyonudur (Williams *et al.* 1990, Welsh and McClelland 1990). RAPD yöntemi, rastgele seçilmiş bir nükleotid dizisi (primer) ile rastgele bir DNA segmentinin PCR amplifikasyonuna dayanır. Bu nedenle AP-PCR, RAPD-PCR olarak da adlandırılır. RAPD uygulamasında 9-10 baz uzunluğunda kısa rastgele diziler kullanılır (Farber 1996). RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA, Randomly Amplified Polymorphic DNAs) ilk olarak 1990 yılında rastgele seçilmiş primerler kullanılarak Polimeraz Zincir Reaksiyonuna (PCR) dayalı bir teknik olarak ortaya çıkmıştır. Aynı yıllarda başka bir çalışma grubu tarafından uygulanmış ve AP-PCR (Arbitrally Primed PCR) olarak adlandırılmıştır. 1991 yılında, DAF (DNA Amplification Fingerprinting) adı verilen ve bu yöntemle aynı temele dayanan, ancak farklı olarak 10 nükleotitten daha kısa primerlerle daha karmaşık bir DNA parmak izi profili elde edilen benzer bir yöntem yayınlandı (Lanini *et al*. 2011, Chang *et al.* 2009). Genel olarak bu tekniklerle karşılaştırıldığında, RAPD tekniğinin en büyük avantajı, ilgilenilen taksonun genleri hakkında herhangi bir ön bilgi gerektirmemesidir (van Belkum *et al.* 1995, Saulnier *et al.* 1993). Aynı oligonükleotit primerleri seti, replikasyondaki tüm organizmalar için kullanılabilir ve bu oligonükleotit, spesifik bölgelere rastgele bağlanarak replike olur. Bir primer ile farklı bitkilerin genomik DNA'sı farklı olacaktır, dolayısıyla ortaya çıkan RAPD belirteçleri farklı olacaktır. Bu farklılık, organizmaların karşılaştırılmasına olanak tanır (Li *et al.* 2009).

REP-PCR yöntemi olarak bakteri genomlarında doğal olarak bulunan bir dizi tekrarlayan DNA dizisi vardır (Versalovic *et al.* 1991). Bu diziler, genom boyunca çoklu kopyalar halinde dağılır. Bu yöntemlerde kullanılan primerler, tekrarlanan DNA dizilerini tamamlayıcıdır ve bu primerler kullanılarak tekrarlar arasındaki DNA fragmanları

çoğaltılır. Tekrarlayan elementlerin sayısı ve yerleşimindeki farklılıklar, bakteri türüne özgü bant profilini oluşturur. Dört grup tekrar eden dizi tanımlanmıştır. Bunlar: REP dizileri, ERIC dizileri, BOX dizileri ve politrinükleotid (GTG)5 dizileri. Bu tekrarlayan dizilere dayalı beş farklı (REP-PCR, ERIC1 PCR, ERIC2 PCR, BOX-PCR ve (GTG)5-PCR) rep-PCR uygulaması vardır ve bu yöntemler farklı bakteri gruplarının tiplendirilmesinde kullanılmaktadır (Stern *et al*. 1984, Van Der Zee *et al.* 1999, Versalovic *et al.* 1991).

PCR yöntemlerine ek olarak, diğer genotipik yöntemler arasında Agr tipleme yöntemi (Novick 2003), Darbeli alan jel elektrofizi yöntemi (Schwartz and Cantor 1984), çoklu lokus dizisi yazma yöntemi (Enright *et al.* 2000), mikroarray yöntemi (Sabat *et al.* 2013), tüm genom dizileme yöntemi (Mellmann *et al.* 2011) yer almaktadır.

PCR-RFLP veya bölünmüş amplifiye polimorfik dizi, bir tür PCR'dir. Bu yöntemde, bir PCR amplikonu, DNA'yı tanıma bölgesi olarak adlandırılan belirli bir kısıtlama bölgesinde kesen ve çeşitli boyutlarda çok sayıda DNA fragmanı ile sonuçlanan spesifik bir RE ile işlenir. Sindirilen amplikonlar daha sonra bir jel üzerine yerleştirilir ve bir elektrik alanına maruz bırakılır (Hashim and Al-Shuhaib 2019). Farklı büyüklükteki bantlar, jel boyunca farklı mesafelerde kayacaktır. Orita vd. (1989), PCR amplikonlarında potansiyel nokta mutasyonlarını bulmak için PCR-SSCP yaklaşımını ilk kullananlardı. PCR-SSCP'nin temel fikri, çift sarmallı formların ısı kullanılarak tek sarmallı formlara ilk ayrılmasıdır, yani erimesidir (Shirasawa *et al.* 2016).

Moleküller, ayrılmış durumdaki nükleik asit dizilerine göre üç boyutlu bir şekle girme eğilimindedir. Sonuç olarak, poliakrilamid jel elektroforezinde, izole edilmiş tek DNA molekülü zincirleri aynı boyuta sahiptir ancak çeşitli hareketliliklere sahip çeşitli üç boyutlu konfigürasyonları barındırır. Ana dizideki belirli bir nükleotid lokasyonundaki bir mutasyon, denatüre tek zincirli bantların fiziksel şeklini değiştirerek yapısal konformasyonu etkileyebilir. Nötr poliakrilamid jellerde, bu değişiklik sıklıkla mutant tek iplikli bantların normal muadillerine kıyasla hafif eğimli olmasına neden olur (Gasser *et al.* 2007).

3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada yapılan analizler, tetikleyiciler ve uygulamalar Irak'ın El Anbar Eyaletinin başkenti Ramadi'de bulunan Ramadi General Hospital'da gerçekleştirilmiştir. Çalışmada Ramadi il merkezi ve çevresindeki beş ilçedeki laboratuvarlardan 165 farklı hastaya ait klinik suşlar elde edilmiştir.

3.1 Numunelerin Toplanması

Suşların elde edileceği kişilerin 18 yaşından büyük olan kişiler seçilmiştir. Son bir ay içinde antibiyotik tedavisi almayan kişilerden öernekler alınmıştır.

Suşların edinimi sırasında katılımcılara gerekli bilgiler verildi. Yazılı muvafakat alınmıştır. Ayrıca, COVID-19 nedeniyle yüz yüze etkili bir görüşme olasılığına karşı bilgilendirme metni elektronik ortamda katılımcılara gönderilmiştir. Ayrıca Ramadi Genel Hastanesi Etik Kurulu ve Araştırma Kurulu'ndan çalışma onayı alındı (No:3050).

3.2 Malzemeler

Test aşamasında kullanılan malzemeler şu şekilde sıralanabilir:

- Kanlı agar bazı (Micromedia, EU)
- Beyin-kalp infüzyon suyu (Direk teşhisi, ABD)
- Mueller-Hinton Broth (MHB, Merck, Almanya)
- Metil kırmızısı-Voges proskauer suyu (MRVP, oksoid, İngiltere)
- Gıda agarı (Himedia, Hindistan)
- Baird Parker Agar (BP Agar, Merck, Almanya)
- Mannitol Tuz Agar (Mannitol Tuz Agar / MSA, Merck, Almanya)
- Müeller – Hilton Agar (MHA, Merck, Almanya)
- Sefoksitin Antibiyotik Diski (MAST Group, İngiltere)
- Neomisin Antibiyotik Diski (MAST Group, İngiltere)

- Siprofloksasin Antibiyotik Diski (MAST Group, İngiltere)
- Penisilin Antibiyotik Diski (MAST Group, İngiltere)
- Gentamisin Antibiyotik Diski (MAST Group, İngiltere)
- Amoksisilin Antibiyotik Diski (MAST Group, İngiltere)
- Kloramfenikol Antibiyotik Diski (MAST Group, İngiltere)
- Klindamisin Antibiyotik Diski (MAST Group, İngiltere)
- DNA Ekstraksiyon Kiti (Thermo Fisher, Amerika Birleşik Devletleri)
- Taq DNA Polimeraz (Thermo Fisher, Amerika Birleşik Devletleri)
- Termal Döngüleyici (Thermo Fisher, Amerika Birleşik Devletleri)
- HaeIII Hızlı Sindirim Enzim (Thermo Fisher, Amerika Birleşik Devletleri)
- Bsp1431 Restriction Sindirim Enzim (Thermo Fisher, Amerika Birleşik Devletleri)
- IBM SPSS – 2020 Yazılımı (IBM, Amerika Birleşik Devletleri)

3.2.1 Ekipman ve aparat

Bu araştırmada kullanılan diğer laboratuvar malzemeleri Çizelge 3.1'de listelenmiştir. Ekipman ve aparatlar Çizelge 3.2'de listelenmiştir.

Çizelge 3.1 Diğer laboratuvar malzemeleri

No	Malzemeler	Şirket ve Menşei
1	Otomatik Pipet (Farklı Boyut)	Marka (Almanya)
2	Eppndroff Tüpü (Farklı Boyut)	Promega (ABD)
3	Filtre Kağıtları Whatman (0,2 µm)	Schleicher ve Schuel (ABD)
4	Forseps	Olimpos (Japonya)
5	Düzlem Tüpler (10 mL), Petri Kapları Ve	Çince
6	Steril süründü	Jlassco (Hindistan)

Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan cihazlar ve araçlar

No	Ekipman ve Aparat	Şirket ve menşe
1	Otoklav	Sakura (Japonya)
2	Merkezkaç	Hettich (Almanya)
3	Soğutma Santrifüjü	Hermle (Çin)
4	Arıtılmış su	Elga (İngiltere)
5	Elektrik Dengesi	Elga (İngiltere)
6	Elektrikli fırın	Olimpos (Japonya)
7	Elektroforez Sistemi, Güç Kaynağı	İlerleme (Japonya)
8	GC/MS Spektroskopisi	Shemaza 2010 Qpplus
9	Jel Belge Sistemi	APEL (Japonya)
10	Davlumbaz Dolabı	Fisher Hamilton (ABD)
11	Sıcak Tabak	Takashima (Japonya)
12	Kuluçka makinesi	Yamato (Japonya)
13	Mikro Santrifüj	Beckman Coulter (ABD)
14	Mikroplaka okuyucu	Biotek 800 (ABD)
15	Mikrotitre Plakası (Polistiren)	Sahil şeridi (ABD)
16	Mikrodalga	Panasonic (Japonya)
17	Nano Damla Spektrometresi	Dihan (Kore)
18	Olimpos (Japonya)	Işık mikroskobu
19	Buzdolabı	Ulusal (Japonya)
20	Sallayarak kuluçka	Gallen Kampı (İngiltere)
21	Spektrofotometre	Apel (Japonya)
22	Termal ısıl döngüleyici	TECHNE, TC-300O, Bibby Scientific Ltd, (ABD)
23	Su banyosu	Tafesa Hannover (Almanya)
24	Vitek2	Bio Mexieux (Fransa)
25	Girdap karıştırıcı	Biocote(İngiltere)

3.2.2 Kimyasal malzemeler

Çizelgeler 3.3 ve 3.4 bu çalışma sırasında kullanılan kimyasalların bir listesini göstermektedir.

Çizelge 3.3 Kimyasalların listesi

No	Kimyasallar ve Biyolojikler	Şirket ve Menşei
1	Mutlak Etanol (%99)	Scharlau (İspanya)
2	Asetik asit	BDH (İngiltere)
3	Alkol	BDH (İngiltere)
4	Koagülaz Plazma (Sitratlı Tavşan Plazması)	Biolife (İtalya)
5	Kristal İhlal Tozu	APCO (Ürdün)
6	Deiyonize Steril Distile Su	Theba (Irak)
7	Gliserol (%99)	Panreac (İspanya)
8	Gram boyama	Apco (Ürdün)
9	Hidrojen Peroksit %3 (Katalaz Testi)	Becton-Dickinson (ABD)
10	Mcfarland Çözümü	Biomerieux (Fransa)
11	Metanol	BDH (İngiltere)
12	Metil Kırmızısı	BDH (İngiltere)
13	Sodyum Klorür (Nacl)	BDH (İngiltere)
14	Sodyum Hidroksit (Naoh)	BDH (İngiltere)

Çizelge 3.4 PCR ve elektroforez malzemelerinin listesi

No	PCR ve Elektroforez malzemeleri	Şirket ve Menşei
1	Agaroz	Cleaver (İngiltere)
2	ddh2o	NEB (İngiltere)
3	DNA Merdiveni Markörü (100 bp)	Promega (ABD)
4	Genezol Trirna Arıtma Kiti	Biyo Laboratuvarları (İngiltere)
5	Hisenscripttm RH(-) RT Ön Karışımı	Biyo Laboratuvarları (İngiltere)
6	Luna Evrensel QPCR Master Karışımı	Biyo Laboratuvarları (İngiltere)
7	Ana Karışım	Neb (İngiltere)
8	Primerler	GENEWIZ (ABD)
9	Kırmızı Güvenlik Boyası	Biyo Laboratuvarları (İngiltere)
10	TAE Tampon-10 X	CARL ROTH (İngiltere)

3.2.3 Kültürel medya

Çizelge 3.5 bu çalışmada kullanılan kültür ortamlarının bir listesini göstermektedir.

Çizelge 3.5 Kültür ortamı listesi

No	Kültürel medya	Şirket ve Menşei
1	Kan Agar Baz	Mikro Medya (AB)
2	Beyin-Kalp İnfüzyon suyu	Direk Teşhisi (ABD)
3	Mannitol Tuzlu Agar	Merk (Almanya)
4	Metil Kırmızı Voges Proskauer Suyu (MRVP)	Oksoid (İngiltere)
5	Mueller-Hinton Et suyu (MHB)	Merk (Almanya)
6	Müller-Hinton Agar	Merk (Almanya)
7	Gıda ağarı	Himedia (Hindistan)
8	Triptikas Soya Suyu	Oksoid (İngiltere)

3.2.4 Kitler

Çizelge 3.6 bu çalışmada kullanılan kitlerin listesini göstermektedir.

