ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

METİSİLİN DİRENÇLİ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* İZOLATLARINDA *FEMA* VE *VANA* GEN VARLIĞININ VE BAZI BENZOİL TİYOÜRE BİLEŞİKLERİNİN İN-VİTRO ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

Maysam Husam Jaber AL ALOOSI

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2023

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Maysam Husam Jaber AL ALOOSI tarafından hazırlanan **"Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus* İzolatlarında *FemA* ve *VanA* Gen Varlığının ve Bazı Benzoil Tiyoüre Bileşiklerinin İn-Vitro Antibakteriyel Aktivitesinin Araştırılması"** adlı tez çalışması 09/02/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman **:** Doç. Dr. Şinasi AŞKAR

Jüri Üyeleri **:**

Başkan **:** Doç. Dr. Şinasi AŞKAR
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye **:** Prof. Dr. Nilgün Ünal
Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Üye **:** Doç. Dr. Mehmet SEZGİN
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. İbrahim ÇİFTÇİ

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum **"Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus* İzolatlarında *FemA* ve *VanA* Gen Varlığının ve Bazı Benzoil Tiyoüre Bileşiklerinin İn-Vitro Antibakteriyel Aktivitesinin Araştırılması"** 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 (09/02/2023).

Maysam Husam Jaber AL ALOOSI

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

METİSİLİN DİRENÇLİ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* İZOLATLARINDA *FEMA* VE *VANA* GEN VARLIĞININ VE BAZI BENZOİL TİYOÜRE BİLEŞİKLERİNİN İN-VİTRO ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

Maysam Husam Jaber ALALOOSI

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Şinasi AŞKAR

Antibiyotiğe dirençli bakterilerin neden olduğu hastalıkların tedavisindeki zorluklar ve halk sağlığı üzerindeki olumsuz etkisi her geçen gün daha artmaktadır. *Staphylococcus aureus*, sepsis, zatürre, gıda zehirlenmesi, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları gibi insanlarda çok çeşitli enfeksiyonlardan sorumlu fırsatçı bir patojendir. Günümüzde metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) çoklu ilaca dirençli bir patojen olarak görülmektedir. Bu tezde farklı klinik örneklerden izole edilen 26 MRSA izolatında *femA* ve *vanA* gen varlığının araştırılması ve 3 farklı benzoil tiyoüre bileşiğinin N-((2-chloropyridin-3-yl) carbamothioyl)-2-chlorobenzamide (EHL-18), N-((6-methylpyridin-2-yl)carbamotioyl) thiophene-2-carboxamide (EHL-32) ve N-(dihexylcarbamothioyl) benzamide (EHL-77) antibakteriyel etkinliğinin ilk kez belirlenmesi amaçlanmıştır. Gen varlığının araştırılmasında qPZR, kimyasalların antibakteriyel etkinliğinin belirlenmesinde disk difüzyon ve broth mikrodilüsyon yöntemleri kullanılmıştır. MRSA izolatlarının tamamında *femA* geni ve 3 izolatta *vanA* geni qPZR ile saptanmıştır. Yapılan mikrodilüsyon test sonuçlarına göre tüm bileşiklerin farklı konsantrasyonlarda minimum inhibitör ve bakterisidal konsantrasyon değerlerine sahip olduğu belirlenmiştir. Bileşikler içinde MRSA izolatlarına karşı en yüksek zon çapı, en düşük minimum inhibitör ve bakterisidal konsantrasyon değeri EHL-77 bileşiğinden elde edilmiştir. Yapılan bu tez ile MRSA izolatlarının %100 oranında *femA* geni, %11,53 oranında *vanA* geni taşıdığı ve EHL77 benzoil tiyoüre bileşiğinin MRSA izolatlarına karşı antibakteriyel ajan olma potansiyelinin olduğu sonucuna varılmıştır.

2023, 50 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: Antibiyotik, Antimikrobiyal direnç, Benzoil tiyoüre, Disk difüzyon, Mikrobroth dilüsyon, QPZR.

ABSTRACT

Master of Science Thesis

INVESTIGATION OF *FEMA* AND *VANA* GENE IN-VITRO ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SOME BENZOYL THIOUREA DERIVATIVES IN METHICILLIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLATES

Maysam Husam Jabber AL ALOOSI

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

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Şinasi AŞKAR

The difficulties in treating diseases caused by antibiotic-resistant bacteria and their negative impact on public health are increasing daily. *Staphylococcus aureus* is an opportunistic pathogen responsible for various human infections, including sepsis, pneumonia, food poisoning, skin infections, and soft tissue infections. With the use of antibiotics, it has become resistant to many antibiotics over time. Today, methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) is seen as a multidrug-resistant pathogen. The Aim of this thesis, the presence of the *femA* gene and the *vanA* gene in 26 MRSA isolates was determined by qPCR and to first time determine the antibacterial activity of 3 different benzoyl thiourea compounds: N-(2-chloropyridin-3-yl)carbamothioyl)-2-chlorobenzamide (EHL-18), N-(6-methylpyridin2-yl) carbamothioyl)thiophene (2-carboxamide (EHL-32), and N-(dihexylcarbamothioyl) benzamide (EHL-77) against some MRSA isolate. Disc diffusion test was used for antibacterial activity, broth microdilution method was used for MIC and MBC. The *femA* gene in all MRSA isolates and the *vanA* gene in three isolates were detected by qPCR. According to the results of the broth microdilution test, it was determined that all compounds had minimum inhibitory and bactericidal concentrations at different concentrations. The largest zone diameter, lowest minimum inhibitory concentration, and lowest bactericidal concentration value against MRSA isolates among the compounds were obtained from the EHL-77 combination. This thesis concluded that 100% and 11.53% of MRSA isolates carry the *femA* and *vanA* genes, respectively, and that the EHL77 benzoyl thiourea compound has the potential to be an antibacterial agent.

2023, 50 pages

Keywords: Antibiotic**,** Antimicrobial resistance, Benzoyl thiourea, Broth microdilution, Disk diffusion, qPCR.

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın planlanmasında, yürütülmesinde ve sonuçlandırılmasında hoşgörüsünü, ilgisini hem maddi hem manevi desteğini esirgemeyen, her zaman engin bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, saygı değer hocam sayın Doç. Dr. Şinasi AŞKAR'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Her daim yanımda hissettiğim, öğrenim hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen hiçbir fedakârlıktan kaçınmayarak beni bu günlere getiren, arkamda duran çok değerli aileme babam ve anneme sonsuz teşekkür ederim. Ayrıca Çorum'daki diğer aileme de destekleri için teşekkür ederim.

Maysam Husam Jaber ALALOOSI
Çankırı, Şubat 2023

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. LİTERATÜR ÖZET **4**
2.1 Tarihçe **5**
2.2 *S. aureus*'un Sınıflandırılması **6**
2.3 *S. aureus*'un Mikroskobik ve Biyokimyasal Özellikleri **6**
2.2 *S. aureus* Epidemiyolojisi **7**
2.3 *S.aureus'un* Genetik Özellikleri **9**
2.4 *S. aureus*'un Virülans Faktörleri **10**
2.5 MRSA Çeşitleri **13**
2.6 *S. aureus*'un Neden Olduğu Hastalıklar **13**
2.7 *S.aureus* Antibiyotik Direnci **15**
2.8 Stapylococcal *femA* Geni **19**
2.9 Staphylococal *vanA* Geni **19**
2.10 Benzoil Tiyoüre Bileşikleri **20**
3. MATERYAL VE METOT **21**
3.1 Bakteri Örnekleri **21**
3.2 Laboratuvar Ekipmanları **21**
3.3 MRSA İzolatlarında *femA ve vanA* Gen Varlığının Tespiti **23**
3.3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler **23**
3.3.2 Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar **24**
3.3.3 Primerler **24**
3.3.4 DNA İzolasyonu **25**

3.3.5 DNA Saflığının Belirlenmesi 26
3.3.6 Primerlerin Hazırlanması 26
3.3.7 PZR Reaksiyon Karışımı 26
3.3.8 PZR Programı 27
3.4 Benzoil Tiyoüre Bileşiklerinin Antibakteriyel Etkinliğinin Belirlenmesi 27
3.4.1 Kullanılan Besiyerleri 28
3.4.2 Kullanılan Kimyasallar 28
3.4.3 Disk Difüzyon Testi 29
3.4.4 Broth Mikrodilüsyon Testi 30
3.5 İstatistik Analiz 30
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 31
4.1 MRSA İzolatlarında *femA* ve *vanA* Gen Varlığının QPZR Analiz Bulguları .. 31
4.2 MRSA İzolatlarında *vanA* Gen Varlığının QPZR Analiz Bulguları 32
4.3 Benzoil Tiyoüre Bileşiklerinin Antibakteriyel Etkinlik Bulguları 33
4.4 Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Test Bulguları 34
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 37
KAYNAKLAR 39
ÖZGEÇMİŞ 50

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
°	Derece
µg	Mikrogram
bp	Baz çifti
gr	Gram
kb	Kilobaz
mm	Milimetre
mol	Mole
ºC	Santigrat derece

KISALTMALAR DİZİNİ

CA-MRSA	Toplumla ilişkili metisiline dirençli *S. aureus*
CDC	Hastalık kontrol ve önleme merkezleri
CFU	Koloni oluşturma ünitesi
CLSI	Klinik ve laboratuvar standartları enstitüsü
DNA	Deoksiribo nükleik asit
fem	Metisilin direncinin ekspresyonu için esansiyel faktör
HA-MRSA	Hastane ilişkili metisiline dirençli *S. aureus*
IgG	İmmünoglobulin G
Koa	Koagülaz enzimi
KoNS	Koagülaz-negatif stafilokoklar
*mec*A	Metisiline dirençli gen
MRSA	Metisiline dirençli *S. aureus*
MSSA	Metisiline duyarlı *S. aureus*
UV	Ultraviyole
PZR	Polimeraz zincirleme reaksiyonu
pH	Hidrojen potansiyeli
PVL	Panton-Valentine lökosidini
RNA	Ribonükleik asit
TSS	Toksik şok sendromu
TSST	Toksik şok sendromu toksin
DMSO	Dimetil sülfoksit
MIC	Minimum inhibitör konsantrasyonu
ORSA	Oksasilin Direnci *Staphylococcus aureus*
PBP2a	Penisilin bağlayıcı protein
VP	Voges Proskauer test

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Gram boyamada üzüm salkımı şeklinde görülen *S. aureus* hücreleri (A), Kanlı agar plağında *S. aureus*'un β-hemolitik özelliği ve sarı koloniler (B) (Cueto *et al*. 2009).....7
Şekil 2.2 2010 (A) ve 2013 (B) yıllarına göre bazı ülkelerde MRSA izolatlarının yüzdesi (Neugebauer *et al.* 2012, Russo *et al.* 2016). 9
Şekil 2.3 Antibiyotiklere dirençli *S. aureus*'un izolasyon zaman çizelgesi (Clatworthy *et al.* 2007).....16
Şekil 2.4 Antibiyotik hedefleri ve direnç mekanizmaları (Wright 2010). 17
Şekil 2.5 Tn1546'nın şematik gösterimi. IRL ve IRR, sırasıyla ters sol ve sağ tekrarlar. Oklar, kodlama dizilerini temsil eder ve transkripsiyon yönünü belirtir (Périchon *et al.* 2009) 20
Şekil 3.1 DiaRex DNA ekstraksiyon kiti 23
Şekil 3.2 Gerçek zamanlı termal döngü cihazı.....24
Şekil 3.3 Quawell UV-Spektrofotometre.....24
Şekil 3.4 Benzoil tiyoüre bileşiklerinin kimyasal yapısı.....29
Şekil 4.1 MRSA izolatlarında *femA* gen taraması qPZR CT görüntüsü 32
Şekil 4.2 MRSA izolatlarında *vanA* gen taraması qPZR CT görüntüsü 32
Şekil 4.3 Benzoil tiyoüre bileşiklerinin MRSA üreme inhibisyon zon görüntüsü.....34
Şekil 4.4 Broth mikrodilüsyon testi pleyt görüntüsü 35

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Patojenik stafilokokların temel virülans faktörleri ve etkinlikleri 11
Çizegle 3.1 Laboratuvar ekipmanları 22
Çizelge 3.2 DNA ekstraksiyon kitinin içeriği 23
Çizelge 3.3 Kullanılan *femA* gen primerleri 25
Çizelge 3.4 Kullanılan *vanA* gen primerleri 25
Çizelge 3.5 Bir PZR karışımındaki bileşen, konsantrasyon ve miktar 27
Çizelge 3.6 PZR programı 27
Çizegle 3.7 Kullanılan besiyerleri 28
Çizelge 4.1 Disk difüzyon yöntemine göre bileşiklerin oluşturduğu üreme inhibisyon zon çapları (mm) 33
Çizelge 4.2 Komplekslerin broth mikrodilüsyon yöntemine göre minimum inhibitör konsantrasyon değerleri (MİK) 34
Çizelge 4.3 Komplekslerin broth mikrodilüsyon yöntemine göre minimum bakterisidal konsantrasyon değerleri (MBK) 35

1. GİRİŞ

Stafilokoklar Gram pozitif, katalaz pozitif, hareketsiz, spor oluşturmayan aerobik koklardır (ortalama çapı 0,5–1,0 nm). Stafilokoklar çiftler, tetradlar veya bazen düzensiz üzüm benzeri kümeler halinde gözlenmektedir. *Staphylococcus aureus,* insanlarda ve hayvanlarda hastalıklara neden olan en önemli stafilokok türüdür. Altın pigment oluşumu ile diğer stafilokoklardan ayrılır (Markey *et al.* 2014). Koagülaz testi, bir laboratuvarda koagülaz pozitif stafilokokları koagülaz negatif stafilokoklardan ayırt etmek için kullanılabilecek en temel yaklaşımdır. Ek olarak, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi, *S. aureus*'un varlığını belirlemek veya doğrulamak için kullanılabilir (Becker *et al*.2004).

Sağlıklı insanların %20 ile %40'ı *S. aureus* ile kolonize olmaktadır. Bu yüzde hem kalıcı olmayan hem de kalıcı taşıyıcıları içerir (Hamdan-Partida *et al.* 2010). Tüm dünyada hastane kaynaklı ve toplum kökenli salgınlar ile bağlantılı fırsatçı bir bakteridir. (Paterson *et al.* 2014). Bakteri sıyrıklar, cilt insizyonları veya intravasküler erişim cihazları ile subkutan dokulara girdiğinde, bu patojenle kolonizasyon invaziv enfeksiyon riskini artırabilir (Aung *et al.* 2017).

Staphylococcus aureus, insan derisi ve mukozasının bir komensalidir ancak aynı zamanda yüksek morbidite ve mortalite oranlarının yanı sıra tıbbi bakımla ilişkili önemli hastalıklarla ilişkili yaygın bir ciddi enfeksiyon kaynağıdır (Schmidt *et al.* 2015). *S. aureus*'un toksin ve enzim üretme yeteneği organizmanın patojenitesine katkıda bulunur ve bu da bakteriyemi, miyokardit, akut endokardit, pnömoni, menenjit ve osteomiyelit gibi ciddi hastalıklara neden olur (Gitau *et al.* 2018). Ayrıca, metisiline (MRSA) dirençli *S. aureus* suşlarının ortaya çıkmasına neden olan yeni antibiyotik direnci oluşturma ve yayma kapasitesine sahiptir. 1961'de Birleşik Krallık'taki hastane ortamlarında, MRSA'nın ilk suşu keşfedilmiştir ve günümüzde mortalitesi ve morbitidesi yüksek hastalıklar bu bakteri ile bağlantılıdır. 1961'de keşfedilmesinden bu yana, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşu hastanelerde hastane ilişkili en önemli enfeksiyonlardan biri olarak kabul edilmiştir (Oniciuc *et al.* 2016). Yeterli personel ve

imkanların olmadığı sağlık kurumlarının karşılaştığı en önemli sorunlardan biri olarak gösterilmektedir (Farzana *et al.* 2008).

