ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YANIK VE YARA ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN STAPHYLOCOCCUS AUREUS'UN BAZI FİZYOLOJİK, BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ VE ÇOKLU ANTİBIYOTİK DIRENCİNİN İNCELENMESİ

Hasanain Ahmed Enad OBAID

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2021

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Hasanain Ahmed Enad OBAID tarafından hazırlanan **"Yanık ve Yara Örneklerinden İzole Edilen *Staphylococcus aureus*'un Bazı Fizyolojik, Biyokimyasal Özellikleri ve Çoklu Antibiyotik Direncinin İncelenmesi"** adlı tez çalışması 00/00/2022 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 Ayşegül OĞLAKÇI İLHAN

Eş Danışman : Dr. Mohammed Abbas FAYİDH

Jüri Üyeleri :

Başkan : Dr. Öğr. Üyesi Ayşegül OĞLAKÇI İLHAN
Eldivan Sağlık Hizmetleri MYO, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Melda DÖLARSLAN
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Mine TÜRKTAŞ
Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Gazi 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 **"Yanık ve Yara Örneklerinden İzole Edilen *Staphylococcus aureus*'un Bazı Fizyolojik, Biyokimyasal Özellikleri ve Çoklu Antibıyotik Direncinin İncelenmesi"** 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 (//2022).

Hasanain Ahmed Enad OBAID

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

INVESTIGATION OF SOME PHYSIOLOGICAL, BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS AND MULTIPLE ANTIBIOTIC RESISTANCE OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLATED FROM WOUND SAMPLES

Hasanain Ahmed Enad OBAID

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr.Öğr. Ayşegül OĞLAKÇI İLHAN
Eş Danışman: Dr. Mohammed Abbas FAYİDH

Bağdat Üniversitesinde gerçekleştirilen bu çalışma da, çeşitli yanık ve yaralanmaya maruz kalmış Iraklı hastaların farklı hastalık problemlerine neden olan *Staphylococcus aureus* enfeksiyonuna ve canlı kontamine mikroorganizmalara etki edecek olan optimum antibiyotiklerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla değişik yaş aralığında olan çeşitli yaralanma ve yanık yarası bulunan bu hastalardan 100 kadar örnek toplanmış ve farklı kültür ortamlarına aktarılmıştır. Ortamlarda meydana gelen üremeler sonucunda %60 oranında *S. aureus* bakterisi ve %40 oranında diğer bakteri türleri tespit edilmiştir. *S. aureus* bakterisi ile bulaşan örnekler tobramisin antibiyotiğine karşı yüksek direnç göstermiştir (%56,7), Gentamisin'e karşı (%30) ve Amikasin'e karşı ise (%10) daha az oranda bir direnç göstermiştir. Bakteri izolatörleri, doldurucu kültür ortamında endol reaksiyonu karşı negative, oksidis reaksiyonu karşı ise pozitif etki göstermiştir. Daha sonra, bakterilerin ince biyofilm tabakası oluşturma yeteneğinini incelenmek için iki metot uygulanmıştır. Birincisi Kongo red agar testi olup burada bakterinin biyofilm (slime) tabakası oluşturma özelliği araştırılmaktadır. İkinci metotta ise bakterinin biyofilm tabakayı oluşturma yeteneğini ölçmek için, mikro titre plaka yöntemi (MTP) kullanılmıştır. Bunun sonucunda da kalibrasyon kapları kullanılarak yapılan metotta bütün izolatlar çok düşük düzeyde biyofilm oluşumu göstermiştir.

2021, 57 sayfa

ANAHTAR KELIMELER: *Staphylococcus aureus,* Antibiyotik direnci, Biyokimyasal özellikler, Yanıklar ve yaralar

ABSTRACT

Master of Science Thesis

INVESTIGATION OF SOME PHYSIOLOGICAL, BIOCHEMICA CHARACTERISTICS AND MULTIPLE ANTIBIOTIC RESISTANCE OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLATED FROM WOUND SAMPLES

Hasanain Ahmed Enad OBAID

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

Advisor: Assist. Prof. Doctor. Ayşegül OĞLAKÇI İLHAN
Co-Advisor: Dr. Mohammed Abbas FAYİDH

In this study, carried out at Baghdad University, it was aimed to determine the optimum antibiotics that will affect *Staphylococcus aureus* infection and live contaminated microorganisms, which cause different disease problems in Iraqi patients who have been exposed to various burns and injuries. For this purpose, about 100 samples were collected from these patients, who were in different age ranges and had various injuries and burn wounds, and were transferred to different culture media. As a result of the growths occurring in the environment, 60% of *S. aureus* bacteria and 40% of other bacterial species were detected. Specimens contaminated with *S. aureus* bacteria showed high resistance to the antibiotic tobramycin (56.7%), and less resistance to Gentamaisin (30%) and Imikacin (10%). Bacterial isolators showed a negative effect on the endol reaction and a positive effect on the oxidis reaction in the filling culture medium. Next, two methods were applied to examine the ability of bacteria to form a thin biofilm. The first is the red congou medium method, which measures the ability of bacteria to form an adhesive layer. In the second method, micro-titer plate method (MTP) were used to measure the bacteria's ability to form the sticky layer. As a result, all insulators showed very low adhesive formation in the method using calibration cups.

2021, 57 pages

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Antibiotic resistance, Biochemical properties, Burns and Wounds

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında bana yardım eden ve işimi tamamlama gücü veren Yüce Allah'a şükranlarımı sunuyorum. Tez çalışmam boyunca verdiği rehberlik ve destekleri için danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Ayşegül OĞLAKÇI İLHAN'a en derin teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmamın laboratuar ve yazım aşaması da dahil olmak üzere tüm bölümlerine yaptığı değerli yorumları, yönlendirmeleri ve beni çalışmaya teşvik etmesi nedeniyle ikinci danışmanın Dr. Mohammed Abbas FAYİDH'e en içten teşekkürlerimi ve takdirlerimi sunuyorum. Ayrıca Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Ana Bilim Dalı başkanı ve başta çok kıymetli hocam Doç. Dr. Melda DÖLARSLAN olmak üzere bölümdeki tüm öğretim üyelerine en derin teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca, beni her zaman destekleyen anneme, babama, kardeşlerime ve diğer sevgili aile üyelerine en içten teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca bu zamana kadar, hayatıma ve ruhuma kattığı anlamlı desteklerinden dolayı yolumdaki yoldaşıma teşekkürlerimi ve takdirlerimi sunarım.

Bana gerek sosyal gerekse de çalışma hayatım boyunca destek veren değerli arkadaşlarıma ve gurbette olsada her zaman desteğini ve yardımlarını gördüğüm kadim dostum Abbas ALİSAWI'ye sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Hasanain Ahmed Enad OBAID
Çankırı, Şubat 2022

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **iii**
İÇİNDEKİLER ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **vi**
KISALTMALAR DİZİNİ ..... **vii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **viii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **ix**
1 GİRİŞ **1**
2 STAPHYLOCOCCUS AUREUS SINIFLANDIRMASI **3**
2.1 *Staphylococcus aureus*'un Morfolojisi ve Biyokimyasal Özellikler **3**
2.2 *Staphylococcus aureus*'un Adaptasyonu **4**
2.3 *Staphylococcus aureus*'un Antimikrobiyal Direnç Geliştirmesi **4**
2.4 Beta-Laktamlara karşı direnç **6**
2.4.1 Vankomisin direnci **7**
2.4.2 Aminoglikozid direnci **8**
2.4.3 Florokinolon direnci gelişimi **8**
2.4.4 Kloramfenikol, rifampin ve mupirosin direnci **8**
2.4.5 Tetrasiklin ve linezolid direnci **9**
2.4.6 Makrolid, linkozamid ve streptogramin direnci-B **9**
2.4.7 Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) **10**
2.5 *Staphylococcus aureus* 'un Hücre Duvarı ile Bağlantılı Yüzey Proteinleri **11**
2.5.1 *Staphylococcus aureus* 'un neden olduğu enfeksiyonlar **12**
2.5.2 *Staphylococcus* aureus'un neden olduğu enfeksiyonların tedavi edilmesi **14**
3 MATERYAL VE METOD **16**
3.1 Ekipman ve Cihazlar **16**
3.2 Yöntemler **20**
3.2.1 Sterilizasyon **20**
3.2.2 Reaktiflerin ve solüsyonların hazırlanması **20**
3.2.3 Kültür ortamının hazırlanması **21**

3.3 Örneklerin Toplanması 24
3.4 Bakteriyel İzolatların Tanımlanması 24
3.4.1 Morfolojik incelemeler 24
3.4.2 Mikroskobik incelemeler 24
3.4.3 Biyokimyasal testler 25
3.5 Bakteriyel İzolatların Saklanması 27
3.5.1 Kısa süreli depolama 27
3.5.2 Orta süreli depolama 28
3.5.3 Uzun süreli depolama 28
3.6 Vitek 2 Kompakt Sistemi Kullanılarak Minimal İnhibitör Konsantrasyonunun Belirlenmesi 28
3.7 Kongo Kırmızı Agar Yöntemiyle Bakteri İzolatlarının Biyofilm Tabakası Oluşturma Yeteneğinin Kalitatif İncelenmesi 29
3.8 Bakteriyel İzolatların Mikrotiter Plaka Kullanarak Biyofilm Oluşturma Yeteneklerinin Kalitatif İncelenmesi 29
4 TARTIŞMA VE SONUÇ 32
4.1 *Staphylococcus aureus*'un İzolasyonu ve Tanımlanması 32
4.2 Vitek2 Kompakt Sistem Kullanılarak Antibiyotiklerin MIC Değerinin Belirlenmesi 34
4.3 Virülans Faktörlerinin Tespiti 37
4.3.1 Pigment üretimi 37
4.3.2 Hemolizin üretimi 38
4.3.3 Proteaz üretimi 39
4.3.4 Biyofilm oluşturma yeteneği 40
KAYNAKLAR 43
ÖZGEÇMİŞ 56

SİMGELER DİZİNİ

µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
mg	Miligram
mL	Mililitre
L	Litre
°C	Santigrat
cm	Santimetre
V	Volt

KISALTMALAR DİZİNİ

ERM	Eritromisin Metilazlar
PBS	Fosfat Tampon Tuzlu Su
MAC	MacConkey
MRSA	Metisiline dirençli Staphylococcus aureus
MSSA	Metisiline duyarlı Staphylococcus aureus
MSCRAMM	Mikrobiyal Yüzey Bileşeni Tanıma
MTP	MikroTiter Plaka
MIC	Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
MGE	Mobil Genetik Öğe
PVL	Panton-Sevgililer-Lökosidin
PBP	Penisilin - Bağlayıcı Protin
SCC	Stafilokok Kaset Kromozomu
TSST	Toksik Şok Sendromu Toksini
Van A	Vankomisin A geni

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Bakterilerde antibiyotik sınıfının ve antibiyotik direnç mekanizmasının şematik gösterimi.....5
Şekil 4.1 Nitrit agar besiyerinde *S. aureus* bakterileri için piyosiyanin boya üretimi...38
Şekil 4.2 Kan ortamında ß-hemoliz enziminin üretimi.....39
Şekil 4.3 Kırmızı kongo'un ortasında *S. aureus* bakterisinin yapışma tabakaları: A- Zayıf oluşum, B- Orta oluşum, C- Güçlü oluşum. 40

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan laboratuvar ekipman ve cihazları 16
Çizelge 3.2 Kimyasallar 18
Çizelge 3.3 Kültür ortamı 18
Çizelge 3.4 Araştırmada kullanılan antibiyotikler 19
Çizelge 4.1 *S. aureus* örneklerinin ve izolatlarının türü, sayısı ve yüzdeleri. 32
Çizelge 4.2 *S. aureus* izolatları için fenotipik ve biyokimyasal testler 33
Çizelge 4.3 *S. aureus* bakteri izolatları için minimum inhibitör antibiyotik konsantrasyonunun direnç ve duyarlılık yüzdeleri. 35
Çizelge 4.4 *S. aureus* izolatlarının antibiyotik direnç değerleri 37
Çizelge 4.5 *S. aureus* bakterilerinin bazı virülans faktörlerinin üretim yüzdesi. 39
Çizelge 4.6 *S. aureus* bakterilerinin Kongo kırmızısı yöntemini kullanarak bir biyofilm oluşturma yeteneği. 41
Çizelge 4.7 *S. aureus* bakterilerinin mikrokalibrasyon kapları kullanarak biyofilm oluşturma yeteneği 42

1 GİRİŞ

Staphylococcus aureus deride ve boğazda, ayrıca gastrointestinal ve üriner sistemlerde bulunabilen bir bakteridir. Ayrıca, perine, cinsel organlar ve üretrada da bulunabilir (Den Heijer *et al.* 2013). İnsanlarda ve hayvanlarda çok çeşitli hastalıklara neden olur (Luzzago *et al.* 2014). Direnç ve virülans genlerini edinme ve kaybetme kapasitesinin yanı sıra zoonotik potansiyeli nedeniyle çok ciddi halk sağlığı sorunlarına neden olmaktadır (Holden *et al.* 2004, Saleha and Zunita 2010, Luzzago *et al.* 2014). Klinik açıdan ele alındığında *S. aureus* türü, Staphylococcus cinsinin en tehlikeli üyesidir. Bu bakteri, yüzeysel cilt apseleri, gıda zehirlenmeleri, bebeklerde nekrotik pnömoni ve kalpte endokardit gibi çeşitli hastalıklara neden olabilen ve antibiyotiğe karşı dirençli olan bir türdür (Shaw *et al.* 2004). Ayrıca, ineklerde mastitis, atlarda botryomikoz, köpeklerde dermatit, tavuklarda septisemi ve artritten sorumludur (Zunita *et al.* 2008, Luzzago *et al.*.2014). Metisilin direnci gösteren *mec*A geni, vankomisin ve teikoplanine yüksek düzeyde dirençli *van*A geni, stafilokokal ekzotoksinler ve antibiyotik direnç genleri, hastalığın başlamasına, bağışıklığın zayıflamasına ve konak doku hasarına yol açarak hastalığın ciddiyetinden sorumlu olan faktörlerdir.

1940'ların ortalarında, bir *S. aureus* suşunun, penisilinaz adı verilen hidrolitik bir enzimin üretimi yoluyla penisiline direnç geliştirdiği gösterilmiştir (Basset *et al.* 2011). Birleşik Krallık ve Amerika Birleşik Devletleri'nde penisiline dirençli *S. aureus* suşları bakteriyemi vakalarında daha sık görülmüştür. Hastane kaynaklı penisiline dirençli bakteriler, ilk kez yalnızca hastalardan ve sağlık çalışanlarından izole edildikleri için bu şekilde adlandırılmıştır. Aynı zamanda, penisiline dirençli suşlar ise hastane enfeksiyonları ile bağlantılı belirgin risk faktörleri olmayan topluluk üyeleri arasında tespit edilmiştir (Chuang and Huang 2013). 1940'ların sonları ile 1960'ların başları arasında, *S. aureus* enfeksiyonunu tedavi etmek için kullanılan Metisilinina adlı antibiyotik penisiline karşı artan direnç göstermiştir (Jevons 1961).

Metisiline dirençli *S. aureus*, elde edilen *mec*A direnç belirleyicisini (MRSA) içeren genomik bir çalışmanın sonucudur. 1960'ların başında Birleşik Krallık'ta

keşfedilmesinden bu yana, metisiline dirençli *S. aureus*, dünya çapında insanlarda, ve hayvanlarda önde gelen enfeksiyon kaynağı olarak öne çıkmıştır. Son birkaç yılda, büyük olasılıkla halihazırda var olan klonların klonal genişlemesi ve MSSA'nın MRSA'ya dönüştürülmesi nedeniyle MRSA gelişerek Tüm beta laktam antibiyotik sınıflarına daha az duyarlı olan bir penisilin bağlayıcı proteini kodlayan metisiline direnç genleri keşfedilmiştir (Noto *et al.* 2008). Günümüzde, antibiyotikler artık eskisi kadar etkili olmamakla beraber insanlarda hastaneye yatış ve kalış süreklerinde uzama olmuştur (Purrello *et al.* 2012).