Çizelge 3.6 Çalışmada kullanılan kitler ve üreticiler

No	Kitler	İmalat (ülke)
1	API Staph kiti	Biomerieux (Fransa)
2	DNA ekstraksiyonu	Promega (ABD)
3	MRSA ekran kiti	Denka Seiken (Japonya)

3.2.5 Antibiyotik

Çizelge 3.7, bu çalışmada kullanılan antibiyotiklerin listesini göstermektedir.

Çizelge 3.7 Antibiyotikler

No	Antibiyotik adı	Disk içeriği (µg)	Bölge çapı kesme noktası (mm)		
			S ≥	Ben	R ≤
1	Amoksisilin + Kalvulanik Asit	25	18	14-17	13
2	Antibiyotik	10	15	13-14	12
3	Azitromisin	15	18	14-17	13
4	Eritromisin	10	23	14-22	13
5	Klindamisin	10	21	15-20	14
6	Meropenem	10	16	14-15	14
7	Metisilin	10	-	-	-
8	Oksasilin	1	-	-	-
9	Siprofloksasin	10	21	16-20	15
10	Tetrasiklin	10	19	15-18	14
11	Trimeteprim	25	16	11-15	10
12	Vankomisin	30	15	-	-

3.3 Bakteri İzolatları

Ramadi şehri ve çevresindeki beş ilçeden toplam 165 katılımcıdan farklı klinik örnekler alındı. Bu klinik örnekler kan, deri, idrar ve yaradan alınmıştır. *S.aureus* suşlarının fenotipik tanımlaması, BP Agar ve MSA besiyerinde gram boyama, katalaz, koagülaz, DNAz yetiştirme testi ile yapıldı. Yöntem, Lu vd. (2011) çalışmasında açıklandığı gibi gerçekleştirildi.

3.4 Antibiyotik Duyarlılığının Araştırılması

Antibiyotik duyarlılığının araştırılmasında CLSI tarafından önerilen talimatlara uyularak Kirby-Bauer Metodu kullanıldı. Bu nedenle *S. aureus* izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları için MHA ortamında sekiz adet antibiyotik diski üzerinde araştırma

yapılmıştır. Test edilen antibiyotik disklerin tamamı İngiliz MAST firmasına ait olup isimleri ve miktarları Çizelge 3.8'deki gibidir.

Çizelge 3.8 *S. aureus* suşlarının CLSI talimatlarına göre antibiyotik duyarlılıklarının saptanmasında kullanılan antibiyotik diskleri

Antibiyotik Diski ve Kökeni	**Miktar (µg)**
Sefoksitin Antibiyotik Diski (MAST Group, İngiltere)	10
Neomisin Antibiyotik Diski (MAST Group, İngiltere)	10
Siprofloksasin Antibiyotik Diski (MAST Group, İngiltere)	10
Penisilin Antibiyotik Diski (MAST Group, İngiltere)	10
Gentamisin Antibiyotik Diski (MAST Group, İngiltere)	10
Amoksisilin Antibiyotik Diski (MAST Group, İngiltere)	10
Kloramfenikol Antibiyotik Diski (MAST Group, İngiltere)	30
Klindamisin Antibiyotik Diski (MAST Grubu, Birleşik Krallık)	10

Her bir antibiyotik için duyarlılık testlerinin her birinde kullanılan *S. aureus* suşları şöyledir. MRSA pozitif kontrol olarak mecA genli standart *S. aureus* suşu kullanıldı. (ATCC 33591). Pozitif kontrol olarak pvl genli standart *S. aureus* suşu kullanıldı (ATCC 49775). Negatif kontrol olarak S. epidermis standart suşu kullanıldı (ATCC 12228).

3.5 DNA Ekstraksiyonu ile PCR

DNA Ekstraksiyonu, DNA Ekstraksiyon Kiti (Thermo Fisher, Amerika Birleşik Devletleri) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Gerekli Materyaller

1.5 mL mikrosentrifuge tubları

Su banyosu, 80°C

Su banyosu, 37°C

Izopropanol, oda sıcaklığı

%70 etanol, oda sıcaklığı

Su banyosu, 65°C (isteğe bağlı; hızlı DNA rehidrasyonu içindir).

50 mM EDTA (pH 8,0)

10 mg/mL lysozyme

10mg/mL lizostafin

Extrasyon protokolü

1. 1.5 mL'lik bir mikrosantrifüj tüpüne 1 mL gecelik kültür eklenir.
2. Hücreleri peletlemek için 13.000–16.000 x g'de 2 dakika santrifüjlenir. Süpernatantı çıkarın. Hücreleri 480 ul 50 mM EDTA içinde tamamen yeniden süspanse edilir.
3. Yeniden süspanse edilen hücre peletine toplam 120 µL hacimde uygun litik enzimleri ekleyin ve karıştırmak için hafifçe pipetlenir.
4. Bu ön işlemin amacı, hücre duvarını zayıflatarak verimli hücre lizisinin gerçekleşmesini sağlamaktır.
5. Not: Belirli Staphylococcus türleri için 60 µL 10mg/mL lizozim ve 60 µL 10mg/mL karışımıdır.
6. Etkin lizis için lizostafin gereklidir. Bununla birlikte, birçok Gram Pozitif Bakteri Suşları.

7. Micrococcus luteus, Nocardia otitidiscaviarum, Rhodococcus rhodochrous ve Brevibacterium albidium) lyse
8. Lizozimin tek başına verimli bir şekilde kullanılması.
9. Örneği 37°C'de 30–60 dakika inkübe edilir. 13.000–16.000 × g'de 2 dakika santrifüjleyin ve süpernatantı çıkarmaktadır.
10. 600 µL Nuclei Lysis Solution eklenir. Hücreler yeniden süspanse edilene kadar yavaşça pipetlenir.
11. Hücreleri parçalamak için 80°C'de 5 dakika inkübe edilir; sonra oda sıcaklığına soğutulur.
12. Hücre lizatına 3 µL RNaz Solüsyonu eklenir. Karıştırmak için tüpü 2-5 kez ters çevirilir.
13. 37°C'de 15-60 dakika inkübe edilir. Numuneyi oda sıcaklığına soğutulur.
14. RNaz ile muamele edilmiş hücre lizatına 200 µL Protein Çökeltme Solüsyonu eklenir.
15. Protein Çökeltme Solüsyonunu hücre lizatı ile karıştırmak için 14 saniye.
16. Örneği buz üzerinde 5 dakika inkübe edilir.

Her bir PCR Reaksiyon karışımı şu şekilde oluşturulmuştur:

- 1.0 µL DNA şablonu
- Aşağıda belirtilen her bir primerden 10 mM
- 2.0 µL Taq tamponu
- 2.5 mM deoksinükleotid trifosfat

2,5 mM Taq DNA polimeraz (Thermo Fisher, Amerika Birleşik Devletleri) kullanılan primerler ve referansları Çizelge 3.9'daki gibidir.

Çizelge 3.9 Kullanılan gen, primer ve referans bilgileri

Gen	**Primer Sırası (5'→3')**	**Referanslar**
mecA-F	TCCAGATTACAACTTCACCAGG	Amini vd. (2012), Pajic vd. (2014), Meharaj vd. (2019), Abbasi vd. (2020)

mecA-R	CCACTTCATATCTTGTAACG	Amini vd. (2012)
pvl-F	AGAAGATACAAGTAGCGATAAGTG	El-Hassnawi vd. (2012)
pvl-R	AAGGATTGAAACCACTGTGTAC	Hora vd. (2020)
koa-F	CGAGACCAAGATTCAACAAG	Goh vd. (1992)
koa-R	AAAGAAAACCACTCACATCA	Kacou-N'douba vd. (2011)
spa-F	ATCTGGTGGCGTAACACCTG	Mohammed vd. (2009)
spa-R	CGCTGCACCTAACGCTAATG	Jahanshahi vd. (2018)

Termal Döngüleme, Termal Döngüleyici (Thermofisher, ABD) üzerinde aşağıdaki parametrelerle gerçekleştirilmiştir:

- Denatürasyon: 94 °C – 30 saniye
- Amplifikasyon: 94 °C – 60 saniye
- Ek Amplifikasyon: 55 °C – 50 saniye, 72 °C – 60 saniye
- Son Uzatma: 72 °C – 60 saniye

3.6 Coa Gen ve Spa Gen PCR Ürünlerinin RFLP Denetimleri

Coa geninin PCR ürününün RFLP tahlilinde, coa geninin PCR ürününün 10 uL'si 10 birim HaeIII (Thermo Fisher, Amerika Birleşik Devletleri) hızlı sindiren enzim ile 36,5 °C'de 45 süreyle su banyosunda inkübe edildi. dakika. bp değeri 81 olarak ayarlanmıştır. Spa geninin her bir amplikonu için, 5 uL PCR ürünü, 10 birim 5 Bsp1431 (Thermo Fisher, ABD) kısıtlama enzimi ile 36,5 °C'de 180 dakika süreyle inkübe edildi. PCR ürünleri ve kısıtlama sindirme fragmanları, %2'lik bir agaroz jeli üzerinde elektroforez ile tespit edildi. Farklı suşları tanımlamak için yorumlama kriteri, tek bir bant farkıdır. Her

benzersiz PCR-RFLP modeline bir genotip atanmıştır. İstatistiksel Analiz için IBM SPSS (2020) programı kullanılmış ve ki-kare testi ile analiz yapılmıştır.

3.7 Yöntemler

3.7.1 Kültür ortamı

Kanlı agar

Hazırlanan besiyerinden yaklaşık (40 g) (1000 mL) distile veya deiyonize suya ilave edildi, süspansiyon, ortamın tamamen çözülmesi için kaynama noktasına kadar ısıtıldı, daha sonra (15 libre) basınçta ve (121 °C) otoklavlanarak sterilize edildi.) yaklaşık (15 dakika). ortam daha sonra otoklavdan çıkarıldı ve yaklaşık (40-45 °C)'ye soğutuldu. buna (%5 v/v) steril defibrine kan aseptik olarak eklendi ve iyice karıştırıldı. Daha sonra ortam, steril koşullar altında steril Petri plakalarına döküldü.

Beyin-Kalp İnfüzyon suyu

Beyin-kalp infüzyon suyu için, (1000 mL) damıtılmış su içinde (37,0 g) askıya alındı, ardından ortamı tamamen çözmek için ısıtıldı.

Mannitol Tuzlu Agar

Mannitol tuzlu agar için, 1000 mL damıtılmış su içinde yaklaşık (111,025 g) ortam. Ortamı tamamen çözmek için kaynatılır. 45-50 °C'ye soğutulur ve petri kaplarına dökülür.

Metil Red-Voges Proskauer Suyu (MRVP)

MRVP için, askıya alınmış (17 g/L), tüplere ve otoklava (5 mL) dağıtıldı (121 °C'de 15 dakika), pH: 25 °C'de 6,9 ± 0,2. Et suyu berrak ve sarımsı-kahverengiydi. Metil kırmızısı

indikatör solüsyonunun hazırlanması için 0,04 g metil kırmızısını 60 mL mutlak etanol içinde süspanse edildi, pH'ı 5,0'a yaklaşık bir değere ayarlandı. Çözelti daha sonra turuncu oldu. O'Meara reaktifinin hazırlanması için Asma (40 g), potasyum hidroksit (100 mL) damıtılmış su soğumaya bırakıldı, (0,3 g) kreatin (monohidrat) Hazırlanan reaktif solüsyonu buzdolabında (+4 °C) yaklaşık (4 hafta) saklanabilir. Bakır sülfat çözeltisinin hazırlanması acc. LEIFSON'a 40 mL konsantre amonyak içinde askıda (1 g) bakır sülfat ve yaklaşık 690 mL eklendi. (%10 potasyum) BARRITT reaktifinin hazırlanması için askıya alınmış (5 g) naftol (1)(100 mL içinde) mutlak etanol kullanılmaktadır.

Mueller Hinton suyu

Mueller Hinton suyu için, 1 L distile su içerisine 21 g Mueller Hinton broth tozu ilave edilerek karıştırılır ve tamamen çözülür. 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

Mueller Hinton ağarı

Mueller Hinton ağarı için, 38 g besiyeri bir L distile su içinde süspanse edildi. Ortamı tamamen çözmek için sık sık çalkalayarak ısıtıldı ve bir dakika kaynatıldı. 121°C'de 15 dakika otoklavlandı. Soğutulmuş Mueller Hinton agar, homojen bir derinlik sağlamak için düz, yatay bir yüzey üzerinde steril petri kaplarına döküldü.

3.7.2 Tanımlama testleri

Gram boyama

Gram boyama için mikroorganizmanın tanımlanmasındaki ilk adım, hücrelerin şekil, boyut, diziliş gibi hücre morfolojisini ve boya ile reaksiyonlarını belirlemektir. Tüm bakteri izolatları ışık mikroskobu altında incelendi, taze kültürden yaymalar hazırlandı ve gram boyama ile boyandı (Becerra *et al*. 2016).

Katalaz testleri

Katalaz testleri için bir cam slayt üzerinde hidrojen peroksit çözeltisinden (%3) bir ila iki damla ve bakteri üremesinden daha az koloni karıştırıldı. Hava kabarcığı oluşumu ise pozitif sonuç olarak kabul edildi (Ganamani *et al*. 2017).