Hastane enfeksiyonları, sağlık kurumlarında edinilen enfeksiyonlardır (Duce *et al.* 2002). MRSA hastane enfeksiyonlarını başlatma potansiyeline sahip olduğundan, bağışıklığı baskılanmış kişilerin en çok endişe duyması gereken patojenlerden birisidir. Tüm dünyada MRSA'nın üç alt tipi bildirilmiştir: hastane ilişkili MRSA (HA-MRSA), toplumla ilişkili MRSA (CA-MRSA) ve çiftlik hayvanları ile ilişkili MRSA (LA-MRSA) (Grema *et al.* 2015).

MRSA'yı saptamak için olağan (fenotipik) prosedürlerden biri olan disk difüzyon testi, maliyeti düşük ancak zaman alıcıdır. PZR antibiyotik direncini genotipik olarak belirleyen hızlı ancak maliyetli bir diğer yöntemdir (Mohanasoundaram *et al.* 2008).

*S. aureus'*ta antibiyotik direncinin prevalansı son birkaç yılda istikrarlı bir şekilde artıyor ve bu da tıbbi harcamalarda önemli bir artışa sebep oluyor (Manandhar *et al.* 2018). Antibiyotiklere dirençli *S. aureus* suşlarının sayısı artmaya devam ederken, araştırmacılar yeni terapötik ajanlar arıyorlar (Zhou *et al.* 2016). Diyalize edilebilir lökosit özütü (DLE) mikrobiyal patojenlere karşı koruma sağladığı bilinen küçük moleküler ağırlıklı bir özüttür. Ek olarak, aktivitesi çok çeşitli viral, bakteriyel, protozoal ve mantar hastalıklarına karşı değerlendirilmiştir (Arnaudov and Kostova 2015).

Kuşların, memelilerin ve balıkların lenfositlerinde bulunabilen transfer faktörü adı verilen bir protein vardır. Bu proteinin antijene özgü bilginin T-lenfositlere taşınmasından sorumlu olduğu bildirilmiştir (Kirkpatrick 2000).

Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (çoklu ilaca dirençli *Staphylococcus aureus* ve oksasiline dirençli *Staphylococcus aureus* veya "ORSA" olarak da bilinir) tüm dünyadaki hastanelerde ciddi bir sorunu temsil eder. Bu *S. aureus* suşu, enfekte hastalarda mortalite ve morbidite oranlarındaki artışın yanı sıra daha yüksek tedavi maliyetlerinden sorumludur (Braoios *et al.* 2009).

Vankomisin gibi glikopeptidler, oksasiline dirençli bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlar için tek geçerli tedavi seçeneği olduğundan, vankomisin dirençli suşların varlığı, etkilenenlerin sağlığı için önemli bir risk oluşturur. Yapılan son çalışmalar vankomisinin bile etkinliğinin azaldığını bildirmektedir. Geniş aktiviteye sahip çok sayıda yeni ilacın ruhsatlandırılmış olmasına rağmen, hiçbirinin gram pozitif bakterilere karşı üstün bir etkinliğe sahip olup geniş bir kullanım alanı bulamamıştır (Kaul *et al.* 2008).

Hastanelerde edinilen MRSA, tipik olarak, aminoglikozid direncini kodlayan genler de dahil olmak üzere çeşitli antibiyotik direnç genlerinin artan ekspresyonuna sahiptir (Deurenberg *et al.* 2007). β-laktam antibiyotiklere afinitesi önemli ölçüde azaltılmış olan ve böylece β -laktam direnci veren penisilin bağlayıcı protein 2a'yı (PBP2a) kodlayan *mec*A geninin edinilmesiyle *S. aureus*, β -laktam antibiyotiklere karşı direnç geliştirmiştir. Bu direnç *S. aureus* tarafından elde edilmiştir, çünkü PBP2a, β -laktam antibiyotikler için önemli ölçüde düşük bir afiniteye sahiptir (Lee 2010). *S. aureus'*un moleküler ve genetik analizi, virülensi etkileyen çok sayıda yüzey adezyonunu, salgılanan enzimleri ve toksinleri ortaya çıkarmıştır. *S. aureus*'un tüm genomu 2001 yılında dizilenmiştir (Kuroda *et al.* 2001). Genomik adalar olarak da bilinen patojenite adaları, ekleme dizileri, transpozonlar, bakteriyofajlar ve diğer mobilize olabilen eksojen DNA segmentleri *Staphylococcus aureus* genomunun içinde bulunur (Ruzin *et al.* 2001).

Hastalık ve antibiyotik direnci için suçlanacak yabancı elementleri taşıyan ve belirli virülans faktörleri olan. *S. aureus*'un bu özelliği yatay gen transferi gerçekleştirme ve hem stafilokok hem de stafilokokal olmayan taksonlar gibi diğer organizmalarla genetik elementleri değiştirme potansiyeli ile açıklanabilir. Bu genetik uyarlanabilirlik, *S. aureus*'un hem kolonize edici hem de hastalık üreten bir organizma olarak başarısının olası bir nedenidir. Gen değişimi, evrimsel sürecin önemli bir parçasıdır (Al-Ugaili 2013).

Bu tezde *S.aureus* ve MRSA prevalansının belirlenmesi, MRSA izolatlarında *femA* gen ve *vanA* varlığı ve çoklu antibiyotik direncinin saptanması, yeni sentezlenen 3 farklı benzoil tiyoüre bileşiğinin MRSA izolatlarına karşı antibakteriyel etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZET

2.1 Tarihçe

Koch (1878) ve Pasteur (1880) stafilokokları tanımlayan ilk bilim insanlardır. Ancak Rosenbach ve Ogston organizmalar üzerinde derinlemesine araştırma yapan ilk araştırmacılardı. Ogston 1880 yılında kümelenmiş mikrokoklara "üzüm salkımı" anlamına gelen *"Staphylococci"* adını vermiştir. Ek olarak, Rosenbach 1884 yılında *Staphylococcus* (Stafilokok) cinsinin resmi bir tanımını yapmıştır. *Staphylococcus* cinsinin toplam 36 türe sahip olduğunu belirlemişlerdir (Götz *et al.* 2006).

1940 yılında penisilini hidrolize edebilen aktif bir β -laktam enzimine sahip olduğu keşfedildi. Bu enzime daha sonra "penisilinaz" adı verildi. Daha sonra, penisilinaz üretimi *S. aureus*'ta da görülmüştür. 1948'de Birleşik Krallık'taki hastanelerdeki hastalardan kültürlenen stafilokok suşlarının %50'sinden fazlasının penisiline dirençli olduğu keşfedilmiştir (Barber ve Rozwadowska-Dowzenko 1948).

O zamandan beri *S. aureus* izolatlarının %90 ila %95'i genel olarak penisiline dirençlidir. Penisilinaz, konjugasyon veya transdüksiyon yoluyla geçişi kolaylaştıran plazmitler üzerinde kodlanmıştır. 1959 yılında *S. aureus*'un tedavisi için metisilin olarak bilinen penisilinaz dirençli bir penisilin tanıtılmıştır. Ancak bir yıl sonra, 1960 yılında, Birleşik Krallık'ta bir hastanede, metisiline dirençli *S. aureus* suşu keşfedilmiştir (Kim 2009).

1962'de, Carshalton'daki Queen Mary'nin adını taşıyan Queen Mary Çocuk Hastanesi'nde bir hastalık salgını meydana geldi. 1960'lara gelindiğinde, bu izolatlar dünyadaki topluluklara ve hastanelere dağılmıştı. 1968'de Amerika Birleşik Devletleri ilk MRSA pandemisinin ortaya çıktığını duyurmuştur (Palavecino 2004). Bununla birlikte, 1970'ler boyunca, *S. aureus* izolatı, penisiline karşı stabil olan penisilinlerin büyük çoğunluğuna karşı direnç geliştirmiştir. 1977'den önce, bir inekte mastitis vakasında MRSA keşfedildiğinde, önce potansiyel olarak insanlara yayılabileceği düşünüldü (Zahraa 2019).

Takip eden yıllarda hem vahşi hem de evcil hayvanlarda MRSA hastalığı vakaları bildirilmiştir (Wardyn *et al.* 2012). 1970'lerde ve 1980'lerde esas olarak hastane hastaları

arasında rapor edilen MRSA tipine o zamandan beri hastane ile ilişkili veya sağlık hizmetleriyle ilişkili MRSA (HA-MRSA) adı verilmiştir (O'gara 2017).

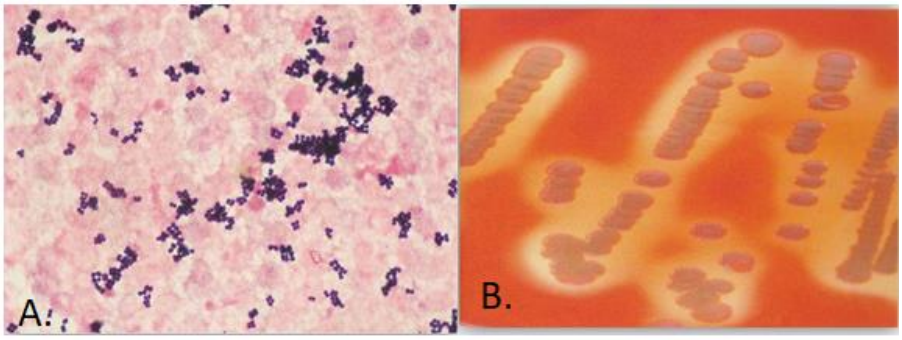
Bu isimlendirme, enfeksiyonun öncelikle sağlık bakım ortamlarında bulunması nedeniyle verilmiştir. Sonraki MRSA izolatları 1990'ların ortasında ortaya çıkmaya başladı. Bu dönemde enfeksiyonlar daha çok hastalığın başlangıcından önce hastaneye kaldırılmamış kişilerde görülüyordu. Bu MRSA izolatları kategorisine topluluk kaynaklı MRSA (CA-MRSA) olarak isimlendirilmiştir. 2005 yılında MRSA izolatları ilk olarak rapor edilmeye başlandı ve bunların çoğu sığırlarla dolaylı veya doğrudan teması olan kişilerden geliyordu. Hollanda ve Fransa, şu anda hayvancılıkla ilişkili MRSA (LA-MRSA) olarak bilinen vakaları bildiren ilk ülkelerdi (Voss *et al.* 2005).

2.2 *S. aureus*'un Sınıflandırılması

Stafilokoklar, Firmicutes şubesi, Bacilli sınıf, Bacillales takım, *Staphylococcaceae* familya ve *Staphylococcus* cinsinde sınıflandırılır (Moroni *et al.* 2011).

2.3 *S. aureus*'un Mikroskobik ve Biyokimyasal Özellikleri

Laboratuvar tanımlaması kültür ve biyokimyasal incelemelere, koagülaz tepkisine ve karakteristik morfolojiye, ısıya dayanıklı nükleazın (*S. aureus* için termonükleaz) gelişimine ve ayrıca trehaloz ve mannitolün fermentasyonuna bağlıdır. Koagülazın plazmayı koagüle etme kapasitesi, *S. aureus'u S. epidermidis*'ten ayırma ve tanımlama sürecinde en çok güvenilen yaklaşımdır (Brooks *et al.* 1996). *S. aureus*, 0,5-1,0 m çapında, çiftler halinde, tek tek, kısa zincirli, üç veya dört hücreli ve tipik olarak simetrik üzüm oluşturmak için birden fazla düzlemde bölünebilmesi ile oluşan Gram pozitif bir koktur (Şekil 2.1) (Götz *et al.* 2006).



Şekil 2.1 Gram boyamada üzüm salkımı şeklinde görülen *S. aureus* hücreleri (A), Kanlı agar plağında *S. aureus*'un β-hemolitik özelliği ve sarı pigmentli koloniler (B) (Cueto *et al*. 2009).

Organizma tuza toleranslıdır ve %7,5 sodyum klorürden oluşan mannitol tuz agar besiyerinde üreme kabiliyetine sahiptir. Neredeyse tüm *S. aureus* suşları, bakterilerin saptanmasına da yardımcı olan bir virülans faktörü olan koagülaz enzimi üretir (Brown *et al.* 2005). Voges Proskauer (VP), katalaz, nitrat indirgeme, üreaz, Metil Kırmızısı (MR), jelatin hidroliz, proteaz, sitrat ve lipaz biyokimyasal reaksiyonları pozitiftir, ancak oksidaz reaksiyonu negatiftir (Karmakar *et al*. 2016).

2.2 *S. aureus* Epidemiyolojisi

Amerika Birleşik Devletleri'ndeki hastanelerde her yıl yaklaşık 400.000 kişi *S. aureus* ile enfekte olur ve bu hastaların yaklaşık 100.000'i hastalıklarının neden olduğu sorunlar sonucu ölmektedir (Haque *et al.* 2018). MRSA şu anda hem tıbbi tesislerde hem de Çin'deki popülasyonda iyi bilinen bir etiyolojik ajandır ve çok sayıda araştırma bu eğilimin genişlediğini göstermiştir. Ayrıca Çin, dünyada MRSA prevalansının en yüksek olduğu ülkelerden biridir (David and Daum 2010).

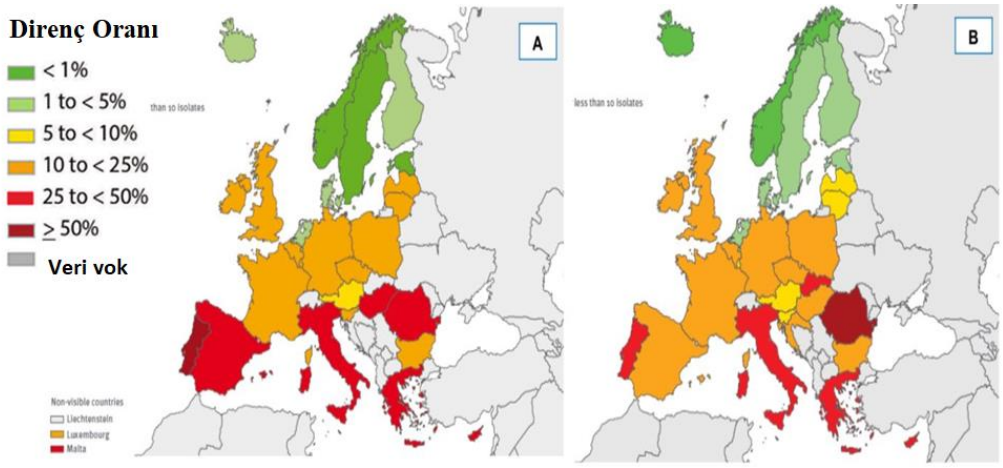
1999'da Çin'de MRSA prevalansı %27,5 iken 2009'da %60,7'ye çıkmıştır (Xiao *et al*. 2011). 2005 yılında erişilen bilgilere göre, Şanghay'da MRSA prevalansı %80'in üzerindeyken, Çin genelinde hastalığın ortalama insidansı %50'nin üzerindeydi (Liu *et al.* 2009), Chongqing gibi yerel şehirlerde yaygınlık oranı %45,0'dır (Cheng *et al.* 2010).

Avrupa sürveyans verilerine göre, kuzey Avrupa'daki invaziv enfeksiyonlardan izole edilen *S. aureus'un* %5'i metisiline dirençlidir, bu oran güney Avrupa'da %25-50 oranındadır (Shehabi *et al.* 2013). Irak'taki İbn Sina Hastanesinde MRSA prevalansı %46,1 olarak bildirilmiştir (Co *et al.* 2011).

Değişen enfeksiyon kontrol prosedürleri ve antibiyotik kullanımının prevalansının 2010 dönemi için MRSA prevalansında azalma eğilimine katkıda bulunan iki faktör olduğu bildirilmiştir (Köck *et al*. 2010). Avrupa'da, özellikle sığır ve domuzlar gibi çiftlik hayvanlarının rezervuar olduğu tanımlanmıştır (Garcia-Alvarez *et al.* 2012). Çoğunlukla klonal kompleks 398'e (CC398) ait olan bu hayvan ilişkili MRSA tarafından üretilen enfeksiyonlar, İspanya, Hollanda ve Almanya'nın kuzeybatısındaki bölgelerde hayvanlarla etkileşime giren kişilerde rapor edilmiştir (Lozano *et al.* 2011,Van Alen *et al.* 2017).