2 STAPHYLOCOCCUS AUREUS SINIFLANDIRMASI

Staphylococcus aureus, spor oluşturmayan, hareketsiz, katalaz ve koagülaz pozitif, aerob ve fakülatif anaerob bir bakteridir. Genelikle, %5 koyun veya at kanı içeren kanlı agar içinde üzüm salkımları gibi görünen, bazen tek veya çiftler halinde olan ve hemolitik aktivite ile altın sarısı renkte koloniler üreten bir bakteridir (Turnidge *et al.* 2008, Plata *et al.* 2009). Bu noktada bugüne kadar bilinen 40 civarında stafilokok türü vardır (Doškař *et al.* 2010). Şu anda tam bir stafilokok sınıflandırması yoktur; yeni türler her geçen gün yapılan çalışmalar sayesinde tanımlanarak literatüre kazandırılmaktadır. Veteriner hekimlikte bazı üyeleri önemli iken, diğer bazı üyeleri ise hayvanlarda veya yiyeceklerde sıklıkla bulunması ve ciddi hasarlara neden olmaması sebebiyle önemli değildir. Biyolojik olarak iki tip stafilokok vardır: koagülaz üretenler ve üretmeyenler. Turnidge *et al.* 2008, Doškař, *et al.* 2010 göre, *Staphylococcus aureus* insanlara ve hayvanlara bulaşabileceğinden stafilokok ailesinin en tehlikeli üyesidir. Hayvanlarda karbolaz (yara izi) pozitif stafilokoklar arasında *Staphylococcus intermedius, Staphylococcus hyicus, Staphylococcus pseudintermedius, Staphylococcs lutrae, Staphylococcus schleiferi subsp. coagulans* ve *Staphylococcus delphini* bulunur. Le Loir *et al.* (2003) göre *S. aureus*'un beş farklı biyotipi tanımlanmıştır: insan, hemolitik anemi hastalığı olmayan insan, sığır, koyun ve kuş.

2.1 *Staphylococcus aureus*'un Morfolojisi ve Biyokimyasal Özellikler

Stafilokoklar iki Yunanca terimden türetilmiştir. Yunanca "üzüm salkımı" anlamına gelen staphyle kelimesi ile "Altın" anlamına gelen aureus kelimesinin birleşimi ile, oluşan *Staphylococcus aureus* "bulaşıcı mikropları" olarak adlandırılmaktadır. Sarımsı beyaz tonları, bakterinin sarımsı beyaz pigmentasyonundan kaynaklanmaktadır (Freeman-cook 2006). Patojenik *Staphylococcus aureus*, gram pozitif, hareketli olmayan, spor oluşturmayan, fakültatif anaerob özelliklerine sahiptir (Plata *et al.* 2009). *Streptococcus* spp.'den farklı olarak, *Staphylococcus aureus* katalaz pozitiftir, ancak oksidazdan yoksundur, bu da gelişme için hayati amino asitlere, B vitaminlerine, ayrıca yüksek sıcaklıklarda ve tuz konsantrasyonlarında hayatta kalma kabiliyetine sahip olduğu anlamına gelir (Plata *et al. 2009* and Lindqvist 2014,).

2.2 *Staphylococcus aureus*'un Adaptasyonu

Deri, mukoza, toprak, su ve hava, stafilokokların bolca bulunabileceği yerlerdir (Freeman-cook and Freeman-cook 2006). Kurumaya karşı dirençli olduğu ve yüksek tuz konsantrasyonlarını sürdürebildiği için *Staphylococcus aureus* seçilmiştir. Bu özellikleri nedeniyle yapılan çalışmalarda diğer bakteri türlerine oranla daha çok tercih edilmektedir (Bremer *et al.* 2004, Wilkinson *et al.* 1997).

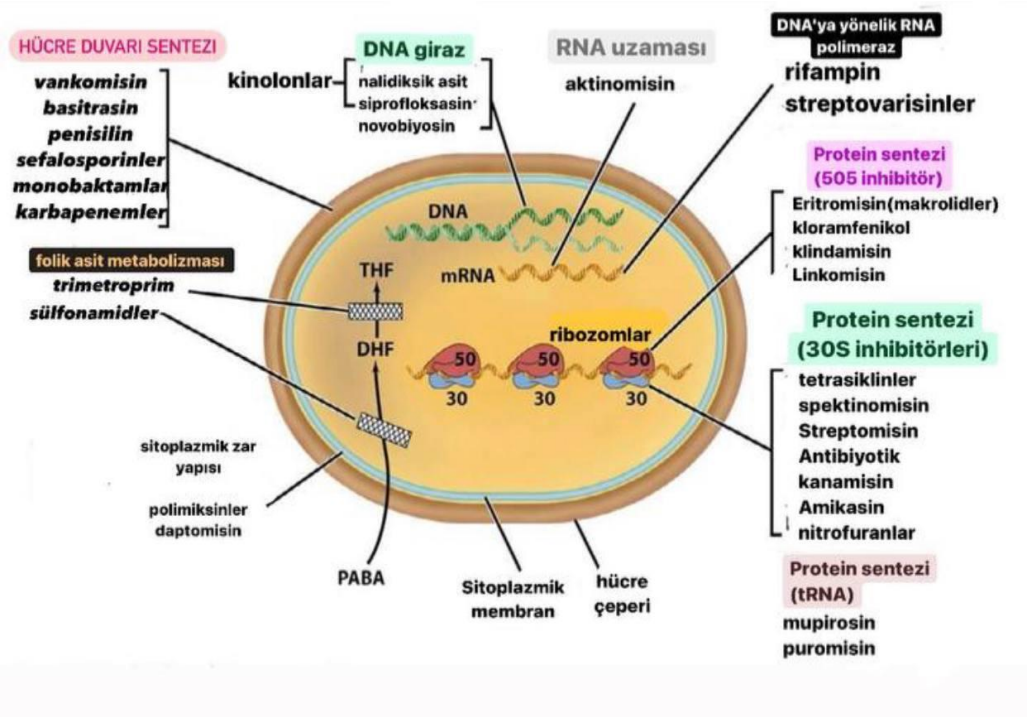
Genellikle bakteriler, 15 ile 45^{o}C arasındaki sıcaklıklarda gelişebilir fakat fakültatif anaerob oldukları için oksidatif fermantasyon ile enerji ve laktik asit üretebilirler. *Staphylococcus aureus, Staphylococcus* cinsinin en tehlikeli üyelerinden biridir ve toplum, hastane ve çiftlik hayvanlarında yaygın bir hastalık kaynağıdır (Bloemendaal *et al.* 2010). Küresel olarak bu hastalıkla mücadelede, hareketli genetik elementlerin (MGE'ler) yapay transferi yoluyla *Staphylococcus* cinsinin diğer üyelerinden direnç ve virülans özelliklerini hızla edinme ve kaybetme kapasitesine dayanılarak çalışmalar yapılmalıdır (Bloemendaal *et al.* 2010, Basset *et al.*.2011, Bitrus *et al.* 2017).

S. aureus genomu; transpozonlar, patojenite adaları, *Staphylococcus* kaset kromozomları, plazmitler, bakteriyofaj ve yerleştirme dizileri içermektedir (Lowy 2003, Holden *et al.* 2004). Lindsay'in (2014) bulgularına göre, *S. aureus*'taki MGE'ler yatay olarak aktarılabilir ve soylara özgüdür. MRSA gibi antibiyotiğe dirençli bakteriler, evrimleşmeleri yeni olduğu için, oldukça dirençli ve tehlikeli suşlar oluşturmalarını sağlayan geniş bir gen yelpazesine sahiptir.

2.3 *Staphylococcus aureus*'un Antimikrobiyal Direnç Geliştirmesi

Bakteriyel adaptasyonun, seçici antibiyotik direncine doğru ve sağlam bir modeli *Staphylococcus aureus* tarafından sağlanmaktadır. Bu bakteriler, yeni antimikrobiyal direnç yollarının yaratılması yoluyla yeni antibiyotiklere hızla adapte olma konusunda kayda değer bir kapasite göstermiştir. Bu patojenlerin hedef bölgedeki değişiklikleri, antimikrobiyal ajan, enzimatik inaktivasyon, dışa akım pompalama ve antimikrobiyal

ajan sekestrasyonu sonucunda dirençleri gelişmektedir (Şekil 2.1). Bunun sonucunda, anti-direnç genleri kazanılmış, pozisyonları seçilmiş ve spontan mutasyonlar meydana gelmiştir (Pantosti *et al.* 2007, Bitrus *et al.* 2017).



Şekil 2.1 Bakterilerde antibiyotik sınıfının ve antibiyotik direnç mekanizmasının şematik gösterimi (Bbosa *et al.*2014)

Staphylococcus aureus'un çekirdek genomu incelendiğinde, onu farklı soylara ayıran klonal kompleks karşımıza çıkmaktadır. Epidemiyolojik özelliklerine göre *S. aureus* patojenleri ayrıca hastane, toplum ve çiftlik hayvanları ile ilişkili olarak sınıflandırılır.

Bakteri, çekirdekten genoma kadar çok çeşitli ve değişken olan bir mobil genetik element içerir. *S. aureus* genomunun beşte biri, stafilokok kaset kromozomları (SCC'ler), bakteriler, integronlar ve bütünleştirici konjugatif plazmitler dahil olmak üzere mobil genetik elementlerinden (MGE'ler) oluşur.

Bu MGE'lerin tümü antimikrobiyal direnç genleri içerebilir, ancak bakteriyofajlar bunları aktarabilir. *S. aureus* klinik izolatlarının çoğu, 1 ile 60 kb arasında değişen plazmitleri içerir ve bu plazmitlerin çok çeşitli direnç genleri taşıdığı bilinmektedir. Tetrasiklin,

kloramfenikol ve eritromisine direnç taşıyan küçük plazmitler vardır, ancak aminoglikozitlere, beta-laktamlara ve makrolidlere direnç taşıyan büyük plazmitler de bulunmaktadır. Bu transpozonlar ayrıca spektinomisin ve eritromisin ve beta laktamlar gibi diğer MGE'lere direnç sağlayan daha büyük plazmitlere entegre edilebilir (McCarthy and Lindsay 2012, Haaber *et al.* 2017, Bitrus *et al.* 2017, Planet *et al.* 2017).

Vankomisin, MRSA enfeksiyonlarının tedavisinde birinci basamak ilaçlardan biri olmaya devam etmektedir. Ancak son yıllarda vankomisine tam dirençli *S. aureus* izolatları ortaya çıkmıştır. Vankomisine dirençli *S. aureus* (VRSA), vankomisine dirençli enterokoktan aktarılan bir vanA gen kümesi aracılık eder. İlk VRSA izolatı 2002 yılında Michigan, ABD'den elde edildiğinden beri, dünya çapında 52 VRSA suşu izole edilmiştir.

S. aureus enfeksiyonunun tedavisi, spesifik bir tedavi ilacının seçilmesi söz konusu olduğunda zordur çünkü mikroorganizmalar hemen hemen tüm antibiyotik sınıflarına karşı direnç geliştirebilmektedir (Şekil 2.1).

2.4 Beta-Laktamlara karşı direnç

Beta laktam antibiyotiklerin *S. aureus*'taki en yaygın inhibitör bölgesi, iki yönlü fonksiyonel transglikolilaz-transpeptidaz PBP2'dir. Peptidoglikan, enzimin transglikosilaz alanı yoluyla zara bağlı lipid II'den tomurcuklanan polisakarit zincirlerine transfer edilebilir. Transpeptidaz içeren alan mevcut olduğunda, glisin çapraz köprülerinin yakındaki başka bir zincire bağlanmasına yardımcı olur (Walsh and Wencewicz 2016). Beta laktam antibiyotikler arasında penisilin, oksasilin, metisilin ve sefalosporin bulunur. Bu antibiyotikler, hücre duvarı sentezinden sorumlu penisilin bağlayan proteinlerin (PBP) transpeptidasyon sürecinin gerçekleşmesini engellerler.

S. aureus'daki metisilin direnci, bakteri kromozomunda ~~yer SCCmec kasetleri olarak adlandırılan~~ mobil bir element üzerine yerleşmiş durumdaki *mec*A geninin kazanılması sonucu elde edilir (Noto 2008, Bitrus *et al.* 2018). Bu da, metisiline daha az duyarlı olan penisilin bağlayıcı bir proteini kodlar. Ayrıca, beta laktam direncini kodlayan plazmitlerin edinilmesi, penisilin direncinin gelişmesiyle sonuçlanmıştır (Noto 2008). blaZ geni

tarafından kodlanan beta laktamaz enzimleri penisilin direncinin gelişmesinde rol oynar. Bu genler transkripsiyonda değişiklik gösterdiğinden, onları düzenleyen genler de değişir (Page 2012). Bir beta laktam antibiyotik, beta laktamaza neden olduğunda, hücre dışı bir enzim oluşturulur. Böylece, beta laktam halkasını hidrolize ederek penisilinin terapötik etkisini önler.

2.4.1 Vankomisin direnci

Vankomisin, *S. aureus* enfeksiyonlarının tedavisi için kullanılan bir ilaç olarak kabul edilmektedir (Bitrus *et al.* 2016). Anti-transpeptidasyon, bakteri hücre duvarlarındaki peptidoglikan tabakasının transpeptidlenmesini engelleyen peptidoglikan kök pentapeptitinin C-terminali D-ala-D-ala'sına bağlanarak önlenir. *S. aureus*'un vankomisin direnci, Van A aracılı direnç ve daha kalın bir hücre duvarı olmak üzere iki farklı mekanizmaya sahiptir (Woodford 2005).

Transpozonlar Tn1546 ve yakından ilişkili elemanlar, yüksek derecede indüklenebilir dirence sahip olan vankomisine *Van* A aracılı direncin iletilmesinden sorumludur. Burada antibiyotiğe dirençli olan *Enterococcus* suşları yaygındır. *Van* A ligaz kullanılarak, D-ala ve D-lac'ı birleştirmek için esterifikasyon kullanılır, bu da pentapeptit sapının depsipeptid sentezi ile sonuçlanır (Weigel *et al.* 2003).

Substratın hücre duvarına katılması, vankomisinin D ala D lac terminaline afinitesi olmamasıyla önlenir. D-ala-D-ala pentapeptit gövdeleri tek başına herhangi bir suşta vankomisin direnci oluşturmak için yeterli değildir (Weigel *et al.* 2003). VanX, dipeptidi hidrolize ettiğinde VanY, peptid gövdesinin C terminalinden pentapeptit gövdesinin C terminalini kaldırır. D-ala-D-ala pentapeptit gövdelerinin *S. aureus* hücre duvarı bölünmesinin bir sonucu olarak, VanX hidrolizi tamamlanmadığında, değiştirilmiş, daha az hassas bir hedef molekül oluşur (Reynolds *et al.* 1994). Orta düzeyde vankomisin direncine sahip *S. aureus* (VISA) suşları ise daha kalın bir bakteri hücre duvarına bağlı bir direnç geliştirme mekanizmasına sahiptir (Bugg *et al.* 1991, Bugg and Brandish 1994). VISA, Van geninden ve bilinen diğer vankomisin direnç faktörlerinden yoksundur, ancak

daha kalın bir hücre duvarına ve daha yüksek hücre duvarı/hücre duvarı hacim oranına sahiptir (Srinivasan *et al.* 2002, McAleese *et al.* 2006).

2.4.2 Aminoglikozid direnci

Aminoglikozitler, 30S ribozomal alt birimine bağlandıklarında ve protein sentezini bozduklarında bakterisidal antimikrobiyal ajanlar olarak kullanılırlar. İn vitro olarak, ribozomal alt birimdeki mutasyonlar aminoglikozitlere karşı dirençten sorumludur. Aminoglikozit direnci, aminoglikozit değiştirici enzimin kazanılmasıyla ilişkilendirilmiştir (Woodford 2005, Wilson 2014, Walsh and Wencewicz 2016).

2.4.3 Florokinolon direnci gelişimi

DNA giraz enzimleri, DNA transkripsiyonunu ve replikasyonunu (Topoizomeraz II ve IV) azaltan bu antibiyotik sınıfı tarafından hedeflenir. Literatüre göre, akış pompası sistemi veya hedef Topoizomeraz II ve IV'ün mutasyonu, kinolon türevlerine karşı iki olası direnç mekanizması vardır. Daha önce belirtildiği gibi, kinolon direnci hedefteki tek bir mutasyonla değil, yüksek florokinolon MİK ile ilişkili bir dizi değişiklikle verilir (Woodford 2005, Courvalin 2006). Florokinolon direnci, (ParC ve ParE) ancak DNA giraz (gyrA ve B) ve Topoizomeraz genlerinin mutasyona uğraması durumunda ortaya çıkabilir. *S. aureus*'taki akış pompası, direncin gelişmesine aracılık eder ve NorA'nın çok ilaçlı bir akış pompası sistemini koordine etmesini gerektirir (Zeng *et al.* 2016, Foster *et al.* 2017).

2.4.4 Kloramfenikol, rifampin ve mupirosin direnci

Bu sınıftaki antibiyotikler, bakteri protein sentezine çeşitli şekillerde müdahale ederler. Kloramfenikol, 50S ribozomal alt birimlerine bağlanarak ve bunların aktivitesini bloke ederek transkripsiyonu baskılarken, Rifampin bunu peptidil transferaza bağlanarak ve aktivitesini inhibe ederek yapar. İzolösin tRNA sentetaz inhibitörleri söz konusu olduğunda, Mupirosin daha iyi bir seçim olarak karşımıza çıkmaktadır (Morton *et*

al..1995, Woodford 2005, Wilson 2009, 2016, Schwarz *et al.* 2016). Daha az duyarlı bir tRNA sentetaz geni (mupA), *S. aureus*'a mupirosin direnci verirken, daha duyarlı rifA geni (rifA geni tarafından kodlanır) *S. aureus'*a direnç verir. Kloramfenikol için, RNA polimerazın beta bileşenini kodlayan rpoB geninde bir mutasyon gereklidir. Bunun gerçekleşmesinde, Kloramfenikol transferaz enzimi rol oynar (Woodford 2005).