Koagülaz testi

Koagülaz testi (Sagar 2018) koagülaz *Staphylococcus aureus* (pozitif) enzimini, koagülaz enzimini oluşturmayan S. epidermis ve S. saprophyticus'tan (negatif) ayırt etmek için kullanılır. Yani Koagülaz Negatif Stafilokok (CONS). Prensip olarak koagülaz, fibrinojeni fibrine dönüştüren ve plazmanın pıhtılaşmasına neden olan enzim benzeri bir proteindir. *Staphylococcus aureus* iki koagülaz formu geliştirir. İlk olarak bağlı koagülazda (topaklanma faktörü) bakteri hücre duvarına bağlanır ve doğrudan fibrinojen ile etkileşir. Bu, stafilokok hücresi üzerinde çökelmek üzere fibrinojenin değişmesiyle sonuçlanır ve hücrelerin plazma ile karıştırılmış bir bakteri süspansiyonu altında kümelenmesine izin verir. Bu, koagülaz reaksiyon faktörü gerektirmez. İkinci olarak serbest koagülazda modifiye edilmiş veya türetilmiş bir trombin molekülü olan plazma koagülaz tepkime faktörünün (CRF) bir koagülaz-CRF kompleksine aktivasyonu gerektirir. Karşılığında, bu kompleks fibrinojen oluşturarak fibrin pıhtısına tepki verir. Prosedür ve koagülaz test çeşitleri olarak bağlı koagülazı tespit etmek için slayt testi aşamaları aşağıdaki gibidir:

1. Bir slaytın her iki ucuna veya iki farklı slayt üzerine bir damla fizyolojik salin yerleştirildi.
2. İzole edilen koloninin bir kısmı, iki kalın süspansiyon oluşturmak için ilmek, düz tel veya ahşap sap ile karıştırıldı.
3. Süspansiyonlardan birini bir damla insan veya tavşan plazmasına ekleyin ve nazikçe karıştırıldı.
4. Türlerin 10 saniye içinde kümelenmesini sağlandı.
5. Organizmanın granüler görünümünün bir kısmını gerçek koagülaz kümelenmesinden ayırmak için ikinci süspansiyona plazma uygulanmaz.

Serbest koagülaz tespiti için tüp testi aşamaları aşağıdaki gibidir:

1. Fizyolojik tuzlu su içinde, plazma 10'da 1 oranında seyreltilmesi (0,2 mL plazmayı 1,8 mL tuzlu su ile karıştırmak).
2. T (Test), P (Pozitif Kontrol) ve N (Negatif Kontrol) ile üç küçük test tüpü etiketlenmesi. Test broth kültürü 18-24 saattir, pozitif kontrol 18-24 saattir. Steril broth *S. aureus* broth kültürüdür ve negatif düzenlemedir.
3. Her tüpün içinde yarım mL plazma seyreltilmesi.
4. "T" etiketli tüpe beş damla test organizması eklenmesi, "P" tüpe 5 damla *S. aureus* ve "N » etiketli tüpe 5 damla steril et suyu kültürü yapılması.
5. Üç tüp karıştırıldıktan sonra 35-37 derece santigratta inkübe edilmesi.
6. 1 saat sonra pıhtılaşmayı kontrol edilmesi. Pıhtılaşma olmadıysa, 30 dakikalık aralıklarla 6 saate kadar muayene edilmesi.

API Staph. sistem

API Staph. sistem tanımlama işlemi tedarikçiye göre yapılmıştır. Protokolü (Biomerieux, Fransa) şu şekilde açıklanmıştır. İnokulumun hazırlanması için 18-20 saat ile saf koloniler staph. API kiti (biomerieux, Fransa) tarafından sağlanan veya (0,5 McFarland standardı) eşdeğerine ulaşmak için 5 mL steril normal salin. İkinci olarak stripin hazırlanışı için nemli bir ortam oluşturmak için strip kutusu çatlaklarına 5 mL distile su dağıtılarak yapıldı. Stripin aşılanması için temiz bir şırınga kullanılarak inokulum süspansiyonu şeridin tamamen mikro ampulleri. Tüpte kabarcık oluşmasını önlemek için, şerit eğimli bir konuma ve tüpün ucuna sabitlendi. İğne, mikro tüpün üst kısmının yanına yerleştirildi. Sonra tamamen mikro ampuller doldurulmuştur, iki mikro ampul hariçtir. Arginin hidrolizi ve üreaz üretimi incelemelerini içerir. Önceki her iki mikro ampulde de üst boruya mineral yağ eklenmiştir. Tüpün tabanı inokulum ile doldurulduktan sonra. Son olarak, şerit kutusu kapatıldı ve 18-24 saat 37°C'de inkübe edildi. Stripi okumak için daha önce sonuçlar kaydedilirken, Nitrat içeren Voges proskauer (VP), indirgeme (NIT), alkalin fosfatlar (PAL) ve asetil-metil karbinol olmak üzere üç test mikro ampulüne API Staph kiti aracılığıyla sağlanan belirli maddeler eklendi (Çizelge 3.10).

Çizelge 3.10 Çalışmada kullanılan API Staph reaktifleri

Test	**Reaktifleri**	**Miktarı**
VP	VP1 ve VP2	Her birine bir damla
NIT	NIT1 ve NIT2	Her birine bir damla
PAL	ZYM A ve ZYM B	Her birine bir damla

Sonuçlar tedarikçi rehberliğine bağlı olarak doğrulandı: bu sonuçlar renklerine göre pozitif veya negatif olarak doğrulandı ve rakamlara dönüştürüldü. Her şerit yedi gruba ayrıldı ve her grup üç muayeneden oluşturuldu. Pozitif testler (1 veya 2 veya 4) ve negatif testler (0) olarak numaralandırıldı. Daha sonra her grubun 3 alt biriminin toplamı hesaplanmıştır. Bitirmek için, her şeridin sonucu yedi sayıyı ifade ediyordu. Bakterilerin cinsini ve türlerini tanımak için bu yedi sayı, Biomeriux şirketi tarafından sağlanan bir analitik profil indeksinin kod numarasına uyarlandı.

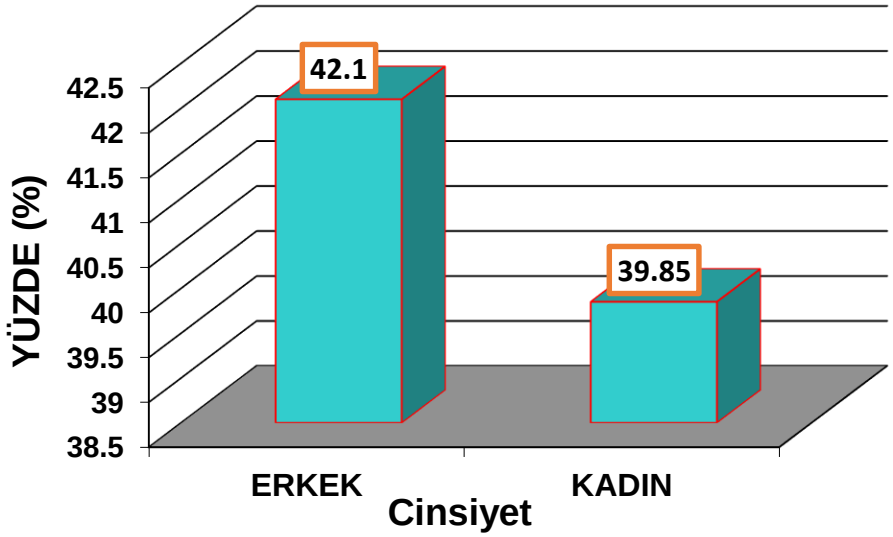
4. BULGULAR

Deneyde kullanılan örnekler klinik kan, yara ve idrar örneklerinden alınarak gram boyama, MsA, katalaz testi ve pıhtılaşma testi ile ayrıştırılmıştır. 165 klinik numuneden 100'ü uygun görüldüğü şekilde toplanmıştır. Klinik örneklerin özellikleri ve hastaların cinsiyetleri Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Numune ve katılımcı yaş / cinsiyet dağılımı

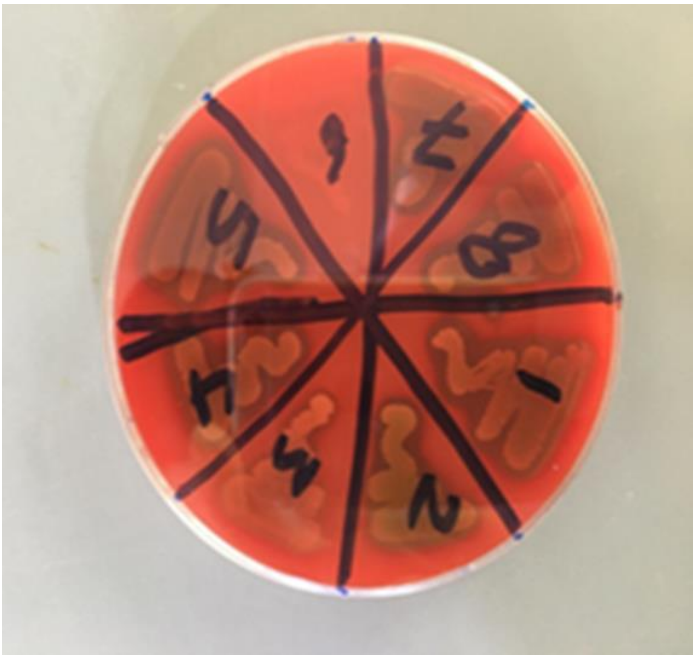
	Kadın		**Erkek**		**Toplam**	
	Sayı	**%**	**Sayı**	**%**	**Sayı**	**%**
Cilt (Deri ve Yumuşak Doku Enfeksiyonu)	11	11	34	34	45	45
Yara (Cerrahi Operasyon / Derin Yara)	2	2	30	30	32	32
Kan	7	7	10	10	17	17
İdrar	1	1	5	5	6	6

Çalışma kapsamında elde edilen 165 örnekten 100'ü seçilerek çalışıldı. Kullanılan 100 örneğin 45'i, deri ve yumuşak doku enfeksiyonu vakaları ile başvuran 11 kadın ve 34 erkek hastadan elde edilen deri kaynaklı MRSA örnekleriydi. Diğer yandan 2'si kadın, 30'u erkek toplam 32 hastadan cerrahi operasyon yaralarından ve derin yaralardan alınan örnekler incelenmiştir. Kan örneklerine bakıldığında 7 kadın ve 10 erkek olmak üzere toplam 17 örneğin kullanılmış, idrar için 1 kadın hastadan 5 ve erkek hastadan 5 olmak üzere toplam 6 örnek kullanılmıştır. Çalışmaya toplam 21 kadın ve 79 erkek hasta katıldı. Hastalarda sigara, alkol ve ilaç kullanımı bildirilmedi. Hastaların cinsiyet ve yaş dağılımı Şekil 4.1'deki gibidir.