Asya-Pasifik bölgesinde, MRSA çoğu hastanede endemiktir ve bazı Asya ülkeleri dünyadaki en yüksek MRSA prevalansına sahiptir. Buna rağmen, mevcut verilerin çoğu yüksek gelirli ülkelerden (Güney Kore, Singapur ve Japonya gibi) gelmektedir ve diğer ülkelerden sınırlı bilgi bulunmaktadır. MRSA, ülkeden ülkeye farklılıklar gösterse de, tüm *Staphylococ* enfeksiyonu vakalarının yarısından sorumludur (Chen ve Huang, 2014). Bölgesel izleme bulgularına göre, Japonya ve Güney Kore'nin yüksek bir MRSA prevalansına sahiptir ve Güney Kore'deki klinik izolatların yüzde yetmişinden fazlası MRSA ile ilişkilidir (Mendes *et al.* 2013).

Afrika kıtasındaki çoğu ülkede MRSA prevalansının %50'den daha az olduğu bildirmektedir (Falagas *et al.* 2013). Bununla birlikte, 2000'lerin başından beri, çoğu ülkeden gelen istatistikler, MRSA insidansının istikrarlı bir şekilde arttığını göstermiştir. Bazı Avrupa ülkelerinde 2010 ve 2013 yıllarında MRSA izolatlarının yüzdesi Şekil 2.2'de verilmiştir.



Şekil 2.2 2010 (A) ve 2013 (B) yıllarına göre bazı ülkelerde MRSA izolatlarının yüzdesi (Neugebauer *et al.* 2012, Russo *et al.* 2016).

2.3 *S.aureus'un* Genetik Özellikleri

S. aureus genomu, nispeten düşük G+C içeriğine sahip tek bir dairesel kromozomdan (2.7-2.8 Mbp) oluşur (Baba *et al*. 2002). Genom korunmuş çekirdek genom ve yardımcı genom olarak adlandırılan iki ana bileşen içerir. Çekirdek genom tüm izolatlarda bulunur ve bir *S. aureus* genomunun yaklaşık %75'ini oluşturur. Çekirdek genler bakteri kromozomu üzerinde bulunur, bu nedenle genellikle stabildir ve dikey olarak aktarılır (Lindsay ve Holden 2006).

Bu genlerin çoğu, metabolizma işlevleriyle ilişkilidir. Toksinler, ekzoenzimler, hücre yüzeyi bağlayıcı proteinler ve kapsül biyosentetik genleri gibi diğer stafilokokal türler tarafından taşınmayan virülans genleri dahil olmak üzere diğer genler ortak işlevlerle ilişkilidir, ancak büyüme ve hayatta kalma için gerekli değildir (Lindsay ve Holden 2004). Çekirdek genomdaki dizi farklılığı "çekirdek değişken" (CV) genler olarak adlandırılır. Bu sekans varyasyonları, tek nükleotit polimorfizmlerinden (SNP'ler) ve/veya büyük DNA bölgelerinden (bir gen içindeki birkaç nükleotidden operonlar içindeki tam veya kısmi genleri içeren birkaç kilobaz çiftine kadar değişen) kaynaklanabilir (Lindsay and Holden 2006).

Yardımcı genom, *S. aureus* genomunun yaklaşık %25'ini oluşturur ve temel olarak suşlar arasında yatay olarak aktarılan mobil genetik elemanlardan oluşur (Lindsay and Holden

2004). Bu elementler arasında bakteriyofajlar, *S. aureus* patojenite adaları (SaPI), stafilokok kaset kromozomları (SCC) bölgeleri, plazmidler ve transpozonlar bulunur (Feil *et al*. 2003). Bu genetik elementlerin çoğu, virülans veya direnç fonksiyonlarına sahip genleri barındırır. Bu nedenle, bu öğelerin dağılımı ve yatay yayılımı klinik olarak anlamlı olabilir (Lindsay and Holden 2004).

Aksesuar genler, bakteriler arasında üç mekanizma yoluyla yatay transfer yoluyla iletilebilir: transformasyon, konjugasyon ve transdüksiyon (Thomas *et al.* 2005). Bununla birlikte, *S. aureus'*ta dönüşüm için gereken genler yoktur. Konjugasyon yaygın görülmemekle birlikte *Enterococci* gibi diğer türlerden *S. aureus*'a gen transferi olabilmektedir (Lindsay,2010). Bu nedenle, bakteriyofaj ile transdüksiyon muhtemelen *S. aureus'*ta yatay transferin en sık görülen mekanizmasıdır ve dolayısıyla bu patojenin evriminde çok önemli bir rol oynar (Lindsay and Holden 2006).

2.4 *S. aureus*'un Virülans Faktörleri

Staphylococcus aureus, çeşitli virülans faktörlerini ifade edebilen çok işlevli bir patojendir. Bu virülans faktörleri stafilokoklara doku üzerinde çoğalma ve yayılma kapasitesi sağlar (Gould *et al.* 2012). Bu virülans faktörleri çok sayıdadır ve enfeksiyon patogenezinde rol oynayan hem yapısal hem de salgılanan ürünleri içerir (Çizelge 2.1). Bu virülens faktörleri arasında adezyon, aderens, konak savunmadan kaçma, enzimler, toksinler ve yüzey proteinlerini yer alır. Hastalığın tezahürü ve şiddeti, konağın bağışıklık tepkisi ile bulaşıcı suşun virülans faktörü repertuarı arasındaki etkileşimin ürünüdür (Salmenlinna *et al*. 2002).

S. aureus suşlarının virülans faktörleri farklı sınıflara ayrılabilir, hücresel konumları ve hizmet ettikleri işlev ile ayırt edilirler. Bu faaliyetlerin bir veya daha fazlasına tek bir faktör katılabilir ve farklı büyüme aşamalarında farklı faktörler üretilir. Klinik ortamlarda izole edilen *S. aureus* suşlarının çoğu, serotip 5 veya 8'in kapsüler polisakaritini üretir. Bir enfeksiyon sırasında, kapsül, opsonizasyon ve fagositozu önleyecek olan antikorların bağlanmasını önleyebilir. Bu, *S. aureus*'un konakçının bağışıklık sistemi tarafından yok

edilmesini önler (Foster 2005). Ayrıca, kapsüler polisakkarit, bakterilerin tıbbi cihazlarda polimer yüzeylere yapışması sürecinde rol oynayabilir (Muller *et al*. 1993).

Stafilokoklar patogenez sürecinde birden fazla adımdan tek bir virülans faktörünün ve aynı rolü yerine getirebilecek birkaç virülans faktörünü kullanabilmektedir (Gordon ve Lowy 2008). Konak dokularına yapışma ve kolonizasyonunda yer alan yüzey proteinleri (yapışmalar, kümelenme faktörleri, fibrinojen bağlayıcı ve fibronektin bağlayıcı proteinler), *S. aureus*'un enfeksiyon yeteneklerine katkıda bulunan başlıca virülans faktörleri sınıflarından bazılarıdır (Ruzin *et al*. 2001).

Bir suşun belirli bir konakçıya bulaşması ve hastalık oluşturması suşun kendisi tarafından salınan virülans faktörleriyle ilişkilidir. *S. aureus*, genomunda çok sayıda virülans faktörüne sahiptir. Bu nitelikler nedeniyle organizma hem insanlarda hem de hayvanlarda çok çeşitli hastalıklardan sorumlu bir patojen olarak etkin bir şekilde işlev görebilir. Konakçı hücrelere bağlanma, konağın immünolojik bariyerinin yok edilmesi, doku invazyonu, sepsis indüksiyonu ve toksin aracılı sendromların indüklenmesi virülans faktörleri tarafından kolaylaştırılır. Bu, konakçıdan sağlam bir bağışıklık yanıtının yokluğunda devam eden stafilokok enfeksiyonlarının temel nedenidir (Kim *et al.* 2016).

Stafilokok enterotoksinleri, düşük moleküler ağırlıklı pirojenik ekzotoksinlerdir. Bu protein süper antijen görevi görerek T hücrelerini aktive eder ve inflamatuar sitokinlerin üretilmesine neden olur (Krakauer 2013).

Stafilokok virülans faktörleri, patogenezdeki etkinliklerine göre Çizelge 2.1'de verildiği gibi sınıflandırılabilir.

Çizelge 2.1 Patojenik stafilokokların temel virülans faktörleri ve etkinlikleri

Virülens faktörü	Etkinliği	Referans
Enzimler		
Koagülaz	Fibrin polimerizasyonu	**(Leboffe ve Pierce 2011)**
Lipazlar	Deriden girişe yardımcı olur	
Hiyalüronidaz veya Yayılma faktörü	Konak bağışıklık sisteminden kaçış	**(Jawets *et al*. 2013)**
Stafilokinaz	Fibrinoliz	
Proteinazlar	Protein sindirimi	
β- laktamaz.	Penisilin antibiyotiğine direnç	
Ekzotoksin		
α- toksin	Güçlü bir hemolizin	**(Jawets *et al* . 2013)**
β- toksin	Sfingomyelini sindirir, ayrıca birçok kişi için insan kırmızı kan hücreleri de dahil olmak üzere toksiktir.	
δ- toksin	Biyolojik zarları bozar, ishalli hastalıklar	
γ- hemolizin	Beyaz kanın hücrelerinin hücre zarında gözenek oluşumu ile parçalanmasına neden olur.	
Enterotoksinler		
(A–E, G–I, K–M)	Gıda zehirlenmesine, kusmaya ve ishale neden olur.	**(Jawets *et al.* 2013)**
TSST-1[1]	Süper antijenler, TSST-1 MHC sınıf II moleküllere bağlanarak T hücresi stimülasyonu sağlar	
Lökosidin	Beyaz kan hücresi zarı üzerinde rol alır	
Eksfoliyatif toksin	Epidermisin mukopolisakkarit matriksinin çözülmesine neden olarak stafilokokal haşlanmış deri sendromu oluşmasına neden olur	
PVL[2] üretimi	Deri enfeksiyonlarının patofizyolojisinde rol alan toksinler	**(Hodille *et al*. 2016)**
Yüzey bileşimi		
Clumping faktör	Bakterilerin fibrinojen veya fibrine tutunmasını sağlar.	**(Jawets *et al*. 2013)**
Peptidoglikan	Endotoksin	
Teikoik asitler	Endokardit	
A protein	A kısmı, spesifik bir antijen ile birleşmek için serbesttir çünkü IgG moleküllerinin Fc bölgesine bağlanır.	
Kapsül	Yüzey antijeni olarak polisakkarit	**(Skurnik *et al*. 2010)**

[1] TSST, Toksik Şok Sendromu Toksin
[2] PVL, Panton-Valentine lökositin

2.5 MRSA Çeşitleri

MRSA'nın tanımlanmış üç alt tipi vardır: hastane ilişkili MRSA (HA-MRSA), toplumla ilişkili MRSA (CA-MRSA) ve çiftlik hayvanları ile ilişkili MRSA (LA-MRSA) (Grema *et al.* 2015). HA-MRSA insidansı, genellikle sağlıklı olan bireylerde görülen CA-MRSA'nın aksine, hastalık için risk faktörü olan veya bağışıklık sistemi zayıf olan hastalarda çok daha yüksektir (David ve Daum 2010). Avrupa ile karşılaştırıldığında, HA-MRSA prevalansı hem Doğu Asya'da hem de Amerika'da çok daha yüksektir. Bir dizi ayrı çalışmanın bulgularına göre, Sri Lanka'daki yaygınlık oranı %70'ten fazladır. Vietnam, Güney Kore, Yunanistan, İtalya ve Portekiz'de %50'nin altında (Temesgen 2011).

Genellikle genç hastalarda tespit edilmiştir ve izolatların çoğu, beyaz kan hücrelerini yok eden ve sonuç olarak dokularda nekroza neden olan PVL toksinini düzenleyen gene sahiptir. TK-MRSA toplumda yaygındır ve hastanelerde yayıldığı düşünülmektedir (Temesgen 2011). Bu nedenle MRSA, florokinolonlar, tetrasiklin ve klindamisin dahil olmak üzere çeşitli antibiyotiklere dirençlidir (Mediavilla *et al*. 2012). MRSA'nın en son keşfedilen suşu LA-MRSA olarak adlandırılır ve genellikle domuz ve sığır gibi tarım hayvanlarında görülür. Çiftlik hayvanlarıyla yakın çalışan ve hayvanları öldüren bireylerin yanı sıra hayvanlar da LA-MRSA bakterileri için potansiyel konaklardır (Temesgen 2011).

2.6 *S. aureus*'un Neden Olduğu Hastalıklar

İnsanları etkileyebilecek birkaç farklı *S. aureus* enfeksiyon türü vardır. *S. aureus*'un neden olabileceği klinik hastalıklar, enfeksiyonun nerede bulaştığına bağlı olarak hastane kaynaklı veya toplum kökenli olarak sınıflandırılabilir (Khan *et al*. 2015). Hastalığın klinik belirtileri, enfeksiyona neden olan *S. aureus* suşlarının genetik akrabalığı ve bu iki alt tipin her birinin çeşitli antibiyotiklere duyarlılığına bağlıdır (Bien *et al*. 2012). Öncelikle hastane kökenli bir bakteri olmasına ve hastanelerde birincil ölüm ve morbidite nedeni olmasına rağmen, toplumda *S. aureus* enfeksiyonları artmaktadır (Loomba *et al*. 2010).

S. aureus ile ilişkili hastalıklar hafif ve lokalize olmaktan şiddetli ve sistemik olmaya kadar değişebilir. En önemli klinik *S. aureus* enfeksiyonları, pyo-miyozit ve enfektif deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarını içerir (Burdette *et al.* 2012). Endokardit, osteoartiküler enfeksiyonlar ve plevra-pulmoner enfeksiyonlar bakterilerin neden olabileceği hastalıklardan bazılarıdır (Kechrid *et al.* 2011, Bassetti *et al.* 2012). Nekrotizan pnömoni, idrar yolu enfeksiyonları (Kreienbuehl *et al.* 2011), menenjit, epidural apse ve toksik şok sendromu diğer klinik enfeksiyonların bazı örnekleridir (Tong *et al.* 2015). Bağışıklık sistemlerinin zayıflamış olması nedeniyle, yanık hastalarının, özellikle yanık selüliti, impetigo ve istilacı enfeksiyon türleri gibi deri ve yumuşak dokuları etkileyen *S. aureus* enfeksiyonlarına yakalanma olasılığı daha yüksektir. Sonuç olarak, hastane ilişkili MRSA suşu önemli bir endişe nedeni olarak ortaya çıkmıştır. Tipik olarak tedavinin başarısızlığına atfedilebilir (Alam *et al.* 2014).

S. aureus, şiddetli toksik şok geçiren yanık hastalarının %40'ının mukozasında ve derisinde bulunmuştur (Matsushima *et al.* 2015). Bir araştırmanın bulgularına göre yanık hastalarında *S. aureus* enfeksiyonlarının görülme sıklığı %47'ye, MRSA enfeksiyonlarının görülme sıklığı ise %45'e ulaşmıştır (Bagdonas *et al*. 2003).

Dünyanın farklı yerlerinde yayınlanan çok sayıda makale, *S.aureus'*un mastitise neden olabilecek birçok patojen arasında en önemlilerinden biri olduğunu göstermiştir (Catozzi *et al.* 2017). Süt üretiminin azalması, tedavi nedeniyle artan harcamalar ve enfeksiyon döneminde etkilenen sütün imhası ile ilgili kayıplar nedeniyle mastitis, süt işletmelerinde birincil ekonomik zarar kaynağı olarak kabul edilmektedir (Reshi *et al*. 2015).

