ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARKLI KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN METİKLİNE DİRENÇLİ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (MRSA) SUŞLARINDA PVL TOKSİNİN MOLEKÜLER ÇALIŞMASI VE TESPİTİ

Safauldeen Abdulkareem Mousa MOUSA

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2023

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Safauldeen Abdulkareem Mousa MOUSA tarafından hazırlanan "**Farklı Klinik Örneklerden İzole Edilen Metikline Dirençli *Staphylococcus Aureus* (Mrsa) Suşlarında PVL Toksinin Moleküler Çalışması Ve Tespiti"** adlı tez çalışması 01/02/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Zehra KARAHAN

Eş danışman : Dr. Öğr. Üyesi Yasir Hammad Hamada KHALAF

Jüri Üyeleri :

Başkan : Prof. Dr. Özcan ÖZKAN
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Zehra KARAHAN
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Naime ULUĞ
Fizyoterapi ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı
Atılım 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 "Farklı Klinik Örneklerden İzole Edilen Metikline Dirençli Staphylococcus Aureus (Mrsa) Suşlarında PVL Toksinin Moleküler Çalışması ve Tespiti" 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 (01/02/2023).

Safauldeen Abdulkareem Mousa MOUSA

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FARKLI KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN METİKLİNE DİRENÇLİ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (MRSA) SUŞLARINDA PVL TOKSİNİN MOLEKÜLER ÇALIŞMASI VE TESPİTİ

Safauldeen Abdulkarem Mousa MOUSA

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Zehra KARAHAN
Eş danışman: Dr. Öğr. Üyesi Yasir Hammad Hamada KHALAF

Staphylococcus aureus toksijenik bir bakteridir ve toksinlerin etkilerinden biri de antibiyotik etkinliğini bozmaktır. Panton-Valintine Lökosidin (PVL) toksini bakterinin virülans faktörlerinden biridir ve genellikle metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) izolatlarında görülür. MRSA hızlı bir şekilde tanımlanabilir. Hem tedavi hem de enfeksiyon kontrol politikasının uygulanması için kritik öneme sahiptir. Bu çalışmanın amacı, çeşitli klinik örneklerden MRSA izolatlarında PVL geninin sıklığına bakmak ve bunların antibiyotik duyarlılıklarını ve biyofilm oluşturma potansiyellerini araştırmaktı. Teşhisi doğrulamak için bakteri kültür morfolojisi ve biyokimyasal özelliklerin yanı sıra VITEK 2 kompakt sistemi kullanılarak tanındı. 150 örneğin 40'ında (%26,6) *S. aureus* izolatı tespit edildi. İzolatların antibiyotik duyarlılıklarına göre en yüksek dirence Metisilin (%100) sahipti, bunu Sefepim(%70), Azitromisin(%57,5) ve Sefoksitin(%55) izledi. İzolatlarda Rifampisin ve Kloramfenikola direnç görülmezken Vankomisinde %2,5, Gentamisinde %5 ve Meropenemde %17,5 direnç oranı görülmüştür. İzolatlar biyofilm üretme potansiyeline sahiptir. Doku kültürü plakası yaklaşımı, *S. aureus* izolatlarının sırasıyla %25, %65 ve %10'unun güçlü, orta ve zayıf biyofilm üreticileri olduğunu ortaya koydu. PVL genlerinin PCR tespiti, bu genin izolatların %85'inde mevcut olduğunu gösterdi.

2023, 57 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: PVL toksini, MRSA suşu , *Staphylococcus aureus*, Virülans faktörü

ABSTRACT

Master of Science Thesis

MOLECULAR STUDY AND DETECTION OF PVL TOXIN IN METHICLLIN RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (MRSA) STRAINS ISOLATED FROM DIFFERENT CLINICAL SAMPLES

Safauldeen Abdulkareem Mousa MOUSA

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

Advisor: Asst. Prof. Dr. Zehra KARAHAN
CO-Advisor: Asst. Prof. Dr. Yasir Hammad Hamada KHALAF

Staphylococcus aureus is a toxigenic bacterium, and one of the toxins' effects is to impair antibiotic efficiency. PVL toxin is one of the bacteria's virulence factors, and it is usually seen in methicillin-resistant isolates of *S. aureus*. MRSA can be identified quickly. It is critical for both treatment and infection control policy implementation. The purpose of this study was to look at the frequency of the PVL gene in methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) isolates from various clinical samples to investigate their antibiotic susceptibility and biofilm forming potential. To validate the diagnosis, the bacteria was recognized using culture morphology and biochemical features as well as the VITEK 2 compact system. *S. aureus* isolates were detected in 40 (26.6%) of 150 samples. The antibiotic susceptibility of the isolates revealed that Methicillin had the highest resistance (100%), followed by Cefepime (70%), Azithromycin (57.5%), and Cefoxitin (55%). Rifampicin and chloramphenicol resistance rates in the isolates were 0%, followed by Vancomycin (2.5%), Gentamycin (5%), and Meropenem (17.5%). The isolates have the potential to produce biofilms. The tissue culture plate approach revealed that 25%, 65%, and 10% of the *S. aureus* isolates were strong, moderate, and weak biofilm producers, respectively. PCR detection of PVL genes indicated that this gene was present in 85% of the isolates.

2023, 57 pages

Keywords: PVL toxin, MRSA strain, *Staphylococcus aureus*, Virulence factor

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında bana yardım eden ve işimi tamamlama gücü veren Yüce Allah'a şükranlarımı sunuyorum. Tez çalışmam boyunca verdiği rehberlik ve destekleri için danışmanım Dr. Öğr. Üyesi zehra KARAHAN'a

Tez çalışmamın laboratuar ve yazım aşaması da dahil olmak üzere tüm bölümlerine yaptığı değerli yorumları, yönlendirmeleri ve beni çalışmaya teşvik etmesi nedeniyle ikinci danışmanın Dr. Öğr. Üyesi Yasir Hammad Hamada KHALAF 'a en içten teşekkürlerimi ve takdirlerimi sunuyorum. Ayrıca Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Ana Bilim Dalı başkanı ve başta çok kıymetli hocam Doç. Dr. Melda DÖLARSLAN olmak üzere bölümdeki tüm öğretim üyelerine en derin teşekkürlerimi sunarım.

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

Safauldeen Abdulkareem Mousa MOUSA

Çankırı - Şubat 2023

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **iii**
İÇİNDEKİLER ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **vi**
KISALTMALAR DİZİNİ ..... **vii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **ix**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **x**
1. GİRİŞ **1**
2. LİTERATÜR ÖZETİ **3**
2.1 Stafilokokların Genel Özellikleri **3**
2.1.1 Sınıflandırma **3**
2.2 Stafilokok Aureus **4**
2.3 Patojenite **5**
2.4 Genom **6**
2.5 Virülans Faktörleri **6**
2.5.1 Hücre yüzey faktörleri **8**
2.5.2 Salgılanan faktörler **9**
2.6 Biyofilm **12**
2.7 Metisiline Dirençli *S. aureus* (MRSA) **13**
2.8 *S. aureus*'ta Antibiyotik Direnci **14**
3. MATERYAL VE METOT **16**
3.1 Cihazlar **16**
3.1.1 Medya **16**
3.1.2 Kimyasallar ve tepkimeler **17**
3.1.3 Teçhizat **18**
3.1.4 Kitler **18**
3.1.5 Antibiyotikler **19**
3.2 Çalışma Planı **20**
3.2.1 PVL geninin PCR yöntemi ile tespiti 1- DNA ekstraksiyonu **20**

3.2.2 PCR reaksiyon karışımı 23
3.3 Medya Hazırlığı 24
3.3.1 Mannitol tuzlu agar (MSA) 24
3.3.2 Kanlı agar 24
3.3.3 Muller-hinton ağarı 25
3.3.4 Beyin kalp infüzyon broth 25
3.4 Numune Toplama 25
3.5 Çalışma Tasarımı 25
3.6 Mikroskobik Özellikler 26
3.6.1 Kanlı agarda koloni morfolojisi 26
3.6.2 Mannitol tuzlu agar üzerinde büyüme 26
3.6.3 Katalaz üretim testi (Biyokimyasal) 26
3.6.4 Koagülaz testi 26
3.7 İzolatların VITEK-2 Sistemi ile Doğrulanması 27
3.8 Antibiyotik Duyarlılık Testi (Modifiye Kirby-Bauer Yöntemi) 28
3.9 Biyofilm Oluşumu Testi (Kantitatif) (Smith *et al.* 2008) 29
3.10 *S. aureus* İzolatının Bakımı ve Muhafazası 30
3.10.1 Kısa saklama 31
3.11 PCR Yöntemi ile PVL Geninin Tespiti 31
3.12 İstatistiksel Analiz 31
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 32
4.1 *S. aureus*'un İzolasyonu ve Tanımlanması 32
4.2 *S. aureus* İzolatlarının Örneklerin Kaynağına Göre Dağılımı 35
4.3 İzolatların Antibiyotik Duyarlılıkları 35
4.5 Moleküler Tahlil 39
4.5.1 Genomik DNA ekstraksiyonu 39
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 43
KAYNAKLAR 44
EKLER 52
ÖZGEÇMİŞ 57