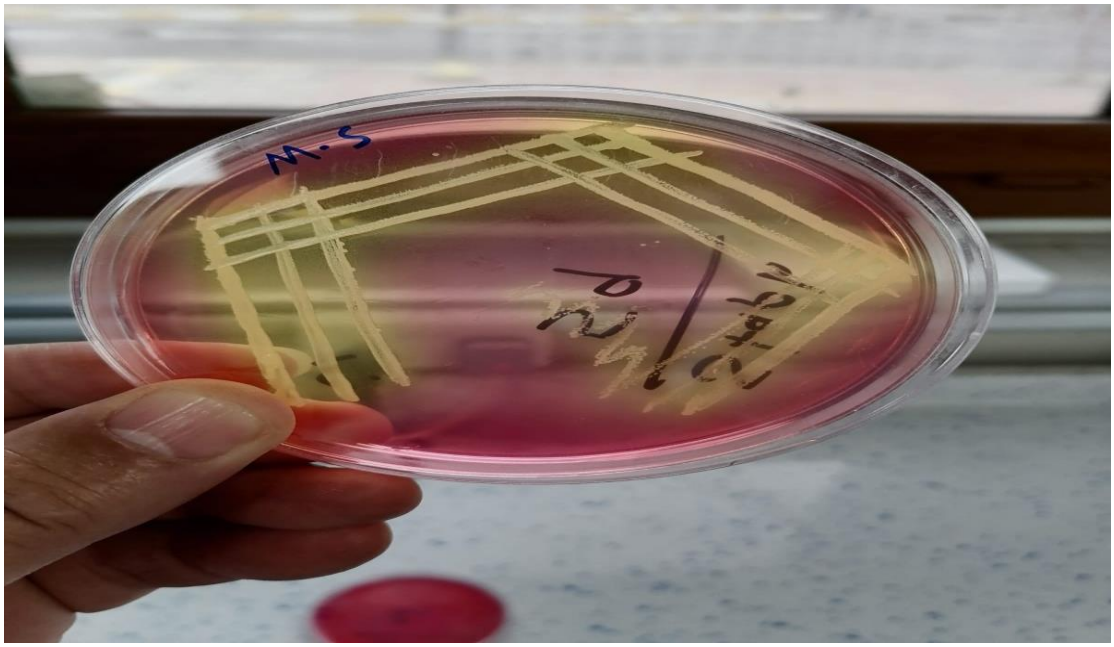


Şekil 4.1 Erkek ve Kadın hastaların yaş ortalamaları

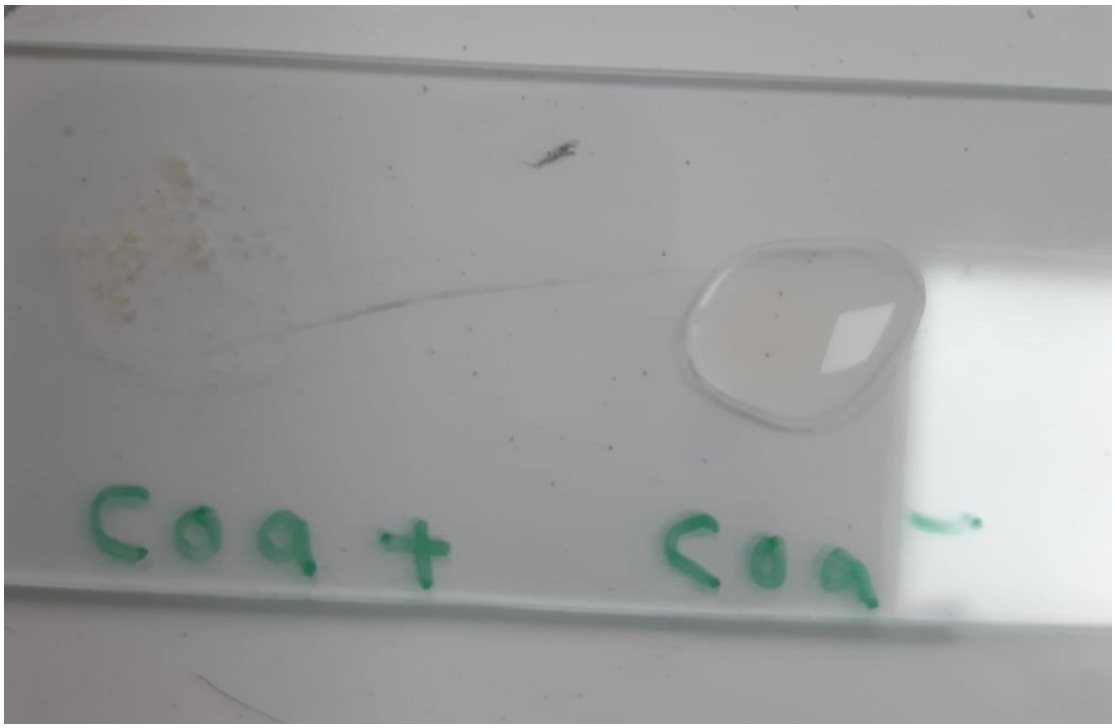
79 erkek hastanın yaş ortalaması 42,10 ± 17,91 iken 21 kadın hastanın yaş ortalaması 39,85 ± 17,85 olarak hesaplandı. Toplam hasta sayısının yaş ortalamasına cinsiyet gözetmeksizin bakıldığında 41,63 ± 17,83 olduğu görülmektedir. Şekil 4.2 *S. aureus*'un beta-hemolitik oluşumunu göstermektedir. Şekil 4.3 mannitol tuzlu agarı göstermektedir. Şekil 4.4 koagülaz testini göstermektedir.



Şekil 4.2 *S. aureus*'un beta-hemolitik oluşumu



Şekil 4.3 Mannitol tuzlu agar



Şekil 4.4 Koagülaz testi

S. aureus izolatlarının test edilen antibiyotiklere duyarlılığı Çizelge 4.2'de ve Şekil 4.5'te gösterilmektedir.

Çizelge 4.2 *S. aureus* izolatlarının test edilen antibiyotiklere duyarlılığı

	Dayanıklı		Orta Dayanıklı		Duyarlı	
	Sayı	**%**	**Sayı**	**%**	**Sayı**	**%**
Amikasin	72	72	2	2	26	26
Amoksisilin	83	83	1	1	16	16
Ampisilin	91	91	3	3	6	6
Eritromisin	51	51	20	20	29	29
Antibiyotik	45	45	5	5	50	50
Klindamisin	50	50	10	10	40	40
Kloramfenikol	7	7	14	14	79	79
Penisilin	99	99	0	0	1	1
Sefoksitin	70	70	2	2	28	28
Siprofloksasin	45	45	0	0	55	55
Trimetoprim	85	85	4	4	11	11
Vankomisin	0	0	1	1	99	99

Buna göre *S. aurus* izolatlarından; 72'si Amikasine direnç gösterdi, 2'si orta düzeyde direnç gösterdi ve 26'sı hiç direnç göstermedi. Bunlardan 83'ü Amoksisiline direnç, 1'i orta direnç ve 16'sı direnç göstermedi. Bunlardan 91'i Ampisiline dirençli, 3'ü orta derecede dirençli ve 6'sı direnç göstermiyor 51'i Eritromisine dirençlidir. Bunlardan 29'u orta derecede dirençli olup, bunlardan 45'i Gentamisin'e dirençli, 5'i orta derecede dirençli ve 50'si hiç direnç göstermemektedir. 50 tanesi Clindamycin'e direnç göstermekte, 10 tanesi orta düzeyde direnç göstermekte ve 40 tanesi direnç göstermemektedir. 7'si Kloramfenikol'e direnç gösterdi, 14'ü orta düzeyde direnç gösterdi ve 79'u hiç direnç göstermedi. Bunlardan 99'u Penisiline direnç gösterdi, hiçbiri orta düzeyde direnç göstermedi ve 1'i hiç direnç göstermedi. Bunlardan 70'i Sefoksitin'e direnç gösterirken, 2'si orta düzeyde direnç gösterdi ve 28'i ise hiç direnç göstermedi. 45'i Siprofloksasine direnç gösterdi, hiçbiri orta düzeyde direnç göstermedi ve 55'i direnç göstermedi. Bunlardan 85'i Trimetoprim'e direnç göstermekte, 4 tanesi orta düzeyde direnç göstermekte ve 11 tanesi ise hiç direnç göstermemektedir. Hiçbiri Vankomisine direnç

göstermedi, 1'i orta derecede direnç gösterdi ve 99'u direnç göstermedi. 100 örnek çalışıldığı için sayı ve yüzdeler eşittir.

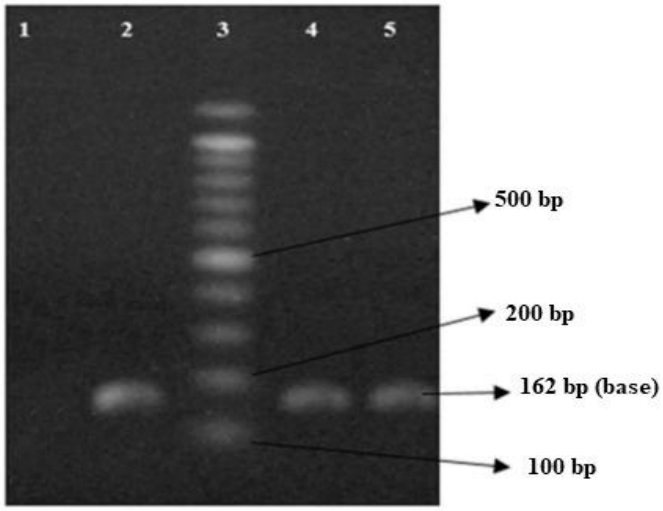


Şekil 4.5 Antibiyotik duyarlılığı

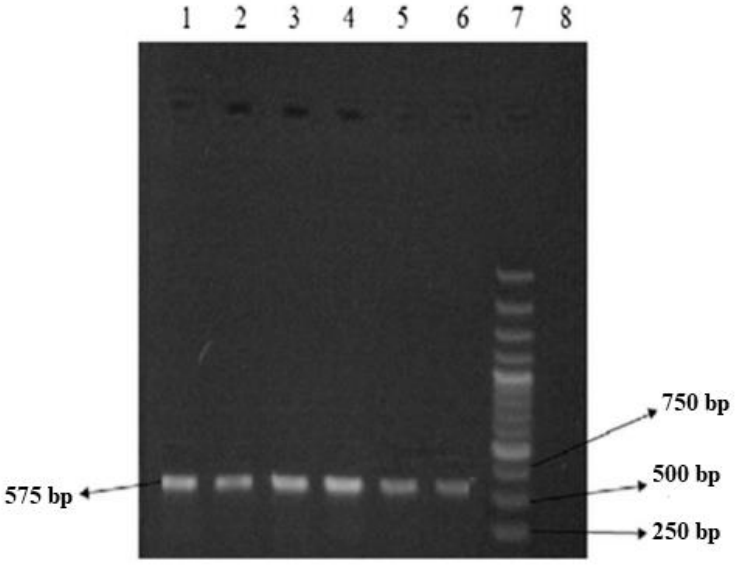
Şekil 4.6 klinik *S. aureus* örneklerinden ekstrakte edilen 162 bp mecA geninin PCR amplifikasyon ürünlerinin %1 agaroz jel elektroforez analizini göstermektedir. Şerit – 1 negatif kontrol ve DNA şablonu yok. Şerit - 2 ve Şerit - 4 pozitif izolatlardır. Lane - 3 DNA moleküler boyut belirteci ve 100 bp DNA Ladder. Şerit – 5 pozitif kontrol, yani mecA pozitif suşudur. MecA geninin analiz edilen 100 örneğin 64'ünde mevcut olduğu ve orantısal olarak %64'e tekabül ettiği bulundu. Pvl geninin amplifikasyonu için bu genin spesifik primerleri kullanıldı ve aşağıdaki resimde görüldüğü gibi Jel Elektroforezinde 575 bp bandında gözlendi. pvl geni örneklerin %20'sinde pozitifti.

Şekil 4.7 klinik *S. aureus* örneklerinden ekstrakte edilen 575 bp mecA geninin PCR amplifikasyon ürünlerinin %1 agaroz jel elektroforez analizini göstermektedir. Şerit 1, 2, 3, 4 ve 5 pozitif izolatları gösterir, şerit 6 pozitif kontrolü, yani pvl pozitif suşu gösterir, şerit 7 DNA moleküler boyut işaretçisidir ve 100 bp DNA Merdiveni ve şerit 8 negatif kontroldür. Coa ve spa genlerinin amplifikasyonunda, ayrılan *S. aureus* suşlarında bu

genlerin spesifik primerleri kullanılarak coa geni ve spa geninin varlığı araştırıldı. Her iki gen için 575 bp bandının görülmesi amaçlandı. Sonuç olarak her birinin iki amplifikasyon paternine sahip olduğu ve genlerin farklı PCR ürün boyutlarına sahip olduğu belirlendi. Coa geni için sırasıyla 405, 810 ve 891 bp değerleri gözlendi. Spa geni için 240, 1200 ve 1296 bp değerleri görüldü.

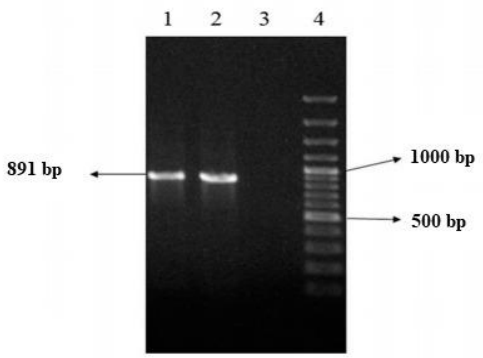


Şekil 4.6 Klinik *S. aureus* örneklerinden ekstrakte edilen 162 bp mecA geninin PCR amplifikasyon ürünlerinin %1 agaroz jel elektroforez analizi

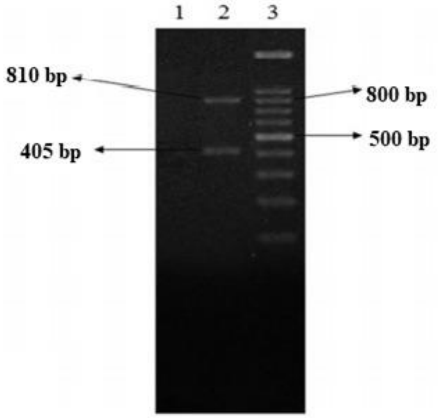


Şekil 4.7 Klinik *S. aureus* örneklerinden ekstrakte edilen 575 bp pvl geninin PCR amplifikasyon ürünlerinin %1 agaroz jel elektroforez analizi

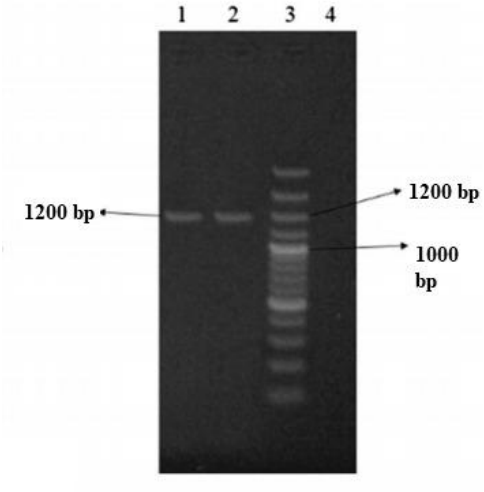
Şekil 4.8’de Coa gen PCR ürünlerinin %2 agaroz jel elektroforez analizi gösterilmektedir. Burada 100 bp'lik bir DNA merdiveni kullanıldı ve şerit 1 ve 2'deki izolatlar tek bant değerini göstermektedir. Şekil 4.8 Coa geni PCR ürünlerinin %2 agaroz jel elektroforez analizini göstermektedir. Burada 100 bp'lik bir DNA Merdiveni kullanıldı ve şerit 2'deki izolatlar iki farklı bant değerlerini göstermektedir. Şekil 4.9 spa geni PCR ürünlerinin %2 agaroz jel elektroforez analizini göstermektedir. Burada 100 bp'lik bir DNA merdiveni kullanıldı ve şerit 1 ve 2'deki izolatlar tek bant değeri göstermektedir. Şekil 4.10 spa geni PCR ürünlerinin %2 agaroz jel elektroforez analizini göstermektedir. Burada 100 bp'lik bir DNA Merdiveni kullanıldı ve şerit 1 ve 2'deki izolatlar iki farklı bant değerleri göstermektedir.