2.4.5 Tetrasiklin ve linezolid direnci

Linezolid, vücudun doğal mekanizmalarına müdahale ederek üretilen bir oksazolidinon antibakteriyel ilaçtır. Bakterilerde ribozomların 50S alt ünitesine bağlanarak protein sentezini inhibe eder. Ribozom sentezinin başlaması, sürecin ilk aşaması olan ribozomal başlatma kompleksi ile başlar. Tetrasiklin, bugün piyasadaki birkaç dirençli antibiyotikten biridir (Woodford 2005). Tetrasiklin, bakteriyostatiktir ve 30s ribozomal alt birimlerine bağlanarak ve tRNA'nın alıcı bölgeye geçişini bloke ederek protein sentezini önler. Dışa akış pompası sistemi veya ribozom koruması, *S. aureus*'un direnç kazanmasının iki yoludur. Ribozomların ve atık pompa sisteminin korunması söz konusu olduğunda, her iki protein birbirinden farklıdır (Woodford 2005, Jenner *et al.* 2013, Nguyen *et al.* 2014).

2.4.6 Makrolid, linkozamid ve streptogramin direnci-B

Antibiyotiklere karşı direncin geliştiği bir süreç vardır. *S. aureus*-B'nin makrolidler, linkozamidler ve streptograminler tarafından metillenmesi mümkündür. Birçok antibiyotik ailesinin benzer niteliklere sahip olmasına rağmen, Ribozomlarda bir bağlanma yeri bulunabilir. Reseptör bağlanma bölgeleri yapısal olarak birbirinden farklıdır. Bir metilaz enzimi de metilasyon için bağlanma bölgesini katalize eder. Bu genin ürünü, eritromisin metilaz enzimi tarafından kodlanır. ErmA, B ve C ifadesinin indüklenebilir mi, isteğe bağlı mı yoksa her ikisi mi olduğu açık değildir. Makrolid tarafından eksprese edilen atık pompa sistemi mrsA, eritromisin metilaz (erm) geninin ekspresyonunu da artırabilir, ancak bunu sadece makrolid yapabilir. Fakat bir yan etki olarak Streptogramin veya linkosamid direnci etkilenmez (Woodford 2005, Wilson 2009, Mukhtar el at. 2001).

2.4.7 Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Cox and Wright 2013 tarafından, enfeksiyonları tedavi etmek için antibiyotiklerin yaygın kullanımından önce, ilk kez antibiyotik direncinin olduğu kaydedilmiştir. 1940'larda bir *S. aureus* suşu penisiline karşı direnç geliştirdiğinde, hidrolitik bir enzim olan penisilinazın sorumlu olduğu gösterilmiştir (Basset *et al.* 2011).

MRSA dahil *Staphylococcus* enfeksiyonları; hastanelerde, topluluklarda ve hayvanlarda sık görülür ve bakteriler antibiyotiklere karşı dirençli olabilir (Aklilu *et al.* 2013). İnsanlarda ve hayvanlarda deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarının yanı sıra yüksek mortalite ve artan veya daha uzun hastanede kalış süresine sahip hastane bağlantılı salgınlarda kan dolaşımı enfeksiyonlarının ikinci en yaygın nedeninin tümüne *Staphylococcus aureus* neden olur (Lamy *et al.* 2012, Nowrouzian *et al.* 2013). 1961'de, ilacın klinik kullanım için ruhsatlandırılmasından sadece birkaç yıl sonra, Birleşik Krallık'ta metisilin direnci keşfedilmiştir (Musser and Kapur 1992). Bunu takip eden birkaç yıl içinde Birleşik Krallık'ta ve diğer Avrupa ülkelerinde birkaç metisiline dirençli *S. aureus* salgını kaydedilmiştir (Hiramatsu 1995).

1970'lerin ortalarında, MRSA'nın hastanelerde önemli bir sorun olduğuna inanılıyordu. Huzurevlerinde ve diğer uzun süreli bakım tesislerinde enfeksiyon kontrolü, antibiyotiğe dirençli bakterilerin artan prevalansı nedeniyle Amerika Birleşik Devletleri'nde ve tüm dünyada ciddi bir sorun haline gelmiştir. (Musser and Kapur 1992)

Metisiline direnç kazanmak için *Staphylococcus aureus,* beta-laktam antibiyotiklere daha düşük afiniteye sahip modifiye bir penisilin bağlayıcı proteini (PBP') kodlayan mecA'yı geliştirmiştir. *S. aureus*'ta 20 ila 65 kb'lik bir mobil element olan stafilokokal kaset kromozomunda (SCCmec), metisiline dirençli determinant mecA (MecA) bulunur (Jansen *et al.* 2006, Ito *et al.* 2007, Stojanov *et al.* 2013).

Hedef genin kromozomal mutasyonu, akış pompa sistemi, MGE'lerin yatay iletimi veya ilaçların enzimatik etkisi (penisilin gibi) dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar,

MRSA'nın dirençli hale gelmesine neden olabilir (Alekshun and Levy 2007). Çok çeşitli ilaçlara karşı bakteriyel direncin evrimi, dünya genelinde MRSA enfeksiyonlarının tedavisini daha da zorlaştırmıştır.

Antibiyotik direncinin en yaygın nedeni kromozomlardan ziyade dış kromozomal elementlerdir. Bakteriyel çoklu ilaç direncinin, artık farklı antibiyotik sınıflarını dışarı atan dışa akış pompaları gibi içsel mekanizmaların bir sonucu olduğu anlaşılmaktadır. Çoklu ilaca dirençli organizmaların neden olduğu enfeksiyonları tedavi etmedeki başarısızlıklar, dünya çapında önemli bir yer tutmaktadır (Alekshun and Levy 2007). MRSA enfeksiyonu için sınırlı tedavi seçenekleri toksin üretiminin neden olduğu yüksek prevalansı, insanlar ve hayvanlar arasında hızla yayılma yeteneği ve ayrıca çoklu antibiyotiğe direnç kazanma yeteneğinden kaynaklanmaktadır (Lamy *et al.* 2012). Enfeksiyöz suşlar, mobil genetik bileşenlerle sık sık ilişkileri nedeniyle direnç genlerini hızla yayabilir ve birçok tedavinin terapötik değerini azaltır (Toh *et al.* 2007). 1990'ların sonlarında, hastanede yatış, intravenöz ilaç kullanımı, daha önce antibiyotik kullanımı ve kardiyovasküler ve akciğer hastalığı, diyabet ve kanser gibi altta yatan koşulları olmayan sağlıklı kişilerde MRSA enfeksiyonu kaydedilmemiştir (Gorak *et al.* 1999, Charlebois *et al.* 2004). Toplumdan edinilen MRSA'nın sadece beta laktam antibiyotiklerine karşı dirençli olduğu, iki SCCmec sınıfına (IV ve V SCCmec) sahip olduğu ve sağlıklı çocuklarda ve yetişkinlerde cilt ve yumuşak doku enfeksiyonlarında yer alan faj kaynaklı pantone Valentine lökosidin (PVL) toksinine sahip olduğu gösterilmiştir (Grundmann *et al.* 2006).

2.5 *Staphylococcus aureus* 'un Hücre Duvarı ile Bağlantılı Yüzey Proteinleri

S. aureus'un biyomateryaller üzerinde biriken plazma ve hücre dışı matris (ECM) proteinlerine bağlanma kapasitesi ile ilişkilendirilir. *S. aureus*, çok çeşitli bakterilerle etkileşime giren bir dizi farklı adezyon üretir. Fibronektin ve fibrinojen, kollajen, vitronektin ve laminin gibi konakçı proteinler, araştırmacılar tarafından MSCRAMM'lere (yapışkan matris moleküllerini tanıyan mikrobiyal yüzey bileşenleri) sınıflandırılmıştır (Foster and McDevitt 1994, Patti *et al.* 1994).

MSCRAMM'lerin biyolojik önemi ve virülans indükleyici aktiviteleri üzerine araştırmalar devam etmektedir. Bir MSCRAMM olarak kategorize edilmek için, bakteri hücre yüzeyinde bir molekül bulunmalı ve konakçının ECM'sinde bulunan bir makromolekül ligandına bağlanmalıdır. Bunlar sadece ECM'de bulunan kolajen, laminin, fibrinojen ve fibronektin bu ligandların örnekleridir. Ayrıca kan plazması gibi çözünür formlarda bulunurlar (Patti *et al.* 1994).

MSCRAMM'ler ve ECM arasındaki etkileşimler çok yakın ve özel olmalıdır. Henüz keşfedilmemiş veya moleküler olarak tanımlanmış bir veya daha fazla ECM bileşeni, bazı bakteriler tarafından bağlanabilir. Birçok ECM ligandı tek bir MSCRAMM tarafından tanınabilir, ancak *S. aureus* gibi bakteriler aynı matris molekülünü saptayan birçok MSCRAMM'i ifade edebilir (Foster and McDevitt 1994). Ökaryotik integrinler ve matris molekülleri arasındaki etkileşim, bir matris molekülünün birkaç integrin tarafından tanımlanabildiği bu iki tip molekül arasında gözlemlenen bu tür varyasyon ve etkileşime benzerdir (Ruoslahti 1991).

2.5.1 Staphylococcus aureus 'un neden olduğu enfeksiyonlar

Hastanede yatan ve bağışıklığı azalmış bireyler ve toplumun bağışıklığı yeterli kişileri, *S. aureus* kolonizasyonu ve enfeksiyonuna eşit derecede duyarlıdır. İnsanlarda bu mikroorganizma tarafından enfekte olabilen nazofaringeal ve kutanöz bakteriler bulunur. Deri, burun, idrar, vajinal ve gastrointestinal enfeksiyonların tümüne neden olabilir, ancak bunların çoğu hafiftir ve yaşamı tehdit etmez (Shulman and Nahmias 1972).

1997 ve 1999 yılları arasında İngiltere'de ameliyat için hastaneye kaldırılan her dört kişiden biri, hastaneye kabul edilmeden önce mevcut olmayan ve nozokomiyal olarak tanımlanan bir enfeksiyona yakalanmıştır (Anonymous 2000). Dirençli *S. aureus* suşları hastane ortamında daha kolay yayıldığından, enfeksiyonların çoğuna *S. aureus* neden olmuş ve bunların %61'i metisiline dirençli olarak tespit edilmiştir (Aklilu *et al.* 2013).

S. aureus deriye veya mukoza zarına nüfuz edemez çünkü bunlar güçlü bariyerlerdir. Ancak *S. aureus* altta yatan dokuya infiltre olarak lokal apse lezyonu oluşturabilir, lenf kanallarına girerse septisemi, travma veya cerrahi ile açılırsa kana karışabilir. *S. aureus* enfeksiyonunun neden olduğu en sık deri lezyonu piyojenik apsedir. Enterotoksin A-E, toksik şok sendromu toksini-1 (TSST-1) ve eksfoliat toksinleri A ve B'nin tümü *S. aureus* tarafından üretilen hücre dışı toksinlerdir (Projan and Novick 1997).

S. aureus tarafından kontamine gıdalarda üretilen enterotoksin gıda zehirlenmesine neden olabilir. TSST-1 genine sahip suşlar, toksik şok sendromuna (TSS) neden olan toksin TSST-1'i üretir. Adet gören kadınlarda, özellikle de tampon kullananlarda, TSS enfeksiyonları yaygın olarak bulunur. *S. aureus*'un neden olduğu cilt yanıkları, toksinlerin pul pul dökülmesine (SSSS) bağlıdır. Cildin epidermal tabakasını etkileyen üç SSSS olayı vardır. Bunlar, toksik epidermal nekroz, skarlatiniform eritem ve büllöz impetigodur (Howard and Kloos 1987).

Total kalça artroplastisi hastalarının %1-2'sinde enfeksiyonlar meydana gelmektedir; Total diz artroplastisi hastalarının %4'ü; açık kırık hastalarının %2-5'i; ve kapalı kırık hastalarının %1,5'inde (ortopedik cerrahi sonrası) bu enfeksiyonlar görülmektedir (Gustilo *et al.* 1990). *S. aureus* ile metal-biyomalzeme, kemik eklemi ve yumuşak doku türlerinin enfeksiyonları arasında bir ilişki vardır (Petty *et al.* 1985, Barth *et al.* 1989). Biyomateryal implantasyonun neden olduğu tahriş, enfeksiyona karşı duyarlılığın artmasına ve bağışıklık sisteminin düşmesine yol açabilir, bu da oksijen radikalleri ve nekroz faktör-alfa (NF-kappa) gibi enflamatuar aracıların üretimine yol açabilir (Merritt 1988). ECM, konak hücreler ve mikroorganizmaların tümü bu süreçte rol oynar (Gristina 1987). Biyomateryal implantlar yerleştirildikten sonra koruyucu bir tabaka ile kaplanır. ECM, ECM dahil olmak üzere ana plazma bileşenleri ile etkileşime girer. Örneğin, fibroblastlar bölgeye ulaştığında, bakteriler biyomateryale bağlandığında ve sabit bağlantılar kurduğunda entegre bir hücre yüzeyi oluşturulur. İşlevsel olarak bütünleşmiş canlı bir hücre katmanına sahiptir. MSCRAMM'ler gibi yapışma mekanizmaları, *S. aureus*'un biyomateryal yüzeyinde biriken ECM proteinlerine ve biyomateryallere yapışmasına yardımcı olur (Herrmann *et al.* 1993). *S. aureus* bir yüzeye yapıştıktan sonra, konakçı hücreler onu çıkaramazlar (Giridhar *et al.* 1994). Başlangıçta bakteriler bir

yüzeye yapışır ve daha sonra birbirlerine yapışarak biyofilmler olarak bilinen birçok bakteri tabakası oluştururlar (Cramton *et al.* 1999). Geliştikten sonra, antibiyotikler ve fagositoz, biyofilmin çekirdeğindeki bakterilere ulaşamaz, bu da tedaviyi zorlaştırır (Hoyle and Costerton 1991). Örneğin proteazlar, *S. aureus* tarafından bir yüzeyi kolonize ettikten sonra üretilir. Enfeksiyon duyarlılığı, implantla ilgili bir dizi değişkenden etkilenebilir. İmplant boyutu ve formu, implant yöntemi ve stabilitesi, yüzey kalitesi, ayrıca implant malzemesi ve biyouyumluluk bu değerlendirmeye dahildir (Melcher *et al.* 1994, Petty *et al.* 1985). Başlangıçta negatif yüklü bakteriler, biyomalzemelerin negatif yüklü yüzeyleri tarafından itilir. Moleküller tarafından yaklaşık 15 nanometre mesafede üretilen van der Waals ve hidrofobik kuvvetler, itmenin üstesinden gelir. Yaklaşık 1 nm'lik bir mesafede, biyomalzemeler ve konakçı hücreler veya bakteriler, kısa menzilli kimyasal etkileşimlere girer (iyonik, hidrojen ve kovalent bağ). Benzer bir etki, ECM üzerindeki reseptörler ve bakteri hücre duvarı etkileşime girdiğinde görülür. Hem canlı hücreler hem de bakteriler, biyomalzemelerle önemli şekillerde etkileşime girer ve yapışır. Bu iki faktör en önemli biyouyumluluk özellikleri olarak sıralanabilir (Stickler and McLean 1995).

2.5.2 S. aureus'un neden olduğu enfeksiyonların tedavi edilmesi

Antibiyotiklerin aşırı kullanımı, dirençli birkaç *S. aureus* suşunun ortaya çıkmasına neden olmuştur (Lowy 2003). *S. aureus* enfeksiyonları 1940'larda penisilin ile tedavi edilmiş ve morbidite ve mortalite üzerinde önemli bir etkisi olmuştur. 1940'ların sonlarında penisilinaz direnci gelişmiştir (Eickhoff 1972).

Eritromisin, ampisilin ve tetrasiklin, *Staphylococcus*'un direnç kazanabileceği antimikrobiyallerin örnekleridir. Bir bakteri türü olan plazmitler, genellikle antibiyotik direncinin gelişmesinden sorumludur. Ortaya çıkışından kısa bir süre sonra MRSA (metisiline dirençli *S. aureus*), hastane kaynaklı bir hastalık olarak dünyaya yayılmaya başlamıştır. Hastanelerdeki, hastane kaynaklı *S. aureus* enfeksiyonlarının %61'i Birleşik Krallık'taki Merkezi Halk Sağlığı Laboratuvarı tarafından bulunmuştur (Anonymous 2000). Test edilen 100 hastaneden 96'sında metisilin direncinin olduğu tespit edilmiştir. Bir ß-laktam antibiyotik olan penisilin, penisilin bağlayıcı proteinleri (PBP) yok ederek

bakteri hücre duvarı üretimini engeller. PBP2/ olarak adlandırılan ve ß-laktam antibiyotiklere olan zayıf afinitesi nedeniyle MRSA suşlarına özgü olan bir enzim, antibiyotik mevcut olduğunda bile PBP2/'nin hücre duvarını oluşturmasına izin verir (Hiramatsu 1995). MRSA bakterilerinde ß-laktam direnci buna dayanmaktadır. PBP2/, metisilin dirençli ancak duyarlı olmayan bakterilerde keşfedilen yabancı bir kromozomal DNA olan mec'de bulunan mecA geninin ürünleridir.