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
°C	Santigrat derece
g	Gram
g+ve	Gram pozitif
G-Ve	Gram - negatif
Ib/In2	İnç kare başına pound
kDa	Kilo dalton
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
OD	Optik yoğunluk
P	Pound
SD	Standart sapma
um	Mikrometre
UV	Ultraviyole
α	Alfa

KISALTMALAR DİZİNİ

AME'ler	Aminoglikozit değiştirici enzimler
AZM	Azitromisin
BEN	Metisilin
BGBM	Sefapim
BHIB	Beyin kalp infüzyon suyu
CA-MRSA	Topluluk kaynaklı metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*
CFU	Koloni oluşturma birimi
ClfA	Topaklanma faktörleri A
ClfB	Topaklanma faktörleri B
CLSI	Klinik ve laboratuvar standartları enstitüsü
CN	Gentamisin
DNA	Deoksiribonükleik asit
EBPS	Elastin bağlayıcı protein
ELISA	Enzim bağlı immünosorbent deneyi
ENO	Laminin bağlayıcı protein
EPS'ler	Ekzopolisakkaritler
ETB	Eksfolyatif Toksin B
FnbA	Fibronektin bağlayıcı protein A
FnbB	Fibronektin bağlayıcı protein B
FOX	Sefoksitin
H2O2	Hidrojen peroksit
HA-MRSA	Hastane metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'u
HLa	Hemolizin alfa
HLb	Hemolizin beta
Ica	Hücre içi yapışma
LukF-PV	Panton-valentine lökosidin (hızlı)
LukS-PV	Panton-valentine lökositin (yavaş)
MecA	Metisilin direnç geni
MEM	Meropenem
MRSA	Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*
MSCRAMM	Yapıştırıcı matris molekülünü tanıyan mikrobiyal yüzey bileşenleri
NCBI	Ulusal biyoteknoloji bilgi merkezi
PBP	Penisilin bağlayıcı protein
PCR	Polimeraz zincirleme reaksiyonu
PIA	Polisakkarit hücreler arası adezin
PVL	Panton-valentin- lökosidin
RF	Rifampisin
RNA	Ribonükleik asit

SAg	Süperantijen
SAK	Stafilokinaz
SCCmec	Staphylococcus kaset kromozom mec
SEL	Stafilokokal enterotoksin benzeri K
Spa	Stafilokok proteini A
Vaftiz	Biyofilm ilişkili protein
VITEK	Değer bütünlük takım çalışması mükemmellik bilgi
VİZE	Vankomisine orta düzeyde dirençli *S. aureus*
VRSA	Vankomisine dirençli *S. aureus*

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1 Plan of the study. 20
Şekil 4.1 Kanlı agar üzerinde *S. aureus* (A) büyük gri koloniler (B) Beta hemoliz gösterir. 32
Şekil 4.2 Mannitol tuzlu agar üzerinde *S. aureus* altın sarısı koloniler gösterir 33
Şekil 4.3 Katalaz testinin sonucu. 33
Şekil 4.4 *S. aureus* izolatlarının pozitif koagülaz sonuçları. 34
Şekil 4.5 Çalışmadaki *S. aureus* izolatlarının sıklığı. 34
Şekil 4.6 *S. aureus* izolatlarına karşı antibiyotik duyarlılık testinin yüzde sonucu. ME:Metisilin, CN: Gentamisin, RF: Rifampisin, C: Kloramfenikol, VAN: Vankomisin, FOX: Sefoksitin, CPM: Sefepim, MEM: Meropenem. 36
Şekil 4.7 *S. aureus* izolatlarının biyofilm üretiminin sonuçları. 37
Şekil 4.8 İzolatların biyofilm oluşturma kapasitesi 38
Şekil 4.9 *S. aureus*'un PCR amplifikasyonu üreten (PVL) geninin agaroz jel elektroforezi, beklenen amplifikasyon ürünleri 435 bp'dir (şerit 1-24: örnekler, hat L: merdiven 1000bp, %2 agroz jel ve 45 için 125 Volt) TBE tamponlarında min. 40
Şekil 4.10 *S. aureus*'un PCR amplifikasyonu üreten (PVL) geninin agaroz jel elektroforezi, beklenen amplifikasyon ürünleri 435 bp'dir (şerit 25-40:numuneler, şerit L: merdiven 1000bp, %2 agroz jel ve 45 dakika TBE tamponlarında. 40
Şekil 4.11 *S. aureus* izolatlarında PVL geninin sonuçları. 41

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 *S. aureus*'un virülans faktörleri ve özellikleri 7
Çizelge 3.1 Mevcut çalışmada kullanılan laboratuvar cihazları 16
Çizelge 3.2 Kültür besiyerleri 17
Çizelge 3.3 Kökenleriyle birlikte bu çalışmada kullanılan kimyasallar ve reaktifler ... 17
Çizelge 3.4 Kaynakları ile birlikte bu çalışmada kullanılan ekipman 18
Çizelge 3.5 Kökenleri ile bu çalışmada kullanılan kitler 19
Çizelge 3.6 Menşei ile antibiyotik duyarlılık testi için bu çalışmada kullanılan antibiyotik diskleri 19
Çizelge 3.7 Geneaid kiti bileşeni ve reaktif hacmi 21
Çizelge 3.8 PVL geni için primer tasarımı (Bioneer/Kore) 23
Çizelge 3.9 PVL geni için PCR reaksiyon karışımı (25ul) 23
Çizelge 3.10 PVL geninin saptanması için PCR amplifikasyon protokolü 24
Çizelge 4.1 *S. Aureus* İzolatların örneklere göre dağılımı 35
Çizelge 4.2 İzolatların antibiyotik duyarlılık sonuçları 36

1. GİRİŞ

Staphylococcus aureus (S. aureus), ciddi toplum kökenli ve hastane enfeksiyonlarında yaygın olarak görülen kommensal bir bakteridir (Shahmoradi *et al.* 2019). Antimikrobiyal direnç önemli bir halk sağlığı sorunudur; Dirençli bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlar artık yaygındır ve bazı hastalıklar birden fazla antibiyotik türüne veya sınıfına direnç kazanmıştır (Straume *et al.* 2020).

Özellikle metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) olmak üzere antibiyotik direncinin giderek artan prevalansı nedeniyle (Evangelista ve Oliveira 2015). Bu değiştirilmiş bir penisilin bağlayıcı proteini kodlayan mecA geninin edinilmesinin bir sonucu olarak gerçekleşir. penisilin bağlayıcı protein (PBP2a veya PBP2') -laktamları bağlamak için daha düşük bir afiniteye sahiptir. Bu, tüm -laktam antibiyotiklere direnç sağlar ve onları MRSA enfeksiyonlarında klinik olarak etkisiz hale getirir. Sonuç olarak, vankomisin gibi glikopeptidler genellikle MRSA'yı tedavi etmek için kullanılır (Straume *et al.* 2020).

Mide, göz ve ürogenital sistem ve cilt ve yumuşak doku enfeksiyonlarının çoğunluğu ile ilişkilidir. Bununla birlikte, bir yara veya cerrahi injeksiyon yoluyla cilde nüfuz edebilir ve enfeksiyona neden olabilir (Neopane *et al.* 2018). Tıbbi cihazlara stafilokok yapışmasına ve bu bakterilerin cilt enfeksiyonu, bakteriyemi, protez eklem enfeksiyonları dahil biyofilm oluşturma eğilimine atfedilebilir (Neopane *et al.* 2018). Menenjit ve endokardit (Szczuka *et al.* 2016).

Antibiyotikler, matrislerinde antibiyotik bozundurucu bileşenler bulunduğundan, biyofilme nüfuz etmekte zorlanırlar (Neopane *et al.* 2018). Ekzotoksinler ve nükleazlar, proteazlar, lipazlar ve hemolizinler gibi enzimler ve ayrıca apoptoz indüksiyonu yoluyla sitotoksik etkiler de bu türün patogenezinde yer alır (Szczuka *et al.* 2016). Gözenek oluşturan toksinler (örneğin, hemolizinler, lökotoksinler), eksfolyatif toksinler ve süperantijenler, toksinlerin üç kategorisidir. Enterotoksinler (örn. deniz), enterotoksin benzeri proteinler (insan primat modellerinde doğrulanmış emetik potansiyeli olmayan

proteinler; örneğin SELK) ve toksik şok sendromu toksini içeren 26 stafilokok SAg vardır (Corbeil *et al.* 2019).