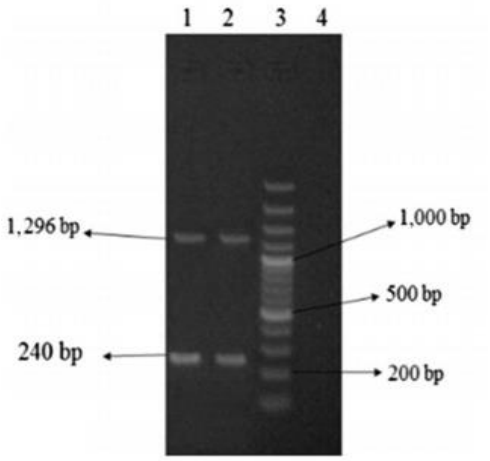
Şekil 4.8 Coa geni PCR ürünlerinin %2 agaroz jel elektroforez analizi



Şekil 4.9 Coa geni PCR ürünlerinin %2 agaroz jel elektroforez analizi



Şekil 4.10 Spa geni PCR ürünlerinin %2 agaroz jel elektroforez analizi



Şekil 4.11 Spa geni PCR ürünlerinin %2 agaroz jel elektroforez analizi

RFLP yaklaşımı kullanılarak, PCR bantlarının genetik içeriğinin çeşitliliği doğrulandı. HaeIII (Thermo Fisher, Amerika Birleşik Devletleri) ve Bsp1431 (Thermo Fisher, Amerika Birleşik Devletleri) enzimleri, koa ve spa genlerinin analizi için kullanıldı. 'Genotipik' mutasyon analizinin RFLP/PCR yöntemi, bir kısıtlama enzimi tanıma dizisinde yer alan ve bu siteyi karşılık gelen endonükleaz tarafından bölünmeye dirençli kılan baz çifti değişikliklerini, küçük silmeleri ve eklemeleri ölçmektedir. Epidemiyolojik çalışmalar, koa ve diğer genlerin PCR-RFLP dayalı tanımlama için daha basit ve doğru bir tiplendirme yöntemi olduğunu göstermiştir.

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Çalışmaya konu olan izolatlar, teşhis konulduğu için toplam 165 bakteri izolatından 100'ü tarafından incelenmiştir ve bu literatürdeki sonuç ile uyumludur (Todar 2011). Sonuçlar, izolatların katalaz enzimini üretme yetenekleri nedeniyle katalaz için pozitif, sitokrom c oksidaz üretememeleri nedeniyle oksidaz için negatif sonuçlar verdiğini göstermiştir. İncelenen bakteri izolatı ile enfekte olan kişilerin yaş grupları da incelendi ve yaş grupları istatistiksel olarak analiz edildi. Analiz sonuçlarına göre, 79 erkek hastanın yaş ortalaması 42,10 ± 17,91 iken, 21 hastanın yaş ortalaması 39,85 ± 17,85'dir. Toplam hasta sayısının yaş ortalamasına cinsiyet gözetmeksizin bakıldığında ise ortalamanın 41,63 ± 17,83 olduğu görülmektedir. Çalışmada yer alan Şekil 4.2, *Staphylococcus aureus'un* beta-hemolitik oluşumunu, Şekil 4.3 mannitol tuzu agarını ve Şekil 4.4 bir pıhtılaşma testini göstermektedir.

Çalışmada ek olarak, mecA ve pvl genlerinin varlığını araştırmak için incelenen numunelerin moleküler çalışması yapılmıştır. %1 agaroz jel elektroforezi analizi, klinik *S. aureus* örneklerinden ekstrakte edilen 162 bp mecA geninin PCR amplifikasyon ürünlerini göstermiştir. Şerit-1 negatif kontrol ve DNA şablonu olmamakla birlikte, Şerit-2 ve şerit-4 pozitif izolatlardır. Şerit - 3 DNA moleküler boyut belirteci ve 100 baz çiftli DNA merdiveni. Şerit-5, pozitif kontrol, yani mecA-pozitif suşudur. MecA geni, analiz edilen 100 örneğin 64'ünde bulunmuştur ve bu %64'e karşılık gelmektedir. Bu gen için spesifik primerler, Pvl genini amplifiye etr-mek için kullanılmıştır ve jel elektroforezinde 575 baz çifti aralığında gözlenmiştir. pvl geni örneklerin %20'sinde pozitif olarak gözlenmiştir.

Çalışmada yer alan Şekil 4.6, klinik *S. aureus* örneklerinden ekstrakte edilen 575 bp mecA geninin PCR amplifikasyon ürünlerinin %1 agaroz jel elektroforez analizini göstermektedir. Şerit 1, 2, 3, 4 ve 5 pozitif izolatlar gösterirken, şerit 6 bir pozitif kontrol, yani pvl-pozitif suş göstermiştir. Bu sonuçlar, çalışılan tüm izolatların mecA ve pvl genini içerdiğini bulan (Khattab ve diğerleri, 2015; Fadhil ve diğerleri, 2016) ile neredeyse uyumludur ve bunu gösteren (Benie et al. 2017) ile kısmen uyumludur (Benie ve diğerleri, 2017). İzolatların %89'u mecA için pozitifti. Sabharwal vd. (2014) ve Al-Dahmoshi vd.

(2018) bu geni taşıyan *S. aureus* izolatlarının yüzdesinin sırasıyla %75 ve %69.23 olduğunu belirtmiştir. Ayrıca *S. aureus* suşlarında bu genlere özgü primerler kullanılarak koa geninin ve SPA geninin varlığını kontrol etmek için PCR-RFLP teknolojisi kullanılmıştır. Her iki genin 575 bp aralığını görmek amaçlanmıştır. Sonuç olarak, her birinin iki amplifikasyon paternine sahip olduğu ve genlerin farklı boyutlarda PCR ürünlerine sahip olduğu belirlenmiştir. Coa geni için sırasıyla 405, 810 ve 891 bp değerleri gözlenmiştir. Spa geni için 240, 1200 ve 1296 bp değerleri görülmüştür. Bu sonuçlar, araştırmacının buldukları ile kısmen uyumludur (Kobayashi et al. 2013).

Çalışmamız sonucunda elde edilen sonuçlar dikkate alındığında Sefoksitin Antibiyotik Diski ile yapılan analiz, S. auerus suşlarının %70'inin sefoksitine, yani MRSA'ya dirençli olduğunu ortaya çıkardı. Irak bölgesinde yapılan diğer çalışmalara baktığımızda aşağıdaki sonuçlarla karşılaşılmaktadır:

- Assafi vd. (2020) Irak'ın Duhok şehrinde tarım işçileri arasında MRSA oranı %84 olarak bulunmuştur.

- Hussein vd. (2017) Kuzey Irak'ta çalışan sağlık çalışanlarından elde edilen suşlarda MRSA oranı %61,0 olarak bulunmuştur.

- Habeeb vd. (2014) Irak, Duhok'ta 489 öğrencinin 90'ında S.auerus kolonizasyonu gözlenmiş ve bu 90 öğrenciden 10'unda Vankomisine duyarlı MRSA suşu saptanmıştır. Bu oran %2,04 olarak bildirilmektedir.

- Al-Dahbi ve Al-Mathkhury (2013) çalışmasında Bağdat'ta Iraklı hastalarda MRSA insidansı %94,3 olarak bildirilmiştir.

- Roberts ve Kazragis (2009) Irak'ta konuşlu Amerikan askerleri arasında bir araştırma yapmışlar ve bu çalışmada S. auerus'lu askerlerin %70'inin MRSA pozitif olduğu bildirilmiştir.

Görüldüğü gibi çalışmanın yapıldığı bölge, çalışmada incelenen kişilerin hastalık durumu, çalıştıkları yer, birlikte yaşayıp yaşamadıkları, hayvanlarla temas edip etmedikleri gibi faktörler belirleyici faktörlerdir. Çalışmamız diğer çalışmalarla uyumludur. Daha sağlıklı sonuçlar elde etmek için daha fazla örneklem bazlı çalışma yapılmalıdır. MRSA suşları, her geçen gün küresel bir sağlık tehdidi haline gelen antibiyotik direncine katkıda bulunur. Bu nedenle bilinçli antibiyotik kullanımı teşvik edilmeli, temizlik ve hijyen önlemleri alınmalıdır. Irak'taki MRSA suşları hakkında daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Çalışmanın sonuçları, S. auerus bakterisinin kadınlarda yaygın olduğunu ve coğrafi bölgelere göre değişiklik gösterdiğini göstermiştir. Bakteri izolatlarının çoğunun çoğu antibiyotiğe karşı dirençli olduğu görülmüştür. İncelenen genler PCR kullanılarak tespit edilmiştir ve gen ekspresyonu bazı Bacillus izolatlarında açıkça gösterilmiştir. Bu çalışmada izolatlar arasındaki genetik bağlantıyı keşfedebilmek için PCR-RFLP tekniğinin kullanılması esastır.

Öneriler, diğer Staphylococcus bakteri türleri tespit edilebilir. Phytech cihazı kullanılabilir ve 16 sRNA ile moleküler tanılamanın kullanılması gibi daha yeni tanı yöntemleri kullanılabilir. Bakterilerde virülans faktörlerinden sorumlu diğer genler araştırılabilir. Moleküler çalışmada, Real Time PCR ve PCR- RAPD kullanımı gibi ek yöntemlere yer verilebilir.

KAYNAKLAR

Abbasi, M., Seyed-Mohammadi, S., Asarehzadegan A., and Saki, M. 2020. Investigation of SCCmec types I–IV in clinical isolates of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in Ahvaz, Southwest Iran. Bioscience reports, 40(5): 433-440.

Abe, M., Kobayashi, M., Fujiyoshi, E., Tamaki, M., Kikuchi, N. and Murase, N. 2013. Use of PCR-RFLP for the discrimination of Japanese Porphyra and Pyropia species (Bangiales, Rhodophyta). J. Appl. Phycol., 25: 225–232.

Aiello, A. E., Lowy, F. D., Wright, L. N. and Larson, E. L. 2006. Meticillin-resistant Staphylococcus aureus among US prisoners and military personnel: review and recommendations for future studies. The Lancet infectious diseases, 6(6): 335-341.

Al-Dahbi, A. M. and Al-Mathkhury, H. J. 2013. Distribution of methicillin resistant Staphylococcus aureus in Iraqi patients and healthcare workers. Iraqi Journal of Science, 54(2): 293-300.

Al-Dahmoshi, H. O., Al-Khafaji, N. S., Jeyad, A. A., Shareef, H. K. and Al-Jebori, R. F. 2018. Molecular Detection of Some Virulence Traits Among S. aureus Isolates, Hilla-Iraq. Biomedical and Pharmacology Journal, 11(2): 835-842.

Al-Hassnawi, H. H., Al-Charrakh, A. H. and Al-Khafaj, J. K. 2012. Antibiotic Resistance Patterns of Community Acquired Methicillin Resistance Staphylococcus aureus (CA-MRSA) in Al-Hilla/ Iraq Kerbala. Journal of Pharmaceutical Sciences, 4: 678-683.

Amini, R., Abdulamir, A. S., Jahanshiri, F., Shan, L. C., Amini, Y., Sekawi, Z. and Jalilian, F. A. 2012. Isolation and identification of methicillin-resistant Staphylococcus aureus from students' coins. African Journal of Biotechnology, 11(50): 11143-11149.

Assafi, M. S., Hado, H. A. and Abdulrahman, I. S. 2020. Detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in broiler and broilers farm workers in Duhok, Iraq by using conventional and PCR techniques. Iraqi Journal of Veterinary Sciences, 34(1): 15-22.

Bannerman, T. L., Hancock, G. A., Tenover, F. C. and Miller, J. M. 1995. Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of Staphylococcus aureus. Journal of Clinical Microbiology, 33(3): 551–555.

Becerra, S. C., Roy, D. C., Sanchez, C. J., Christy, R. J. and Burmeister, D. M. 2016. An optimized staining technique for the detection of Gram positive and Gram negative bacteria within tissue. BMC research notes, 9: 216-221.

Becker, K., Heilmann, C. and Peters, G. 2014. Coagulase-negative staphylococci. Clinical microbiology reviews, 27(4): 870-926.

Becker, K., Schaumburg, F., Fegeler, C., Friedrich, A. W. and Köck, R. 2017. Staphylococcus aureus from the German general population is highly diverse. International Journal of Medical Microbiology, 307(1): 21-27.

Becker, K., Skov, R. L. and von Eiff, C. 2015. Staphylococcus, Micrococcus, and other catalase-positive cocci. Manual of clinical microbiology, 34(1): 354-382.

Benie, C. K. D., Dadie, A., Guessennd, N., Kouame, N. D. and N'gbesso-Kouadio N. A. 2017. Molecular Identification and Virulence Factors of S. aureus Strains Isolated from Animal Products. J Bacteriol Mycol Open Access, 4(3): 54-59.

Boyle-Vavra, S., Li, X., Alam, M. T., Read, T. D., Sieth, J., Cywes-Bentley, C. and Daum, R. S. 2015. USA300 and USA500 clonal lineages of Staphylococcus aureus do not produce a capsular polysaccharide due to conserved mutations in the cap5 locus. MBio, 6: 22-29.

Brink, A., Moolman, J., Da Silva, M. C. and Botha, M. 2007. Antimicrobial susceptibility profile of selected bacteraemic pathogens from private institutions in South Africa. South African Medical Journal, 97(4): 273-279.