Gıda kaynaklı MRSA'nın doğrudan bir sonucu olan ve bu enfeksiyonun insan sağlığı üzerindeki potansiyel etkisini vurgulayan gastrointestinal semptomlar (kusma, ishal vb.) ortaya çıkar (Crago *et al.* 2012). Antimikrobiyal dirençli bakteriler, özellikle gıda kaynaklı hastalıklar olarak sürekli olarak artış gösterdiğinden, bu, küresel ölçekte en önemli endişeye neden olmaktadır. *S. aureus*, antibiyotik direncinin gelişimine öncülük eden patojen olduğundan, yeni dirençli izolatların gelişmesine yönelik devam eden araştırmaların odak noktasıdır (Abidatul *et al*. 2018).

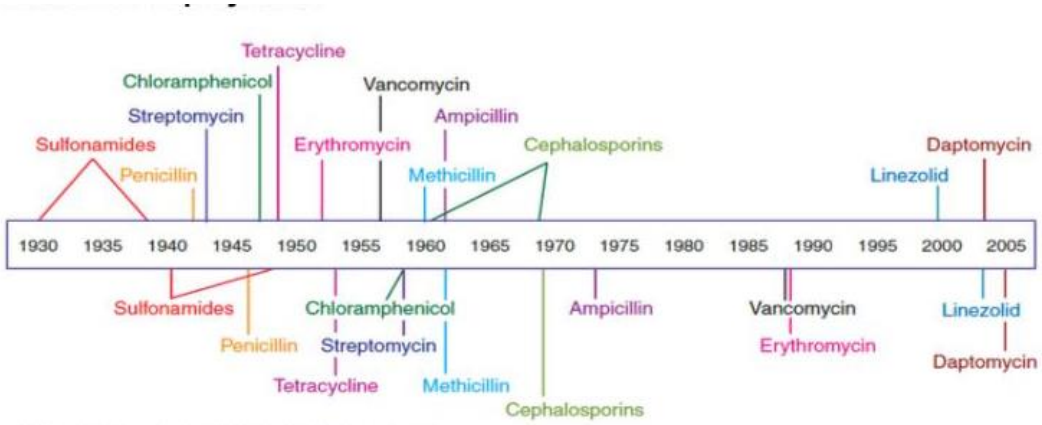
MRSA'nın gıdalarda yayılımı, hayvan kaynağına ve bölgeye bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Birçok araştırma, çeşitli et ve süt ürünlerinde MRSA izole edildiği bildirmiştir (Weese *et al.* 2010, Kamal *et al.* 2013). *S. aureus*, İsviçre'deki taze süt peynir kontaminantının önemli kaynağıdır (Hummerjohann *et al.* 2014).

Toplum ilişkili MRSA (CA-MRSA) ve hastane ilişkili MRSA'nın (HA-MRSA) öncelikle insanları etkilediği ve sığır enfeksiyonlarını etkilemeyeceği düşünülmektedir. Öte yandan, çiftlik hayvanlarıyla ilişkili MRSA insanlar tarafından taşınabilir ve bu en sık enfekte hayvanlarla mesleki temasın olduğu durumlarda karşılaşılır (Cuny *et al.* 2015).

Hem gıda zinciri hayvanlarında hem de insanlarda MRSA kolonizasyonu ve enfeksiyonu, MRSA'nın büyük bir zoonotik patojen olduğunu doğrular (Oniciuc *et al.* 2016). İnsan tüketimi için işlenmiş gıdalarda *S. aureus* biyofilm üreticisi olduğu tanımlamıştır. Stafilokok enterotoksinleri insan tarafından 20mg civarında yutulduğunda, gıda kaynaklı bir zehirlenmeye neden olur. Hastalığın şiddeti, tüketilen toksik maddenin miktarı ve her bireyin genel sağlığı ile değişir (Schelin *et al.* 2011).

2.7 *S.aureus* Antibiyotik Direnci

Metisiline dirençli *S. aureus* anlamına gelen MRSA, yarı sentetik penisilinlere (yani metisilin, nafsilin ve oksasilin) dirençli *S. aureus* suşudur. Sonuç olarak, enfeksiyonların tedavisinde kullanılan birçok antibiyotiğe (penisilin, sefalosporinler ve sefamisinler) ve tüm β -laktam antibiyotiklere dirençlidir. MRSA sıklıkla aminoglikozidler, makrolidler ve kinolonlar gibi diğer antibiyotik sınıflarına veya bu ilaçların herhangi bir kombinasyonuna direnç gösterebilir. Sonuç olarak MRSA sadece metisiline değil aynı zamanda Şekil 2.3 görüldüğü gibi birçok antibiyotiğe de aynı anda dirençlidir (Onanuga and Temdie 2011).



Şekil 2.3 Antibiyotiklere dirençli *S. aureus*'un izolasyon zaman çizelgesi (Clatworthy *et al.* 2007)

Tüm dünyada, çoklu ilaca dirençli *S. aureus* izolatlarının sayısında bir artış olmuştur. Vankomisin, başlangıçta metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) enfeksiyonlarının tedavisinde son derece etkili olan bir glikolpeptiddir; bununla birlikte, bazı MRSA suşlarının vankomisine orta düzeyde direnç geliştirdiği gösterilmiştir (Majeed *et al.* 2022). Ek olarak, bu bakterinin geniş bir antibiyotik yelpazesine karşı direnç kazanma konusundaki kabiliyeti ve metisilin direncinin ortaya çıkması ve dünya çapında yayılması *S. aureus*'u özellikle hastanelerde ve sağlık bakımıyla ilgili diğer ortamlarda bir endişe konusu yapmıştır (Hiramatsu *et al.* 2002).

Antimikrobiyal tedavilere dirençli bakterilerin, artan ölüm oranlarına ve salgınlara neden olabilecek tehlikenin birincil kaynağı olduğu düşünülmektedir. Avrupa Birliği, antibiyotiğe dirençli bakterilerin doğrudan bir sonucu olarak yıllık 25.000'den fazla ölümle karşılaşmaktadır. Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezlerinden (CDC-2017) alınan verilerde bunu göstermiştir.

Klinikte sıklıkla kullanılan antibiyotikler bakterilerde hedefledikleri mekanizmalara göre beş kategoride sınıflandırılabilir:

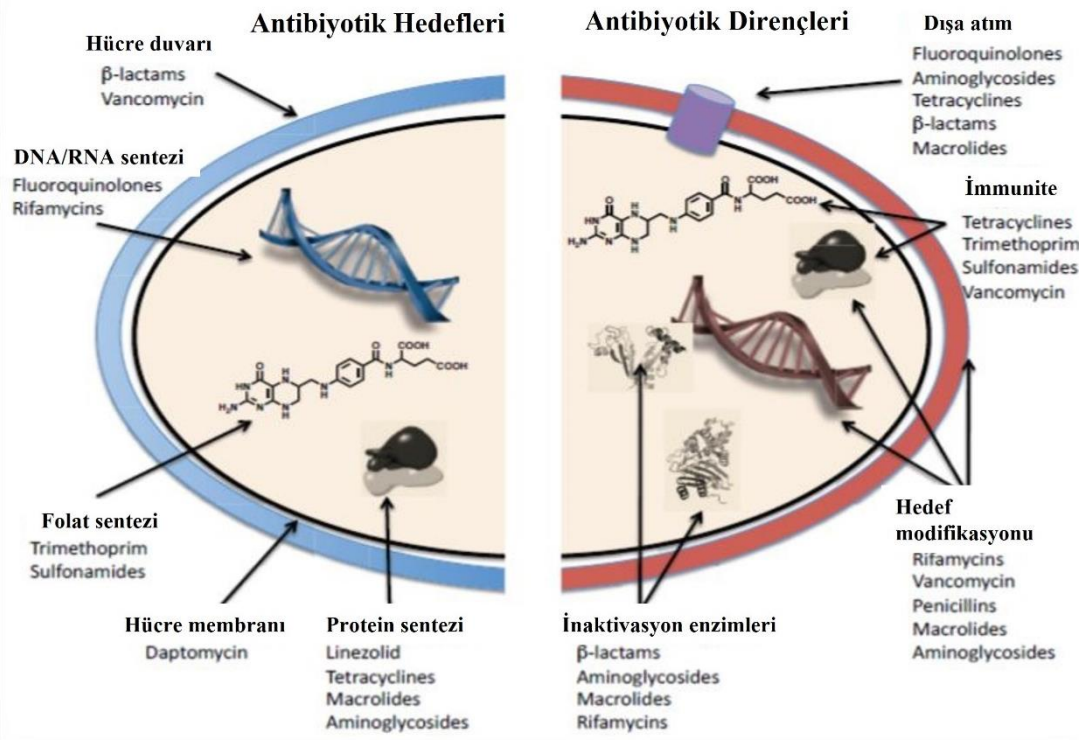
i) Hücre duvarı sentezi (ör. β -laktamlar ve glikopeptidler),

ii) Protein sentezi (ör. Fusidik asit),

iii) DNA replikasyonu (ör. Kinolonlar),

iv) RNA sentezi (ör. Rifampin),

v) Folik asit metabolizması (ör. sülfonamidler ve trimetoprim) (Şekil 2.4)



Şekil 2.4 Antibiyotik hedefleri ve direnç mekanizmaları (Wright 2010).

Mikroorganizmaların antibiyotik direnci geliştirdiği ana mekanizmalar üç farklı sınıfa ayrılabilir:

i) Hedefe erişimin engellenmesi (azaltılmış geçirgenlik, aktif akış veya artırılmış dışa akış);

ii) İlaç inaktivasyonu (antibiyotiğin ortadan kaldırılması veya etkisizleştirilmesi, dolayısıyla hedefi)

iii) Hedef değişikliği (hedefin aşırı üretimi ve modifikasyon/değişiklik, antibiyotik bağlanmasından kaçınma).

Genel olarak, bakteriler bu mekanizmalardan bir veya daha fazlasına aynı anda sahip olabilir (Wright 2010, Madigan *et al.* 2006).

S. aureus'ta metisiline dirençli olarak sınıflandırılan bakteri suşlarının ortaya çıkışı ile MRSA 1960'lardan günümüze kadar tüm dünyada hastane enfeksiyonları için klinik komplikasyonların en önemli nedenlerinden birisi olmuştur. Özellikle, deri, kan dolaşımı enfeksiyonlarına ve ventilatörle ilişkili pnömoniye (VAP) MRSA ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (De Kraker *et al.* 2011).

Penisilin Bağlayıcı Proteinler (PBP'ler), bakteri hücre duvarının yapımında önemli enzimlerdir. Stafilokoklarda keşfedilen ve rolleri hücre duvarı biyosentezinin son aşamalarının birleştirilmesini ve kontrolünü içeren sitoplazmik membrana bağlanan dört doğal PBP vardır. Bakteriler, β-laktam antibiyotikler (penisilinler, sefalosporinler) Penisilin Bağlayıcı Proteinleri etkisiz hale getirdiğinde zarar görür (Plata *et al.* 2009).

Çapraz bağlanan enzimleri inaktif hale getirmeye yönelik bu yöntem, hücre duvarı peptidoglikanının normal fizyolojik bileşiminin bozulmasıyla sonuçlanır ve bu da hücrenin parçalanmasına ve ölümüne yol açar (Zeba 2005).

S. aureus'un antibiyotiklere karşı nasıl direnç kazandığına dair bilinen üç mekanizma vardır.
I) β -laktamaz enzimi aracılığıyla
II) Genellikle PBP'ler olarak bilinen düzenli penisilin bağlayıcı proteinlerin modifikasyonu
III) PBP2a olarak bilinen ve edinilmiş bir penisilin bağlayıcı proteinin varlığı (Rello *et al.* 2005).

Metisilin direnci, bakterilerin stafilokokal kromozomal kaset mec (SCCmec) adı verilen yeni bir mobil genetik element edinmesiyle ortaya çıkar. SCCmec, bugüne kadar keşfedilen en büyük bakteriyel mobil elementlerden biridir. 21 ile 67 kbp arasında değişen bir boyuta sahiptir ve stafilokoklar ona sahip olan tek bakteridir (Robinson ve Enright 2004).

Farklı stafilokok türleri arasındaki yatay transferin SCCmec için bulaşma yolu olduğu düşünülmektedir. SCCmec, alternatif tamamlayıcı hedef proteini (PBP2a) kodlayan *mec*A genine sahiptir. Bu protein, sefalosporinler, karbapenemler ve β-laktamaz inhibitörlerinin kombinasyonları dahil olmak üzere β-laktamlar için düşük bir afiniteye sahiptir. β-laktamların mevcudiyetinde normal PBP'lerin biyosentetik aktivitelerinin yerini alabilir, bu da β-laktamların mevcudiyetinin bir sonucu olarak hücre lizizinin oluşmasını önler. Güçlü çapraz bağlı peptidoglikanın sentezinden sorumlu olan diğer doğal PBP'lerle karşılaştırıldığında, PBP2a, nispeten düşük aktivite seviyesine sahip bir

enzim gibi görünmektedir. Ayrıca SCCmec, β laktam olmayan ajanlara karşı direnç genleri içerebilir ve hastanelerle ilişkili olduğu tespit edilen çoklu ilaca dirençli suşlara neden olabilir (Iyer ve Kumosani 2011). PBP2a, PBP'lerin yüksek moleküler kütleli (78 kDa) familyasına aittir (Goffin and Ghuysen 1998).

2.8 Staphylococcal *femA* Geni

FemABX gen ailesi *S. aureus*'ta metisilin direncinin gen ifadesinde rol alır. *femAB* operonu, peptidoglikanın çapraz bağı olarak işlev gören pentaglisin interpeptid köprüsünün oluşumu için gerekli iki proteini kodlar. *femA* geni, ailenin ilk keşfedilen genidir ve peptidoglikan biyosentezinde yer alan bir protein öncüsünü kodlayan ve *S. aureus*'un tanımlanması için bir moleküler belirteç olarak kullanılır (Li *et al*. 2008).

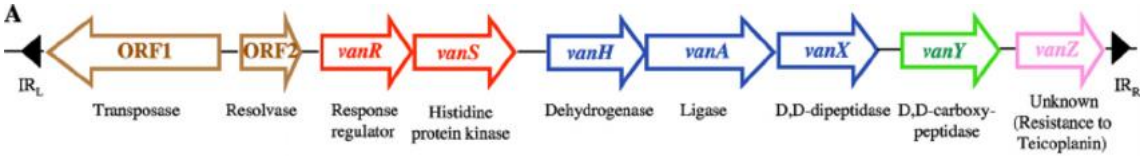
S. aureus'ta *femA* geni kromozomal olarak kodlanmış 48 kDa'lık bir protein ürününden sorumlu bir gendir (Zhou *et al*. 2008). Peptidoglikan yapısında 2 ve 3. glisin kalıntılarının eklenmesi için gereklidir.

femA ve *femB*' nin etkisizleştirilmesi aynı zamanda virülans faktörlerinin salgılanmasını da etkiler böylece hücrenin enfeksiyona neden olma yeteneği de sınırlanabilir (Ton-That 1998).

2.9 Staphylococcalocal *vanA* Geni

Glikopeptitler, peptidoglikanın pentapeptit öncüllerinin c-terminali d-Alad-Ala'ya bağlanarak gram-pozitif bakterilerde hücre duvarı sentezini inhibe eder, böylece transglikosilasyon ve transpeptidasyon reaksiyonlarını bloke eder (Reynolds 1989).

İlk keşfedilen ve en yaygın olan VanA tipi direnç, glikopeptidlere, vankomisine ve teikoplanine karşı yüksek düzeyde direnç ile karakterize edilir. Bu gen transpozon Tn1546 veya kromozomal veya plazmit yerleşimlidir. Bu genin ekspresyonundan dokuz polipeptit kodlanır ve bunlardan birisi de *VanA*'dır (Şekil 2.5) (Périchon et al. 2009).