1996 yılında, vankomisine orta düzeyde direnç gösteren ilk VISA suşu Japonya'da bulunmuştur (Hiramatsu *et al.*1997). Amerika Birleşik Devletleri, Fransa, İskoçya, Kore, Güney Afrika ve Brezilya'da birçok vankomisine dirençli *S. aureus* (VRSA) suşu tanımlanmıştır. Vankomisin ile tedavi edildiğinde, bazı MRSA bakterileri yaygın olarak hetero-VISA suşları olarak bilinen VISA suşlarını üretmektedir. Yeni bir araştırmaya göre, hücre duvarında peptidoglikan kalınlaşması ve glikopeptid hedefindeki artış, daha fazla VISA testi gerektirdiğini ortaya koymaktadır. Tüm VISA suşlarında enterokokal van genlerinin olmaması, vankomisine dirençli enterokoklarda görülenden farklı bir direnç mekanizması olduğunu düşündürür. Vankomisine dirençli *S. aureus* (VRSA), 2002 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde bir hastada bulunmuştur (Sievert *et al.* 2008). Bu da akla, *S. aureus* ve vankomisine dirençli enterokokların, bu suşa direnç belirleyicisini veren genetik materyalin değiş tokuş etmiş olabileceğini getirmektedir. Vankomisin direnci artık dünyada yaygın olduğuna göre, antibiyotik öncesi çağın geri dönüyor olabileceğinin düşünülmesi aşikardır. Bu nedenle, yeni antimikrobiyal aşı arayışında, antibiyotikler ve aşılar için yeni hedefler keşfetmek bir ön koşul gibi görünmektedir.

3 MATERYAL VE METOD

3.1 Ekipman ve Cihazlar

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan laboratuvar ekipman ve cihazları

No	Araçlar ve malzemeler	Şirket	Ülke
1	Inkübatör	Member VWR	Almanya, Amerika Birleşik Devletleri
2	Fırın, otoklav, Benson brülör, Su banyosu	Member	Almanya
3	Vitek sistemi, Vitek cam (polistiren) test tüpleri, Densichek Metre, Vitek Gram-negatif ID Ek Kart Seti (GNI+)	Biomero	Amerika Birleşik Devletleri
4	Eppendorf 5415D Mikro Eppendorf 5417 Santrifüj, küçük santrifüjler	Ebay Inc	Amerika Birleşik Devletleri
5	Mikro Eppendorf 5430 D Santrifüj	Thomas Scientific	Amerika Birleşik Devletleri
6	Eppendorf tüpleri, uçlar	Sterellin Ltd.	Birleşik Krallık
7	Yüksek Hızlı Soğuk Santrifüj, PCR Tüpler, DNA ekstraksiyon tüpleri	Eppendorf	Almanya
8	Işık mikroskobu	Olympus Carl Zeiss	Japonya Almanya
9	Binoküler	Carl Zeiss	Almanya
10	Mikropipet 0.5-10.1-20 µL, 5-50 µL, 10-200 µL, 100-1000 µL	Blue sky VWR	Belçika Amerika Birleşik Devletleri
11	Tahta çubuklar	Supertop	Çin
12	Buzdolabı	Concord	İtalya
13	Karıştırıcı / sıcak plaka	Teknoloji Laboratuvarı Corning	Kore, Amerika Birleşik Devletleri

14	Plastik test tüpleri, Millipore filtre (0.45 µm)	VWR	Amerika Birleşik Devletleri
15	Konvansiyonel PCR / Thermal cycler ve Multiplex PCR	MJ Search Pioneer	Amerika Birleşik Devletleri, Kore
16	Elektroforez jeli	Shandu Scientific Corporation. BIO-RAD	Birleşik Krallık, Amerika Birleşik Devletleri
17	Duman odası (hood)	Labogen	Danimarka
18	UV	Boya San. Jibril	Kore, Kaliforniya
19	Küçük vorteks	Blue sky Fisher Scientific	Belçika, Amerika Birleşik Devletler
20	Mikrodalga	Kenmore	Amerika Birleşik Devletleri
21	Dijital kuru banyo (42°C, 50°C, 100°C)	Corning LSE	Amerika Birleşik Devletleri
22	Termo Salıncak İnkübatörü	Scientific Poker	Amerika Birleşik Devletleri
23	Trmoelektronik	Rochester	Amerika Birleşik Devletleri
24	Hassas elektrolit dengesi (mg, g)	Bywat	Amerika Birleşik Devletleri
25	Spektrofotometreler	Biyo Radyasyon	Amerika Birleşik Devletleri
26	A ile Jel Dokümantasyon Sistemi Dijital Kamera, Mikroişlemci	Uygulamalı Biyosistemler	Amerika Birleşik Devletleri
27	Genetik Analiz Cihazı ABI 3730	Uygulamalı Biyosistemler	Amerika Birleşik Devletleri
28	Kamera	Canon	Japonya
29	Tek Kullanımlık Petri kapları	Al Hani Şirketi	Lübnan
30	Tek kullanımlık steril pamuklu çubuklar Şırınga 10mL, 5mL ve 3mL	EO sterilizatör	Çin

Çizelge 3.2 Kimyasallar

N0.	Kimyasallar	Şirket / Ülke
1	NaCl, KOH, Na_2HPO_4, KH_2S4, K_2HPO_4 ve New Hampshire4Cl, $MgSO_4$, Like2, NAH_2S_4, $H2A_2$, KCN, Tripton, Maya Özü, HCl	Merck Darmstadt – Almanya
2	Alfa Naftol, P-Dimetilaminobenzaldehit, Pepton, Metil Kırmızısı, Gliserin, Izopropanol	BDH – İngiltere
3	%99, %95 ve %70 Alkol (Etanol)	BDH - İngiltere & Flukachemika – İsviçre
4	Üre Çözeltisi (%40)	Flukachemika – İsviçre
5	Aspartik Asit	Vegetadrog – Fransa
6	Tanik Asit, Laurik Asit, Miristik Asit ve Palmitik Asit, Stearik Asit, Oleik Asit, Pnitrofenilgliserol, Sodyum Azid, Üre Çözeltisi %40	American Scientific Fisher
7	Gram Boyama Seti	Doğa Bilimleri -Amerika Birleşik Devletleri
8	Resveratrol	Thomas Scientific American
9	D-Mannoz Reaktifi, Sodyum Nitroprussid, Potasyum Siyanü	VWR- ABD
10	Jelatin, Trikloroisik Asit (%5)	Sigma Almanya
11	Etidyum Bromür	Vital Basics – ABD ve Alfa Acer Amerika Birleşik Devletleri
12	Xterminator Büyük Boya	Uygulamalı Biyosistemler – ABD

Çizelge 3.3 Kültür ortamı

No	Modlar	Şirket / Ülke
1	Macconkey Agar, Kanlı Agar, MR-VP Et Suyu, Pepton Suyu, Mueller Hinton Agar	Himedia - Accumax Hindistan

2	Üre Agar, Simmons Sitrat Agar	DEFCO – Michigan
3	Agaroz	DEFCO – ABD ve VWR- ABD
4	Tryptic Soy Agar, Et Suyu, Luria Bertani Broth besiyeri	natural roses Science-ABD VWR- ABD

Antibiyotik

Çizelge 3.4 Araştırmada kullanılan antibiyotikler

Antibiyotik	Sembol	Nokta durağı	Şirket
Amikasin	AK	≤16	
Sefepim	FEP	≤8	Biyoanaliz
Seftazidim	CAZ	≤8	
Kolistin	CT	≤2	
Siprofloksasin	CIP	≤1	
Imipenem	IPM	≤2	
Gentamisin	CN	≤4	
Meropenem	MEM	≤2	
Piperasilin	PRL	≤16	
Piperasilin/Tazobaktam	TZB	≤16/4	
Tikarsilin	TI	≤16	
Tikarsilin/Klavulanik Asit	TIM	≤16/2	
Tobramisin	TOB	≤4	

3.2 Yöntemler

3.2.1 Sterilizasyon

3.2.1.1 Otoklav kullanarak sterilizasyon

Hazırlanan ortam ve çözeltiler, 15 dakika boyunca 121°C sıcaklıkta ve 1 atmosfer basınç altında sterilize edilmiştir (Tille 2015).

3.2.1.2 Kuru sıcak hava (pastor fırını) ile sterilizasyon

Cam malzemeler pastör fırınında 175°C'de bir saat tutularak sterilize edilmiştir (Tille 2014).

3.2.1.3 Millipore filtreleri kullanarak sterilizasyon

Yüksek sıcaklıktaki çözeltiler, 0,22 µm çapında bir Millipore Filtresi ile sterilize edilmiştir (Kumari *et al.* 2008).

3.2.2 Reaktiflerin ve solüsyonların hazırlanması

3.2.2.1 Katalaz Reaktifi

Reaktif, izolatların katalaz üretme yeteneklerini araştırmak için, % 21 konsantrasyonda 12 mL hidrojen peroksit alınarak ve distile su ile hacmi 177 mL'ye tamamlanarak ve reaktif opak bir flakonda saklanarak %3 hidrojen peroksit (H_2O_2) konsantrasyonu hazırlanmıştır. (Tadesse and Alem 2006).

3.2.2.2 Oksidaz reaktifi

Bakteri izolatlarının oksidaz enzimini üretme kabiliyetini göstermek için, Reaktif hemen NNNN-tetrametilfenilendiamin dihidroklorür Millipore filtre üniteleri ile sterilize edilen

100 mL distile su içinde çözülerek hazırlanmış ve koyu renkli bir şişede kullanılana kadar buzdolabında saklanmıştır (Macfaddin 2000).

3.2.2.3 Voges-Proskauer reaktifi

İki solüsyondan meydana gelir.

- İlk çözelti, 1 g a-neftolün 100 mL mutlak etil alkol içinde çözülmesiyle hazırlanmıştır.
- İkinci çözelti: 0,7 g potasyum hidroksit solüsyonu 67 mL distile suda çözülerek hacmi 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır. Bu test, izolatların glikoz şekerlerini fermente etme ve aseton üretme yeteneğini göstermeyi amaçlamaktadır (Cruickshank *et al.* 1975).

3.2.2.4 Kristal menekşe boya çözeltisinin hazırlanması

Bakteri izolatlarının biyofilm oluşturma yeteneklerini incelemek için, Çözelti, 17 mL distile su içerisine 7,1 g kristalli menekşe tozu eklenerek hazırlanmış ve mikrofiltrasyon ünitelerinde sterilize edilerek, ardından 4 °C sıcaklıkta saklanmıştır (Mathur *et al.* 2006, Babapour *et al.* 2016).

3.2.3 Kültür ortamının hazırlanması

3.2.3.1 Hazır Ortam

Tüm hazır ortamlar üreticinin talimatlarına ve ambalaj üzerinde belirtilenlere göre Peptone su s ve MR / VP suyu ile hazırlanmıştır. MacConkey agar, Muller-Hinton agar, beyin-kalp infüzyon broth agar, beyin-kalp infüzyon agar, besleyici agar, Luria broth, Luria-Berton broth, tripton soya broth, Simon sitrat agar, Kligler demir agar. Hepsi oksitleyici ajanla 121°C ve 1,5 basınçta 11 dakika sterilize edildikten sonra soğutulmuştur, daha sonra sterilize kaplara veya tüplere yerleştirilerek kullanılıncaya kadar buzdolabında saklanmıştır.

3.2.3.2 Sentetik ortamın hazırlanması

- **Müller agarı**

Staphylococcus aureus'u izole etmek ve teşhis etmek için, Ortam, 0,9 g Setrimit agarın 17 mL gliserol içeren 1000 mL damıtılmış su içinde çözülmesiyle hazırlanmıştır, daha sonra 121 °C sıcaklıkta ve 1,1 pound/inç 2 basınçta ozmoz ile 11 dakika sterilize edilmiş ve daha sonra soğutulmuştur. 45 °C'de ve daha sonra 11 amalgam nalidiksik asit ile iyice karıştırıldıktan sonra steril kaplara dökülerek katılaşmaya bırakılmıştır (Hashim 2013).

- **Kanlı agar**

Kanlı agar besiyeri, izolatların hemolizin enzimini üretme kabiliyetini göstermek için, üreticinin talimatlarına göre 36,1 g agarın bir litre distile su içinde çözülmesi, besiyerinin homojen hale gelinceye kadar karıştırılması ve daha sonra sterilizatör ile 121°C sıcaklıkta ve basınçta 11 dakika sterilize edilmesiyle hazırlanmıştır. Daha sonra %5-7 oranında kan eklenerek, iyice çalkalanıp, ardından steril petri kaplarına dökülerek katılaşmaya bırakılmıştır (Vandepitte *et al.* 2003).

- **Üre agar**

Bu besiyeri, bakterilerin üreaz enzimini üretme yeteneğini incelemek için, 2,0 g üre agar bazının 95 mL distile suda çözülmesiyle hazırlanmıştır, daha sonra ozmoz ile sterilize edilerek 01 °C'ye soğutulmuştur. Sterilize edilen ortama %07 konsantrasyonda 7,01 mikro çapında mikrofiltre ile 5 mL üre çözeltisi ilave edilmiştir. Daha sonra ortam steril tüplere dökülerek, açılı olarak yerleştirilip ve 0 °C sıcaklıkta tutulmuştur (Forbes *et al.* 2007).

- **İndol test ortamı**

Bakteriyel izolatların indol halkası üretme kabiliyetini göstermek için, 27 gr pepton ve 1 gr sodyum klorürün 617 mL distile suda çözülmesiyle hazırlanmış, olan çözeltinin hacmi

1 litreye tamamlanarak oksidasyonla sterilize edilmiş, tüplere ayrılmış ve 4 °C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir (Collee *et al.* 1996).

- **Yağsız süt agar**

Bakteri izolatlarının enzim proteazını üretme kabiliyetini göstermek için, 10 gr yağsız süt tozu 100 mL distile suda eritilmiş ve 5 dakika arıtıcıda sterilize edilmiştir. Daha sonra, katı kültür ortamı 900 mL damıtılmış su içinde çözülerek hazırlanmıştır ve arıtıcı ile 15 dakika sterilize edilerek, 45°C'lik bir sıcaklıkta soğumaya bırakılmıştır. Bunlara ek olarak, süzülmüş süt çözeltisi, besin agarına ilave edilerek iyice karıştırıldı ve sterilize edilmiş kaplara dökülerek katılaşmasına sağlanmıştır (Senior *et al.* 1988).

- **% 2 Glikoz ile beyin kalp infüzyon suyunun hazırlanması**

Bakterilerin biyofilm oluşturma yeteneğini göstermek için, 0,2 g glikoz şekeri 100 mL kalp ve beyin infüzyon suyunda eritilmiştir. Daha sonra hazırlanan çözelti, arıtıcı ile sterilize edilerek süzülmüştür (Babapour *et al.* 2016).

- **Biyofilm oluşumunu araştırmak için kongo kırmızısı agar kullanımı**

Katı yüzeyler üzerinde ince bir filmin fenotipik oluşumunu göstermek için hazırlanan bu ortam, 37 gr/litre kalp ve beyin infüzyon suyu ile 50 gr/litre glikoz ve 10 gr/litre agar ve ardından 0,8 gr/litre Kongo kırmızısı boyası karıştırılarak elde edilmiştir. Kongo kırmızı boya tozu, konsantre sulu bir solüsyon olarak hazırlanmıştır ve ortamın diğer bileşenlerinden ayrı olarak sterilize edilmiştir. Daha sonra, toz, 45 °C'lik bir sıcaklığa kadar soğutulduktan sonra sterilize edilen ortama ilave edilerek karışım iyice karıştırıldı ve daha sonra sterilize edilmiş kaplara dökülmüştür (Freeman *et al.* 1989).

- **Piocyanin kati boyalarin hazırlanmasi için besiyeri king-a agarın hazirlanmasi**

Staphylococcus aureus'nun mavi-yeşil pigmentlerinin pyocyanin üretme yeteneğini göstermek için, 46 g besiyeri bir litre distile suda çözülürek ve besiyerine 10 mL gliserol

eklenmiştir. Daha sonra, ortamı sterilize edilip, soğumaya bırakılmıştır. Sterilize edilmiş kaplara aktarılarak kullanılana kadar 4°C'de saklanmıştır (Murray et al. 2007).