Burian, M., Rautenberg, M., Kohler, T., Fritz, M., Krismer, B., Unger, C. and Goerke, C. 2010. Temporal expression of adhesion factors and activity of global regulators during establishment of Staphylococcus aureus nasal colonization. The Journal of infectious diseases, 201(9): 1414-1421.

Chambers, H. F. and DeLeo, F. R. 2009. Waves of resistance: Staphylococcus aureus in the antibiotic era. Nature Reviews Microbiology, 7(9): 629-641.

Chang, H. L., Tang, C. H., Hsu, Y. M., Wan, L., Chang, Y. F., Lin, C. T. and Lai, C. H. 2009. Nosocomial outbreak of infection with multidrug-resistant Acinetobacter

baumannii in a medical center in Taiwan. Infection control and hospital epidemiology, 30(1): 34-49.

Chen, C. J. and Huang, Y. C. 2014. New epidemiology of Staphylococcus aureus infection in Asia. Clinical Microbiology and Infection, 20(7): 605-623.

Cheng, A. G., DeDent, A. C., Schneewind, O. and Missiakas, D. 2011. A play in four acts: Staphylococcus aureus abscess formation. Trends in microbiology, 19(5): 225-232.

Chua, K. Y., Seemann, T., Harrison, P. F., Monagle, S., Korman, T. M., Johnson, P. D. and Stinear, T. P. 2011. The dominant Australian community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus clone ST93-IV [2B] is highly virulent and genetically distinct. PLoS One, 6(10): e25887.

Coombs, G. W., Daley, D. A., Lee, Y. T., and Pang, S. 2019. Australian group on antimicrobial resistance (AGAR) Australian Staphylococcus aureus sepsis outcome programme (ASSOP) annual report 2017. Communicable diseases intelligence, 43: 667-690.

Courvalin, P. 2006. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. Clinical infectious diseases, 42(1): 25-34.

Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, Í. and Penadés, J. R. 2001. Bap, a Staphylococcus aureus surface protein involved in biofilm formation. Journal of bacteriology, 183(9): 2888-2896.

Dantes, R., Mu, Y., Belflower, R., Aragon, D., Dumyati, G., Harrison, L. H. and Fridkin, S. 2013. National burden of invasive methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections. JAMA internal medicine, 173(21): 1970-1978.

De Lencastre, H., Oliveira, D. and Tomasz, A. 2007. Antibiotic resistant Staphylococcus aureus: a paradigm of adaptive power. Current opinion in microbiology, 10(5): 428-435.

de Oliveira, M. A. R., Carpentieri-Pípolo, V. and Nora, T. D. 2018. RBC2, a new dominant gene for resistance of soybean to cowpea mild mottle virus: inheritance and mapping. Crop Breeding and Applied Biotechnology, 18(2): 169–175.

DeLeo, F. R. and Chambers, H. F. 2009. Reemergence of antibiotic-resistant Staphylococcus aureus in the genomics era. The Journal of clinical investigation, 119(9): 2464-2474.

DeLeo, F. R., Otto, M., Kreiswirth, B. N. and Chambers, H. F. 2010. Community-associated meticillin-resistant Staphylococcus aureus. The Lancet, 375(9725): 1557-1568.

Diekema, D. J., Pfaller, M. A., Schmitz, F. J., Smayevsky, J., Bell, J. and Jones, R. N. 2001. Survey of infections due to Staphylococcus species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–1999. Clinical Infectious Diseases, 32(2): 114-132.

Drougka, E., Foka, A., Liakopoulos, A., Doudoulakakis, A., Jelastopulu, E., Chini, V. and Spiliopoulou, I. 2014. A 12-year survey of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in Greece: ST80-IV epidemic?. Clinical Microbiology and Infection, 20(11): 796-803.

Duim, B., Wassenaar, T. M., Rigter, A. and Wagenaar, J. 1999. High-Resolution Genotyping ofCampylobacter Strains Isolated from Poultry and Humans with Amplified Fragment Length Polymorphism Fingerprinting. Applied and Environmental Microbiology, 65(6): 2369-2375.

Dutfield, G. 2009. Intellectual property rights and the life science industries: past, present and future. World Scientific, Singapore.

Emonts, M., Uitterlinden, A. G., Nouwen, J. L., Kardys, I., Maat, M. P. D., Melles, D. C. and Belkum, A. V. 2008. Host polymorphisms in interleukin 4, complement factor H, and C-reactive protein associated with nasal carriage of Staphylococcus aureus and occurrence of boils. The Journal of infectious diseases, 197(9): 1244-1253.

Enright, M. C. and Spratt, B. G. 1999. Multilocus sequence typing. Trends in microbiology, 7(12): 482-487.

Enright, M. C., Day, N. P., Davies, C. E., Peacock, S. J. and Spratt, B. G. 2000. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of Staphylococcus aureus. Journal of clinical microbiology, 38(3): 1008-1015.

Epstein, L., Mu, Y., Belflower, R., Scott, J., Ray, S., Dumyati, G. and Lessa, F. C. 2016. Risk factors for invasive methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection after

recent discharge from an acute-care hospitalization, 2011–2013. Clinical Infectious Diseases, 62(1): 45-52.

Eriksen, N. R., Espersen, F., Rosdahl, V. T. and Jensen, K. 1995. Carriage of Staphylococcus aureus among 104 healthy persons during a 19-month period. Epidemiology and Infection, 115(1): 51-60.

Falagas, M. E., Karageorgopoulos, D. E., Leptidis, J. and Korbila, I. P. 2013. MRSA in Africa: filling the global map of antimicrobial resistance. PloS one, 8(7): e68024.

Faoagali, J. L., Thong, M. L. and Grant, D. 1992. Ten years' experience with methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a large Australian hospital. Journal of Hospital Infection, 20(2): 113-119.

Farber, J. M. 1996. An introduction to the hows and whys of molecular typing. Journal of Food Protection, 59(10): 1091-1101.

Feil, E. J. and Enright, M. C. 2004. Analyses of clonality and the evolution of bacterial pathogens. Current opinion in microbiology, 7(3): 308-313.

Foster, T. J., Geoghegan, J. A., Ganesh, V. K. and Höök, M. 2014. Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of Staphylococcus aureus. Nature reviews microbiology, 12(1): 49-62.

Francis, J. S., Doherty, M. C., Lopatin, U., Johnston, C. P., Sinha, G., Ross, T. and Bartlett, J. G. 2005. Severe community-onset pneumonia in healthy adults caused by methicillin-resistant Staphylococcus aureus carrying the Panton-Valentine leukocidin genes. Clinical infectious diseases, 40(1): 100-107.

Fraser, J. D. and Proft, T. 2008. The bacterial superantigen and superantigen-like proteins. Immunological reviews, 225(1): 226-243.

Frenay, H. M. E., Bunschoten, A. E., Schouls, L. M., Van Leeuwen, W. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., Verhoef, J. and Mooi, F. R. 1996. Molecular typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus on the basis of protein A gene polymorphism. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 15(1): 60-64.

Gagliotti, C., Balode, A., Baquero, F., Degener, J., Grundmann, H., Gür, D. and Heuer, O. 2011. Escherichia coli and Staphylococcus aureus: bad news and good news from the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net, formerly EARSS): 2002 to 2009. Eurosurveillance, 16(11): 198-203.

Ganamani, A., Hariharan, P. and Satyassela, P. 2017. Staphylococcus aureus: Overview of Bacteriology, Clinical Diseases, Epidemiology, Antibiotic Resistance and Therapeutic Approach. Frontiers in Staphylococcus aureus, Shymaa Enany and Laura E. Crotty Alexander, IntechOpen.

García-Álvarez, L., Holden, M. T., Lindsay, H., Webb, C. R., Brown, D. F., Curran, M. D. and Holmes, M. A. 2011. Meticillin-resistant Staphylococcus aureus with a novel mecA homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. The Lancet infectious diseases, 11(8): 595-603.

Gasser, R. B., Hu, M., Chilton, N. B., Campbell, B. E., Jex, A. J., Otranto, D., Cafarchia, C., Beveridge, I. and Zhu, X. 2007. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) for the analysis of genetic variation. Nature Protocols, 1(6): 3121–3128.

Goh, S. H., Byrne, S. K., Zhang, J. L. and Chow, A. W. 1992. Molecular typing of Staphylococcus aureus on the basis of coagulase gene polymorphisms. Journal of Clinical Microbiology, 30(7): 1642-1645.

Gordon, R. J. and Lowy. F. D. 2008. Pathogenesis of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection. Clin. Infect. Dis., 46: 350– 359.

Habeeb, A., Hussein, N. R., Assafi, M. S. and Al-Dabbagh, S. A. 2014. Methicillin resistant Staphylococcus aureus nasal colonization among secondary school students at Duhok City-Iraq. Journal of Microbiology and Infectious Diseases, 4(2): 59-63.

Harkins, C. P., Pichon, B., Doumith, M., Parkhill, J., Westh, H., Tomasz, A. and Holden, M. T. 2017. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus emerged long before the introduction of methicillin into clinical practice. Genome biology, 18(1): 1-11.

Hashim, H. O. and Al-Shuhaib, M. B. S. 2019. Exploring the potential and limitations of PCR-RFLP and PCR-SSCP for SNP detection: A review. Journal of Applied Biotechnology Reports, 6(4): 137–144.

Heilmann, C., Hussain, M., Peters, G. and Götz, F. 1997. Evidence for autolysin-mediated primary attachment of Staphylococcus epidermidis to a polystyrene surface. Molecular microbiology, 24(5): 1013-1024.

Heilmann, C., Schweitzer, O., Gerke, C., Vanittanakom, N., Mack, D. and Götz, F. 1996. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming Staphylococcus epidermidis. Molecular microbiology, 20(5): 1083-1091.

Hetem, D. J., Bootsma, M. C., Troelstra, A. and Bonten, M. J. 2013. Transmissibility of livestock-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Emerging infectious diseases, 19(11): 179-187.

Hiramatsu, K., H. Kihara, and T. Yokota, (1992) "Analysis of borderline- resistant strains of methicillin-resistant Staphylococcusaureus using polymerase chain reaction", Microbio Immuno 36(5): 445–53.

Holden, M. T., Lindsay, J. A., Corton, C., Quail, M. A., Cockfield, J. D., Pathak, S. and Edgeworth, J. D. 2010. Genome sequence of a recently emerged, highly transmissible, multi-antibiotic-and antiseptic-resistant variant of methicillin-resistant Staphylococcus aureus, sequence type 239 (TW). Journal of bacteriology, 192(3): 888-892.

Hookey, J. V., Richardson, J. F. and Cookson, B. D. 1998. Molecular typing of Staphylococcus aureus based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. Journal of Clinical Microbiology, 36(4): 1083–1089.

Hora, P., Noor A. M. and Masoumeh A. 2020. In strains of Staphylococcus aureus with gene (MRSA): the frequency of methicillin resistance gene isolated from clinical samples of Rasht hospitals (pvl) lecosidine Pantone Valentin. Journal of Fasa University of Medical Sciences, 10(1): 76-89.

Houston, P., Rowe, S. E., Pozzi, C., Waters, E. M. and O'Gara, J. P. 2011. Essential role for the major autolysin in the fibronectin-binding protein-mediated Staphylococcus aureus biofilm phenotype. Infection and immunity, 79(3): 1153-1165.

Howden, B. P., Davies, J. K., Johnson, P. D., Stinear, T. P. and Grayson, M. L. 2010. Reduced vancomycin susceptibility in Staphylococcus aureus, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. Clinical microbiology reviews, 23(1): 99-139.

Höffler, U., Bulanda, M., Heczko, P. B. and Pulverer, G. 1978. A comparison of staphylococcal nasal carrier rates in Germany and Poland. Medical microbiology and immunology, 164(4): 285-290.

Hussein, N. R., Assafi, M. S. and Ijaz, T. 2017. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus nasal colonisation amongst healthcare workers in Kurdistan Region, Iraq. Journal of global antimicrobial resistance, 9: 78-81.

Jahanshahi, A., Zeighami, H. and Haghi, F. 2018. Molecular characterization of methicillin and vancomycin resistant Staphylococcus aureus strains isolated from hospitalized patients. Microbial Drug Resistance, 24(10): 1529-1536.

Jain, R., Kralovic, S. M., Evans, M. E., Ambrose, M., Simbartl, L. A., Obrosky, D. S. and Roselle, G. A. 2011. Veterans Affairs initiative to prevent methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections. New England Journal of Medicine, 364(15): 1419-1430.

Jevons, M. P. 1961. Celbenin-resistant staphylococci. British medical journal, 1(5219): 124-133.

Joshi, G. S., Spontak, J. S., Klapper, D. G. and Richardson, A. R. 2011. Arginine catabolic mobile element encoded speG abrogates the unique hypersensitivity of Staphylococcus aureus to exogenous polyamines. Molecular microbiology, 82(1): 9-20.

Kacou-N'douba, A., Kazali, A., Koffi, K. S., Ekaza, E., Kouablan, A., Kangah, T. and Dosso, M. 2011. Community-acquired skin infections in children in Abidjan: methicillin-resistant Staphylococcus aureus and exfoliative toxin production. J Microbiol Antimicrob, 3: 201-5.

Kadıoğlu, A., Weiser, J. N., Paton, J. C. and Andrew, P. W. 2008. The role of Streptococcus pneumoniae virulence factors in host respiratory colonization and disease. Nature Reviews Microbiology, 6(4): 288-301.

Kaito, C., Saito, Y., Ikuo, M., Omae, Y., Mao, H., Nagano, G. and Sekimizu, K. 2013. Mobile genetic element SCC mec-encoded psm-mec RNA suppresses translation of agrA and attenuates MRSA virulence. PLoS Pathog, 9(4): e1003269.