Şekil 2.5 Tn1546'nın şematik gösterimi. IRL ve IRR, sırasıyla ters sol ve sağ tekrarlar. Oklar, kodlama dizilerini temsil eder ve transkripsiyon yönünü belirtir (Périchon *et al.* 2009)

2.10 Benzoil Tiyoüre Bileşikleri

Günümüzde insan, hayvan ve bitki patojenlerinde antimikrobiyal direncin ortaya çıkışı, yeni ilaçların bulunmayışı ile bağlantılı olarak, mevcut antimikrobiyal ajanların etkinliğine meydan okumaktadır (Holla *et al*. 2006). Bu nedenle, direnç mekanizmalarını araştırarak, antimikrobiyal yönetimi iyileştirerek ve antimikrobiyal ajanlar geliştirerek bu küresel tehdidi azaltmak için beşerî tıp, veterinerlik, tarım ve çevre sektörlerinde kapsamlı ve çok disiplinli çabalara ihtiyaç vardır (Betts *et al*. 2018).

Tiyokarbonil grubu benzoil tiyoüre ligandları protein ve proteinlere benzeyen maddelerle etkileşerek viral ve bakteriyel proliferasyonu inhibe eder (Holla *et al*. 2006). Bu bileşikler kanser ve tiroid gibi çeşitli hastalıklarda tedavi edici özellikleri araştırmalarda bildirilmiştir. Yapısında kükürt ve nitrojen atomları bulunan siklik bileşiklerin özellikle *E. coli* bakterisine karşı etkili olduğu keşfedilmiştir. Mantar ve mayalara karşı antibakteriyel etkileri nedeniyle, benzoil tiyoüre türevi kimyasalların farmakoloji alanında da kullanılabileceği bildirilmiştir (Rodriguez-Fernandez *et al*. 2005, Binzet *et al*. 2006, Saeed and Flörke 2007).

3. MATERIALYAL VE METOT

Ankara ilinde özel bir laboratuvara gelen farklı klinik sürüntü örneklerinden (yanık, yara, kulak, apse, burun) identifiye ve *mecA* genleri belirlenen 26 MRSA izolatında *femA* ve *vanA* genlerinin varlığı qPZR ile araştırılmıştır. İlk kez bu tez ile 3 farklı benzoil tiyoüre bileşiğinin N-((2-chloropyridin-3-yl)carbamothioyl)-2-chlorobenzamide (EHL-18), N-((6-methylpyridin-2-yl)carbamothioyl)thiophene-2-carboxamide (L-32), ve N-(dihexylcarbamothioyl)benzamide (EHL-77) MRSA izolatlarına karşı antibakteriyel etkinliği incelenmiştir.

3.1 Bakteri Örnekleri

Tezin örneklemini Ankara ilindeki farklı hastanelerden 2022 yılı içerisinde özel bir laboratuvara gelen, yara, yanık, kulak, nazal ve apse sürüntülerini içeren 100 klinik örnekte konvensiyonel yöntemlerle identifiye edilen MRSA izolatları (Alhadeethi 2022) oluşturmuştur.

3.2 Laboratuvar Ekipmanları

Gerçek zamanlı PZR ve antibiyotik direnç ve duyarlılık belirleme testlerinde kullanılan laboratuvar ekipmanlarının bilgileri Çizelge 3.1 'te verilmiştir.

Çizegle 3.1 Laboratuvar ekipmanları

No.	Ekipmanlar	Firma
1	Otoklav	HMC Hirayama
2	Bunzen beki	Amal
3	Santrifüj	Fisher Scientific
4	Hassas terazi	Mettler
5	Derin dondurucu	Hettich
7	Düz kapaksız cam tüp	S&H Labware
8	Steril pipet ucu	Eppendorf
9	Tek kullanımlık petri kapları 90mm	Fisher Scientific
10	Distile su cihazı	Aromel
11	Eppendorf tüp (farklı boyutlar)	Eppendrof
12	Mikro spin santrifüj	Nüve
13	Laminar flow kabinleri (Laminar hava akış kabini)	Nüve
14	Isıtıcılı manyetik karıştırıcı	Velp
15	İnkübatör	Nüve EN 500
16	Işık mikroskobu	Olympus
17	Mikropipet (farklı boyutta)	Bioanalyse
18	Kuru sterilizatör	Memmert
19	Parafilm	Bemis
20	Sıvap	Bioanalyse
21	Plastik öze	Looplast, LP Italiana SPA
22	pHmetere	Inolab pH 7110 – WTW
24	Gerçek zamanlı PZR sistemi	Roche

3.3 MRSA İzolatlarında *femA ve vanA* Gen Varlığının Tespiti

Faklı kliniklerden izole edilmiş olan 26 MRSA izolatında gerçek zamanlı PCR kullanılarak direnç genlerinden olan *femA* ve *vanA* gen varlığı araştırılmıştır.

3.3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Yapılan konvansiyonel çalışmalarda MRSA olarak belirlenen izolatlarda *femA* gen varlığı qPZR yöntemi ile araştırılmıştır. MRSA izolatlarından DNA ekstraksiyonu amacı ile DiaRex DNA ekstraksiyon Kiti (Şekil 3.1) (Katalog no: SD-0323-50, Diagen/Türkiye) kullanmıştır. Kit içeriği Çizelge 3.2 'de verilmiştir.



Şekil 3.1 DiaRex DNA ekstraksiyon kiti

Çizelge 3.2 DNA ekstraksiyon kitinin içeriği

No.	İçerik	Miktar
1	Toplama tüpleri içinde spin kolonlar	5 adet
2	Toplama tüpleri (2mL)	50 adet
3	Lizis solüsyonu (LBD)	1mL
4	Proteinaz K solüsyonu (PKD)	1.25mL
5	Bağlama solüsyonu (BBD)	15mL
6	Yıkama solüsyonu (WBD-1)	17mL
7	Yıkama solüsyonu (WBD-2)	17mL
8	Elüsyon solüsyonu (EBD)	15mL

3.3.2 Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar

Roche 480 gerçek zamanlı termal döngü cihazı ve DNA saflığının belirlenmesinde Quawell UV-Spektrofotometre (Q3000) cihazı kullanılmıştır (Şekil 3.2, Şekil 3.3).



Şekil 3.2 Gerçek zamanlı Termal Döngü Cihazı



Şekil 3.3 Quawell UV-Spektrofotometre

3.3.3 Primerler

MRSA izolatlarında *femA ve vanA* gen varlığının tespiti çalışmaları için Diagen AŞ tarafından tasarlanan liyofilize haldeki primerler Biomers (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Primer dizileri Çizelge 3.3 ve 3.4'te verilmiştir.

Çizelge 3.3 Kullanılan femA gen primerleri

Primer	Sekans
femA (F)	5'GAAGAAACCAGCAGAGATAG 3'(20)
femA (R)	5'CACAYAACAAGCGAGATAA 3' (19)

(F) = İleri primer (R)= Geri primer

Çizelge 3.4 Kullanılan vanA gen primerleri

Primer	Sekans
*van*A (F)	5' GATACAGGAAACGGCAAAAA3'(20)
*van*A (R)	5' CATCATACGGGGATAACGA 3' (19)

(F) = İleri primer (R)= Geri primer

3.3.4 DNA İzolasyonu

DNA ekstraksiyonu DiaRex DNA ekstraksiyon kiti kullanılarak üretici firmanın önerdiği protokole göre yapılmıştır. DNA ekstraksiyon kitinde bulunan WBD-1 ve WBD-2 solüsyonlarına sırasıyla 11mL ve 38 mL absolut etanol ile dilue edilmiştir. Daha sonra 1 gece NB'de inkübe edilen MRSA izolatlarından 1-3 mL (OD 600=1) alınarak 5000x rpm devirde 5dk santrifüj yapılmıştır ve süpernatant atılmıştır. Kalan pelet üzerine LBD solüsyonundan 300µl eklenmiş ve 2x 20 saniye 4000rpm olacak şekilde homejenizasyon yapılmıştır.

Ardından PKD solüsyonundan 25 µl eklenip ve lizat vorteks ile homojen hale getirilip 56ºC 30 dakika inkübe edilmiştir. Süre sonunda 5000rpm devirde 5dk santrifüj yapılmıştır ve süpernatant yeni tüpe aktarılmıştır. Süpernatant üzerine BBD solüsyonundan 300µl eklenmiştir ve lizat pipetaj ile homojen hale getirilmiştir. Daha sonra tüm içerik spin kolana aktarılmıştır ve 8000rpm devirde 1dk santrifüj yapılmıştır. Atık tüp değiştirilip kolon üzerine 500µl WBD-1 solüsyonu eklenmiştir ve 8000rpm devirde 1dk santrifüj yapılmıştır. Atık tüp değiştirilip kolon üzerine 500µl WBD-2 eklenmiştir ve 8000rpm devirde 1dk santrifüj yapılmıştır. Son işlem bir kere daha tekrar edildikten sonra spin kolon genomik DNA elde edileceği tüpe aktarılmıştır ve üzerine 100-200 µl EBD solüsyonu eklenmiştir. Tüp oda sıcaklığında 1dk inkübe edildikten sonra

8000rpm devirde 1dk santrifüj edilmiştir. Bu işlemler sonunda DNA ekstraktı eppendorf tüpünde toplanmıştır ve bu ekstrakt -20ºC de muhafaza edilmiştir.

3.3.5 DNA Saflığının Belirlenmesi

Numunelerin protein, RNA vb. kontaminasyonu optik yoğunluk OD (Optical density, optik yoğunluk) 260/280 nm oranı gözlemlenerek değerlendirilmiştir. Ekstrakte edilen DNA 1µL alınarak Qubit cihazının lensine eklenmiş ve ölçüm yapılmıştır. OD 260/280 oranı 1.7-2.0 olanlar PZR çalışmalarında kullanılmak üzere -22^{o}C 'de muhafaza edilmiştir.

3.3.6 Primerlerin Hazırlanması

Liyofilize ileri ve geri primerler, bir stok çözelti olarak 100 pmol/µL'lik bir nihai konsantrasyon verecek şekilde nükleaz içermeyen su içinde çözündürüldü. 10 pmol/µL çalışan bir primer solüsyonu elde etmek için 90µL nükleaz içermeyen suya 10µL primer stok solüsyonu eklenmiştir.

3.3.7 PZR Reaksiyon Karışımı

Gerçek zamanlı PZR reaksiyonlarında Sybrgreen 2x qPZR MasterMix (Sansifast, İngiltere) kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı için 10 µL 1x PZR MasterMix, 5 µL forward-reverse primer (0,4 mM), 5 µL örnek DNA kullanılmıştır. QPZR tüplerinde son konsantrasyonu 20 µL olacak şekilde Çizelge 3.5 'de miktarları verilen karışım hazırlanmıştır.

Çizelge 3.5 Bir PZR karışımındaki bileşen, konsantrasyon ve miktar

No.	İçerik	Hacim (µl)
1	2x Taq Master Mix (Vivantis)	10
2	10 pmol/µl Primer F/R	5
5	DNA örneği (en az 0,1 ng)	5
6	Genel toplam	20

(F) = İleri primer **(R)=** Geri primer

3.3.8 PZR Programı

MRSA izolatlarında *femA ve vanA* genini araştırmak için 8'li strip tüpler kullanılarak hazırlanan qPZR tüpleri, gen çoğaltma program bilgileri Çizelge 3.6 'da verilen termal döngüleyiciye (Roche) yerleştirilerek DNA çoğaltma işlemi yapılmıştır. Reaksiyon, Roche 480 Real-Time PZR System (Roche, USA), ilk denatürasyon 95 ºC 5 dk. daha sonra 40 tekrar olacak şekilde 95 ºC 10 sn, 60 ºC 30 sn (okuma), 72 ºC 30 sn (okuma) fragment çoğaltma işlemi yapılmıştır. Gerçek zamanlı PZR işlemi sonucunda CT (cycle of threshold) değerleri elde edilmiş ve kaydedilmiştir.

Çizelge 3.6 PZR programı

No.	Adımlar	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü
1	Ön denatürasyon	95°C	5 dk	1
2	Denatürasyon	95°C	10 sn	40
3	Birleşme	60°C	30 sn	
4	Uzama	72°C	30 sn	

3.4 Benzoil Tiyoüre Bileşiklerinin Antibakteriyel Etkinliğinin Belirlenmesi

Faklı kliniklerden izole edilmiş olan 26 MRSA izolatında 3 farklı Benzoil Tiyoüre bileşiğinin antibakteriyel etkinliği ve minimum inhibitör konsantrasyonlarını belirlemek amacıyla disk difüzyon ve broth mikrodilüsyon testleri yapılmıştır.

3.4.1 Kullanılan Besiyerleri

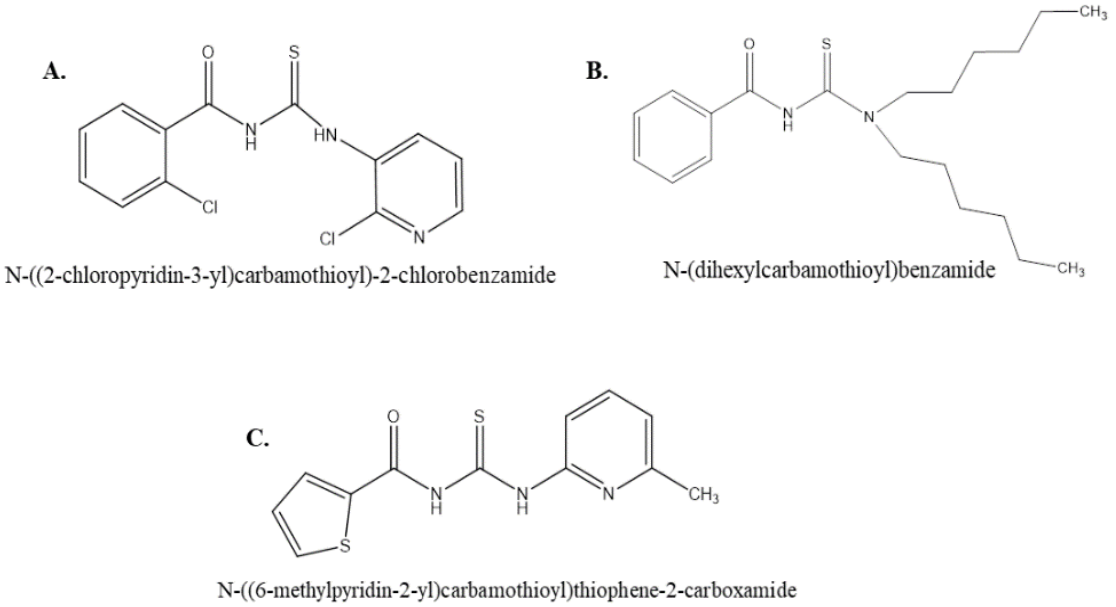
MRSA izolatlarını aktifleştirmek için nutrient agar ve nutrient broth besiyerleri kullanılmıştır. Antibiyotik duyarlılık testlerinde disk difüzyon testi için Mueller-Hinton agar, broth mikrodilüsyon testinde katyon ayarlı Mueller Hinton II broth besiyerleri kullanılmıştır. Tüm besiyerleri üretici firmanın önerileri doğrultusunda hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyerleri sterilite kontrolü için 37^{o}C 'de 18 saat bekletildikten sonra kullanılıncaya kadar +4^{o}C 'de saklanmıştır. Kullanılan bazı besiyerleri listesi Çizelge 3.7' de verilmiştir.

Çizegle 3.7 Kullanılan besiyerleri

No.	Besi yerleri	Kısaltması	Üretici Firma ve Katalog numarası
1	Nutrient Agar	NA	Merck -105450
2	Nutrient Broth	NB	Merck-105443
3	Mueller-Hinton Agar	MHA	Merck-105437
4	Mueller-Hinton II Agar	MHA-II	BBL-296164

3.4.2 Kullanılan Kimyasallar

Yeni sentezlenen 3 farklı benzoil tiyoüre bileşiği N-((2-chloropyridin-3-yl) carbamothioyl)-2-chlorobenzamide (EHL-18: Molekül Ağırlığı: 326.20 gr/mol), N-((6-methylpyridin-2-yl) carbamothioyl) thiophene-2-carboxamide (EHL-32: Molekül Ağırlığı: 277.37 gr/mol) ve N-(dihexylcarbamothioyl) benzamide (EHL-77: Molekül Ağırlığı: 348.55 gr/mol) Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya bölümünden temin edilmiştir. İlk kez bu tez ile bu 3 farklı benzoil tiyoüre bileşiklerinin 10 adet MRSA izolatına karşı antibakteriyel etkinliği araştırılmıştır. Benzoil tiyoüre bileşiklerinin kimyasal yapıları Şekil 3.4 'de verilmiştir.