Panton-Valentine lökosidin (PVL), *S. aureus*'un %5'inden daha azı tarafından üretilen sitolitik bir toksin. *S. aureus* suşlarında virülans faktörü olduğu düşünülmektedir (Anwar Hussein ve Salih 2020). Lökosit ölümüne ve doku tahribatına neden olan güçlü bir etkiye sahip iki bileşenli gözenek oluşturucu bir toksindir. Bir bakteriyofaj bulunarak lukS-PV ve lukF-PV genleri tarafından kodlanan PVL gen lokusunu taşır (Nabiel ve Barakat 2017). Bu gen klonal büyüme ve yatay transfer yoluyla *S. aureus* arasında dağılır, Panton ve Valentine 1932'de bu lökotoksinin deri ve yumuşak doku iltihabı ile ilişkili olduğunu belirlemişlerdir. Tüm dünyada CA-MRSA izolatlarının tanımlanmasında bir belirteç olarak kullanılmaktadır (Divyakolu *et al.* 2019).

Çalışmanın amacı:

1- Birkaç klinik örnekten *S. aureus* izolasyonu ve tanımlaması
2- Metisilin direnci *S. aureus* (MRSA) fenotipik tespiti.
3- İzolatların antibiyotik duyarlılık paterninin belirlenmesi
4- İzolatlar arasında PVL geninin frekansının moleküler tespiti.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Stafilokokların Genel Özellikleri

Stafilokoklar, katalaz üreten gram pozitif bakterilerdir. Lekeli yaymalarda tek tek, çiftler halinde ve kümeler halinde görünen yuvarlak hücrelere (0,5 ila 1,5 m) sahiptirler (Lipsky *et al.* 2010). Yunanca "üzüm salkımı" anlamına gelen staphule adı verilir (Funke *et al.* 2016). Ne hareketlidirler ne de spor oluştururlar ve 40 türü vardır. 5 ila 12 amino asit tarafından sağlanan organik bir nitrojen temeli gerektiren karmaşık bir beslenme sorumluluğudur. Hemolizinler, lipazlar ve proteazların yanı sıra apoptoz indüksiyonu yoluyla sitotoksik aktiviteler bu türün patofizyolojisinde rol oynar (Rocchetti *et al.* 2018).

İnsan enfeksiyonlarıyla en sık ilişkili olanlar *S. aureus*, *Staphylococcus haemolyticus* (*S. haemolyticus*), *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*), *Staphylococcus saprophyticus* (*S. saprophyticus*) ve *Staphylococcus lugdunensisdir* (*S. lugdunensis*) (Menyhárt-Laub 2017).

Pozitif pıhtılaşan stafilokoklar, koagülaz üreten küçük bir stafilokok kategorisidir. (*S. aureus, S. intermedius, S. Pseudointermedius, S. Dolphini, S. lutrae ve S. hyicus*), Staphylococcaceae familyasının klinik olarak en önemli üyesi *S. aureus*'tur. Kalan stafilokoklar koagülaz negatifleridir (CoNS), *S. haemolyticus, S. epidermidis*, *S. lugdunensis* ve *S. saprophyticus* klinik olarak en önemli türler gibi görünmektedir, Staphylococci, genom boyutları 2 ila 3 mbps arasında değişen bakterilerdir ve bir %27 ila %41 arasında değişen düşük G+C konsantrasyonuna sahiptir (Hiramatsu *et al.* 2014).

2.1.1 Sınıflandırma

Stafilokokların taksonomik sınıflandırması (Kloos ve Schleifer 1975).
Domain: Bakteri
Filum: Firmicutes

Sınıf: Basiller
Aile: Staphylococcaceae
Cins: Stafilokok
Tür: Aureus

Koch (1843-1910) ve Pasteur (1822-1895), Stafilokokları ilk gözlemleyen ve kültürleyen kişilerdi. Birkaç yıl sonra, İskoç bir cerrah olan Sir Ogston (1844-1929), bu bakteri üzerinde ilk kapsamlı çalışmayı gerçekleştirdi. Mikroskop altında bir küme küresel hücre gördü ve bunların apse oluşumundaki rollerini özetledi ve mikroskop altındaki görünümlerine göre isimlendirildiler. *S. aureus* ilk kez Rosenbach (1842–1923) tarafından izole edilmiş ve kolonisinin sarımsı rengi olan altın anlamına gelen aurum adı verilmiştir (Licitra 2013).

2.2 Stafilokok Aureus

S. aureus, 1880'de İskoçya'nın Aberdeen kentinde ülserli yaralardan, gram pozitif, ~0.8µm mikroskopla izole edildi ve bir "üzüm dizisi" olarak gruplandı (Guo *et al.* 2020). Bu tür, katı besi yerinde altın renkli koloniler üretme kabiliyeti nedeniyle adlandırılmıştır. Hücre duvarı, biraz şekilsiz bir görünüme ve kabaca 2040 nm kalınlığa sahip güçlü bir koruyucu kaplama bariyeridir. Hücre duvarı yapısının en önemli katmanları peptidoglikanlar (%50) ve teikoik asitler(%40) iken, geri kalanı ekzoproteinler, yüzey proteinleri ve peptidoglikan hidrolazlardan oluşur. Bu yapısal bileşenler ayrıca bakteriyel patojenitede rol oynar (Taylor ve Unakal 2017).

S. aureus klinik olarak en önemli stafilokok türüdür ve hafif etkilerden yaşamı tehdit edene kadar geniş bir enfeksiyon yelpazesine neden olur. Normalde ciltte ve vücudun bölümlerinde bulunmasına rağmen, duyarlı dokulara sızabilen fırsatçı bir floradır (McPherson ve Pincus 2021). Ayrıca, klinik suşların yaklaşık %90'ı kapsüler yapılar oluşturma yeteneğine sahiptir ve polisakkarit kapsüller, fagositozdan kaçmada ve bakteriyemiye karşı patojeniteyi iyileştirmede, biyofilm oluşumuyla sonuçlanan bir role sahiptir (Taylor ve Unakal 2017).

Bu patojenin virülans faktörleri, salgılanan ürünler ve patogenezde rolü olan yapısal proteinler dahil olmak üzere çeşitlidir (Wang *et al.* 2019). Enzimler, toksinler ve hücre yüzeyi ile ilişkili antijenler, üretilen birkaç faktör arasındadır (Oliveira *et al.* 2018). Bu virülans faktörleri, konak yapılara bağlanma ve onları hedeflemenin yanı sıra içselleştirme, bağışıklıktan kaçınma ve hücre içi stabilite ile sonuçlanan bir dizi patojenik yolak tarafından farklılaştırılmıştır. Bu tür selülite ve yara enfeksiyonuna neden olabilir, ancak aynı zamanda tüm vücuda yayılarak sepsis ve septik artrit, endokardit ve epidural apse gibi çeşitli diğer ciddi sistemik hastalıklara neden olabilir (Almousawi *et al.* 2020).

Birçok *S. aureus* suşu sıradan laboratuvar ortamında 37 ^{o}C'de büyür ve Oksijen(O_2) ve Karbondioksit(CO_2) varlığında daha iyi gelişen yükseltilmiş, opak ve küresel kolonilere sahip fakültatif anaeroblardır. 15 ile 45 ^{o}C arasındaki sıcaklıklarda ve %15'e kadar yüksek sodyum klorür (NaCl) konsantrasyonu ile büyüyebilir. 45 ^{o}C'nin üzerindeki yüksek sıcaklıklar ve 10 ^{o}C'nin altındaki düşük sıcaklıklar ise doğal olarak alkol ve mannitol şeker fermentasyonu gibi deterjanlara ve yüksek ozmolariteye dayanıklı bu bakterilerin çoğalmasını etkileyecektir (Almousawi *et al.* 2020).

2.3 Patojenite

S. aureus, klinik olarak önemli bakterilerin çoğundan ayıran çeşitli özelliklere sahiptir (Truant 2016).

Birçok virülans faktörünü ifade etme kapasitesine sahiptir.Çok çeşitli antimikrobiyal antibiyotik sınıflarına karşı direnç geliştirme ve yayma yeteneğine sahiptir.Hastane ve toplum ortamlarında yaygındır.

S. aureus birçok özelliği patojenite ile ilgilidir ve konakçı-mikrop ilişkisini tanımlamaya yardımcı olur (Goldman ve Green 2015). Bu yetenekler, hücre dışı faktörlerin ve toksinlerin yanı sıra invaziv özelliklerinin bir sonucudur (Berkowitz ve Jerris 2016).

S. aureus, cilt lezyonları (furuncles, carbuncles), pnömoni ve osteomiyelit dahil olmak üzere çok sayıda enfeksiyondan izole edilmiştir. Organizmalar bu yerlerden kan dolaşımına girerek idrarda ortaya çıkabilir veya vücudun çeşitli yerlerinde apse oluşturabilirler (Lipsky *et al.* 2010). Çoklu ilaca dirençli suşların yayılmasının yanı sıra bağışıklığı baskılanmış hastalarda ve tıbbi cihazla ilişkili enfeksiyonlarda hastalıkların artan prevalansı, *S. aureus* hastalıklarının görülme sıklığını artırmaktadır (Kadariya *et al.* 2014).