Kazakova, S. V., Hageman, J. C., Matava, M., Srinivasan, A., Phelan, L., Garfinkel, B. and Jernigan, D. B. 2005. A clone of methicillin-resistant Staphylococcus aureus among professional football players. N engl J med, 352: 468-475.

Klevens, R. M., Morrison, M. A., Nadle, J., Petit, S., Gershman, K. and Ray, S. 2007. Active Bacterial Core surveillance (ABCs) MRSA Investigators. Invasive

methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in the United States. Jama, 298(15): 1763-1771.

Kluytmans, J., Mouton, J. W., Ijzerman, E. P. F., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., Maat, A. W. P. M., Wagenvoort, J. H. T. and Verbrugh, H. A. 1995. Nasal carriage of Staphylococcus aureus as a major risk factor for wound infections after cardiac surgery. Journal of Infectious Diseases, 171(1): 216-219.

Kluytmans, J., Van Belkum, A. and Verbrugh, H. 1997. Nasal carriage of Staphylococcus aureus: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. Clinical microbiology reviews, 10(3): 505-520.

Koupahi, H., Honarmand Jahromy, S. and Rahbar, M. 2016. Evaluation of Different Phenotypic and Genotypic Methods for Detection of Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA). Iranian journal of pathology, 11(4): 370–376.

Köck, R., Becker, K., Cookson, B., van Gemert-Pijnen, J. E., Harbarth, S., Kluytmans, J. A. J. W. and Friedrich, A. W. 2010. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. Eurosurveillance, 15(41): 19688.

Krismer, B., Weidenmaier, C., Zipperer, A. and Peschel, A. 2017. The commensal lifestyle of Staphylococcus aureus and its interactions with the nasal microbiota. Nature reviews microbiology, 15(11): 675-687.

Laabei, M., Recker, M., Rudkin, J. K., Aldeljawi, M., Gulay, Z., Sloan, T. J. and Massey, R. C. 2014. Predicting the virulence of MRSA from its genome sequence. Genome research, 24(5): 839-849.

Laarman, A., Milder, F., van Strijp, J. and Rooijakkers, S. 2010. Complement inhibition by gram-positive pathogens: molecular mechanisms and therapeutic implications. Journal of molecular medicine, 88(2): 115-120.

Ladhani, S., Joannou, C. L., Lochrie, D. P., Evans, R. W. and Poston, S. M. 1999. Clinical, microbial and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome. Clinical microbiology reviews, 12(2): 224-242.

Lai, C. C., Lin, S. H., Sheng, W. H. and Hsueh, P. R. 2013. Decrease in the incidence of meticillin-resistant Staphylococcus aureus nosocomial bloodstream infections in Taiwan. International journal of antimicrobial agents, 41(6): 591-9.

Lanini, S., D'Arezzo, S., Puro, V., Martini, L., Imperi, F., Piselli, P. and Ippolito, G. 2011. Molecular epidemiology of a Pseudomonas aeruginosa hospital outbreak driven by a contaminated disinfectant-soap dispenser. PloS one, 6(2): e17064.

Larsen, J., Petersen, A., Sørum, M., Stegger, M., van Alphen, L., Valentiner-Branth, P and Skov, R. L. 2015. Meticillin-resistant Staphylococcus aureus CC398 is an increasing cause of disease in people with no livestock contact in Denmark, 1999 to 2011. Eurosurveillance, 20(37): 300-21.

Lee, G. M., Kleinman, K., Soumerai, S. B., Tse, A., Cole, D., Fridkin, S. K. and Jha, A. K. 2012. Effect of nonpayment for preventable infections in US hospitals. New England Journal of Medicine, 367(15): 1428-1437.

Li, W., Raoult, D. and Fournier, P. E. 2009. Bacterial strain typing in the genomic era. FEMS microbiology reviews, 33(5): 892-916.

Lindsay, J. A. 2014. Staphylococcus aureus genomics and the impact of horizontal gene transfer. International Journal of Medical Microbiology, 304(2): 103-109.

Lindsay, J. A., Moore, C. E., Day, N. P., Peacock, S. J., Witney, A. A., Stabler, R. A. and Hinds, J. 2006. Microarrays reveal that each of the ten dominant lineages of Staphylococcus aureus has a unique combination of surface-associated and regulatory genes. Journal of bacteriology, 188(2): 669-676.

Llarrull, L. I., Fisher, J. F. and Mobashery, S. 2009. Molecular basis and phenotype of methicillin resistance in Staphylococcus aureus and insights into new β-lactams that meet the challenge. Antimicrobial agents and chemotherapy, 53(10): 4051-4063.

Lowy, F. D. 1998. Staphylococcus aureus infections. New England journal of medicine, 339(8): 520-53.

Lu, S. Y., Chang, F. Y., Cheng, C. C., Lee, K. D. and Huang, Y. C. 2011. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus nasal colonization among adult patients visiting emergency department in a medical center in Taiwan. PLoS One, 6(6): e18620.

Lucet, J. C., Paoletti, X., Demontpion, C., Degrave, M., Vanjak, D., Vincent, C. and Nicolas-Chanoine, M. H. 2009. Carriage of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in home care settings: prevalence, duration and transmission to household members. Archives of internal medicine, 169(15): 1372-1378.

Ma, X. X., Ito, T., Tiensasitorn, C., Jamklang, M., Chongtrakool, P., Boyle-Vavra, S. and Hiramatsu, K. 2002. Novel type of staphylococcal cassette chromosome mec

identified in community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains. Antimicrobial agents and chemotherapy, 46(4): 1147-1152.

Mack, D., Nedelmann, M., Krokotsch, A., Schwarzkopf, A., Heesemann, J. and Laufs, R. 1994. Characterization of transposon mutants of biofilm-producing Staphylococcus epidermidis impaired in the accumulative phase of biofilm production: genetic identification of a hexosamine-containing polysaccharide intercellular adhesin. Infection and immunity, 62(8): 3244-3253.

Mahmoudi, H., Arabestani, M. R., Mousavi, S. F. and Alikhani, M. Y. 2017. Molecular analysis of the coagulase gene in clinical and nasal carrier isolates of methicillin-resistant Staphylococcus aureus by restriction fragment length polymorphism. Journal of Global Antimicrobial Resistance, 8: 41–45.

Malachowa, N. and DeLeo, F. R. 2010. Mobile genetic elements of Staphylococcus aureus. Cellular and molecular life sciences, 67(18): 3057-3071.

Meharaj, S. S., Jayanthi, S., Danisvijay, D., Sujhithra, A. and Perumal, J. 2019. Multiplex PCR based detection of mecA, mecC and PVL gene in analysis of prevalence, circulation, transmission of MSSA/MRSA strains in a tertiary care hospital. IP International Journal of Medical Microbiology and Tropical Diseases, 5(3): 155-159.

Mellmann, A., Harmsen, D., Cummings, C. A., Zentz, E. B., Leopold, S. R., Rico, A. and Karch, H. 2011. Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic Escherichia coli O104: H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. PloS one, 6(7): e22751.

Mendes, R. E., Mendoza, M., Singh, K. K. B., Castanheira, M., Bell, J. M., Turnidge, J. D. and Jones, R. N. 2013. Regional resistance surveillance program results for 12 Asia-Pacific nations 2011. Antimicrobial agents and chemotherapy, 57(11): 5721-5726.

Merino, N., Toledo-Arana, A., Vergara-Irigaray, M., Valle, J., Solano, C., Calvo, E. and Lasa, I. 2009. Protein A-mediated multicellular behavior in Staphylococcus aureus. Journal of bacteriology, 191(3): 832-843.

Miller, L. G., Perdreau-Remington, F., Rieg, G., Mehdi, S., Perlroth, J., Bayer, A. S. and Spellberg, B. 2005. Necrotizing fasciitis caused by community-associated

methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Los Angeles. New England Journal of Medicine, 352(14): 1445-1453.

Mitchell, B. G., Collignon, P. J., McCann, R., Wilkinson, I. J. and Wells, A. 2014. A major reduction in hospital-onset Staphylococcus aureus bacteremia in Australia—12 years of progress: an observational study. Clinical Infectious Diseases, 59(7): 969-975.

Mohammed, M. J., Al-Bayati, F. A. and Deplano, A. 2009. Isolation and identification of antibacterial compounds from Thymus kotschyanus aerial parts and Dianthus caryophyllus flower buds. Phytomedicine, 16: 632-7.

Monecke, S., Coombs, G., Shore, A. C., Coleman, D. C., Akpaka, P., Borg, M. and Ehricht, R. 2011. A field guide to pandemic, epidemic and sporadic clones of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. PloS one, 6(4): e17936.

Moran, G. J., Krishnadasan, A., Gorwitz, R. J., Fosheim, G. E., McDougal, L. K., Carey, R. B. and Talan, D. A. 2006. Methicillin-resistant S. aureus infections among patients in the emergency department. New England Journal of Medicine, 355(7): 666-674.

Mortimer, P and Arnold, C. 2001. FAFLP: last word in microbial genotyping? J Med Microbiol, 50: 393–395.

Murchan, S., Kaufmann, M. E., Deplano, A., de Ryck, R., Struelens, M., Zinn, C. E. and Cookson, B. 2003. Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant Staphylococcus aureus: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains. Journal of clinical microbiology, 41(4): 1574-1585.

Nada, T., Ichiyama, S., Osada, Y., Ohta, M., Shimokata, K., Kato, N. and Nakashima, N. 1996. Comparison of DNA fingerprinting by PFGE and PCR-RFLP of the coagulase gene to distinguish MRSA isolates. Journal of Hospital Infection, 32(4): 305–317.

Nielsen, K. L., Pedersen, T. M., Udekwu, K. I., Petersen, A., Skov, R. L., Hansen, L. H. and Frimodt-Møller, N. 2012. Fitness cost: a bacteriological explanation for the demise of the first international methicillin-resistant Staphylococcus aureus epidemic. Journal of antimicrobial chemotherapy, 67(6): 1325-1332.

Novick, R. P. 2003. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. Molecular microbiology, 48(6): 1429-1449.

O'Brien, L. M., Walsh, E. J., Massey, R. C., Peacock, S. J. and Foster, T. J. 2002. Staphylococcus aureus clumping factor B (ClfB) promotes adherence to human type I cytokeratin 10: implications for nasal colonization. Cellular microbiology, 4(11): 759-770.

O'Gara, J. P. and Humphreys, H. 2001. Staphylococcus epidermidis biofilms: importance and implications. Journal of medical microbiology, 50(7): 582-587.

Orita, M., Y. Suzuki, T. Sekiya and K. Hayashi. 1989. A rapid and sensitive detection of point mutations and genetic polymorphisms using polymerase chain reaction. Genornics, 5: 874-879.

Otto, M. 2006. Bacterial evasion of antimicrobial peptides by biofilm formation. Antimicrobial peptides and human disease, 13: 251-258.

Otto, M. 2010. Basis of virulence in community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Annual review of microbiology, 64: 143-162.

Otto, M. 2014. Staphylococcus aureus toxins. Current opinion in microbiology, 17: 32-37.

Painter, K. L., Krishna, A., Wigneshweraraj, S. and Edwards, A. M. 2014. What role does the quorum-sensing accessory gene regulator system play during Staphylococcus aureus bacteremia?. Trends in microbiology, 22(12): 676-685.

Pajic, M. J., Rašić, Z. B., Velebit, B. M., Boboš, S. F., Mihajlović-Ukropina, M. M., Radinović, M. Ž. and Trojačanec, S. I. 2014. The prevalence of methicillin resistance and Panton-Valentine leukocidin synthesis genes in Staphylococcus aureus isolates of bovine and human origin. Vet arhiv, 84: 205-214.

Penn, C., Moddrell, C., Tickler, I. A., Henthorne, M. A., Kehrli, M., Goering, R. V. and Tenover, F. C. 2013. Wound infections caused by inducible meticillin-resistant Staphylococcus aureus strains. Journal of global antimicrobial resistance, 1(2): 79-83.

Peschel, A. and Sahl, H. G. 2006. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. Nature Reviews Microbiology, 4(7): 529-536.

Planet, P. J., Diaz, L., Kolokotronis, S. O., Narechania, A., Reyes, J., Xing, G. and Arias, C. A. 2015. Parallel epidemics of community-associated methicillin-resistant

Staphylococcus aureus USA300 infection in North and South America. The Journal of infectious diseases, 212(12): 1874-1882.

polymerase chain reaction", Microbio Immuno 36(5): 445–53.

Popovich, K. J., Weinstein, R. A. and Hota, B. 2008. Are community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) strains replacing traditional nosocomial MRSA strains?. Clinical Infectious Diseases, 46(6): 787-794.

Proctor, R. A., Von Eiff, C., Kahl, B. C., Becker, K., McNamara, P., Herrmann, M. and Peters, G. 2006. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. Nature Reviews Microbiology, 4(4): 295-305.

Recker, M., Laabei, M., Toleman, M. S., Reuter, S., Saunderson, R. B., Blane, B. and Massey, R. C. 2017. Clonal differences in Staphylococcus aureus bacteraemia-associated mortality. Nature microbiology, 2(10): 1381-1388.

resistant strains of methicillin-resistant Staphylococcusaureus using

Roberts, S. S. and Kazragis, R. J. 2009. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in US service members deployed to Iraq. Military medicine, 174(4): 408-411.

Rolain, J. M., Abat, C., Brouqui, P. and Raoult, D. 2015. Worldwide decrease in methicillin-resistant Staphylococcus aureus: do we understand something?. Clinical Microbiology and Infection, 21(6): 515-517.