Şekil 3.4 Benzoil tiyoüre bileşiklerinin kimyasal yapısı

MRSA izolatlarına karşı 3 farklı benzoil tiyoüre bileşiğinin (EHL12, EHL-32, EHL-77) in-vitro antibakteriyel aktivitesini araştırmak amacıyla disk difüzyon ve broth mikrodilüsyon yöntemleri kullanılmıştır. On adet izolat stok besiyerinden nutrient brotha ekilmiş ve 37^{o}C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra antibakteriyel aktivite testlerine başlamadan önce nutrient agara ekilip ve 37^{o}C'de 24 saat inkübe edilmiştir.

3.4.3 Disk Difüzyon Testi

Benzoil tiyoüre bileşiklerinin MRSA izolatlarına karşı antibakteriyel etkinliğini belirlemek için Klinik ve Laboratuvar Standartları Ensititüsü'nün (CLSI-2012a) bildirdiği disk difüzyon testi kullanılmıştır. NA besiyerinde kültüre edilmiş bakteri kolonilerinden, %0,9'luk serum fizyolojik içerisinde bulanıklığı McFarland 0.5'e (~1.5x10^{8}cfu/mL) ayarlanmış bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır.

Bu bakteri süspansiyonlarında kısa süre içerisinde Mueller-Hinton agar yüzeyine sıvap ile yayma ekim yapılmıştır. Takiben daha önce dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözülerek 150mg/mL olacak şekilde hazırlanan maddelerin her birinden 30µl (4.5mg/disk) boş disklere emdirilmiştir ve 37^{o}C'de kurutulmuştur. Diskler steril pens ile bakteri ekimi yapılmış Mueller-Hinton agar yüzeyine yerleştirilmiştir. Araştırmada

metisilin (5µg) diskleri referans antibiyotik olarak kullanılmıştır. Besiyerleri 37ºC'de 20-24 saat inkübe edilmiş ve inkübasyon sonrası 7 mm'den daha büyük olan inhibisyon zonları kaydedilmiştir. Analizler üç paralelli yapılmıştır.

3.4.4 Broth Mikrodilüsyon Testi

Benzoil tiyoüre bileşiklerinin MRSA izolatlarına karşı minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) belirlemek için broth mikrodilüsyon yöntemi (CLSI-2012b) kullanılmıştır. Etken maddeler 150 mg/mL konsantrasyonunda olacak şekilde DMSO ile çözdürülmüştür, mikroplaklarda 75mg/mL ile 0,58 mg/mL doz aralığında iki katlı seyreltme yapılmıştır. Pleytin kuyucuklarına son konsantrasyonu ~$1{,}5x10^5$ kob olacak şekilde MRSA kültürü yapılmıştır.

Çalışmada Gentamisin (Sigma) (0,01 mg/mL) referans antibiyotik olarak kullanılmıştır. Kimyasal bileşikleri içermeyen kuyucuklar üreme kontrolü için, sadece besiyeri ve etken madde içeren kuyucuklarda sterilite kontrolü için kullanılmıştır. Üreme kontrol kuyucuklarından FTS içerisinde 1:1000 sulandırma yapılarak 0.1 mL nutrient agara ekim yapılarak bakteri sayısı belirlenmiştir.

Mikroplakalar 37°C'de 20-24 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda bulanıklığın olmadığı son dilüsyon kuyucukları MİK değeri olarak belirlenmiştir. MİK değeri belirlenen kuyucuklardan ve MİK değerinden daha yoğun kimyasal içeren kuyucuklardan öze ile NA besiyerine ekimler yapılmıştır. Besi yerleri 37ºC de 24 saat inkübe edilmiştir ve üreme durumu değerlendirilerek minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) değerleri belirlenmiştir. Tüm analizler üç paralelli yapılmıştır.

3.5 İstatistik Analiz

Minitab 16 (Minitab Inc. State College, PA) paket programı ile tek yönlü varyans analizi (ANOVA) Disk difüzyon testinden elde edilen verilere uygulanmıştır. Önem düzeyi $p < 0.05$ olarak belirlenmiştir.

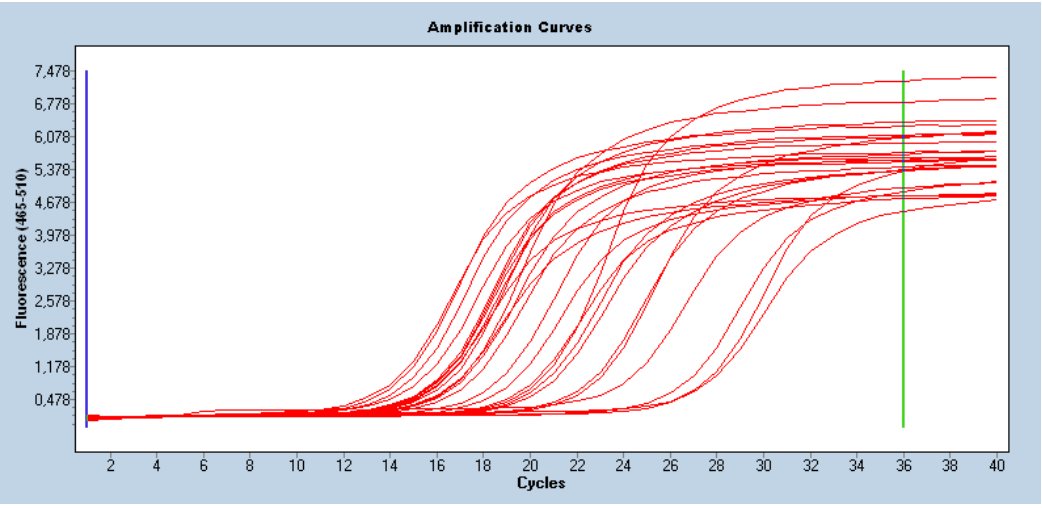
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Farklı klinik sürüntü örneklerinden (yanık, yara, kulak, irin, burun) elde edilen 26 MRSA örneğinin tamamında *S.aureus* bakterisine özgü *femA* geni, 3'ünde vankomisin direnç geni olan *van*A geni qPZR ile belirlenmiştir.

Benzoil tiyoüre bileşiklerinin MRSA izolatlarına karşı antibakteriyel etkinlik testleri sonucunda farklı düzeylerde antibakteriyel aktivite gösterdiği fakat en etkili kimyasalın EHL77 olduğu saptanmıştır.

4.1 MRSA İzolatlarında *femA* ve *vanA* Gen Varlığının QPZR Analiz Bulguları

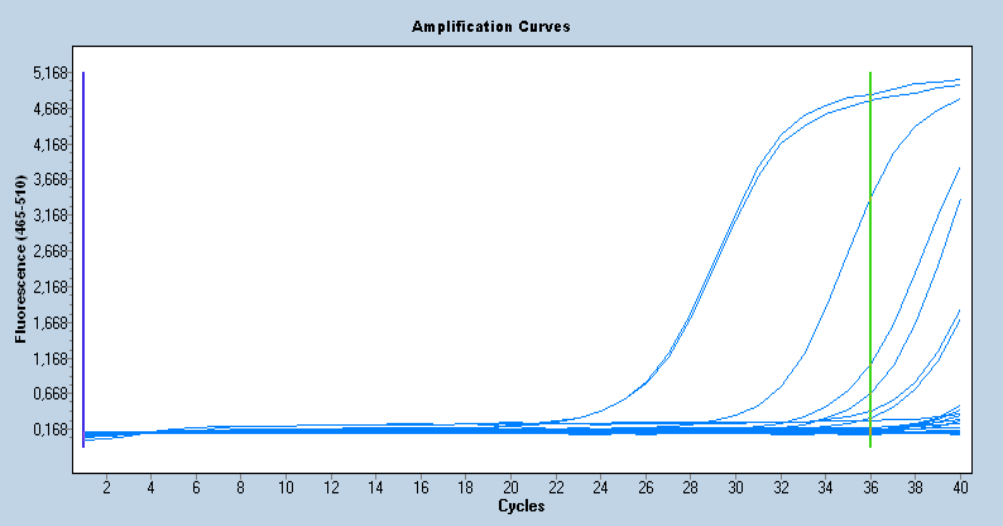
MRSA izolatlarında *femA* ve *vanA* gen varlığını araştırmak için qPZR kullanılmıştır. Yapılan analizler sonucunda 26 izolatın tamamında *femA* genini taşıdığı belirlenmiştir. Elde edilen qPZR CT görüntüsü Şekil 4.1 'te verilmiştir. Chen *et al.* (2003), 178 *Staphylococcus* izolatının tamamında femA gen varlığı doğrulanmıştır. Ayrıca Park *et al.* (1996), *femA* geninin %100 oranında MRSA izolatlarında pozitif olduğunu bildirmiştir. Bunun nedeni, *femA* geninin genellikle MRSA genomunda bulunmasıdır (Maidhof *et al.* 1991, Mehrotra *et al.* 2000). Bu araştırmada tüm MRSA izolatlarında *femA* geni belirlenerek bakteriler moleküler olarak doğrulamıştır. Elde edilen sonuçlar diğer araştırmacıların sonuçlarıyla benzer bulunmuştur.



Şekil 4.1 MRSA izolatlarında *femA* gen taraması qPZR CT görüntüsü

4.2 MRSA İzolatlarında *vanA* Gen Varlığının QPZR Analiz Bulguları

Yapılan analizler sonucunda 26 izolatın 3'ünde *vanA* genini taşıdığı belirlenmiştir. Elde edilen qPZR CT görüntüsü Şekil 4.2 'te verilmiştir. VRSA prevalansı 2006'dan önce %2, 2006–2014'te %5 ve 2015–2020'de %7 ve 2006 ile 2020 yılları arasında VRSA sıklığında 3,5 kat artış gösterdiği bildirilmiştir. VRSA prevalansı Asya'da %5, Avrupa'da %1, Amerika'da %4, Güney Amerika'da %3 ve Afrika'da %16 olarak rapor edilmiştir. VRSA suşları arasında *vanA, vanB* ve *vanC1* pozitif prevalansı sırasıyla %71, %26 ve %4 raporlanmıştır. Bu araştırmada 26 MRSA izolatında *vanA* gen taşıyıcılığı %11,53 olarak belirlenmiştir (Wu *et al.* 2021). Banerjee ve Anupurba (2012) başta ABD'de olmak üzere farklı enfeksiyon modelleriyle Brezilya'da hastaların *vanA* geni barındıran *S. aureus* taşıdığı ve HA enfeksiyonların oluşumunu bildirilmiştir.



Şekil 4.2 MRSA izolatlarında *vanA* gen taraması qPZR CT görüntüsü

4.3 Benzoil Tiyoüre Bileşiklerinin Antibakteriyel Etkinlik Bulguları

Üç farklı benzoil tiyoüre bileşiğinin (EHL12, EHL32 ve EHL77) *vanA* geni içeren izolatlar başta olmak üzere 10 MRSA izolatına karşı disk difüzyon testinde elde edilen zon çapı değerleri ve ANOVA istatistik sonuçları Çizelge 4.1 'te verilmiştir. Bu verilere göre; MRSA izolatlarına karşı 4,5 mg/disk dozunda EHL12 ve EHL32 bileşiklerinin inhibisyon zonu oluşturmadığı fakat EHL77 bileşiğinin farklı düzeyde (13-15 mm) inhibisyon zonu oluşturduğu belirlenmiştir. Elde edilen inhibisyon zon çapları görüntüsü Şekil 4.3 'te verilmiştir.

Çizelge 4.1 Disk difüzyon yöntemine göre bileşiklerin oluşturduğu üreme inhibisyon zon çapları (mm)

S.No	MRSA İzolatları	Kimyasal Maddeler (4.5 mg/disk) ve (Antibakteriyel aktivite zon çapları (mm)			Metisilin (5µg)
		EHL12	EHL32	EHL77	
1	M3	R	R	13 ± 2^{A}	R
2	M5	R	R	$14\pm1,7^{A}$	R
3	M7	R	R	13 ± 2^{A}	R
4	M8	R	R	13 ± 2^{A}	R
5	M11	R	R	$12\pm1,7^{B}$	R
6	M12	R	R	$13\pm0,5^{A}$	R
7	M13	R	R	$12\pm1,5^{B}$	R
8	M20	R	R	$14\pm1,7^{A}$	R
9	M22	R	R	$13\pm1,5^{A}$	R
10	M25	R	R	$14\pm1,5^{A}$	R

R: Dirençli. Değerler; ortalama ± standart sapma **A-B:** Aynı sütundaki gruplar arasındaki farklılıklar, **p**<0.05 düzeyinde önemli.



Şekil 4.3 Benzoil tiyoüre bileşiklerinin MRSA üreme inhibisyon zon görüntüsü

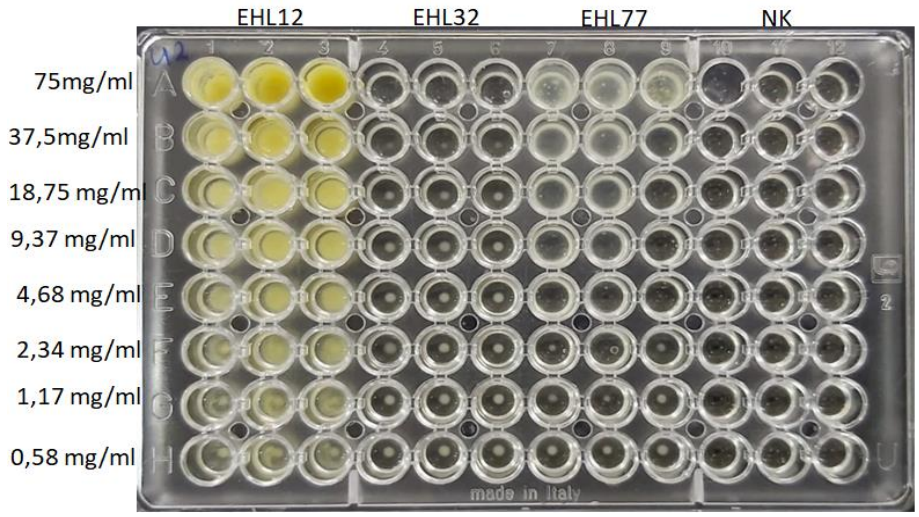
4.4 Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Test Bulguları

Bileşiklerin *vanA* geni içeren 3 MRSA izolatı (M11, M12 ve M13) üzerine minimum inhibitör konsantrasyonu belirlemek amacıyla broth mikrodilüsyon testi yapılmıştır. Şekil 4.4' te broth mikrodilüsyon testi pleyt görüntüsü verilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2' de verilmiştir. Bu sonuçlara göre, EHL12 ve EHL32 bileşiklerinin 75 mg/mL dozunda, EHL77 bileşiğinin 2,34 mg/mL ve 4,68 mg/ml dozlarında MİK düzeylerine sahip olduğu belirlenmiştir. MRSA'ya karşı komplekslerden en düşük MİK değeri EHL77 kimyasalında belirlenmiştir. MİK testinde elde edilen bu sonuçlar disk difüzyon sonuçları ile uyumlu bulunmuştur.