3.3 Örneklerin Toplanması

Çeşitli sağlık kuruluşlarından ve yaşlardan olmak üzere toplamda 100 örnek toplanmıştır. Elde edilen örneklerin alındığı hastaların yaşları 20-60 yaş aralığında değişmektedir. Yara enfeksiyonu (48) ve kan (2) örnekleri, Bağdat'taki Şehir Hastanesi, Bağdat Eğitim Hastanesi ve Gazi Hariri Hastanesi'nden temin edilmiştir. Geriye kalan 4 deri örneği ve 46 yanık enfeksiyonu örneği ise, Irak Yanık Hastanesi ve Eğitim laboratuvarlarından sağlanmıştır.

3.4 Bakteriyel İzolatların Tanımlanması

3.4.1 Morfolojik incelemeler

Kanlı agar, MacConkey agar ve setrimid agar besiyerleri üzerinde büyüyen bakteri kolonilerinin fenotipik özellikleri ve kolonilerin şekil, boyut, renk, koku ve pigment üretme yeteneği gibi özellikleri identifikaasyon için incelenmiştir. Morfolojik gözlemlerin yapıldığı setrimide agar besiyerinde, yeşil renkle gösterilen laktoz şekerlerinin fermantasyonu sadece *S. aureus* bakterilerinin büyümesine izin vermiştir. Bu besiyerinde diğer bakteri türlerinin büyümesi~~ni~~ engellenmiştir (Levinson 2016).

3.4.2 Mikroskobik incelemeler

Bakteri izolatlarının mikroskobik incelemesi, Gram boyama ile boyanmış preparatlarla yapılmıştır ve daha sonra boya ile etkileşimlerini ve hücrelerin şekli ve düzenini gözlemlemek için mikroskop altında (Olympus Carl Zeiss Stemi Stereo 305) incelenmiştir (Forbes *et al.* 2007).

3.4.3 Biyokimyasal testler

Staphylococcus aureus izolatlarını teşhis etmek için aşağıda sıralanmış olan biyokimyasal testler yapılmıştır:

3.4.3.1 Oksidaz testi

18-24 saatlik tek bir bakteri kolonisi, steril bir tahta çubukla bir parça filtre kağıdına yerleştirildikten sonra üzerine iki damla oksidaz reaktifi yerleştirilmiştir. Renk koyu mora döndüğünde sonuç pozitif olarak değerlendirilmiştir (Procop *et al.* 2016).

3.4.3.2 Katalaz testi

18-24 saatlik tek bir bakteri kolonisi, temiz bir lama aktarıldıktan sonra bir damla hidrojen peroksit (%3) eklenmiştir. Hava kabarcıklarının görünümü, testin sonucunu pozitif olarak göstermiştir (Procop *et al.* 2016).

3.4.3.3 4°C ve 42°C sıcaklıklarda büyüme

Bakteriyel izolatlar, besleyici agar besiyerinde sürme yöntemiyle büyütülerek, 4°C ve 42°C'de 20 saat inkübe edilmiştir. Büyümenin varlığı, testin sonucunun pozitif olduğunu göstermiştir (Forbes *et al.* 2007).

3.4.3.4 İndol üretim testi

Pepton su ortamına tek bir bakteri kolonisi aşılanmıştır. Daha sonra 37 °C'de 24 saat inkübe edilerek, 5 damla Kovacs reaktifi eklenmiş ve hafifçe çalkalanmıştır. Tüplerin üst kısmında bir iki dakika içinde kırmızı bir halkanın oluşması pozitif reaksiyon (indol formasyonunu) ifade etmektedir. Sarımsı halka ise indolun oluşmadığını göstermektedir (MacFaddin, 2000).

3.4.3.5 Metil red testi (MR)

Bakteri kolonileri, 18-24 saat aralıklarla Metil red ortamında MR-VP tüplerine ekilmiştir, ardından 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra, her tüpe beş damla metil red reaktifi eklenerek hafifçe çalkalanmıştır. Oluşan kırmızı renk değişimi, testin pozitif olduğunun ve bakterilerin glikoz şekerlerini fermente etme ve asit üretme kabiliyetinin bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir (MacFaddinn 2000).

3.4.3.6 Vogas – Proskauer testi

MR-VP tüpleri bakteri izolatları ile ekilmiştir, 18-24 saat bekletilmiş ve ardından 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra 9 damla alfa-naftol ve iki damla reaktif potasyum hidroksit eklenmiştir. Daha sonra hafifçe çalkalanmıştır ve ortamın kırmızı rengi, testin pozitifliğini ve bakterilerin glikozu fermente etme ile aseton üretme yeteneğini göstermiştir (Forbes *et al.* 2007).

3.4.3.7 Sitrat kullanım testi

Simon sitrat agar besiyeri tüplerinin eğimli yüzeyi, planlama yöntemine göre bakteri izolatları ile kültürlendi ve 37 °C'de 2 ila 4 saat süreyle inkübe edildi. Ortamın rengi, pozitif bir testin kanıtı olarak yeşilden maviye değişti (Forbes *et al.* 2007).

3.4.3.8 Üreaz üretim testi

Bakteriyel izolatlarla agar inoküle edildikten sonra 37 °C'de 2-4 saatlik bir süre boyunca inkübe edilmiştir. Pembe rengin ortaya çıkması, testin pozitifliğinin ve bakterilerin üreaz enzimini üretme kabiliyetinin kanıtı olarak değerlendirilmiştir (Forbes *et al.* 2007).

3.4.3.9 Kligler demir agar (KDA) testi

KDA tüplerinin dibi bıçaklama yöntemiyle, eğimli yüzey ise düzeni yöntemiyle bakteri ile aşılanmış ve 37°C sıcaklıkta 2-4 saat süreyle inkübe edilmiştir. Meydana gelen

sararma glikoz şeker ve asit üretiminin fermantasyonunun bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir. Alt kısımda siyah rengin görülmesi, hidrojen sülfür üretiminin, tüpün alt kısmında gaz birikmesi ise bakteriler tarafından gaz üretiminin bir kanıtı olduğunun tespiti olarak değerlendirmeye alınmıştır (Leboff *et al.* 2011).

3.4.3.10 Hemoliz üretim testi

Bu yöntemde, bakteri kolonileri 18-24 saat bekletildikten sonra kanlı agar besiyerine aşılanmış ve 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir Bu testin sonunda, Alfa hemolizde: Koloni çevresinde yeşilimsi renk değişikliği, Beta hemolizde: Koloni çevresinde şeffaf renk değişikliği, Gama hemolizde ise koloni çevresinde renk değişikliği görülmemektedir (Kayser *et al.* 2005).

3.4.3.11 Proteaz enzimi üretim testi

Enzim üretimini göstermek için yağsız süt agar kullanılmıştır. 1.5 x 108 hücre/mL'lik bir konsantrasyonda bir bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. Sütlü agarın ortasında yerleştirilen deliklere 200 µL bakteri süspansiyonu eklenerek, bir mantar zımbası yardımıyla sıralama (8 mm çapında) yapılmış ve ardından inkübe edilmiştir. 37 °C sıcaklıkta ve 2-4 saatlik bir süre boyunca bakterilerin bu enzimi üretme kabiliyetini belirlemek için deliklerin çevresinde şeffaf bir harenin oluşması gözlemlenmiştir. Bu yapının oluşması enzimin üretildiğinin göstergesi olarak değerlendirlmiştir (Senior 1988).

3.5 Bakteriyel İzolatların Saklanması

3.5.1 Kısa süreli depolama

Bakteriyel izolatlar, planlama yöntemi kullanılarak kalp ve beyin agarının kültür ortamına aşılanmıştır. Ardından kaplar 37°C sıcaklıkta 42 saat süreyle inkübe edilmiş ve ardından 4°C sıcaklıkta tutulmuştur (Harley and Prescott 2002).

3.5.2 Orta süreli depolama

Bakteri izolatları agarın eğimli yüzeyine ekilerek, kalp ve beyin kültürü ortamı üzerindeki steril tüplere aşılanmıştır. Tüpler, 2-4 saatlik bir süre boyunca 37°C sıcaklıkta inkübe edilmiş ve 4°C'de saklanmıştır. Bu yöntemle koruma süresi en fazla üç hafta olarak tespit edildiğinden bu sürenin sonunda elde edilen materyalin tekrar hazırlanması gerekmektedir (Harley and Prescott 2002).

3.5.3 Uzun süreli depolama

Bakteri izolatları, tüplere aktarıldıktan sonra, sterilizatör ile sterilize edilmiştir. Tüpler soğutulduktan sonra taşıyıcı yardımıyla (her tüp için) ortama bir izolat aktarılmış ve daha sonra 37 °C sıcaklıkta 6 saat inkübe edilirerek numuneler -20 ° C'lik bir sıcaklıkta %15 gliserol içeren kalp ve beyin infüzyon sıvısında üç aydan daha uzun bir süre boyunca saklanmıştır (Ausubel *et al.* 1987).

3.6 Vitek 2 Kompakt Sistemi Kullanılarak Minimal İnhibitör Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Bakteri izolatlarında antibiyotiklerin minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerleri, Pincus 2016'da belirtilenlere göre vitek cihazı ve antibiyotik duyarlılık test kartındaki (AST) özel kart kullanılarak belirlenmiştir. Duyarlılık test kartı, 46 deliğe dağıtılmış 18-20 antibiyotik içermektedir. Cihaz, bakteri üremesinden sonra değişiklikleri kaydetmeye çalıştığından, her bir antibiyotik, kartta birden fazla konsantrasyona sahip olarak yerleştirilmiştir.

Duyarlılığı test edilecek bakteri izolatları sterstermid besiyerinde kültüre edilerek 37 °C'de 42 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra kanüller alınmış ve her birine ayrı ayrı 3 mL fizyolojik solüsyon ilave edilmiştir. Ardından besiyerinden birkaç ayrı koloni alınarak, ortam yoluyla tüplere (her numune ayrı ayrı) aktarılmış ve bir bakteri süspansiyonu elde etmek için fizyolojik solüsyonla karıştırılmıştır. Asılı süspansiyonun bulanıklığının

(0,50-0,63) arasında olması gerektiğinden, cihazın yoğunluk kontrolü kullanılarak asılı ortamın bulanıklığı ölçülmüştür. Duyarlılık Test Kartına bağlı Kart Aktarımı iletim tüpü tertibatını tüplere yerleştirilerek test kaseti tutucusuna takılmıştır. Numuneler tüplerden karta aktarılmak üzere yükleme kapısından girişi sağlanmış ve test işlemini tamamlamak için 37 °C sıcaklıkta 6-12 saat süreyle inkübe edilmiştir.

3.7 Kongo Kırmızı Agar Yöntemiyle Bakteri İzolatlarının Biyofilm Tabakası Oluşturma Yeteneğinin Kalitatif İncelenmesi

Öze ile stermid besiyerinden saf bir koloni alınarak, kırmızı kongo agar çözeltisinin ortasına ekilmiş ve 37 °C sıcaklıkta 42 saat süreyle inkübe edilmiştir. Aşağıda belirtilen her iki sonuçta durum pozitif olarak değerlendirilmiştir. Bunlar;

- Birincisi, koyu siyah renkte kolonilerin görünümü ile temsil edilen güçlü bir biyofilm üretimidir.
- İkincisi, kolonilerin açık siyah renkte görünmesiyle temsil edilen ortalama bir biyofilm üretimidir.

Koloniler kırmızı veya koyu pembe görünüyorsa sonuç negatif~~tir~~ olarak değerlendirmeye alınmıştır (Freeman *et al.* 1989).

3.8 Bakteriyel İzolatların Mikrotiter Plaka Kullanarak Biyofilm Oluşturma Yeteneklerinin Kalitatif İncelenmesi

Babapour *et al.* (2016) ve Mathur *et al.* (2006) belirttiği gibi, mikrotitre plaka yöntemi kullanılarak bakteriyel izolatların biyofilm oluşturma yeteneğinin gösterilmesi;

1- Kalp ve beyin infüzyon suyu kullanılarak bakteriyel süspansiyon hazırlanarak izolat seyreltilmiş ve standart McFarland çözeltisi ile karşılaştırılmıştır.

2- Her numune için üç tekrar yapılarak, %2 glikoz içeren toplamda 180 mikrolitre olan kalp ve beyin infüzyon suyu içeren bir kalibrasyon çanağının kuyularına 20 µl bakteri süspansiyonu aktarılmıştır. Buna karşılık, %2 glikoz bakteri içermeyen toplamda 200 mikrolitre olan kalp ve beyin infüzyon suyu üç kuyuya ilave edilerek karşılaştırma için negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

3- Kalibrasyon kabı kapatılarak ve 37 °C'de 4 saat inkübe edilmiştir.

4- Yapışmayan bakteri hücreleri, üç kez fosfat tamponlu tuzlu su ile yıkanarak çıkarılmış ve daha sonra oda sıcaklığında 15 dakika kurutulmuştur.

5- Yapışan hücreler, her deliğe 200 ul mutlak metanol eklenerek sabitlenerek ve 15 dakika beklemeye bırakılmıştır. Ardından metanol uzaklaştırılarak titrasyon kabı kurumaya ayarlanmıştır.

6- Her deliğe %0,1 konsantrasyonda hazırlanan 200 mikrolitre kristal viyole boyası ilave edilerek 15 dakika beklemeye bırakılmıştır.

7- Daha sonra bağlanmamış boyalardan kurtulmak için çukurlar üç kez fosfat tuzu çözeltisi ile yıkanmış ve ardından oda sıcaklığında kurutulmuştur

8- Kristal viyole ile boyanan yapışık hücrelere ise 200 µl mutlak etanol eklenmiştir.

9- Absorbans, bir ELISA cihazı kullanılarak 630 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Daha sonra elde edilen okumalar aşağıdaki denklemlerle karşılaştırılarak izolatların biyofilm oluşumu üzerindeki etkinliği belirlenmiştir:

- Kontrol katsayısının ortalama optik yoğunluğu, izolatın ortalama optik yoğunluğundan büyük veya ona eşitse ($OD_c \geq OD$) izolatın biyofilm oluşturmadığı kabul edilir.

- İzolatın ortalama optik yoğunluğu, kontrolün ortalama optik yoğunluğundan daha büyük veya kontrolün optik yoğunluğunun (ODc4xODc) iki katına eşit veya iki katından azsa, bir izolatın zayıf biyofilm oluşturduğu kabul edilir.

4 TARTIŞMA VE SONUÇ

4.1 *Staphylococcus aureus*'un İzolasyonu ve Tanımlanması

Bağdat'taki Şehir Hastanesi, Bağdat Eğitim Hastanesi, Gazi Hariri Hastanesi, Yanık İhtisas Hastanesi ve Eğitim Laboratuvarından 100 örnek toplanmıştır (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 S. aureus örneklerinin ve izolatlarının türü, sayısı ve yüzdeleri.

Örnek Tip	Toplam numune sayısı	İzole *Staphylococcus aureus* sayısı	İzolatların yüzde oranı %*
Yara Enfeksiyonları	48	30	62.5
Yanık Enfeksiyonları	46	26	56.52
Kan	2	2	100
Deri kazıntısı	4	2	50
Toplam sayı	100	60	60

* Hesaplanan toplam izolat yüzdesi

Bakteri kolonileri laktoz şekerini fermente edememeleri nedeniyle soluk renkte göründüklerinden dolayı, bakterilerin teşhisi MacConkey agarın katı besiyerinde kültürlenmesiyle yapılmıştır (Forbes *et al.* 2007). Bakterilerin hemoliz enzimini üretme kabiliyetinin kanıtı olan β-hemoliz tipinin tespit edilmesi için, kanlı agar besiyerine katı setrimid eklenerek bekletilmiştir (Selim *et al.* 2015). Bunun sonucunda, UV ışınları altında koloni çevresinde yeşilimsi renk değişikliğine neden olan pigmentlerin Pyocyanin içerdiği ve bu pigmentlerin suda çözünür olarak değerlendirmeye alındığı tespit edilmiştir (Sudhakar *et al.* 2015).

Spor oluşturmayan gram-pozitif çomakların varlığını tespit etmek için mikroskobik inceleme (Al-Dahmoshi 2013) yapılmıştır. Ayrıca, 100 izolattan 60'ı hem oksidaz testi

hem de katalaz testi için pozitif sonuçlar gösterdiğinden ek olarak biyokimyasal testler yapılmıştır. Bu testlerden, Indol testleri, Metil kırmızısı testi, ve Voges Proskauer testi negatif sonuç gösterirken ve Sitrat kullanım testini içeren IMViC, pozitif sonuç göstermiştir. Üreaz testinde ise sonuçlar birbirinden farklı çıkmıştır. Demir arıtıcı için reaksiyon bazik olarak tespit edilmiş ve bakteri 42°C'lik bir sıcaklıkta büyüme göstermiştir (Çizelge 4.2). Elde edilen bu sonuçlar Tadess and Alem 2006 ve Todar 2011 tarafından yapılan çalışmalardaki sonuçlar ile benzer şekilde ortaya çıkmıştır.