2.4 Genom

2001 yılında, *S. aureus*'un tüm genomu dizilenmiş ve daha fazla moleküler ve genetik diseksiyon, önemli çeşitlilikte yüzey adezyonlarını, salgılanan enzimleri ve istilayı kolaylaştıran toksinleri ortaya çıkardı (Monteiro *et al.* 2015). Bu bakteri, spesifik hastalık ve antibiyotik belirleyicilerini içeren yerleştirme dizileri, bakteriyofajlar, transpozonlar ve patojenite adaları (genomik adalar olarak da adlandırılır) dahil olmak üzere mobilize edilebilen çeşitli yabancı DNA segmentlerine sahiptir (Bellanger *et al.* 2014). direnç. Bu yabancı bileşenler, *S. aureus*'un hem stafilokokal hem de stafilokokal olmayan cinslerden organizmalarla yatay gen transferi ve genetik element değişimi için büyük yeteneğini açıklar (Rossi *et al.* 2020).

Stafilokok DNA'sının guanin artı sitozin (G + C) içeriği %30 ila %39 mol aralığındadır. Bu cinsi sınıflandırmak için diğer genotipik kriterler, 16S rRNA veya 23S rRNA dizilerinin karşılaştırılmasıyla oluşturulan bir filogenetik ağacı temel alır (Gyles *et al.* 2008).

2.5 Virülans Faktörleri

S. aureus, konak doku bağlanmasına, doku invazyonuna, konak immünitesinden kaçınmaya ve toksikoza yardımcı olan çeşitli virülan faktörlere sahiptir (Çizelge 2.1) (Almousawi *et al.* 2020). Bunların niteliklerini, yönlerini ve işlevlerini özetlemektedir.

Çizelge 2.1 *S. aureus*'un virülans faktörleri ve özellikleri

İşlev	Faktörler	Özellikler
Konakçı dokuya bağlanma	Hücre yüzey bileşenleri	Bu yüzey proteinleri ailesi, fibrinojen ve fibronektin gibi konakçı bileşenlerle etkileşerek konakçı dokuya bağlanmaya izin vererek konakçı bağışıklığından kaçınmaya dahil olur Bu sınıftaki virülans faktörleri en yaygın fnbA, fnbB, cna, clfA ve clfB'yi içerir.
Konakçının bağışıklığının kırılması	polisakkarit mikrokapsül	Anti-fagositiktir ve bakteri hücre duvarını çevreler
	Protein A (*spa*)	Anti-komplement aktivite, kemotaktik özellikler ve anti-fagositik özellikler gibi birçok biyolojik özelliğe sahiptir. Aynı zamanda konak bağışıklık yanıtını sınırlar, aşırı duyarlılık reaksiyonlarını ve trombosit hasarını indükler ve doğal öldürücüyü arttırdığı gösterilmiştir.insan lenfositlerinin aktivitesi
	PVL	Bu toksin TK-MRSA ile ilişkilidir, lökosit lizisine ve doku nekrozuna neden olarak bu patojenin deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarına (CYBE) neden olmasına izin verir. Gözenek oluşumunu tetiklemek için birlikte çalışan iki bileşenli yavaş (S) alt birimi ve hızlı (F) alt birimi vardır. lökosit hücrelerinin hücre zarında nekroza neden olur
	α-toksin (α hemolizin	Bu toksin, güçlü lökosit yeteneklerine sahiptir ve hücrelerde demirin temizlenmesine yardımcı olur; sızıntıya neden olan bir gözenek oluşturan ekzotoksindir. konakçı hücre zarında ve ölümde
	kemotaksis-inhibitör proteinler	Nötrofilleri ve monositleri kemotaksis aktivitesini inhibe eden hücre dışı bir proteindir
Dokuya giriş	Hücre dışı yapışma proteini	Hücre dışı proteinler, konakçı hücre matrisine, plazma proteinlerine ve endotel hücrelerine bağlanır. Koagülaz enzimi gibi bu proteinler, konak savunmasını inhibe edebilir ve dokulara yapışmayı artırabilir. Ayrıca stafilokokal apselerin, bakteriyeminin patogenezini de teşvik ederler ve endokardit
	Faktör •Lipase, protease, Hyaluronidase, Staphylokinase, ve phospholipase C	Doku yıkımına neden olan ve diğer doku penetrasyonuna yardımcı olan hücre dışı enzimler
Toksinoza neden olan	Enterotoksinler	Emetik aktiviteye sahip bir toksin sınıfıdır ve en yaygın olanı dünya çapında stafilokokal gıda zehirlenmesine neden olan enterotoksin tip A'dır (SEA). Enterotoksin grubu bir süper antijen olarak kabul edilir ve plazmidler, patojenite adaları, profajlar gibi mobil genetik elementler (MGE'ler) üzerinde veya SCCmec elemanının yakınında bulunan kromozomal genler.
	Faktör •Toksik şok sendromu toksini -1	Ekzotoksini, başlangıçta vajinal tampon kullanan kadınlarda görülen yüksek ateş, kızarıklık, ishal, kusma ve ölüm gibi tehlikeli yan etkilere neden olan süper antijen nitelikleri içerir. Bu süper antijen, enfeksiyon bölgesine çok sayıda T lenfosit çekerek şoka neden olur ve bu da masif sitokin oluşumuna neden olur. serbest bırakmak.
	Peeling toksinler A ve B	Serin proteazlar stafilokokal haşlanmış deri sendromuna neden olur (SSSS), çoğunlukla bebekleri etkileyen bir durumdur

S. aureus, insanlarda antibiyotik direncindeki büyüme nedeniyle önemli bir patojendir; aynı zamanda diğer Koagülaz Negatif Stafilokok (CoNS) türlerinden farklı olup filogenik benzerliklerine rağmen daha öldürücüdür (Taylor ve Unakal 2017). Çok yönlü bir patojen olarak başarısı, kısmen bakterinin adeziv matris molekülünü tanıyan mikrobiyal yüzey bileşenleri (MSCRAMM), hemolizin genleri (hla ve hlb), termo nükleaz geni (nuc), koagülaz geni (coa), proteaz genleri, süperantijen genleri ve toksin genleri gibi virülans genlerini içeren benzersiz virülans faktörlerine bağlıdır (Wang *et al.* 2016).

Bakterilerin, biyofilmler olarak bilinen yüksek düzeyde yapılandırılmış çok hücreli kompleksler oluşturma kapasitesinin, patojenliği artıran çok önemli bir bileşen olduğu düşünülmektedir. Staphylococcus suşları biyofilmler, özellikle gram pozitif koklarda, ekleme dizileri gibi sorumlu genlerin transferine izin vererek, kronik enfeksiyon oluşturmada ve antibiyotik direncini artırmada bakterilere yardımcı olur (Shahmoradi *et al.* 2019).

2.5.1 Hücre yüzey faktörleri

S. aureus, virülansına katkıda bulunan birkaç hücre yüzeyi faktörünü ifade eder. Bunlar, yapışkan matris moleküllerini (MSCRAMM'ler), kapsüler polisakkaritleri ve stafiloksantin'i (bir karotenoid pigmenti) tanıyan mikrobiyal yüzey bileşenlerini içerir (Lin ve Peterson 2010).

2.5.1.1 Polisakkarit kapsül

Nötrofil fagositozunu inhibe eder ve bakteri kolonizasyonunu ve mukozal yüzeylerde kalıcılığı destekler (Clauditz *et al.* 2006).

2.5.1.2 Stafiloksantin

Bazı *S. aureus* suşları, bakteriyel bir antioksidan görevi gören, mikropun oksidatif stresten kaçınmasına izin veren ve konakçı bağışıklık sistemi tarafından patojenleri öldürmek için kullanılan Staphyloxanthin (bir karotenoid pigment) üretir (Lin ve Peterson 2010).

2.5.1.3 Yapışkan matris moleküllerini (MSCRAMM'ler) tanıyan mikrobiyal yüzey bileşenleri

Stafilokokal protein A (Spa), immünoglobulin G'nin fragman kristalize edilebilir bölgesine (Fc) bağlanabilen, opsonizasyon ve fagositozun inhibe edilmesine neden olabilen hücre duvarı bağlantılı bir proteindir (Bartlett ve Hulten 2010). Kümelenme faktörleri (ClfA ve ClfB), fibronektin varlığında kümeleşmeye ve fibrinojen yapışmasına aracılık eder (Lin ve Peterson 2010).

Fibronektin bağlayıcı proteinler (FnbA ve FnbB): bu proteinler, *S. aureus*'un epitel hücreleri, endotel hücreleri, fibroblastlar ve osteoblastlar dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerine bağlanmasına ve istila etmesine izin verir. Konak hücre fibronektin reseptörü ve integrin istilaya yardımcı olur (Santos *et al.* 2014). Kollajen bağlayıcı adezin (CNA) hücre duvarına bağlıdır ve N-ucunda bir kolajen bağlama yeri vardır. Bu proteinin canlı olarak septik artritte eklemlerin erken kolonizasyonuna yardımcı olduğu ve osteomiyelit ve enfektif endokardit patogenezine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Bartlett ve Hulten 2010).