Sabat, A. J., Budimir, A., Nashev, D., Sá-Leão, R., Van Dijl, J. M., Laurent, F. and ESCMID Study Group of Epidemiological Markers. 2013. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. Eurosurveillance, 18(4): e20380.

Sabharwal, N., Dhall, S., Chhibber, S. and Harjai, K. 2014. Molecular detection of virulence genes as markers in S. aureus isolated from urinary tract infections. International journal of molecular epidemiology and genetics, 5(3): 125-131.

Sagar, A. 2018. Coagulase Test- Principle, Procedure, Types, Interpretation and Examples. Key CDN, 12: 15-24.

Sakr, A., Brégeon, F., Mège, J. L., Rolain, J. M. and Blin, O. 2018. Staphylococcus aureus nasal colonization: an update on mechanisms, epidemiology, risk factors and subsequent infections. Frontiers in microbiology, 9: 2419-2433.

Saulnier, P., Bourneix, C., Prevost, G. and Andremont, A. 1993. Random amplified polymorphic DNA assay is less discriminant than pulsed-field gel electrophoresis for typing strains of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Journal of Clinical Microbiology, 31(4): 982-985.

Schroeder, K., Jularic, M., Horsburgh, S. M., Hirschhausen, N., Neumann, C., Bertling, A. and Heilmann, C. 2009. Molecular characterization of a novel Staphylococcus aureus surface protein (SasC) involved in cell aggregation and biofilm accumulation. PloS one, 4(10): e7567.

Schwartz, D. C. and Cantor, C. R. 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. cell, 37(1): 67-75.

Sendi, P. and Proctor, R. A. 2009. Staphylococcus aureus as an intracellular pathogen: the role of small colony variants. Trends in microbiology, 17(2): 54-58.

Severin, A., Wu, S. W., Tabei, K. and Tomasz, A. 2004. Penicillin-binding protein 2 is essential for expression of high-level vancomycin resistance and cell wall synthesis in vancomycin-resistant Staphylococcus aureus carrying the enterococcal vanA gene complex. Antimicrobial agents and chemotherapy, 48(12): 4566-4573.

Seybold, U., Kourbatova, E. V., Johnson, J. G., Halvosa, S. J., Wang, Y. F., King, M. D. and Blumberg, H. M. 2006. Emergence of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus USA300 genotype as a major cause of health care—associated blood stream infections. Clinical Infectious Diseases, 42(5): 647-656.

Shirasawa, K., Hirakawa, H. and Isobe, S. 2016. Analytical workflow of double-digest restriction site-associated DNA sequencing based on empirical and in silico optimization in tomato. DNA Research, 23(2): 145–153.

Shiroma, A., Terabayashi, Y., Nakano, K., Shimoji, M., Tamotsu, H., Ashimine, N. and Hirano, T. 2015. First complete genome sequences of Staphylococcus aureus subsp. aureus Rosenbach 1884 (DSM 20231T): determined by PacBio single-molecule real-time technology. Genome announcements, 3: 44-55.

Shopsin, B., Gomez, M., Montgomery, S. O., Smith, D. H., Waddington, M., Dodge, D. E. and Kreiswirth, B. N. 1999. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of Staphylococcus aureus strains. Journal of clinical microbiology, 37(11): 3556-3563.

Sim, B. L. H., McBryde, E., Street, A. C. and Marshall, C. 2013. Multiple site surveillance cultures as a predictor of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections. Infection Control and Hospital Epidemiology, 34(8): 818-824.

Spaan, A. N., Surewaard, B. G., Nijland, R. and Van Strijp, J. A. 2013. Neutrophils versus Staphylococcus aureus: a biological tug of war. Annual review of microbiology, 67: 629-650.

Spaan, A. N., van Strijp, J. A. and Torres, V. J. 2017. Leukocidins: staphylococcal bi-component pore-forming toxins find their receptors. Nature Reviews Microbiology, 15(7): 435-444.

Stapels, D. A., Ramyar, K. X., Bischoff, M., von Köckritz-Blickwede, M., Milder, F. J., Ruyken, M. and Rooijakkers, S. H. 2014. Staphylococcus aureus secretes a unique class of neutrophil serine protease inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences, 111(36): 13187-13192.

Stern, M. J., Ames, G. F. L., Smith, N. H., Robinson, E. C. and Higgins, C. F. 1984. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. Cell, 37(3): 1015-1026.

Stewart, P. S. and Costerton, J. W. 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. The lancet, 358(9276): 135-138.

Styers, D., Sheehan, D. J., Hogan, P. and Sahm, D. F. 2006. Laboratory-based surveillance of current antimicrobial resistance patterns and trends among Staphylococcus aureus: 2005 status in the United States. Annals of clinical microbiology and antimicrobials, 5(1): 1-9.

Talan, D. A., Krishnadasan, A., Gorwitz, R. J., Fosheim, G. E., Limbago, B., Albrecht, V. and Moran, G. J. 2011. Comparison of Staphylococcus aureus from skin and soft-tissue infections in US emergency department patients, 2004 and 2008. Clinical Infectious Diseases, 53(2): 144-149.

Tan, L., Li, S. R., Jiang, B., Hu, X. M. and Li, S. 2018. Therapeutic targeting of the Staphylococcus aureus accessory gene regulator (agr) system. Frontiers in microbiology, 9, 55-62.

Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H. and Swaminathan, B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction

patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. Journal of clinical microbiology, 33(9): 22-33.

Thammavongsa, V., Kim, H. K., Missiakas, D. and Schneewind, O. 2015. Staphylococcal manipulation of host immune responses. Nature Reviews Microbiology, 13(9): 529-543.

Thomer, L., Schneewind, O. and Missiakas, D. 2016. Pathogenesis of Staphylococcus aureus bloodstream infections. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, 11: 343-364.

Todar, K. 2011. S.aureus. Textbook of Bacteriology. Science Magazine, 304:14-21.

Totake, K., Kobayashi, N. and Odaka, T. 1998. Trimethoprim resistance and susceptibility genes in Staphylococcus epidermidis. Microbiology and Immunology, 42(7): 497–501.

Tristan, A., Ferry, T., Durand, G., Dauwalder, O., Bes, M., Lina, G. and Etienne, J. 2007. Virulence determinants in community and hospital meticillin-resistant Staphylococcus aureus. Journal of Hospital Infection, 65: 105-109.

Van Alen, S., Ballhausen, B., Peters, G., Friedrich, A. W., Mellmann, A., Köck, R. and Becker, K. 2017. In the centre of an epidemic: Fifteen years of LA-MRSA CC398 at the University Hospital Münster. Veterinary microbiology, 200: 19-24.

Van Belkum, A., Kluytmans, J., Van Leeuwen, W., Bax, R., Quint, W., Peters, E. and Koeleman, H. 1995. Multicenter evaluation of arbitrarily primed PCR for typing of Staphylococcus aureus strains. Journal of Clinical Microbiology, 33(6): 1537-1547.

Van Belkum, A., Verkaik, N. J., De Vogel, C. P., Boelens, H. A., Verveer, J., Nouwen, J. L. and Wertheim, H. F. 2009. Reclassification of Staphylococcus aureus nasal carriage types. The Journal of infectious diseases, 199(12): 1820-1826.

Van Cleef, B. A., Monnet, D. L., Voss, A., Krziwanek, K., Allerberger, F., Struelens, M. and Kluytmans, J. A. 2011. Livestock-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus in humans, Europe. Emerging infectious diseases, 17(3): 502-511.

Van Der Zee, A., Verbakel, H., van Zon, J. C., Frenay, I., van Belkum, A., Peeters, M., Bergmans, A. 1999. Molecular genotyping of Staphylococcus aureus strains: comparison of repetitive element sequence-based PCR with various typing methods

and isolation of a novel epidemicity marker. Journal of Clinical Microbiology, 37(2): 342-349.

Van Rensburg, M. J. J., Whitelaw, A. C. and Elisha, B. G. 2012. Genetic basis of rifampicin resistance in methicillin-resistant Staphylococcus aureus suggests clonal expansion in hospitals in Cape Town, South Africa. BMC microbiology, 12(1): 1-7.

Vanhommerig, E., Moons, P., Pirici, D., Lammens, C., Hernalsteens, J. P., De Greve, H., Malhotra-Kumar, S. 2014. Comparison of biofilm formation between major clonal lineages of methicillin resistant Staphylococcus aureus. PloS one, 9(8): e104561.

Vaudaux, P. E., Francois, P., Proctor, R. A., McDevitt, D., Foster, T. J., Albrecht, R. M. and Cooper, S. L. 1995. Use of adhesion-defective mutants of Staphylococcus aureus to define the role of specific plasma proteins in promoting bacterial adhesion to canine arteriovenous shunts. Infection and immunity, 63(2): 585-590.

Versalovic, J., Koeuth, T. and Lupski, R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to finerpriting of bacterial enomes. Nucleic acids research, 19(24): 6823-6831.

Von Dach, E., Diene, S. M., Fankhauser, C., Schrenzel, J., Harbarth, S. and François, P. 2016. Comparative genomics of community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus shows the emergence of clone ST8-USA300 in Geneva, Switzerland.

Von Eiff, C., Becker, K., Machka, K., Stammer, H. and Peters, G. 2001. Nasal carriage as a source of Staphylococcus aureus bacteremia. New England Journal of Medicine, 344(1): 11-16.

Vuong, C., Kocianova, S., Voyich, J. M., Yao, Y., Fischer, E. R., DeLeo, F. R. and Otto, M. 2004. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion and virulence. Journal of Biological Chemistry, 279(52): 54881-54886.

Wei, W., Davis, R. E., Lee, M. and Zhao, Y. 2007. Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: Identification of ten new phytoplasma groups. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57(8): 1855–1867

Weidenmaier, C., Kokai-Kun, J. F., Kulauzovic, E., Kohler, T., Thumm, G., Stoll, H. and Peschel, A. 2008. Differential roles of sortase-anchored surface proteins and wall

teichoic acid in Staphylococcus aureus nasal colonization. International Journal of Medical Microbiology, 298(5-6): 505-513.

Welsh, J. and McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic acids research, 18(24): 7213-7218.

Wertheim, H. F., Melles, D. C., Vos, M. C., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Verbrugh, H. A. and Nouwen, J. L. 2005. The role of nasal carriage in Staphylococcus aureus infections. The Lancet infectious diseases, 5(12): 751-762.

Wertheim, H. F., Vos, M. C., Ott, A., van Belkum, A., Voss, A., Kluytmans, J. A. and Verbrugh, H. A. 2004. Risk and outcome of nosocomial Staphylococcus aureus bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers. The Lancet, 364(9435): 703-705.

Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic acids research, 18(22): 6531-6535.

Williamson, D. A., Coombs, G. W. and Nimmo, G. R. 2014. Staphylococcus aureus 'Down Under': Contemporary epidemiology of S. aureus in Australia, New Zealand and the south west Pacific. Clinical Microbiology and Infection, 20(7): 597-604.

Winstanley, T. and Courvalin, P. 2011. Expert systems in clinical microbiology. Clinical microbiology reviews, 24(3): 515-556.

Zervou, F. N., Zacharioudakis, I. M., Ziakas, P. D., Rich, J. D. and Mylonakis, E. 2014. Prevalence of and risk factors for methicillin-resistant Staphylococcus aureus colonization in HIV infection: a meta-analysis. Clinical Infectious Diseases, 59(9): 1302-1311.

Zhang YM, Brady S Smith 2001 Segmentation of brain MR images through a hidden Markov random field model and the expectation-maximization algorithm. IEEE Trans Med Imaging 20:45–57.

Zhao, S., Mitchell, S. E., Meng, J., Kresovich, S., Doyle, M. P., Dean, R. E. and Weller, J. W. 2000. Genomic typing of Escherichia coli O157: H7 by semi-automated fluorescent AFLP analysis. Microbes and infection, 2(2): 107-113.

Zimmerli, W., Trampuz, A. and Ochsner, P. E. 2004. Prosthetic-joint infections. New England Journal of Medicine, 351(16): 1645-1654.

Zoll, S., Pätzold, B., Schlag, M., Götz, F., Kalbacher, H. and Stehle, T. 2010. Structural basis of cell wall cleavage by a staphylococcal autolysin. PLoS Pathog, 6(3): e1000807.

FIRAT TERCÜME
NOTER YEMİNLİ TERCÜME
TRANSLATION OFFICE
www.firattercume.com.tr

Yeminli Tercüme

Sağlık Bakanlığı
AL Anbar Sağlık Müdürlüğü
Al-Ramadi Kadın Sağlığı ve Çocuk
Eğitim Hastanesi

/ Logo /

No : 3050
Tarih : 18/07/2020

/ Mühür /

KİME: ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ

Hastanemizde araştırmasının pratik kısmını yapabilmesi amacıyla **(RANA HASAN ALI ALI)**'nin **talebini kabul ettiğimizi** tarafınıza bildiririz.

Dr. Muneem Aftan Ayed
AL-Ramadi Kadın Sağlığ
ve Çocuk Eğitim Hastanesi

/ İmza ve Mühür /

E-mail: .alatfalhos@yahoo.com

FIRAT Tercüme
Turizm Dış Ticaret

ASILdan FAKS'tan
FOTOKOPİ'den ÇEVİRİDİR

İNGİLİZCE
İşbu Çeviri ASLINDAN
FOTOKOPİDEN TÜRKÇE
Tarafımdan Aslına Sadık Kalınarak Tercüme Edilmiştir.
Yeminli Mütercim Tercüman Savaş HÜRMÜZ

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Rana Hasan Ali ALI

Eğitim

Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2019-Halen
Lisans	Anbar Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	1999-2003