Çizelge 4.2 S. aureus izolatları için fenotipik ve biyokimyasal testler

No	Test	Sonuç
1	Gram boyama	-
2	Hücre şekli ve gruplandırma	Kok
3	MacConkey agarda büyüme	Laktoza fermente edilmemiş
4	Kanlı agarın ortasında büyüme	β- hemoliz
5	Setrimide agar üzerinde büyüme	+
6	4°C'de büyüme	-
7	42°C'de büyüme	+
8	Oksidaz enzimi	+
9	Katalaz enzimi	+
10	Üreaz enzimi	-/+
11	Alandol	_
12	Metil Kırmızısı	_
13	Voges Proskauer	_
14	Sitrat tüketimi	+
15	Demir Arıtıcı	K/K(baz/baz)

+ Test pozitif, - Test negatif, (+/-) heterojen, K: baz reaksiyonu

4.2 Vitek2 Kompakt Sistem Kullanılarak Antibiyotiklerin MIC Değerinin Belirlenmesi

Bu sistem, Pincus 2006'daki prosedüre göre uygulanmıştır. Prosedüre göre, AST analizinde etiketlemek üzere Vitek2 kompakt sistemine, amikasin, sefepim, seftazidim, siprofloksasin, piperasilin, meropenem, imipenem, gentamisin, kolistin, tikarsilin/klavülin/klavulanik asit olmak üzere on üç antibiyotik eklenmiştir. Bu antibiyotikler minimum inhibitör konsantrasyon değerlerini belirlemek için kullanılmıştır (Çizelge 4.3). Sonuçlar, anti-amikasin minimum inhibitör konsantrasyonunun 3'ü %10 dirençli, 1'i %3,3 orta dirençli ve 26'sının ise %87,6 oranında duyarlı izolat olduğunu göstermiştir. Antagonist sefapime gelince, sonuçlar 4 izolatın (%13,3) dirençli, 8'inin (%26,7) orta derecede dirençli ve 18'inin (%60) duyarlı olduğunu göstermektedir. Antagonist seftazidime ise, 9 izolatın (%30) dirençli, 8'inin (%26,7) orta derecede dirençli ve 13'ünün (%43,3) duyarlı olduğu ortaya çıkmıştır.

Anti-siprofloksasin sonuçlarında 8 izolatın (%26,7) dirençli, 6 izolatın (%20) orta derecede dirençli ve 16 izolatın (%53,3) duyarlı olduğu bulunmuştur. Anti-kolistin sonuçları incelendiğinde, 16 izolatın (53,3) dirençli, 14'ünün (%46,7) duyarlı olduğu orta düzeyde dirençli hiçbir izolatın olmadığı görülmüştür.

Anti-gentamisine gelince, 9 izolat (%30) dirençli, 3 izolat (%10) orta derecede dirençli ve 18 izolat (%60) duyarlı olarak karşımıza çıkmaktadır. İmipenem sonuçlarında, 4 izolatın (%13,3) dirençli ve 26'sının (%86,7) duyarlı olduğunu görülürken, orta derecede dirençli izolata rastlanmamıştır.

Anti-meropenem için, 4 izolat (%13,3) dirençli, 26 izolat (%86,7) duyarlı ve orta derecede dirençli izolat bulunmamaktadır.

Anti-piperasilinde, 15 izolatta (%50) direnç ve 15 izolatta (%50) duyarlılık bulunurken, orta dirençli izolat ortaya çıkmamıştır. Piperasilin/tazobaktam antagonistine gelince, tüm izolatlar bu antagoniste duyarlıdır (%100). Antagonist tikarsilin sonuçlarında, 15 izolatta

%50 direnç ve 15 izolatta %50 duyarlılık bulunurken, ara dirençli numuneler ortaya çıkmamıştır. Antagonist tikarsilin/klavulanik asit sonuçları 13 (%43,3) dirençli ve 17 (%56,7) izolatın duyarlı olduğunu gösterirken orta derecede dirençli izolat oluşmadığını ortaya koymuştur.

Son olarak, Tobramisin antagonistinin sonuçları,47 izolatta (%56,7) en dirençli ve 1 izolatta (%3,3) orta derecede dirençli ve 12'sinde (%40) duyarlı olarak sıralanmaktadır.

Çizelge 4.3 *S. aureus* bakteri izolatları için minimum inhibitör antibiyotik konsantrasyonunun direnç ve duyarlılık yüzdeleri.

Antibiyotik	Direnç			Orta direnç			Hassas		
	sayı	yüzde %	MIC мg	sayı	yüzde %	MIC мg	sayı	yüzde %	MIC мg
Tobramisin	47	56,7%	>=16	1	3,3%	8	12	40%	1= >
Piperasilin	15	80	=128	/	/	/	15	50	8
Piperasilin/Tazobaktam	/	/	/	/	/	/	30	100	8
Meropenem	4	13,3	>=16	/	/	/	26	86,7	<=0,25
Imipenem	4	13,3	>=16	/	/	/	26	86,7	<=0,25
Gentamisin	9	12	>=16	3	10	8	18	60	>=1
Kolistin	16	53,3	>=16	/	/	/	14	46,7	>=0.5
Siprofloksasin	8	26,7	3	6	20	2	16	54	0,25
Seftazidim	9	30	63	8	26	16	13	43	4
Sefapim	4	13	>=64	8	25	16	18	60	2
Amikasin	3	10	64	1	3	32	26	86	2
Tikarsilin	15	50	128	/	/	/	15	50	8
Tikarsilin/Klavulanik	13	43	128	/	/	/	17	56	32

Khan ve Faiz (2016) tarafından yapılan çalışmada, Suudi Arabistan'daki *S. aureus* izolatlarının anti-tikarsilin direncinin %55 olduğunu bulmuşlardır. Bu çalışmanın

sonuçları bizim çalışmamız ile benzer sonuçlar göstermiştir. Sekar *et al.* 2014 tarafından Irak'ta yapılan başka bir çalışmada, *Staphylococcus aureus*'un klinik izolatlarının siprofloksasin, sefapim ve tobramisine %24,4 ve gentamisin ve seftazidime ise %27 dirençli olduğunu ortaya çıkmıştır. Al-Asady *et al.* (2016), *Staphylococcus aureus* izolatlarının %56,6 oranında piperasilin direnci gösterdiğini belirtmiştir. Başka bir çalışma da ise, kök izolatlarının %20'sinin piperasiline dirençli olduğu bulunmuştur (Karthi *et al.* 2012) tarafından yapılan çalışma, amikasine karşı bakteriyel direnç oranının %13 olduğunu ortaya koymuştur. Aynı şekilde Al-Taee *et al.* (2017) tarafından, 31 *Staphylococcus aureus* izolatı üzerinde MIC tayinini belirlemek amacıyla gerçekleştrilen çalışmada amikasine karşı direnç %65, gentamisin ve piperasilin/tazobaktama direnci %80, meropenem direnci%75, imipeneme direnç %70 ve son olarak siprofloksasine direnç %65 olarak karşımıza çıkmıştır.

Helal and Khan (2015), tarafından 136 bakteri izolatı üzerinde yapılan çalışmada, anti-tikarsilin direnci %61 olarak tespit edilmiştir. Sharma and Dhar (2017) ise çalışmasında, anti-tikarsilin/klavulanik aside karşı %54'lük bir direnç, anti-tobramisine karşı %79 direnç oranı olduğunu ifade etmiştir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz bakteri izolatlarının anti-kolistine karşı %53.3 oranında gösterdiği direnç, Mohanty *et al.* 2019 tarafından gerçekleştirilen çalışma ile uyumlu sonuçların olduğunu ortaya koymaktadır. Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde, *S. aureus* bakterilerinin antibiyotiklere karşı direnç nedeninin birçok farklı mekanizmaya sahip olmasından dolayı olduğu çalışmamızdan ve daha önceki çalışmalardan anlaşılmaktadır. Bu mekanizmalar, dış zarın geçirgenliğini değiştirme yeteneği, akış pompalarına sahip olma, geniş spektrumlu beta-laktamaz enzimlerinin üretimi, biyofilm oluşumu ve çeşitli antibiyotiklere direnç genleri taşıyan direnç plazmitlerine sahip olmaları olarak sıralanmaktadır (Hong *et al.* 2016).

Çizelge 4.4 incelendiğinde, *Staphylococcus aureus* izolatlarının (30 izolat) antibiyotik dirençlerine göre yedi farklı türe ayrıldığı görülmektedir. 1. tür onbir antibiyotiğe karşı %6.6 oranında dirençli iken 2. tür %6.6 oranında anti-siprofloksasin ve kolistin dışında dokuz antibiyotiğe karşı dirençli, 3. tür sekiz antibiyotiğe (%6), 4. tür %3,3 oranı ile yedi

antibiyotiğe, ardından 5. tür altı antibiyotiğe (%6,6), 6. tür %26,6 oranı ile beş antibiyotiğe ve son olarak 7. tür üç antibiyotiğe (%10) duyarlı olarak karşımıza çıkmaktadır.

Çizelge 4.4 S. aureus izolatlarının antibiyotik direnç değerleri

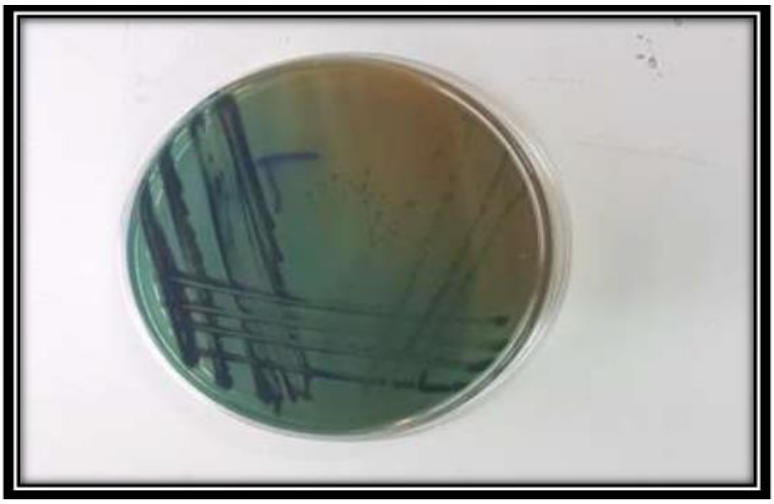
Tür Sayısı	Antibiyotik sayısı	Dirençli izolat sayısı	Yüzde (%)
1. Tür	11	2	6,6
2. Tür	9	2	6,6
3. Tür	8	2	6,6
4. Tür	7	1	3,3
5. Tür	6	2	6,6
6. Tür	5	8	26
7. Tür	3	3	10

4.3 Virülans Faktörlerinin Tespiti

Bakteriyel izolatların virülans faktörleri nedeniyle enfeksiyona neden olma yeteneği, enfeksiyonların tetiklenmesinde önemli rol oynamaktadır (LaSarre and Federle 2013). *S. aureus* bakterilerinin sahip olduğu bazı virülans faktörler incelenmiştir. Bunlara ek olarak, pigment üretme yeteneği, hemolizin enzimi, proteaz üretimi, siderofor üretimi veya doğrudan veya çekirdek algılayıcı genlerin kontrolü altında olan biyofilmler oluşturma yeteneği de dahil edilebilir (Çizelge 4.5) (García-Contreras 2016).

4.3.1 Pigment üretimi

Yapılan çalışmada, Piyosiyanin boyasının 18/30, nitrit agar besiyerinde çizim yöntemi kullanılarak *S. aureus* izolatını %60 oranında büyüttüğü karşımıza çıkmaktadır. (Şekil 4.1)

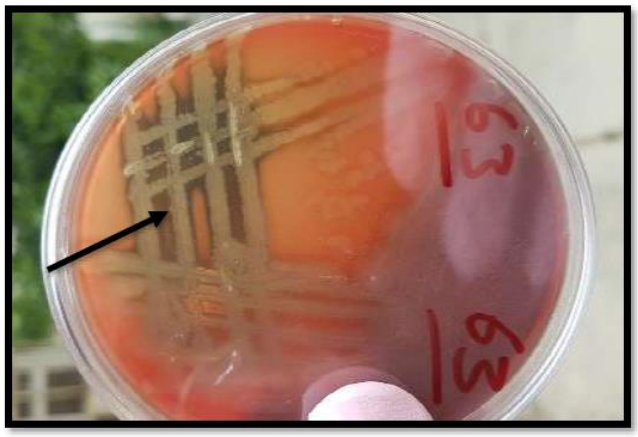


Şekil 4.1 Nitrit agar besiyerinde *S. aureus* bakterileri için piyosiyanin boya üretimi.

Pigment Piyosiyanin önemli bir virülans faktörüdür. Bu pigment, akut ve kronik bronşitte önemli bir rol oynadığı için biyofilm oluşumu sırasında üretilir. Ayrıca, bir oksidan gibi davrandığı ve bakterilerin anaerobik koşullar altında hayatta kalmasına izin verdiği için antimikrobiyal bir bileşiktir (Hotterbeekx *et al.* 2017) Hücre içi sinyalleme yoluyla, Piyosiyanin, *S. aureus'*un diğer bakterilere ve hatta mantarlara karşı başarılı bir şekilde rekabet etmesine izin verir (Tashiro *et al.* 2013, Stringfellow *et al.* 2009). Solunum yollarının pigment piyosiyanine maruz kalması akciğerlere zarar verir ve kistik fibroz hastalığının gelişimine neden olur. Bu sebeplerden dolayı Piyosiyanin pigmentinin üretimini engelleyen bir maddenin bulunması gerekli hale gelmiştir.

4.3.2 Hemolizin üretimi

Khalil *et al.* 2015 tarafından yürütülen bir çalışmada, tüm izolatların kanlı agar üzerinde β-hemolizin enzimi üretme kabiliyetine sahip olduğunu tespit edilmiştir. Türkiye'de izolatların~~ın~~ %95,2'si bu enzimi üretmektedir. Al-Arnaouti 2015 tarafından yapılan çalışmada, yanık ve yaralardan izole edilen *S. aureus* izolatlarında hemolisinin üretim oranını %100 olduğunu bulmuştur. Hemolisin gibi toksinlerin üretimi, bakterilerin yayılmasını ve konakçıya besinlerin salınmasını kolaylaştıran doku hasarına neden olmaktadır. Ayrıca konakçının hayatta kalmasının yanı sıra inflamatuar yanıtlar ve hücre iskeleti dinamikleri de dahil olmak üzere birçok süreci etkileyebilen konak sinyalini değiştirebilme kabiliyetine sahiptirler (Wiles *et al.* 2008). (Şekil 4.2)



Şekil 4.2 Kan ortamında ß-hemoliz enziminin üretimi.

4.3.3 Proteaz üretimi

Sonuçlar, bakterilerin agar besiyerindeki (25/30) izolatlarda %83,3 oranında ve ortalama çapları 12-20 mm arasında proteaz enzimleri üretme kabiliyetini göstermiştir. Al-Tikrity *et al.* 2015 ve Al -Tikrity *et al.* 2019 tarafından Irak'ta gerçekleştirilen çalışmada, yağsız sütten *S. aureus* bakterilerinin sırasıyla %88,3 ve %86,1'inin proteaz ürettiğini ortaya koyulmuştur.

Yaptığımız çalışmada ise, kolistine dirençli tüm izolatların bu enzimi ürettiği bulunmuştur. (Çizelge 4.5) Bazı çalışmalar, proteaz enziminin ekspresyonunun, bazı bakteri türlerinde polimiksin antijenlerine içsel olarak direnme yeteneği için gerekli olduğunu göstermiştir (Velkov *et al.* 2013) ve bu, proteaz üretme yeteneği ile polimiksin antijenlerine direnç arasında bir ilişki olduğunu düşündürmektedir.

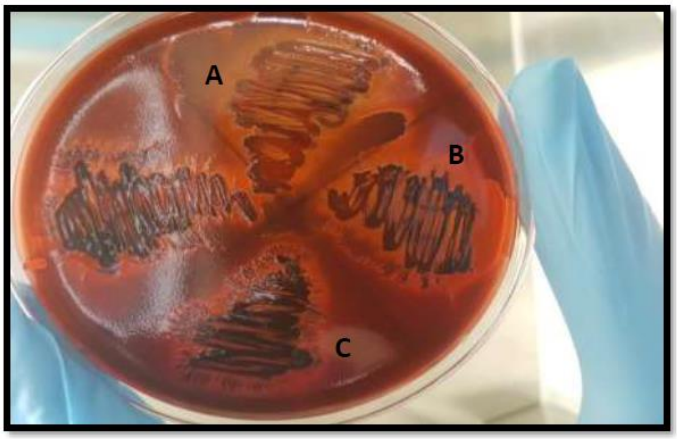
Çizelge 4.5 *S. aureus* bakterilerinin bazı virülans faktörlerinin üretim yüzdesi.