2.5.2 Salgılanan faktörler

S. aureus'un, yukarıda bahsedilen hücre duvarı ile ilişkili virülans faktörlerinin koruyucu ve pasif rollerinin aksine, toksin salgılama yeteneği, konak bağışıklığının devre dışı bırakılmasında aktif bir rol oynar. Besinleri serbest bırakmak ve bakteriyel yayılmayı kolaylaştırmak için, konakçı bağışıklık sistemine müdahale eden konakçı

hücreleri ve dokuları bozarlar. Bu salgılanan faktörler üç tipte sınıflandırılır: süperantijenler, ekzoenzimler ve sitolitik toksinler (Lin ve Peterson 2010).

2.5.2.1 Ekzoenzimler

Neredeyse tüm *S. aureus* suşları, işlevi konak dokuların bozulması ve/veya bakteri üremesi ve yayılması için edinilmiş besinlerin inaktivasyonu olduğu düşünülen birkaç hücre dışı enzim salgılar. Koagülaz, hiyalüronidaz (yayıcı faktör), nükleaz, lipaz, eksfolyatif toksin A ve B (ETA ve ETB), Stafilokinaz (SAK) ve beta-laktamaz gibi proteazlar ekzoenzimlerin örnekleridir (Bokarewa *et al.* 2006).

2.5.2.2 Süperantijenler

Toksik şok sendromu (TSS) dahil olmak üzere çok çeşitli insan hastalıklarına neden olabilen güçlü bir salgılanan bağışıklık uyarıcı protein sınıfıdır (Spaulding *et al.* 2013).

2.5.2.3 Hemolitik toksin (Sitolitik toksinler)

Enfeksiyon sırasında öncü bir rol oynayan salgılanan toksinleri içeren çeşitli virülans faktörleri cephaneliği, *S. aureus* virülans derecesine atfedilir. Bu toksinlerin çoğu biyolojik zarlara zarar vererek ve sonunda hücre ölümüne neden olarak çalışır. Spesifik olarak, *S. aureus,* etkili hemolizinler ve lökotoksinler üretir. Örneğin nötrofiller, bu hücreler tarafından alındıktan sonra toksinleri parçalayarak, onları doğuştan gelen konak savunması yoluyla bakteriyel patojenlere karşı yalnızca güçlü bir silah haline getirir. Ayrıca, kompleman kaskadını engelleyen veya konak savunması tarafından tanınmasını engelleyen çok sayıda faktör üretir. Konak savunma mekanizmaları tarafından ortadan kaldırılmasını önlemek için *S. aureus*'un çok yönlü protokolüne daha birçok toksin eklenmiştir (Otto 2013).

Enfeksiyon sırasında öncü bir rol oynayan salgılanan toksinleri içeren çeşitli virülans faktörleri cephaneliği, *S. aureus* virülans derecesine atfedilir. Bu toksinlerin çoğu

biyolojik zarlara zarar vererek ve sonunda hücre ölümüne neden olarak çalışır. Spesifik olarak, *S. aureus*, etkili hemolizinler ve lökotoksinler üretir. Örneğin nötrofiller, bu hücreler tarafından yutulduktan sonra toksinleri parçalayarak, onları doğuştan gelen konak savunması yoluyla bakteriyel patojenlere karşı yalnızca güçlü bir silah haline getirir. Ayrıca, kompleman kaskadını engelleyen veya konak savunması tarafından tanınmasını engelleyen çok sayıda faktör üretir. Konak savunma mekanizmaları tarafından ortadan kaldırılmasını önlemek için *S. aureus*'un çok yönlü protokolüne daha birçok toksin eklenmiştir (Otto 2013).

S. aureus klinik izolatlarının yaklaşık %99'u α-hemolizin (hla) lokuslarına sahiptir ve klinik izolatların %5'i PVL genlerine sahiptir, ancak MRSA izolatlarının yüzde 85'i PVL genlerine sahiptir (DuMont ve Torres 2014).

2.5.2.3.1 Panton-valentine lökosidin (PVL)

Panton-Valentine Lökosidin, ilk olarak Van de Velde tarafından 1894'te bildirilen ve Woddin tarafından *S. aureus* V8 kültür süpernatanlarından izole edilen hücre dışı bir sitotoksindir. Karboksi metil selüloz kolonları üzerinde migrasyonlarına bağlı olarak "S" yavaş elute ve "F" hızlı elute olarak adlandırılan iki sinerjik fakat farklı protein bileşenine (32 kDa ve 38 kDa) sahiptir, insan ve tavşan nötrofilleri için son derece toksiktir, lökositlerin zarlarında gözenekler oluşturarak parçalanmaya neden olur, çoğunlukla polimorfonükleer hücreleri etkiler (Divyakolu *et al.* 2019).

Birden fazla gen tarafından kodlanan bir virülans faktörü olan PVL'nin CA-MRSA için stabil bir belirteç olduğu bildirilmiştir (Dweba *et al.* 2019). Ayrıca, birincil hedefin miyeloid hücreler olduğu ve toksinin düşük konsantrasyonlarının apoptoza neden olurken, daha yüksek konsantrasyonların nötrofil lizisine neden olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir. Gözenek oluşumu, toksinin iki bileşeni olan LukS-PV ve LukF-PV'nin varlığını tetikler. Bu gözenek, *S. aureus* α-toksin gibi, hücre zarı düzlemine dikey bir oktamerik β-varil moleküler kompleksidir (Bien *et al.* 2011).

SSTI'ler (apseler, fronküller, karbonküller veya nekrotizan fasiit), şiddetli nekrotizan pnömoni ve agresif kemik ve eklem enfeksiyonlarına PVL pozitif suşlar neden olur ve klonları DFI'den nadiren izole edilir (Dunyach-Remy *et al.* 2016). Ancak bu gen, endokardit, mediastinit, hastane kaynaklı pnömoni, idrar yolu enfeksiyonları veya enterokolit ile ilişkili suşlarda veya toksik şok sendromunda bulunmadı (Oliveira *et al.* 2018).

2.6 Biyofilm

Biyofilmler, ekzopolisakkaritler (EPS'ler), proteinler ve DNA gibi belirli mikromoleküllerden oluşan, kendi ürettiği bir hücre dışı matris içinde toplanan bakteriler tarafından oluşturulur. Hem biyotik hem de abiyotik yüzeylerde gelişebilir, mikrobu konak savunmasından korur ve ilaç dağıtımını engeller (Neopane *et al.* 2018).

Protein (>%2), polisakkaritler (%1-2), DNA molekülleri (>%1), RNA (>%1), iyonlar (bağlı ve serbest) ve su (%97) hücre dışı bileşenlerin bileşenleridir. polimerik bileşikler. Su içeriği, bir biyofilm içindeki kritik besinlerin hareketinden sorumludur(Jamal *et al.* 2018).

Metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) genellikle çok çeşitli ilaçlara dirençlidir, hastalar için önemli bir tehlike oluşturur ve biyofilm oluşumu nedeniyle hem mortalite hem de morbiditede büyük bir artış oluşturur. *S. aureus* enfeksiyonları ve biyofilm gelişimi, hastanede kalış süresinin uzamasına ek olarak, pnömoni, poliartrit, nekrotizan fasiit, endokardit ve septisemi gibi klinik olarak daha önemli hastalıklarla bağlantılıdır (Neopane *et al.* 2018).

Optimal yapışma ve biyofilm büyümesine izin vermek için *S. aureus,* bakterilerin konakçı hücrelere bağlanmasına izin veren benzersiz kimyasallar içerir. Spesifik olarak, *S. aureus*, kollajen bağlayıcı proteinler (cna) ve fibronektin bağlayıcı proteinler A ve B (fnbA, fnbB) aracılığıyla hücre yüzeyi proteinleriyle etkileşime girer (Shahmoradi *et al.* 2019).

2.7 Metisiline Dirençli *S. aureus* (MRSA)

Yüzyıldan fazla bir süredir *S. aureus*, insan hastalığının önemli bir nedeni olarak kabul edilmiştir. Toksijeniktir ve toksinin etkilerinden biri de antibiyotik etkinliğini azaltmasıdır. İlk sentetik penisilin olan metisilin, ilk olarak 1960 yılında *S. aureus* enfeksiyonlarını tedavi etmek için kullanıldı. Ancak kısa sürede metisiline dirençli suşlar hastane ortamında ortaya çıktı ve önemli morbidite ve mortalite ile sonuçlanan MRSA salgınları bildirildi (Viswanathan *et al.* 2019).