Çizelge 4.2 Komplekslerin broth mikrodilüsyon yöntemine göre minimum inhibitör konsantrasyon değerleri (MİK)

S.No	MRSA İzolatları	Kimyasal Maddeler (mg/mL)		
		EHL12 (mg/mL)	L32 (mg/mL)	L77(mg/mL)
1	M11	75	75	4,68
2	M12	75	75	2,34
3	M13	75	75	4,68

***** Genişlemiş Spektrumlu β-Laktamaz üreten, ****** Metisilin dirençli



Şekil 4.4 Broth mikrodilüsyon testi pleyt görüntüsü

Bileşiklerin bakteriler üzerine minimum bakterisidal konsantrasyonu belirlemek amacıyla broth mikrodilüsyon pleytinin kuyucuklarından NA ekim yapılmıştır ve petriler 37^{o}C de 18-24 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda bakteri üremesinin görülmediği kuyucuklar minimum bakterisidal konsantrasyon olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre, EHL12 ve EHL 32 bileşiğinin 75 mg/mL dozunda, EHL77 bileşiğinin 9,37mg/mL dozunda MBK düzeylerine sahip olduğu belirlenmiştir. MRSA bakterilerine karşı tüm kompleksler içerisinde en düşük MBK değeri EHL77 kimyasalında belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar MİK sonuçları ile uyumlu bulunmuştur.

Çizelge 4.3 Komplekslerin broth mikrodilüsyon yöntemine göre minimum bakterisidal konsantrasyon değerleri (MBK)

S.No	**MRSA İzolatları**	**Kimyasal Maddeler**		
		EHL12(mg/mL)	**EHL32(mg/mL)**	**EHL77(mg/mL)**
1.	**M11**	75	75	9,37
2.	**M12**	75	75	9,37
3.	**M13**	75	75	9,37

Limban *et al*. (2011) yaptıkları bir araştırmada, yeni sentezledikleri benzoil tiyoüre türevlerinin Gram pozitif ve Gram negatif bazı bakterilere karşı antibakteriyel

aktivitelerinin olduğunu bildirmişlerdir. Kurt *et al*. (2009), yaptıkları araştırmada yeni benzoil tiyoüre türevleri, (E)-N-[(2-benzamidometilenamino) etilkarbamotioil benzamid H3L′, N-(1-(3-benzoiltioureido) propan-2-ilkarbamotioil) benzamid H4L", (E)-N-[4-(benzamidometilenamino) fenilkarbamotioil benzamid H3L‴ sentezlenmiş ve in vitro antibakteriyel ve antifungal aktivite açısından değerlendirilmiştir. Bileşik H3L antibakteriyel aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Binzet *et al*. (2006), N,N-di-n-propyl-N′-(2-chlorobenzoyl)thiourea (HL1) (1), N,N-diphenyl-N′-(2-chlorobenzoyl)thiourea (HL2) (2) bileşiklerinin Ni, Co, Cu, Zn, Pt, Cd ve Pd komplekslerini sentezlemiş, karakterize etmiş ve antibakteriyel etkinliğini araştırmıştır. Sentezlenen tiyoüre bileşiklerinin bazı bakterilerin üremesini 43 ile 224 µg/cm3 arasında değişen MIK değerleriyle inhibe ettiğini kaydetmiştir. Vedavathi *et al*. (2017) tarafından yapılan bir çalışmada sentezlenen tüm tiyoüre bileşiklerin *S. aureus*, *P. aeruginosa*, ve *E. coli' ye* karşı antibakteriyel aktiviteleri ve minimum inhibitör konsantrasyonları açısından değerlendirilmiştir. Disk difüzyon testine göre 4 ile 21.2 mm aralığında inhibisyon zonu ve dilüsyon testine göre 19 ile 40 µg/mL aralığında MIK değerlerine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Uygulanan dozlara bağlı olarak sonuçlar bu araştırma sonucuyla uyumlu bulunmuştur.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasıyla çeşitli sürüntü örneklerinde *S.aureus* ve MRSA prevalansı, MRSA izolatlarının *femA* ve *vanA* gen taşıyıcılığı ve 3 yeni benzoil tiyoüre bileşiğinin MRSA hastane izolatları üzerine antibakteriyel etkinliği araştırılmıştır.

MRSA izolatlarında *femA* ve *vanA* gen varlığını araştırmak için qPZR kullanılmıştır. Yapılan analizler sonucunda 26 izolatın tamamında *femA* genini taşıdığı ve 3 izolatın vanA genini taşıdığı belirlenmiştir. Üç farklı benzoil tiyoüre bileşiğinin (EHL12, EHL32 ve EHL77) vanA geni içeren izolatlar başta olmak üzere 10 MRSA izolatına karşı yapılan disk difüzyon testinde elde edilen değerlere göre; MRSA izolatlarına karşı 4.5 mg/disk dozunda EHL12 ve EHL32 bileşiklerinin inhibisyon zonu oluşturmadığı fakat EHL77 bileşiğinin farklı düzeyde (13-15 mm) inhibisyon zonu oluşturduğu saptanmıştır.

Bileşiklerin *vanA* geni içeren 3 MRSA izolatı (M11, M12 ve M13) üzerine minimum inhibitör konsantrasyonu belirlemek amacıyla broth mikrodilüsyon testi yapılmıştır. Test sonuçlarına göre, EHL12 ve EHL32 bileşiklerinin 75 mg/mL dozunda, EHL77 bileşiğinin 2,34mg/mL ve 4,68mg/ml dozlarında MİK düzeylerine sahip olduğu belirlenmiştir. MRSA bakterilerine karşı tüm kompleksler içerisinde en düşük MIC ve MBK değeri EHL77 kimyasalında tespit edilmiştir.

Sonuç olarak MRSA'nın neden olduğu enfeksiyon, halk sağlığı için küresel bir tehdittir. Vankomisin, MRSA enfeksiyonlarının tedavisi için birinci basamak ilaçlardan biri olmaya devam etmektedir. Ancak son yıllarda dünyada vankomisine tam dirençli S. *aureus* izolatları ortaya çıkmıştır. Antibiyotik direncinin ortaya çıkmasını ve daha fazla yayılmasını önlemek için antibiyotik politikası titiz bir şekilde izlenmeli, nozokomiyal ilişkili enfeksiyonların özellikle vankomisin direncinin düzenli sürveyansı yapılmalıdır. Antibiyotik direncine karşı yeni kimyasalların sentezi ve invivo deneylerle doğrulama çalışmaları arttırılmalıdır.

KAYNAKLAR

Abidatul, A. A., Nur Farhanah, N. M. J., Noramirah, R., Ling S., New, C. Y., and Son, R. 2018. Prevalence and classification of high antimicrobial-resistant *Staphylococcus aureus* in wastewater eluted from poultry slaughterhouse. Food Research, 2(2): 201-207.

Alam, S. M. S., Kalam, M. A., Munna, M. S., Munshi, S. K., and Noor, R. 2014. Isolation of pathogenic microorganisms from burn patients admitted in Dhaka Medical College and Hospital and demonstrating their drug-resistance traits. Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 4(5): 402-407.

Alhadeethi, S. K. A. 2022. Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus* İzolatlarında *mecA* Gen Varlığı ve Bazı Benzoil Tiyoüre Bileşiklerinin İn Vitro Antibakteriyel Aktivitesinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 79 sayfa, Çankırı.

Al-Ugaili, D. 2013. Bacteriological and Genetic Studies on Oxacillin Resistant Staphylococcus aureus. Doctoral Thesis, Al- Nahrain University, 85 Sayfa, Baghdad.

Aung, M. S., San, T., Aye, M. M., Mya, S., Maw, W. W., Zan, K. N., and Kobayashi, N. 2017. Prevalence and genetic characteristics of *Staphylococcus aureus* and Staphylococcus argenteus isolate boring Panton-Valentine leukocidin, enterotoxins, and TSST-1 genes from food handlers in Myanmar. Toxins, 9(8): 241.

Arnaudov, A., and Kostova, Z. 2015. Dialysable leukocyte extracts in immunotherapy. Biotechnology and Biotechnological Equipment, 29(6): 1017-1023.

Baba, T., F. Takeuchi, M. Kuroda, H. Yuzawa, K. I. Aoki, A. Oguchi, Y. Nagai, N. Iwama, K. Asano, T. Naimi, H. Kuroda, L. Cui, K. Yamamoto, and K. Hiramatsu. 2002. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. Lancet, 359: 1819-27.

Bagdonas, R., Tamelis, A. and Rimdeika, R. 2003. *Staphylococcus aureus* infection in the surgery of burns. Medicina, 39(11): 1078-1081.

Banerjee, T., Anupurba, S. 2012. Colonization with vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* strains containing the vana resistance gene in a tertiary-care center in north India. Journal of Clinical Microbiology, 50(5): 1730-1732.

Barber, M. and Rozwadowska-Dowzenko, M. 1948. Infection by Penicillin-Resistant *Staphyloeoeci*. Lancet, 641-4.

Bassetti, M., Trecarichi, E. M., Mesini, A., Spanu, T., Giacobbe, D. R., Rossi, M.and Viscoli, C. 2012. Risk factors and mortality of healthcare-associated and community-acquired staphylococcus aureus bacteremia. Clinical Microbiology and Infection, 18(9): 82862-869.

Becker, K., Harmsen, D., Mellmann, A., Meier, C., Schumann, P., Peters, G. and Von Eiff, C. 2004. Develop and evaluate a quality-controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA-based identification of *Staphylococcus* species. Journal of Clinical Microbiology, 42(11): 4988-4995.

Betts, J. W., Hornsey, M., La Ragione, R. M. 2018. Novel antibacterials: alternatives to traditional antibiotics. In Advances in microbial physiology, (Vol. 73: pp. 123-169).

Bien, C.G., Vincent, A., Barnett, M. H., Becker, A. J., Blümcke, I., Graus, F. and Sutton, I. 2012. Immunopathology of autoantibody-associated encephalitides: clues for pathogenesis. Brain, 135(5): 1622-1638.

Binzet, G., Arslan, H., Flörke, U., Külcü, N., Duran, N. 2006. Synthesis, characterization, and antimicrobial activities of transition metal complexes of N, N-dialkyl-N′-(2-chlorobenzene) thiourea derivatives. Journal of Coordination Chemistry, 59(12): 1395-1406.

Braoios, A., Fluminhan, A., Pizzolitto, A. C. 2009. Multiplex PZR use for *Staphylococcus aureus* identification and oxacillin and mupirocin resistance evaluation. Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences, 30(3): 303-307.

Brooks, G. F., Butel, J. S., Ornston, L. N., Jawetz, E., Melnick, J. L., and Adelberg, E. A. (1996). Flora mikroba normal tubuh manusia. Mikrobiologi kedokteran. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC, 188-92.

Brown, D. F., Edwards, D. I., Hawkey, P. M., Morrison, D., Ridgway, G. L., Towner, K. J. and Wren, M. W. 2005. Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 56(6): 1000-1018.

Burdette, S. D., Watkins, R. R., Wong, K. K., Mathew, S. D., Martin, D. J., and Markert, R. J. 2012. *Staphylococcus aureus* pyomyositis compared with non-*Staphylococcus aureus* pyomyositis. Journal of Infection, 64(5): 507-512.

Catozzi, C., Sanchez Bonastre, A., Francino, O., Lecchi, C., De Carlo, E., Vecchio, D., Ceciliani, F. 2017. The microbiota of water buffalo milk during mastitis. PLoS One, 12(9): e0184710.

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

Chen, Z., Fan, X., and Lü, X. 2003. Combination PZR of *mecA* and *femA* genes for detection of MRSA. Sichuan University. Medical Science Edition, 34(4): 663-666.

Cheng, G., Cho, J. S., Pietras, E. M., Garcia., N. C., Ramos, R. I., Farzam, D. M., and Monroe, H. R. 2010. IL-17 is essential for host defense against cutaneous *Staphylococcus aureus* infection in mice. The Journal of Clinical Investigation, 120(5): 1762-1773.

Clatworthy, A. E., E. Pierson, and Hung, D. T. 2007. Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy, 3: 541-8

Co, E. M., Keen III, E. F., Aldous, W. K. 2011. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a combat support hospital in Iraq. Military Medicine, 176(1): 89-93.

Crago, B., Ferrato, C., Drews, S. J., Svenson, L. W., Tyrrell, G. and Louie, M. 2012. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant S. aureus (MRSA) in food samples associated with foodborne illness in Alberta, Canada, from 2007 to 2010. Food Microbiology, 32(1): 202-205.

Cueto, M., Pascual, A., and Pahissa, A. (2009). Microbiología y Patogenia de las infecciones producidas por Staphylococcus aureus. Infecciones producidas por Staphylococcus aureus, pp15-29.

Cuny C., Wieler L. H. and Witte W. 2015. Livestock-associated MRSA: the impact on humans. Antibiotics, 4: 521–543.

David, M. Z. and Daum, R. S. 2010. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. Clinical Microbiology Reviews, 23(3): 616-687.

De Kraker, M. E., Wolkewitz, M., Davey, P. G. and Grundmann, H. 2011. Clinical Impact of Antimicrobial Resistance in European Hospitals: Excess Mortality and Length of Hospital Stay Related to Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections. Antimicrob. Agents Chemother, 55(4): 1598–1605.

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

Ducel, G., Fabry, J., and Nicolle, L. (2002). Prevention of hospital-acquired infections: a practical guide. Preventing hospital-acquired diseases: a practical guide, (Ed. 2).

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

Farzana, K., Rashid, Z., Akhtar, N., Abdul sattar; Alikhan, J. and Nasir, B. 2008. Nasal carriage of *Staphylococci* in health care workers: antimicrobial susceptibility profile. Pak. J. Pharm. Sci. 21:290-294.

Feil, E. J., Cooper, J. E., Grundmann, H., Robinson, D. A., Enright, M. C., Berendt, T., Day, N. P. 2003. How clonal is *Staphylococcus aureus*. Journal of Bacteriology, 185(11): 3307-3316.

Foster, T. J. 2005. Immune evasion by *staphylococci*. Nature Reviews Microbiology, 3(12): 948-958.

Garcia-Alvarez, L., Dawson, S., Cookson, B. and Hawkey, P. 2012. Working across the veterinary and human health sectors. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 67(suppl_1): i37-i49.

Gitau, W., Masika, M., Musyoki, M., Museve, B. and Mutwiri, T. 2018. Antimicrobial susceptibility pattern of *Staphylococcus aureus* isolates from clinical specimens at Kenyatta National Hospital. BMC research notes, 11(1): 226.

Goffin, C. and Ghuysen, J. M. 1998. Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 1079-1093.

Gordon, R. J. and Lowy, F. D. 2008. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. Clinical Infectious Diseases, 46 (Supplement_5): S350-S359.

Gould, I. M., David, M. Z., Esposito, S., Garau, J., Lina, G., Mazzei, T. and Peters, G. 2012. New insights into meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pathogenesis, treatment, anand resistantesistanceJ. Antimicrob. Agents, 39: 96-104.

Götz, F., Bannerman, T., Schleifer, K. H. (2006). The genera *staphylococcus* and micrococcus. The Prokaryotes, 5.

Grema, H. A., Geidam, Y. A., Gadzama, G. B., Ameh, J. A. and Suleiman, A. 2015. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA): a review. Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, 3(2): 79-98.

Hamdan-Partida, A., Sainz-Espuñes, T., and Bustos-Martínez, J. 2010. Characterization and persistence of *Staphylococcus aureus* strains isolated from healthy carriers' anterior nares and throats in a Mexican community. Journal of Clinical Microbiology, 48(5): 1701-1705.

Haque, M., Sartelli, M., McKimm, J. and Bakar, M. A. 2018. Healthcare-associated infections–an overview. Disease and Drug Resistance, 11: 2321.

Hiramatsu, K., Katayama, Y., Yuzawa, H., Ito, T. 2002. Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Int. J. Med. Microbiology, 292: 67-74.

Hodille, E., Cuerq, C., Badiou, C., Bienvenu, F., Steghens, J. P., Cartier, R. and Diep, B. A. 2016. Delta hemolysin and phenol-solublemoduless induce maalpha-hemolysinion but not alpha-hemolysin panton-valentine leukocidin—Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 6: 180.

Holla, B. S., Mahalinga, M., Karthikeyan, M. S., Akberali, P. M., Shetty, N. S. 2006. Synthesis of some novel pyrazole [3,4-d] pyrimidine derivatives as potential antimicrobial agents. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 14(6): 2040-2047.