Hastalık Oluşturma Faktörü	Toplam İzolat Sayısı	Üretilen İzolat Sayısı	Yüzde (%)
Pigment Üretimi	30	18	60
Hemolizin Üretimi	30	30	100
Proteaz Üretimi	30	25	83,3
Biyofilm Üretimi	30	30	100

4.3.4 Biyofilm oluşturma yeteneği

4.3.4.1 Kongo kirmizisi yöntemi kullanilarak staphylococcus aureus'un adezyon tabakasi oluşturma yeteneğinin tespiti

Yapılan çalışma sonucunda elde edilen veriler, testin gerçekleştirildiği tüm *S. aureus* izolatlarının %100 oranında yapışma tabakaları oluşturma kabiliyetine sahip olduğunu göstermiştir. Bu katmanlar arasında renge bağlı olarak ortaya çıkan farklılıklar Şekil 4.3'de gösterilmiştir.



Şekil 4.3 Kırmızı kongo'un ortasında *S. aureus* bakterisinin yapışma tabakaları: A- Zayıf oluşum, B- Orta oluşum, C- Güçlü oluşum.

Kongo Kırmızısı CRA besiyerinin kullanıldığı yöntem, ekzopolisakkaritleri üreten ikincil metabolik faktörlerin yansıtıldığı, besiyerindeki sakaroz konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak fenotipin renk ve kolonilerindeki değişimi ortaya koyan tanımlayıcı bir testtir. İnkübasyonun sonraki aşamalarında, eğer ince yapışık izolat tabakalarının üretiminde siyah renk azalır, pürüzlülük, kuruluk ve kristalli form artarsa güçlü oluşum kategorisine ait olarak değerlendirilir, ancak renk soluk siyah ise, izolatlar orta bileşimde, daha çok kırmızı renkli veya soluk pembe koloniler varsa zayıf oluşum kategorisinde ~~olarak~~ ele alınmaktadır (Hou *et al.* 2012).

Bu çalışmada Kongo kırmızısı yöntemine göre, ince tabakaların üretimi, 20 *S. aureus* bakterisi izolatından sadece üç izolatın, yani %15'inin bunu yapabildiğini göstermiştir. Bu oran, Lima *et al.* 2017 tarafından Brezilya da gerçekleştirilen çalışmaya göre daha yüksek olarak karşımıza çıkmaktadır (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6 *S. aureus* bakterilerinin Kongo kırmızısı yöntemini kullanarak bir biyofilm oluşturma yeteneği.

Numune Sayısı	Güçlü		Orta		Zayıf	
	İzolat Sayısı	Yüzde	İzolat Sayısı	Yüzde	İzolat Sayısı	Yüzde
11,41,17,11, 13,2 4,41,18,60, 16,14, 11	16	53	/	/	/	/
4,34,25,39,19,35 9,58,59	/	/	12	42	/	/
24,34	/	/	/	/	2	6.6

4.3.4.2 *Staphylococcus aureus*'un biyofilm oluşumuna duyarlılığının tespiti

Biyofilm oluşumu, bakterilerin zorlu çevre koşullarında hayatta kalabilmek için kullandıkları en yaygın yöntemlerden biridir. Bakteriler, su sistemlerinde çeşitli abiyotik yüzeylerde ve ayrıca doğal su ortamlarında biyofilm oluşturabilir (Bronowskil *et al.* 2014). *S. aureus* izolatlarının biyofilm oluşturma yetenekleri mikrotitre plaka (MTP) yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. %40 oranında 12 izolat orta derecede biyofilm oluştururken, %13 oranında 4 izolat yüksek biyofilm oluşturmuştur. Yapmış olduğumuz çalışmanın sonuçları, bakteri izolatlarının %53'ünün yüksek oranda biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir. Elde edilen sonuçlar, yapılan diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında, izolatların %100'ünün biyofilm oluşturma kabiliyetine sahip olduğunu bulan Al-Taee*et al.* (2017) ve Al-Asady *et al.* (2020) sonuçlarıyla uyumlu olarak karşımıza çıkmaktadır.

Çizelge 4.7 *S. aureus* bakterilerinin mikrokalibrasyon kapları kullanarak biyofilm oluşturma yeteneği

Güçlü Oluşum		Orta Oluşum		Zayıf Oluşum	
İzolat sayısı	Yüzde (%)	İzolat Sayısı	Yüzde (%)	İzolat Sayısı	Yüzde (%)
4	13	12	40	14	47

Yapılan çalışmalar, devlet hastenelerinde sıklıkla görülen *Staphylococcus aureus* bakterisinin bazı fiziksel ve kimyasal özelliklerinin çoklu antibiyotik direncine göre değişimini saptamaya yönelik olarak ortak bir amaca hizmet etmektedir. Tüm bu elde edilen veriler değerlendirildiğinde ve daha önce yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında, kimyasal reaksiyonlar ve antibiyotiklere karşı direncin birbiriyle uyumlu sonuçlar gösterdiği tespit edilmiştir.

Bu bilgiler doğrultusunda *Staphylococcus aureus* bakterisinin incelemeye devam edilmesini, farklı antibiyotiklere karşı var olan ya da var olacak dirençlerin belirlenmesini, bu özelliklere sahip bakteri türlerinin kontrol altına alınabilmesini ve bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların üstesinden gelinebilmesi için sahip olunan tüm tehditlerin ayrıntılı bir şekilde yapılacak olan başka çalışmalarda ele alınmasını öneririz.

KAYNAKLAR

Aklilu, E., Zunita, Z., Hassan L., Cheng, C.H. 2013. Molecular epidemiology of methicillin- resistant Staphylococcus aureus (MRSA) among veterinary students and personnel at a veterinary hospital in Malaysia.Veterinary Microbiology. 164(3–4): 352-358.

Al-Dahmoshi, H. O. M. 2013. Genotypic and phenotypic investigation of alginate biofilm formation among Pseudomonas aeruginosa isolated from burn victims in Babylon, Iraq. Science Journal of Microbiology, 2013.

Al-Asady, F. M., Al-Saray, D. A., & Obed, A. W. 2020. Incidence of septicemia. Etiology and antimicrobial susceptibility testing among patients admitted to tertiary care hospital. The Journal of Infection in Developing Countries, 14(12), 1387-1394.

Alekshun, M.N., Levy, S. B. 2007. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. Cell, 128(6): 1037-1050.

Al-Taee, E. H., Al-Naimi, R. A., Znad, K. H., & Al-Tamimi, A. A. 2017. Study the Histopathological Changes and Bacteriological Causes of Natural Infection of the Livers in Sheep at Diyala Province. Diyala Journal For Pure Science, 13(4-part 1).

AL-Tikrity, T. A. H., Al-Douri, M. T. A., Hilal, N. N., & Abdul-Aziz, M. M. 2015. Diagnostic Values of Some Immunological Markers in Patients With Urinary Tract Infection.

AL-Tikrity, T. A. H., Al-Douri, M. T. A., Abdul-Aziz, M. M., & Al-Jebouri, U. M. A. 2019. Diagnostic Values of Complete Blood Count in Patients with Urinary Tract Infection. Indian Journal of Public Health Research & Development, 10(10).

Anonymous, 2000. Central Public Health Laboratory, Department of Health and Community Services, Annual Performance Report, UK.

Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Smith, J.A. Seidman, J.D. and Struhi, K. 1987. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons, Inc. New York.

Babapour, E., Haddadi, A., Mirnejad, R., Angaji, S-A. and Amirmozafari, N. 2016. Biofilm formation in clinical isolates of nosocomial *Acinetobacter baumannii* and its relationship with multidrug resistance. Asian Pac. J. Trop. Biomed., 6(6): 528–533.

Barth, J. T., Alves, W. M., Ryan, T. V., Macciocchi, S. N., Rimel, R. W., Jane, J. A., & Nelson, W. E. 1989. Mild head injury in sports: Neuropsychological sequelae and recovery of function. Mild head injury, 257-275.

Basset, P., Feil, E.J., Zanetti, G., Blanc, D. S., 2011. 25 - The Evolution and Dynamics of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. In M. Tibayrenc (Ed.), Genetics and Evolutionof Infectious Disease; (pp. 669-688). London: Elsevier.

Bitrus, A.A., Zakaria, Z., Bejo, S. K., Othman, S. 2016. Persistence of Antibacterial Resistanceand Virulence Gene Profile of Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA) Isolated from Humans and Animals. Pakistan Veterinary Journal. 36(1).

Bitrus, A.A, Zunita, Z., Bejo, S.K., Othman, S., Nadzir, N. A. 2017. In vitro transfer of methicillinresistance determinants mec A from methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA)to methicillin susceptible Staphylococcus aureus (MSSA). BMC microbiology. 17(1):83.

Bitrus, A.A., Zunita, Z., Goni, M. D. and Mshelia, I. T. 2018. Dissemination of resistance and virulence determinants in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* during colonization and disease. A Review. Advances in Animal and Veterinary Sciences. 6(1): 44-54.

Bloemendaal, A.L.A., Brouwer, E.C., Fluit, A. C. 2010. Methicillin resistance transfer from Staphylocccus epidermidis to methicillin-susceptible Staphylococcus aureus in a patient during antibiotic therapy. PLoS One, 5(7): e11841.

Bbosa, G. S., Mwebaza, N., Odda, J., Kyegombe, D. B., & Ntale, M. (2014). Antibiotics/antibacterial drug use, their marketing and promotion during the post-antibiotic golden age and their role in emergence of bacterial resistance. *Health*, *2014*.

Bremer, P. J., Fletcher, G. C., Osborne, C. 2004. Staphylococcus aureus. New Zealand Institute for crop and Food Research limited.

Bronowskil, C.; James, C. E. and Winstanley, C. 2014. Role of environmental survival in transmission of Campylobacter jejuni. FEMS Microbiol. Lett., 356(1):8-19.

Bugg, T. D. H. and Brandish, P. E. 1994. From peptidoglycan to glycoproteins: common featuresof lipid-linked oligosaccharide biosynthesis. FEMS Microbiology Letters, 119(3): 255-262.

Bugg, T. D. H., Wright, G. D., Dutka-Malen, S., Arthur, M., Courvalin, P., Walsh, C. T. 1991.Molecular basis for vancomycin resistance inEnterococcus faecium BM4147: biosynthesis of a depsipeptide peptidoglycan precursor by vancomycin resistance proteins VanH and VanA.Biochemistry, 30(43): 10408-10415.

Charlebois, E. D., Perdreau-Remington, F., Kreiswirth, B., Bangsberg, D. R., Ciccarone, D., Diep, B. A., Ng, V. L., Chansky, K., Edlin, B., Chambers, H. F. 2004. Origins of communitystrains of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Clinical Infectious Diseases, 39(1):47-54.

Chuang, Y-Y., Huang, Y-C. 2013. Molecular epidemiology of community-associated meticillin-resistant Staphylococcus aureus in Asia. The Lancet Infectious Diseases, 13(8):698-708.

Cong, Y., Yang, S., & Rao, X. (2020). Vancomycin resistant Staphylococcus aureus infections: A review of case updating and clinical features. Journal of Advanced Research, 21, 169-176.

Collee, J. G., Fraser, A. G.; Marmion, B. P. and Simmons, A. 1996.Practical medical microbiology. 14th ed. Longman. Singapore Publishers (pet) ltd. Singapore: 363-373.

Courvalin, P. 2006. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. Clinical infectious diseases, 42(Supplement 1), S25-S34.

Cox, G., Wright G. D. 2013. Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. International Journal of Medical Microbiology, 303(6–7):287-292.

Cramton, S. E., Gerke, C., Schnell, N. F., Nichols, W. W., & Götz, F. 1999. The intercellular adhesion (ica) locus is present in Staphylococcus aureus and is required for biofilm formation. Infection and immunity, 67(10), 5427-5433.

Cruickshank, R.; Duguid, J. P.; Marmion, B. P. and Swain, R. H. A. 1975. Medical Microbiology. 12th ed Churchill. Livingstone (publ.), London.

Den Heijer, C. D. J., van Bijnen, E. M. E., Paget, W. J., Pringle, M., Goossens, H., Bruggeman, C. A., Stobberingh, E. E. 2013. Prevalence and resistance of commensal Staphylococcus aureus, including meticillin-resistant S aureus, in nine European countries: a cross-sectionalstudy. The Lancet Infectious Diseases.13(5); 409-415.

Deurenberg, R. H., Vink, C., Kalenic, S., Friedrich A. W., Bruggeman, C. A., Stobberingh, E. E. 2007. The molecular evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Clinical Microbiology and Infection, 13(3): 222-235.

Doškař, J., Pantůček, R., Růžičkova, V., Sedlaček, I. 2010. Molecular Diagnostics of *Staphylococcus aureus* Detection of Bacteria, Viruses, Parasites and Fungi, Springer, 139-184.

Eickhoff, T. C. (1972). Hospital epidemiology in the work of Maxwell Finland. The Journal of Infectious Diseases, S84-S88.

Forbes, B. A.; Sahm, D. F. and Weissfeld, A. S. 2007. Bailey and Scott, S. Diagnostic Microbiology. 12th ed. Mosby. Inc. U.S.A.

Forbes, B. A. and Schaberg, D. R. 1983. Transfer of resistance plasmids from Staphylococcus epidermidis to Staphylococcus aureus: evidence for conjugative exchange of resistance. Journal of Bacteriology,153(2):627-634.

Foster, T. J. & McDevitt, D. 1994. Surface-associated proteins of Staphylococcus aureus: their possible roles in virulence. FEMS microbiology letters, 118(3), 199-205.

Foster, T. J. 2017. Antibiotic resistance in Staphylococcus aureus. Current status and future prospects. Fems Microbiology Reviews. 41(3):430-49.

Freeman, D.; Falkiner, F.; and Keane, C. 1989. New method for detecting slime production by coagulase-negative staphylococci. J. Clin. Pathol. 42: 872–874.

Freeman-Cook, L., Freeman-Cook, K. D., Alcamo, I. E. and Heymann, D. L. 2006. *Staphylococcus aureus* infections: Infobase Publishing.

Gorak, E. J., Yamada, S. M., Brown, J. D. 1999. Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus in hospitalized adults and children without known risk factors. Clinical Infectious Diseases, 29(4): 797-800.

Gristina, A. G. 1987. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. Science, 237(4822), 1588-1595.

Giridhar, G., Kreger, A. S., Myrvik, Q. N., & Gristina, A. G. (1994). Inhibition of Staphylococcus adherence to biomaterials by extracellular slime of S. epidermidis RP12. Journal of biomedical materials research, 28(11), 1289-1294.

Grundmann, H., Aires-de-Sousa, M., Boyce, J. and Tiemersma, E. 2006. Emergence and resurgence of meticillin-resistant Staphylococcus aureus as a public-health threat. The Lancet,368(9538): 874-885.

Gustilo, R. B., Merkow, R. L., & Templeman, D. A. V. I. D. (1990). The management of open fractures. JBJS, 72(2), 299-304.

Haaber, J., Penades, J. R. and Ingmer, H. 2017. Transfer of antibiotic resistance in Staphylococcus aureus. Trends in Microbiology. 893- 905.

Hashim, I. 2013. Microbiology culture media in pharmaceutical industry.

Helal, Z. H., & Khan, M. I. 2015. QacE and QacEΔ1 Genes and Their Correlation to Antibiotics and Biocides Resistance Pseudomonas aeruginosa. American Journal of Biomedical Sciences, 7(2).

Herrmann, M., Lai, Q. J., Albrecht, R. M., Mosher, D. F., & Proctor, R. A. 1993. Adhesion of Staphylococcus aureus to surface-bound platelets: role of fibrinogen/fibrin and platelet integrins. Journal of Infectious Diseases, 167(2), 312-322.

Hiramatsu, K. 1995. Vancomycin resistance in staphylococci. Drug Resistance Updates, 1(2): 135-150.

Hiramatsu, K., Hanaki, H., Ino, T., Yabuta, K., Oguri, T., & Tenover, F. C. 1997. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. The Journal of antimicrobial chemotherapy, 40(1), 135-136.

Holden, M. T. G., Feil, E. J., Lindsay, J. A., Peacock, S. J., Day, N. P. J., Enright, M. C., Atkin, R. 2004. Complete genomes of two clinical Staphylococcus aureus strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101(26): 9786-9791.

Hong, J. S., Yoon, E-J., Lee H., Jeong, S. H., Lee, K. 2016. Clonal Dissemination of Pseudomonas aeruginosa sequence type 235 isolates carrying bla IMP-6 and emergence of bla GES-24 and blaIMP-10 on novel genomic islands PAGI-15 and -16 in South Korea. Antimicrob. Agents Chemother., 60: 7216–7223.