MRSA suşları, anormal penisilin bağlayıcı proteinlerin (PBP'ler) üretimini düzenleyen mecA geninin varlığı ile tanımlanır. Bu PBP'ler genellikle β-laktam halkası için önemli bir afiniteye sahiptir. Bununla birlikte, başka bir PBP2a, MRSA suşlarında β-laktam antibiyotiklere bağlanma için çok düşük bir afiniteye sahiptir. Sonuç olarak metisilin antibiyotikleri bakteri hücre duvarını çözemezler (Anwar *et al.* 2020).

Stafilokok kromozomal kaseti (SCC) olarak bilinen mobil direnç elemanı, Stafilokokal kromozomal kaset mec'yi (SCCmec) taşır. Önceki araştırmalar, hastane kaynaklı MRSA'nın genellikle SCCmec tip I-III ve nadiren SCCmec tip IV taşıdığını buldu. Sonuç olarak, MRSA rezervuarlarının ve bulaşma yollarının izlenmesi ve tipleme yöntemleri kullanılarak genetik karakterizasyonunun belirlenmesi, MRSA'nın önlenmesi ve yönetiminde en temel adımlardan biridir (Motallebi *et al.* 2021).

MRSA enfeksiyon tedavisi küresel bir endişe kaynağıdır. Şimdi daha önce etkili olan ß-laktam ilaçlarına direnç veriyor. Glikopeptitler, bakteri hücre duvarı oluşumunu -laktamlardan farklı bir mekanizma yoluyla baskıladığından, iki tipte sınıflandırılan MRSA (Wang *et al.* 2018). Dahil olmak üzere tüm *S. aureus* suşlarına karşı aktif olabilirler. Enfeksiyon türlerinden biri, öncelikle sağlık bakım ortamlarında (hastane kaynaklı Hastane Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'u ([HA]-MRSA) yayılan hastane enfeksiyonudur. Diğer tip, toplum enfeksiyonlarında (CA-MRSA) edinilen MRSA'dır (Viswanathan *et al.* 2019). Bu da metisiline duyarlı *S. aureus*'un neden olduğu enfeksiyonlarla karşılaştırıldığında daha yüksek hastaneye yatış oranı, ölüm oranı ve sağlık hizmetleri maliyetleri ile ilişkilidir (Zhen *et al.* 2020).

Çoğu MRSA suşu ayrıca koagülaz ve hemolizinler (alfa, beta, gama ve delta) üretir. Alfa ve beta hemolizinler dermonekrotik ve nörotoksiktir, bağışıklık sisteminin kapanmasına ve yumuşak doku yaralanmalarına neden olur (Motallebi *et al*. 2021).

Ayrıca, MRSA, her ikisi de MRSA'nın konak dokulara birincil yapışmasında önemli roller oynayan yapışkan matris moleküllerini (MSCRAMM'ler) tanıyan mikrobiyal yüzey bileşenleri ve hücreler arası yapışma gen kümesi (ica) gibi kolonizasyona yardımcı olan virülans faktörleri üretebilir ve biyofilm oluşumu (Azmi *et al.* 2019).

MSCRAMM'ler (yapışkan matris moleküllerini tanıyan mikrobiyal yüzey bileşenleri), fibronektin bağlayıcı proteinler (fnbA ve fnbB), kollajen bağlayıcı protein (cna), laminin bağlayıcı protein (eno), elastin bağlayıcı protein (ebps), fibrinojen bağlayıcı protein (fib), ve biyofilmle ilişkili protein (Bap) ve ayrıca biyofilm oluşturma yeteneği. Hücre içi yapışma (ica) operonunun biyofilm üretimini kontrol etmek için gerekli olduğu keşfedilmiştir. icaADBC genini içeren ica lokusu, polisakkarit hücreler arası adhezin (PIA) moleküllerinin sentezini kolaylaştıran proteinleri kodlar (Motallebi *et al.* 2016).

2.8 *S. aureus*'ta Antibiyotik Direnci

Topluluk ve hastane ortamlarında Metisiline Dirençli *S. aureus* (MRSA) gibi çok ilaca dirençli suşların ortaya çıkması nedeniyle son yıllarda *S. aureus* enfeksiyonlarının tedavisi giderek daha zor hale gelmiştir (Taylor ve Unakal 2021). Beta-laktamlar için düşük afiniteye sahip bir penisilin bağlayıcı proteini (PBP2a) kodlayan mecA veya mecC geni metisilin direncine neden olur (Panchal *et al.* 2020).

MecA ve mecC genleri de mobil bir genetik elementte bulunur. Bunlar, mobil bir genetik ada (SCCmec) olan "Stafilokok Kaset Kromozomu mec"inin bir parçasıdır. Şu anda, insanlardan ve hayvanlardan MRSA'da en az 13 farklı ana SCCmec elemanı tipi ve ayrıca çok sayıda alt tip tanımlanmıştır (Miklasińska-Majdanik *et al.* 2018).

Biyofilm oluşumu, *S. aureus* suşlarında tedavi başarısızlığının, tekrarlayan enfeksiyonların ve çoklu ilaç direncinin gelişmesinin başlıca nedeni olarak tanımlanmıştır. Oluşumu, polisakkarit hücre içi yapışma (PIA) sentezine aracılık eden (ica) ADBC genleri tarafından kodlanır. Biyofilm organizmayı antimikrobiyallerin yanı sıra bağışıklık sistemi öldürmeden korur (Lister ve Horswill 2014).

MRSA, tüm beta-laktam antibiyotiklere iki farklı mekanizma yoluyla direnç geliştirmiştir: (1) beta-laktam antibiyotikler tarafından inhibisyona karşı oldukça dirençli olan ve peptidoglikanı koruyabilen bir trans peptidaz olan penisilin bağlayıcı protein 2a'nın (PBP2a) üretimi. çapraz bağlama, suşun beta-laktam antibiyotiklerin varlığında hayatta kalmasına izin verir; ve (2) PBP'leri hidrolize eden beta-laktamazların üretimi, bakteri hücre duvarlarının sentezindeki son adımdan sorumlu olan ve laktamaz antibiyotikleri için birincil hedef olan membran bağlantılı enzimlerdir (Lade ve Kim 2021).

MRSA vankomisin ile tedavi edildi. Ancak vankomisine dirençli *S. aureus* (VRSA) ve vankomisine orta dirençli *S. aureus* (VISA) izolatları ortaya çıkmıştır (Abdelraheem *et al.* 2021).

3. MATERYAL VE METOT

Tarafından tanımlanabilir.

3.1 Cihazlar

Mevcut çalışmada kullanılan tüm ekipman ve cihazlar Çizelge 3.1'de listelenmiştir.

Çizelge 3.1 Mevcut çalışmada kullanılan laboratuvar cihazları

Cihazlar	Şirket (Ülke)
Otoklav	GFL(Almanya)
Bileşik ışık Mikroskobu	Olimpos (Japonya)
Soğutmalı Mikrosantrifüj	Hettich(Almanya)
Jel Elektroforez ünitesi	Termo bilimsel (ABD)
Sıcak plaka	Goson (Türkiye)
kuluçka makinesi	GFL (Almanya)
Laboratuvar davlumbazları	Nuaire (ABD)
Mikrodalga	Gosonik (Çin)
ELISA Okuyucu	BAĞLAYICI(Almanya)
Buzdolabı	JVC(Japonya)
Hassas elektrik dengesi	Hiclave (Japonya)
Termal döngüleyici PCR	Eppendorf (Almanya)
Termometre	Stuart Scientific (İngiltere)
UV transillüminatörü	Majer bilimi (Tayvan)
Vitek 2 sistemi	Biomerieux (Fransa)
Vorteks Karıştırıcı	Gemmy Industrial Corp.(Tayvan)
Su banyosu, Su damıtma cihazı	Julabo (ABD)

3.1.1 Medya

Bu çalışmada kullanılan kültür ortamları ve kökenleri Çizelge 3.2'de listelenmiştir.

Çizelge 3.2 Kültür besiyerleri

Kültür ortamı	**Şirket (Ülke)**
Kanlı Agar (BA)	(İngiltere)
Beyin Kalp İnfüzyon Suyu(BHIB)	(İngiltere)
Mannitol Tuz Agar(MSA)	(İngiltere)
Mueller-Hinton Agar (MHA)	(İngiltere))

3.1.2 Kimyasallar ve tepkimeler

Bu çalışmada kullanılan tüm kimyasallar ve reaktifler kökenleriyle birlikte Çizelge 3.3'te listelenmiştir.

Çizelge 3.3 Kökenleriyle birlikte bu çalışmada kullanılan kimyasallar ve reaktifler

Kimyasallar ve reaktifler	**Şirket (Ülke)**
Agaroz jel	BDH (İngiltere)
Buzlu asetik asit	Sirbio (Suriye)
H2O2	Merhaba medya (Hindistan)
Mutlak etanol	Merck (İngiltere)
Gliserol	Merck (İngiltere))
10X TBE tamponu	Bio basic INC(Kanada)
Glikoz	Merck (İngiltere)
Yağa daldırma	Merck (İngiltere)
Fosfat tamponlu salin	Merck (İngiltere)
Etidyum bromür	Bioneer (Kore)
Serbest nükleaz suyu	Bioneer (Kore)

3.1.3 Teçhizat

Bu çalışmada kullanılan tüm ekipmanlar ve kökenleri Çizelge 3.4'te listelenmiştir.