Hummerjohann, J., Naskova, J., Baumgartner, A. and Graber, H.U. 2014. Enterotoxin-producing Staphylococcus aureus genotype B is a significant contaminant in Swiss, raw milk cheese. Journal of Dairy Science, 97(3): 1305-1312.

Iyer, A. P., Kumosani, T. A. 2011. PCR-based detection of nosocomial infection causing MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*). In 2nd International Conference on Biotechnology and Food Science IPCBEE (Vol. 7).

Jawets M., Adelbergs k. and Danova S. 2013. Medical microbiology. 25th edition. McGraw-Hill companies.The USA. Chapter 13: 185-193.

Kamal, R. M., Bayoumi, M. A. and El Aal, S. F. A. 2013. MRSA detection in raw milk, some dairy products, and hands of dairy workers in Egypt, a mini-survey. Food Control, 33(1): 49-53

Karmakar, A., Dua, P. and Ghosh, C. 2016. Biochemical and Molecular Analysis of *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates from Hospitalized Patients. Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology, 2016: 1-7.

Kaul, D. R., Collins, C. D., Hyzy, R. C. 2008. New developments in antimicrobial use in sepsis. Curr. Pharm. Des, 14(9): 1912-1920.

Kechrid, A., Pérez-Vázquez, M., Smaoui, H., Hariga, D.; Rodríguez-Baños, M., Vindel, A. and Del Campo, R. 2011. Molecular analysis of community-acquired methicillin-susceptible and resistant *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bacteremia and osteomyelitis infections in children from Tunisia. Clinical Microbiology and Infection, 17(7): 1020-1026.

Khan, H. A., Ahmad, A. and Mehboob, R. 2015. Nosocomial infections and their control strategies. Asian pacific journal of tropical biomedicine, 5(7): 509-514.

Kim, H. K., Falugi, F., Missiakas, D. M. and Schneewind, O. 2016. Peptidoglycan-linked protein A promotes T cell-dependent antibody expansion during Staphylococcus aureus infection. Proceedings of the National Academy of Sciences, 113(20): 5718-5723.

Kim, J. 2009. Understanding the evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clinical Microbiology Newsletter, 31(3): 17-23.

Kirkpatrick, C. H. 2000. "Transfer factors: Identification of conserved sequences in transfer factor molecules." Molecular medicine (Cambridge, Mass.), 6 (4): 332-341.

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

Krakauer, T. 2013. Update on *staphylococcal* superantigen-induced signaling pathways and therapeutic interventions. Toxins, 5(9): 1629-1654

Kreienbuehl, L., Charbonney, E. and Eggimann, P. 2011. Community-acquired necrotizing pneumonia due to methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* secreting Panton-Valentine leukocidin: a review of case reports. Annals of Intensive Care, 1(1): 52.

Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., Baba, T., Yuzawa, H., Kobayashi, I., Hiramatsu, K. 2001. Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. The Lancet, 357(9264): 1225-1240.

Kurt, G., Sevgi, F., Mercimek, B. 2009. Synthesis, characterization, and antimicrobial activity of new benzoyl thiourea ligands. Chemical Papers, 63(5): 548-553.

Leboffe, M. J., and Pierce, B. E. 2011. Photographic Atlas for the microbiology laboratory. 4th edition. USA: Douglas N. Morton.

Lee, E. C. 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: The Deadly Superbug. The Journal of Young Investigators. 1-9. Long-term care facilities. Reviews in Medical Microbiology, 19: 47–55

Li, X., Xiong, Y., Fan, X., Zhong, Z., Feng, P., Tang, H., and Zhou, T. 2008. A study of the regulating gene of femA from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. Journal of International Medical Research, 36(3): 420-433.

Limban, C., Missir, A., Chirita, I., Nitulescu, G., Caproiu, M., Chifiriuc, M., and Israil, A. 2011. Synthesis and antimicrobial properties of new 2-((4-methyl phenoxy) methyl) benzoyl thioureas. Chemical Papers, 65(1): 60-69.

Lindsay, J. A. (2010). Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus*. International Journal of Medical Microbiology, 300(2-3), 98-103.

Lindsay, J. A., and M. T. Holden. 2004. *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome. Trends Microbiol, 12: 378-85.

Lindsay, J. A., and M. T. Holden. 2006. Understanding the rise of the superbug: Investigation of the evolution and genomic variation of *Staphylococcus aureus*. Funct Integr Genomics, 6: 186-201.

Liu Y., Wang H., Du N., Shen E., Chen H. and Niu J. 2009. Molecular evidence for the spread of two major methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones with a unique geographic distribution in Chinese hospitals. Antimicrob. Agents Chemother. 53: 512–518. 10.1128/aac.00804-08

Loomba, P. S., Taneja, J. and Mishra, B. 2010. Methicillin and vancomycin-resistant S. aureus in hospitalized patients. Journal of Global Infectious Diseases, 2(3): 275.

Lozano, C., Rezusta, A., Gómez, P., Gómez-Sanz, E., Báez, N., Martin-Saco, G. and Torres, C. 2011. High prevalence of spa types associated with the clonal lineage CC398 among tetracycline-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in a Spanish hospital. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 67(2): 330-334.

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. 2006. Brock biology of microorganisms (Vol. 11, p. 136). Upper Saddle River, N. J.: Pearson Prentice Hall.

Maidhof, H., Reinicke, B., Blumel, P., Berger-Bachi, B. and Labischinski, H. 1991. Fema, which encodes a factor essential for the expression of methicillin resistance, affects the glycine content of peptidoglycan in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains. Journal of Bacteriology, 173: 3507-3513.

Majeed, Z., Qudir Javid, M., Nawazish, S., Ahmad, B., Hassan Faiz, A. U., Baig, A., Al Ali, A. 2022. Clinical Prevalence, Antibiogram Profiling and Gompertz Growth Kinetics of Resistant *Staphylococcus* epidermidis Treated with Nanoparticles of Rosin Extracted from Pinus roxburghii. Antibiotics, 11(9): 1270.

Manandhar, S., Singh, A., Varma, A., Pandey, S. and Shrivastava, N. 2018. Biofilm Producing Clinical *Staphylococcus aureus* Isolates Augmented Prevalence of Antibiotic Resistant Cases in Tertiary Care Hospitals of Nepal. Frontiers in Microbiology, 9: 2749.

Markey, B. K., Leonard, F. C., Archambault, M. Cullinane, A. and Maguire, D. 2014. Clinical Veterinary Microbiology. 2nded. Mosby Elsevier. Pp, 105-120.

Matsushima, A., Kuroki, Y., Nakajima, S., Sakai, T., Kojima, H. and Ueyama, M. 2015. Low level of TSST-1 antibody in burn patients with toxic shock syndrome caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of Burn Care and Research, 36(3): e120-e124

Mediavilla, J. R., Chen, L., Mathema, B. and Kreiswirth, B. N. 2012. Global epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). Current Opinion in Microbiology, 15(5): 588-595.

Mehrotra, M., Wang, G. and Johnson, W. M. 2000. Multiplex PZR for detecting genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. Journal of Clinical Microbiology, 38: 1032-1035.

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

Mohanasoundaram, K. M. and Lalitha, M. K. 2008. Comparison of phenotypic versus genotypic methods in detecting methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Indian Journal of Medical Research, 127(1): 78.

Moroni P., Pisoni G., Cremonesi P. and Castiglioni B. 2011. *Staphylococcus* p. 308- 317 In LIU Dongyou (ed), Molecular Detection of Human Bacterial Pathogens. Taylor and Francis Group, U.S. Government works.

Muller, E., Takeda, S., Shiro, H., Goldmann, D. and Pier, G.B. 1993. Occurrence of capsular polysaccharide/adhesion among clinical isolates of coagulase-negative *staphylococci*. J. Infect. Dis. 168: 1211-8.

Neugebauer, U., Große, C., Bauer, M., Kemper, B., Barroso-Pena, A., Bauwens, A., ... Mellmann, A. 2012. From Infection to Detection: Imaging *S. aureus*–host interactions. Biomedical Engineering/Biomedizinische Technik, 57(SI-1-Track-B).

O'gara, J. P. 2017. Into the storm: Chasing the opportunistic pathogen *Staphylococcus aureus* from skin colonization to life- threatening infections. Environmental Microbiology, 19(10): 3823-3833.

Onanuga, A. and Temedie, T.C. 2011. Nasal carriage of multi-drug resistant *Staphylococcus aureus* in healthy inhabitants of Amassoma in Niger delta region of Nigeria. Afr. Health Sci, 11(2): 176-81.

Oniciuc, E. A., Cerca, N. and Nicolau, A. I. 2016. Compositional analysis of biofilms formed by Staphylococcus aureus isolated from food sources. Frontiers in microbiology, 7, 390.

Palavecino, E. 2004. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. Clinics in Laboratory Medicine, 24(2): 403-41 8.

Park, J. E., Kim, T. S., Park, S. S., Kim, E. R., Kim, I. S., Ann, I. Y., Park, H. H. 1996. Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by In Vitro Enzymatic Amplification of MecA and FemA Gene. Korean Journal of Pediatric Infectious Diseases, 3(2): 133-138.

Paterson, G. K., Harrison, E. M. and Holmes, M. A. 2014. The emergence of mecC methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Trends in Microbiology, 22(1): 42-47.

Périchon, B., Courvalin, P. 2009. *VanA*-type vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 53(11): 4580-4587.

Plata, K., Rosato, A. and Wegrzyn, G. 2009. *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: an overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. Acta Biochemica Polonica, 56(4): 597-612.

Rello, J. N., Sole-Violan, J., Sa-Borges, M., et al. Garnacho-Montero, J.; Muñoz, E.; Sirgo, G.; Olona, M.; Diaz, E. 2005 Pneumonia caused by oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* treated with glycopeptides. Crit. Care Med, 33: 1983–1987.

Reshi, A. A., Husain, I., Bhat, S. A., Rehman, M. U., Razak, R., Bilal, S. and Mir, M. R. 2015. Bovine mastitis is evolving disease and its impact on the dairy industry. Int.J. Curr. Res. Rev, 7(5): 48-55.

Reynolds, P. E. 1989. Structure, biochemistry, and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 8:943-950.

Robinson, D. A. and Enright, M. C. 2004. Multilocus sequence typing and the evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Clin Microbiol Infection, 10(2): 92-97.

Rodriguez-Fernandez, E., Manzano, J. L., Benito, J. J., Hermosa, R., Monte, E., Criado, J. J. (2005). Thiourea, triazole, and thiadiazole compounds and their metal complexes as antifungal agents. Journal of Inorganic Biochemistry, 99(8): 1558-1572.

Russo, A., Concia, E., Cristini, F., De Rosa, F. G., Esposito, S., Menichetti, F., Bassetti, M. 2016. Current and future trends in antibiotic therapy of acute bacterial skin and skin-structure infections. Clinical Microbiology and Infection, 22: 27-S36.

Ruzin, A., Lindsay, J. and Novick, R. P. 2001. Molecular genetics of SaPI1--a mobile pathogenicity island in Staphylococcus aureus. Mol Microbiol, 41(2): 365-77.

Saeed, A., Flörke, U. 2007. 1-(3-Methylbenzoyl)-3-(2-methylphenyl) thiourea. Acta Crystallographica Section E: Structure Reports Online, 63(3): 1390-1392.

Salmenlinna, S., Lyytikäinen, O., Vuopio-Varkila, J. 2002. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Finland. Emerging Infectious Diseases, 8(6): 602.

Schelin, J., Wallin-Carlquist, N., Thorup Cohn, M., Lindqvist, R. and Barker, G.C. 2011. The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. Virulence, 2(6): 580-592.

Schmidt, A., Bénard, S. and Cyr, S. 2015. Hospital cost of staphylococcal infection after cardiothoracic or orthopedic operations in France: a retrospective database analysis. Surg. Disease, 16: 428–435. 10.1089/sur.2014.045

Shehabi, A. A., Abu- Yousef, R., Badran, E., Al- Bakri, A. G., Abu- Qatouseh, L. F. and Becker, K. 2013. Significant characteristics of SStaphylococcusaureus colonizing Jordanian infants. Pediatrics International, 55(3): 300-304.

Skurnik, D., Merighi, M., Grout, M., Gadjeva, M., Maira-Litran, T., Ericsson, M., Goldmann, D. A., Huang, S. S., Datta, R., Lee, J. C. and Pier, G. B. 2010. Animal and human antibodies to distinct Staphylococcus aureus antigens mutually neutralize opsonic killing and protection in mice. Journal of Clinical Investigation, 120: 3220-33.

Temesgen, Z. 2011. Mayo clinic infectious diseases board review. Oxford University Press.

Thomas, C. M., and K. M. Nielsen. 2005. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. Nat Rev Microbiol, 3: 711- 21.

Tong, S. Y., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L. and Fowler, V. G. 2015. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. Clinical Microbiology Reviews, 28(3): 603-661.

Ton-That, H., Labischinski, H., Berger-Bächi, B., Schneewind, O. 1998. Anchor structure of *staphylococcal* surface proteins: III. Role of the FemA, FemB, and FemX factors in anchoring surface proteins to the bacterial cell wall. Journal of Biological Chemistry, 273(44): 29143-29149.

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

Vedavathi, P., Sudhamani, H., Raju, C. N. 2017. Synthesis and antimicrobial activity of new urea and thiourea derivatives of (2′-(1H-tetrazol-5-yl) biphenyl-4-yl) methenamine Research on Chemical Intermediates, 43(5): 3251-3263.

Voss, A., Loeffen, F., Bakker, J., Klaassen, C., and Wulf, M. 2005. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. Emerging Infectious Diseases, 11(12): 1965.

Warden, S. E., Kauffman, L. K. and Smith, T. C. 2012. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in central Iowa wildlife. Journal of Wildlife Diseases, 48(4): 1069- 1073.

Weese, J. S., Reid-Smith, R., Rousseau, J. and Avery, B. 2010. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) contamination of retail pork. The Canadian Veterinary Journal, 51(7): 749

Wu, Q., Sabokroo, N., Wang, Y., Hashemian, M., Karamollahi, S., and Kouhsari, E. (2021). Systematic review and meta-analysis of the epidemiology of vancomycin-resistance *Staphylococcus aureus* isolates. Antimicrobial Resistance & Infection Control, 10: 1-13.

Wright, G. D. 2010. Q&A: Antibiotic resistance: where does it come from, and what can we do about it? BMC Biol, 8: 123.

Xiao, Y. H., Giske, C. G., Wei, Z. Q., Shen, P., Heddini, A. and Li, L. J. 2011. Epidemiology and characteristics of antimicrobial resistance in China. Drug Resistance Updates, 14(4-5): 236-250.

Zahraa K. L. 2019. Determination of Antimicrobial Resistant blaZ and mecA genes and Immunotherapeutic Efficacy of Transfer factor to Staphylococcus aureus isolated from Humans and Buffalo.University of Baghdad, Veterinary Medicine.

Zeba, B. 2005. Overview of b-lactamase incidence on bacterial drug. African Jo Biotechnolo, 4 (13): 1559-1562.

Zhou, J., Kong, C., Feng, L., Yu, J., Jia, Y. and Wang, L. 2016. Preparation and characterization of transfer factor specific to Staphylococcus aureus in vitro. Appl. Biochem, 62(1): 112-20.

Zhou, T., Li., X., Xiong, Y., Fan, X., Zhong, Z., Feng, P., Tang, H. 2008. A study of the regulating gene of femA from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. Journal of International Medical Research, 36(3): 420-433.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı: Maysam ALALOOSI

Eğitim

Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi
	Fen Bilimleri Enstitüsü
	Biyoloji Anabilim Dalı 2020-Halen
Lisans	Tikrit Üniversitesi
	Veteriner Fakültesi 2009-2013

Akademik Aktiviteler

1. ALALOOSI, M. 2021. Adipsin and their role in disease. Çankırı Karatekin Üniversitesi, Fen Bilimleri Ünsititüsü Biyoloji Anabilim Dalı. Yüksek lisans semineri. Çankırı/Türkiye.