Hotterbeekx, A., Kumar-Singh, S., Goossens, H. and Malhotra-Kumar, S. 2017. *In vivo* and *In vitro* Interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus* spp. J. Front. Cell. Infect. Microbiol.,7: 106.

Hou, W., Sun, X., Wang, Z., and Zhang, Y. 2012. Biofilm-forming capacity of Staphylococcus epidermis's, Staphylococcus aureus, and Pseudomonas aeruginosa from ocular infections. Investigative Ophthalmol. Visual Sci., 53(9): 5624–5631.

Howard BJ, Kloos WE 1987. Staphylococci. In: Howard BJ, Klass J II, Rubin SJ, Weissfeld AS, Tilton RC, eds. Clinical and Pathogenic Microbiology. Mosby, Washington D.C. pp 231-244

Hoyle, B. D., & Costerton, J. W. 1991. Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. Progress in Drug Research/Fortschritte der Arzneimittelforschung/Progrès des recherches pharmaceutiques, 91-105.

Ito, T., Kuwahara, K. and Hiramatsu, K. 2007. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) analysis of MRSA Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Protocols. Springer, 87-102.

Jansen, W. T. M., Beitsma, M. M., Koeman, C. J., Van Wamel, W. J. B., Verhoef, J., Fluit, A. C. 2006. Novel mobile variants of staphylococcal cassette chromosome mec in Staphylococcus aureus. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 50(6): 2072- 2078.

Jenner, L., Starosta, A. L., Terry, D. S., Mikolajka, A., Filonava, L., Yusupov, M., Blanchard, S. C., Wilson, D. N. and Yusupova, G. 2013. Structural basis for potent inhibitory activity of the antibiotic tigecycline during protein synthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences. 110(10):3812-6.

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

Karthi, R., Selvachandra, M., & JamunaDevi, P. 2012. Perspective of insurance agents' about LIC of India-A study at Nagapattinam District. In IEEE-International Conference On Advances In Engineering, Science And Management (ICAESM-2012) (pp. 63-69). IEEE.

Kayser, F. H.; Bienz, K. A.; Eckert, J. and Zinkernagel, R. M. 2005. Medical microbiology. Georg thieme Verlag, Stuttgart, New York, USA.

Harley, J. and Prescoot H. (2002). Laboratory exercise in microbiology. Fifth edition. The McGraw−Hill Companies.

Khan, M. A. and Faiz, A. 2016. Antimicrobial resistance patterns of Pseudomonas aeruginosa in tertiary care hospitals of Makah and Jeddah. Ann. Saudi Med., 36(1): 23-28.

Kumari, H. V., Nagarathna, S., Chandramouli, B. A., Rao, G. U., & Chandramuki, A. 2008. Investigation of an outbreak of device-related postoperative ventriculitis: a lesson learnt. Indian Journal of Pathology and Microbiology, 51(2), 301.

Lamy, B., Laurent, F., Gallon, O., Doucet-Populaire, F., Etienne, J., Decousser, J-W. 2012. Antibacterial resistance, genes encoding toxins and genetic background among Staphylococcus aureus isolated from community-acquired skin and soft tissue infections in France: a national prospective survey. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 31(6): 1279-1284.

LaSarre, B. and Federle, M.J. 2013. Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 77:73-111

Le Loir, Y., Baron, F. and Gautier, M. 2003. Staphylococcus aureus and food poisoning. Genetics and Molecular Research, 2(1): 63-76.

Levinson, W. 2016. Review of medical microbiology and immunology. 14th ed. McGraw-Hill Education, USA.

Lima, J. L.; Alves, L. R.; Paz, J. N.; Rabelo, M. A. and Maciel, M. A. 2017.Analysis of biofilm production by clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa from patients with ventilator-associated pneumonia. Rev. Bras Ter Intensiva, 29(3): 1–7.

Lindqvist, M. 2014. Epidemiological and molecular biological studies of multi-resistant methicillin-susceptible Staphylococcus aureus. Linkoping University Medical Dissertations, ISSN 0345-0082; 1386.

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

Lowy, F. D. 2003. Antimicrobial resistance: the example of Staphylococcus aureus. The Journal of Clinical Investigation. 111(9):1265-73.

Luzzago, C., Locatelli, C., Franco, A., Scaccabarozzi, L., Gualdi, V., Vigano, R., Sironi, G., Besozzi, M., Castiglioni, B., Lanfranchi, P. and Cremonesi, P. 2014. Clonal diversity, virulence-associated genes and antimicrobial resistance profile of Staphylococcus aureus isolates from nasal cavities and soft tissue infections in wild ruminants in Italian Alps. Veterinary Microbiology, 170(1):157-61.

MacFaddin, F. J. 2000. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. 3rd ed. The Williams and Wilkins Baltimore. U.S.A

Mathur, T., Singhal, S., Khan, S., Upadhyay, D. J., Fatma, T., & Rattan, A. 2006. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods. Indian journal of medical microbiology, 24(1), 25-29.

McAleese, F., Wu, S. W., Sieradzki, K., Dunman, P., Murphy, E., Projan, S. and Tomasz, A. 2006. Overexpression of genes of the cell wall stimulon in clinical isolates of Staphylococcus aureus exhibiting vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus type resistance to vancomycin. Journal of Bacteriology, 188(3): 1120-1133.

McCarthy, A. J., & Lindsay, J. A. 2012. The distribution of plasmids that carry virulence and resistance genes in Staphylococcus aureus is lineage associated. BMC microbiology, 12(1), 1-8.

Melcher, G. A., Claudi, B., Schlegel, U., Perren, S. M., Printzen, G., & Munzinger, J. 1994. Influence of type of medullary nail on the development of local infection. An experimental study of solid and slotted nails in rabbits. The Journal of Bone and Joint Surgery. British volume, 76(6), 955-959.

McCarthy, A.J. and Lindsay, J. A. 2012. The distribution of plasmids that carry virulence and resistance genes in Staphylococcus aureus is linMerritt, K., Gaind, A., & Anderson, J. M. (1998). Detection of bacterial adherence on biomedical polymers. Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and the Australian Society for Biomaterials, 39(3), 415-422.

Mohanty, S., Behera, B., Sahu, S., & Praharaj, A. K. 2019. Recent pattern of antibiotic resistance in Staphylococcus aureus clinical isolates in Eastern India and the emergence of reduced susceptibility to vancomycin. Journal of Laboratory Physicians, 11(04), 340-345.

Morton, T. M., Johnston, J. L., Patterson, J. and Archer, G. L. 1995. Characterization of a conjugative staphylococcal mupirocin resistance plasmid. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 39(6), 1272-1280.

Mukhtar, T. A., Koteva, K. P, Hughes, D. W. and Wright, G. D. 2001. Vgb from Staphylococcus aureus inactivates streptogramin B antibiotics by an elimination mechanism not hydrolysis. Biochemistry. 40(30):8877-86.

Murray P. R., Baron, E. J.; Sen, J. H. and Landry, P. M. 2007. Manual of Clinical Microbiology. 9th ed (9th ed). American Society for Microbiology.

Musser, J. M. and Kapur, V. 1992. Clonal analysis of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains from intercontinental sources: association of the mec gene with divergent phylogenetic lineages implies dissemination by horizontal transfer and recombination. Journal of Clinical Microbiology, 30(8): 2058-2063.

Nguyen, F., Starosta, A. L., Arenz, S., Sohmen, D., Donhofer, A. and Wilson, D. N. 2014. Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. Biological chemistry. 395(5):559-75.

Noto, M. J., Fox, P. M. and Archer, G. L. 2008. Spontaneous deletion of the methicillin resistance determinant, mecA, partially compensates for the fitness cost associated with high-level vancomycin resistance in Staphylococcus aureus. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 52: 1221-1229.

Noto, M. J., Kreiswirth, B. N., Monk, A. B. and Archer, G. L. 2008. Gene acquisition at the insertion site for SCCmec, the genomic island conferring methicillin resistance in Staphylococcusaureus. Journal of Bacteriology, 190(4): 1276-1283.

Nowrouzian, F. L., Karami, N., Welinder-Olsson, C., Ahren, C. 2013. Virulence gene typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus as a complement in epidemiological typing. Journal of Microbiological Methods, 93(3): 173-176.

Page, M. G. P. 2012. Beta-lactam antibiotics Antibiotic Discovery and Development. Springer, 79-117.

Pantosti, A., Sanchini, A. and Monaco, M. 2007. Mechanisms of antibiotic resistance in Staphylococcus aureus. Future Microbiology, 2 (3): 323- 334.

Patti, J. M., Bremell, T., Krajewska-Pietrasik, D., Abdelnour, A., Tarkowski, A., Rydén, C., & Höök, M. 1994. The Staphylococcus aureus collagen adhesin is a virulence determinant in experimental septic arthritis. Infection and immunity, 62(1), 152-161.

Petty, W. I. L. L. I. A. M., Spanier, S. U. Z. A. N. N. E., Shuster, J. J., & Silverthorne, C. A. R. O. L. (1985). The influence of skeletal implants on incidence of infection.

Experiments in a canine model. The Journal of bone and joint surgery. American volume, 67(8), 1236-1244.

Planet, P. J., Narechania, A., Chen, L., Mathema, B., Boundy, S., Archer, G., Kreiswirth, B. 2017. Architecture of a species: phylogenomics of Staphylococcus aureus. Trends in microbiology. 25(2):153-66.

Plata, K., Rosato, A. E. and Wegrzyn, G. 2009. Staphylococcus aureus as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. Acta Biochimica Polonica, 56(4): 597.

Procop, G., Church, D., Hall, G.; Janda, W., Koneman, E.; Schreckenberger, P. and Woods, G. 2016. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 7th ed. Lippincott Williams and Willkins. Philadelphia. Baltimore. New York. London

Projan, S., and R. Novick. 1997. The molecular basis of pathogenicity, p. 55-81. In G. Archer and K. Crossley (ed.), Staphylococci in human diseases. Churchill Livingstone, New York, N.Y.

Purrello, S. M., Daum, R. S., Edwards, G. F. S., Lina, G., Lindsay, J., Peters, G., Stefani, S. 2012. Meticillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) update: New insights into bacterial adaptation and therapeutic targets. Journal of Global Antimicrobial Resistance, 2(2): 61-69.

Reynolds, P. E., Depardieu, F., Dutka-Malen, S., Arthur, M. and Courvalin, P. 1994. Glycopeptide resistance mediated by enterococcal transposon Tn 1546 requires production of VanX for hydrolysis of D-alanyl-D-alanine. Molecular Microbiology, 13 (6): 1065-1070.

Ruoslahti, Erkki 1991. Integrins as receptors for extracellular matrix. In: Cell biology of extracellular matrix. Springer, Boston, MA, p. 343-363.

Saleha, A., Zunita, Z. 2010. Methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA): An emerging veterinary and zoonotic pathogen of public health concern and some studies in Malaysia. Journal Animal Veterinary Advances, 9(7): 1094-1098.

Schwarz, S., Shen, J., Kadlec, K., Wang, Y., Michael, G.B., Fesler, A.T. and Vester, B. 2016. Lincosamides, streptogramins, phenicols, and pleuromutilins: mode of action and mechanisms of resistance. Cold Spring Harbor perspectives in medicine. a027037.

Sekar, M., Jaffar, F. N. A., Zahari, N. H., Mokhtar, N., Zulkifli, N. A., Kamaruzaman, R. A., & Abdullah, S. (2014). Comparative evaluation of antimicrobial properties of red and yellow rambutan fruit peel extracts. Annual Research & Review in Biology, 3869-3874.

Selim, S., Elkholy, I., Hagagy, N., ElAlfay, S. and Abedl Aziz, M. 2015.Rapid identification of *Pseudomonas aeruginosa* by pulsed – field gel electrophoresis. Biotechnol. Biotechnol. Equipment, 1(29): 152-156.

Senior, B. W., Albrechtsen, M. and Kerr, M. 1988. A survey of IgA protease production among clinical isolates of the proteases. J. Med. Microbiol, 25: 27-31.

Sharma, S., & Dhar, R. 2017. Nontuberculous mycobacterial diseases: current diagnosis and treatment. Astrocyte, 4(1), 67.

Shaw, L., Golonka, E., Potempa, J. and Foster, S.J. 2004. The role and regulation of the extracellular proteases of Staphylococcus aureus. Microbiology, 150(1): 217-228.

Shulman, J A, Nahmias, A J 1972. Staphylococcal infections; clinical aspects. In: The Staphylococci. Edited by Cohen, J O , pp 457–481, Wiley-Interscience, New York.

Sievert, D. M., Rudrik, J. T., Patel, J. B., McDonald, L. C., Wilkins, M. J., & Hageman, J. C. (2008). Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus in the United States, 2002–2006. Clinical infectious diseases, 46(5), 668-674..

Srinivasan, A., Dick, J. D., Perl, T. M. 2002. Vancomycin resistance in staphylococci. Clinical Microbiology Reviews, 15(3): 430-438.

Stickler, D. J., & McLean, R. J. (1995). Biomaterials associated infections: the scale of the problem. Cells and Materials, 5(2), 6.

Stojanov, M., Sakwinska, O. and Moreillon, P. 2013. Expression of SCCmec cassette chromosome recombinases in methicillin-resistant Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 68(4): 749-757.

Stringfellow, K., Anderson, P., Caldwell, D., Lee, J., Byrd, J., McReynolds, J., Farnell, M. 2009. Evaluation of disinfectants commonly used by the commercial poultry industry under simulated field conditions. Poultry science, 88(6), 1151-1155

SudhaKar, T.; Karpngam, S. and Premkumer, J. 2015. Biosynthesis antibacterial activity of pyocyanin pigment ced produced by *pseudomonas aeruginosa* SU1. JCPRG5. 7(3):921-924.

Tadesse, A. and Alem, M. 2006. Medical bacteriology. University of Gondar: 61-63.

Tashiro, Y.; Yawata, Y.; Toyofuku, M.; Uchiyama, H.; and Nomura, N. 2013. Interspecies interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and other microorganisms. J. Microbes Environ., 28: 13–24.

Tille, P. 2014.Bailey and S cotts Diagnostic Microbiology –E- Book: Elsevier Health Sciences.

Tille, P. 2015.Bailey and Scotts Diagnostic Microbiology–E- Book: Elsevier Health Sciences.

Toh, S, M., Xiong, L., Arias, C.A., Villegas, M.V., Lolans, K., Quinn, J. and Mankin, A.S 2007. Acquisition of a natural resistance gene renders a clinical strain of methicillin-resistant Staphylococcus aureus resistant to the synthetic antibiotic linezolid. Molecular Microbiology, 64(6): 1506-1514.

Turnidge, J., Chang, F. Y., Fowler, V. G. and Rao, N. 2008. Staphylococcus aureus. Updated December. Guided Medline Search.

Vandepitte, J., Verhaegen, J., Engbaek, K., Rohner, P., Piot, P.and Heuck, C. C. 2003. Basic laboratory procedures in clinical Bacteriology. 2nd.World Health Organization Geneva: 109-120

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

Walsh, C. T., Wencewicz, T. A. 2016. Antibiotics: Challenges, Mechanisms, Opportunities. Washington, DC: ASM Press, pp 477.

Weigel, L. M., Clewell, D. B., Gill, S. R, Clark, N. C., McDougal, L. K., Flannagan, S. E., Kolonay, J. F., Shetty, J., Killgore, G. E. and Tenover, F. C. 2003. Genetic analysis of a high-level vancomycin- resistant isolate of Staphylococcus aureus. Science, 302(5650): 1569-71.

Wiles, T. J.; Kulesus, R. R. and Mulvey, M. A. 2008. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic Escherichia coli. Exper. Molec. Pathol.,85:(1)11-19

Wilkinson, B. J. Biology. In: Crossley, KB and Archer, GL. (eds). 1997. The Staphylococci in Human Disease. (pp 1-38). Churchill Livingstone, London.

Wilson, D. N. 2009. The A-Z of bacterial translation inhibitors. Critical Reviews in Biochemical Molecules.; 44: 393–433.

Wilson, D. N. 2014. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. Nature Reviews in Microbiology,12:35–48.

Woodford, N. 2005. Biological counterstrike: antibiotic resistance mechanisms of Gram-positive cocci. Clinical Microbiology and Infection, 11(3): 2-21.

Zeng, D., Debabov, D., Hartsell, T. L., Cano, R. J., Adams, S., Schuyler, J. A., McMillan, R., Pace, J. L. 2016. Approved glycopeptide antibacterial drugs: mechanism of action and resistance. Cold Spring Harbor perspectives in medicine. a026989.

Zunita, Z., Bashir, A., Hafizal, A. 2008. Occurrence of Multidrug Resistant Staphylococcus aureus in horses in Malaysia. Veterinary World, 1(6): 165-167. View publication

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Hasanain Ahmed Enad OBAID

Eğitim

Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2020-2022
Lisans	Bağdat Üniversitesi Saf Bilim Ibn Al-Haitham Eğitim Koleji, Biyoloji Bölümü	2014-2018