Çizelge 3.4 Kaynakları ile birlikte bu çalışmada kullanılan ekipman

Teçhizat	Şirket (Ülke)
Beher (500 ml , 1000 ml)	BBL (ABD)
Slaytlar, Lameller	Süperstar (Hindistan)
Silindir (100ml)	BBL (ABD)
Tek kullanımlık aşılama döngüsü	Merhaba medya (Hindistan)
Tek kullanımlık Petri kapları	El Hani (Çin)
Tek Kullanımlık Tüp (5 ml, 10 ml)	Meheco (Çin)
Eppendorf tüpleri (1ml,2ml)	EAPF (Almanya)
Filtre kağıtları whatman birimi (0,22 μm)	BBL (ABD)
Şişe(500 mi , 1000 mi)	BBL(ABD)
Forseps	BBL(ABD)
Cam Tüp (20 ml)	BBL (ABD)
Eldiven, Pamuk, Steril Pamuklu Çubuk	Meheco (Çin)
Aşılama döngüsü	(Hindistan)
Mikropipet (1000) μ, Pipet uçları (0,5 ve 1 ml)	EAPF (Almanya)
Mikrotitre plakası	BBL (ABD)
McFarlan	Gilson (Fransa)

3.1.4 Kitler

Bu çalışmada kullanılan bakteri tanımlama ve doğrulama kitleri, kökenleriyle birlikte Çizelge 3.5'te listelenmiştir.

Çizelge 3.5 Kökenleri ile bu çalışmada kullanılan kitler

Kitler	Şirket (Ülke)
DNA ekstraksiyon Kiti	Geneaid (Tayvan)
Gram boyama kiti	AFCO (Ürdün)
VITEK 2 GP sistem kiti	Biomerieux (ABD)

3.1.5 Antibiyotikler

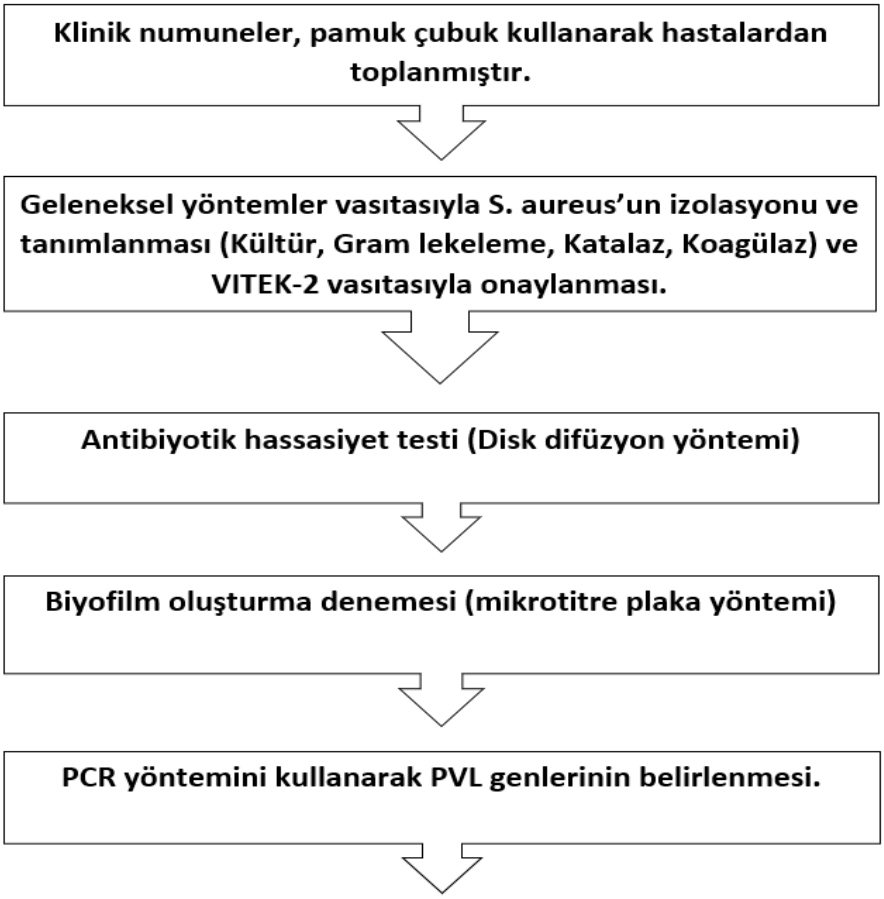
CLSI 2020 yönergelerine göre menşeli antibiyotik duyarlılık testleri için kullanılan antibiyotik diskleri Çizelge 3.6'da listelenmiştir.

Çizelge 3.6 Menşei ile antibiyotik duyarlılık testi için bu çalışmada kullanılan antibiyotik diskleri

Antibiyotik diskleri	İçerik µg	Antibiyotik sınıfı	Sembol	Ülke
Azitromisin	15	Monobaktam	AZM	Bio analyses/ Turkey
Sefoksitin	30	Sefamisin	FOX	
Sefamisin	30	Sefalosporin IV	CPM	
Kloramfenikol	30	Amfenikoller	C	
Gentamisin	10	Aminoglikozitler	CN	
Meropenem	30	Karbepenemler	MEM	
Metisilin	30	B-laktam	ME	
Rifampisin	5	Ansamisin	RF	
Vankomisin	30	Glikopeptid	VAN	

3.2 Çalışma Planı

Araştırmayı gerçekleştirmek için çalışma Şekil 3.1'de belirtildiği gibi planlanmıştır:



Şekil 3.1 Çalışma planı

3.2.1 PVL geninin PCR yöntemi ile tespiti 1- DNA ekstraksiyonu

Geneaid gram pozitif bakteri kiti bileşeni ve reaktif hacmi Çizelge 3.7'de listelenmiştir.

Çizelge 3.7 Geneaid kiti bileşeni ve reaktif hacmi

Bileşen	Boy
Gram Tamponu	2ml
GB Tamponu	2 ml
GT Tamponu	1.5 ml
W1 Tamponu	2ml
Lizozim	8mg
Proteinaz K 3 (ddH2O ekleyin)	1 mg (0.1 ml)
Elüsyon Tamponu	1mg
GD Sütunları	4
2 ml Toplama Tüpleri	8

A- DNA ekstraksiyonunun aşamaları (Geneaid, Tayvan)

Üreticinin genomik DNA saflaştırma kitine göre:

1. Bakteriler BHI agar üzerinde büyütüldü ve bir 1.5 ml mikro santrifüj tüpünde 180µL GT tamponu içinde süspanse edilmeden önce 37°C'de 18-24 saat inkübe edildi ve pelet şiddetli bir şekilde vortekslendi.
2. 1.5 ml'lik bir mikro santrifüj tüpüne 1 x 109'a kadar bakteri hücresi eklendi. Daha sonra Gram+ Tamponuna (15 ml santrifüj tüpünde) Lizozim (0,8 mg/200µL) ilave edildi ve Lizozim'i tamamen çözmek için vortekslendi. 1.5ml mikro santrifüj tüpündeki numuneye 200µL Gram+ Tamponu (Lizozimli) aktarın, ardından bir vorteks veya pipet kullanarak peleti yeniden süspanse edin. 37oC'de 30 dakika inkübe edildi.
3. Yaklaşık 20 µl proteinaz K3 ilave edildi ve tüp her 3 dakikada bir karıştırılarak en az 10 dakika 60°C'de su banyosunda inkübe edildi.
4. Numune lizatının berrak olduğundan emin olmak için, 200 µl GB tampon eklendi ve 10 saniye vortekslendi ve 70 oC'de 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon aşamasında tüpü her 3 dakikada bir döndürüyoruz.
5. Aşağıdaki adımlara hazırlanmak için durulama solüsyonunu 70°C'ye ısıtın.
6. İnkübasyonun ardından, lizat örneğine 200 µL %100 etanol eklenir ve iyice karıştırılır. Pipet, silti kırmak için kullanıldığında.

7. 2 mL'lik toplama tüpünü GD sütunu ile yarıya kadar doldurun. Sıvının (herhangi bir çözünmeyen çökelti dahil) GD kolonuna aktarılmasından ve 14.000 g'de 2 dakika santrifüj edilmesinden sonra, akış atılır ve GD kolonu, 2 ml'lik yeni bir toplama tüpüne konur.
8. 400 µl W1 tamponu yapın, GD kolonuna ekleyin ve akışı atmadan ve GD kolonunu 2 ml'lik bir toplama tüpüne yerleştirmeden önce 14000 xg'de 30 saniye santrifüjleyin.
9. Yıkama tamponu (600µl) GD kolonuna eklenir ve 30 saniye 14000-16000 xg'de santrifüjlenir. GD kolonunu 2ml toplama tüpüne geri yerleştirin ve kolon matrisini kurutmak için 14000 xg'de 3 dakika santrifüjleyin.
10. GD kolonunu yeni bir temiz 1.5ml mikro santrifüj tüpüne aktardıktan sonra, kolon matrisinin ortasına 100µL önceden ısıtılmış elüsyon tamponu döküldü ve elüsyon tamponunun tamamen absorbe edilmesi için 3 dakika beklemeye bırakıldı. Ardından, saf DNA'yı ayrıştırmak için 30 saniye boyunca 14000 xg'de santrifüjleyin.
11. DNA'yı -20°C'de saklayın.

B-PVL gen tespiti için tasarlanmış primerler

Astarlar (NCBI) Bioneer, Kore tarafından tasarlanır ve sağlanır ve üreticinin talimatlarına göre yapılır. Nükleaz içermeyen su ile döndürüldükten sonra primerler, liyofilize primerler çözülerek yeniden süspanse edildi. İlk olarak, primerin nmolünün 10 katı kadar su eklenerek, yani nmol 10 ile çarpılarak 100 M'lik bir stok solüsyon oluşturuldu. Daha sonra stok solüsyon, 10µL stok solüsyonu 90µL ile birleştirerek (1:10) seyreltildi. nükleaz içermeyen su ilave edildi ve çalışma solüsyonu -20oC'de tutuldu.DNA'yı -20°C'de saklayın (Çizelge 3.8).

Çizelge 3.8 PVL geni için primer tasarımı (Bioneer/Kore)

Astar	**Sıra 5-3**	**kan basıncı boyutu**
PVL F	CATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCAA	435 bp
PVL R	TGCATCAAGTGTATTGGATAGCAAAAG	

3.2.2 PCR reaksiyon karışımı

PCR reaksiyon karışımı Çizelge 3.9'da gösterilmektedir.

Çizelge 3.9 PVL geni için PCR reaksiyon karışımı (25ul)

Bileşen	**25 µl reaksiyon hacm**
ana karışım	5µl
Şablon DNA'sı	5 µl
İleri astar (10 pmol, ul)	1 µl
Ters astar (10pmole, ul)	1 µl
Serbest nükleaz damıtılmış su	13 µl
Toplam hacm	25 µl

PCR tüpleri, talimatlara göre amplifikasyon sürecini başlatmak için ısı döngüsüne yerleştirildi. Çizelge 3.10, PVL gen tespiti için özel protokole göre PCR amplifikasyon reaksiyonunu göstermektedir.

Çizelge 3.10 PVL geninin saptanması için PCR amplifikasyon protokolü

Adımlar	Hava sıcaklığı	Zaman	Döngüler
ön denatürasyon	95 ºC	5 dakika	1 döngü
denatürasyon	95 ºC	30 saniye	35 devir
Tavlama	60 ºC	30 saniye	
Eklenti	72 ºC	1 dakika	
Son uzatma	72 ºC	5 dakika	1 döngü

3.3 Medya Hazırlığı

Tüm içeriği tamamen çözmek için suda kaynatılarak, ardından pH 7.2'ye ayarlanarak ve 121oC'de (15 Ib/In2) 15 dakika inkübator'da(kuluçka)sterilize edilerek üreticinin talimatlarına göre hazırlanmıştır. 37oC'de 18-24 saat inkübe edilerek sterilize edildi.

3.3.1 Mannitol tuzlu agar (MSA)

Bu araştırma için şu şekilde yapılmıştır: pH-metre özelliklerine göre kalibre edilmiş pH; 121oC'de 15 dakika 15 Ib/In2'de inkübatorlandı ve daha sonra gerektiğinde Petri kaplarına veya tüplerine dağıtıldı, steriliteyi sağlamak için 37oC'de 24 saat inkübe edildi ve kullanılıncaya kadar 4oC'de saklandı.

3.3.2 Kanlı agar

Bu besiyeri, 40g'nin 1L distile su içinde çözülmesi, 50oC'ye soğutulması ve ortama %5 kan eklenmesiyle yapılmıştır. İyice karıştırdıktan sonra sterilize edilmiş tabaklara dökün. Bu besiyeri, patojenik bakterileri yetiştirmek ve ayrıca bakterilerin hemoliz kapasitesini ve hemoliz türünü değerlendirmek için kullanıldı (Forbes *et al.* 2007).

3.3.3 Muller-hinton ağarı

Besiyeri plakaların üzerine dökülmeden önce 45-50oC'ye soğutulur. Plakalar, agar sertleştikten sonra kapakları açık olarak inkübatöre dik olarak yerleştirilerek 10-30 dakika 35oC'de kurutulur. (Forbes *et al.* 2002).

3.3.4 Beyin kalp infüzyon broth

37g 1000 ml distile suda süspanse edin, tüplere dağıtın ve inkübator ile sterilize edin.

3.4 Numune Toplama

Mart 2021'den Eylül 2022'ye kadar, Al-Azadi Eğitim Hastanesi, Kerkük Hastanesi ve Kerkük Halk sağlığı laboratuvarlarındaki 17-79 yaş arası 150 (94 erkek ve 56 kadın) hastadan klinik örnek alındı. S.aureus'un geleneksel yöntemler ve PCR kullanılarak belirlendi ve tanımlandı.. Her numune laboratuvarda Kanlı agar ve Mannitol tuzlu agar plakalarına aşılanarak ve aerobik koşullarda 37 ^{0}C'de 24-48 saat inkübe edildi.

3.5 Çalışma Tasarımı

Araştırmanın amacını gerçekleştirmek için çalışma, Şema (1): Çalışmanın planı'nda belirtildiği gibi planlanmıştır.

A. Pamuklu çubuk kullanılarak hastadan klinik örnekler toplanması
B. S.aureus'un geleneksel yöntemlerle (kültür,gram boyama, katalaz, koagülaz) izolasyonu ve tanımlanması
C. VITEK -2 yoluyla doğrulanması
D. Antibiyotik duyarlılık testinin yapılması (disk difüzyon yöntemi)
E. Biyofilm oluşum testinin yapılması(mikroter plaka yöntemi)
F. PVL genlerinin PCR yöntemi kullanılarak saptanması

3.6 Mikroskobik Özellikler

Şüpheli kolonilerde, bakterilerin tipik morfolojisini ışık mikroskobu altında tespit etmek için gram boyama kullanıldı.

3.6.1 Kanlı agarda koloni morfolojisi

Kanlı agar plağında gelişen kolonilerin renk, boyut, form ve kan hemoliz paterni araştırıldı.

3.6.2 Mannitol tuzlu agar üzerinde büyüme

Plakalara test edilmiş saf bir bakteri kolonisi uygulandıktan sonra, 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Bu besiyeri, mikroorganizmaları seçici olarak örneklerden izole etmek ve yetiştirmek için kullanıldı. Koagülaz pozitif stafilokoklar, mannitol tuz agar üzerinde sarı bir bölge ile sarı koloniler oluşturacaktır (pozitif bir sonuç olarak), ancak diğer stafilokok türleri, besiyerinde renk değişikliği olmaksızın küçük pembe ila kırmızı koloniler oluşturacaktır (Kloos ve Schleifer 1975).

3.6.3 Katalaz üretim testi (Biyokimyasal)

Bir cam slayt üzerine bir damla hidrojen peroksit (%3 H2O2) konuldu ve test edilmiş bakteri kültürlerini içeren bir öze hidrojen peroksit ile karıştırılarak..kabarcıkların ortaya çıkması ise olumlu bir sonuç olarak kabul edildi (Benson 2002).

3.6.4 Koagülaz testi

5 ml seyreltilmiş plazma test tüpüne eklendi, ardından beş damla et suyu kültürü karıştırıldı ve pıhtı oluşumu aranırken 37oC'de bir saat inkübe edildi (Pai *et al.* 2010).

3.7 İzolatların VITEK-2 Sistemi ile Doğrulanması

Bu sistem bir kişisel bilgisayar, kart kaseti, kart doldurma mekanizması, kaset yükleme işleme mekanizması, kart mühürleyici, barkod okuyucu, kaset karuseli ve kuluçka makinesi gibi birden fazla dahili bileşene sahip bir okuyucu/inkübatör içerir. Ayrıca geçirgenlik optiği, atık işleme, alet kontrol elektroniği ve firma gereçleri. Sistem, mikrobiyolojik teşhiste hızı artıran ve daha fazla test ihtiyacını azaltan, hem test hem de kullanıcı için güvenliği artıran tüm düzenli tanımlama testleri için genişletilmiş bir tanımlama veritabanıyla donatıldı. 43 testten (biyokimyasal testler) oluşan bu araştırmada gram pozitif bakteri türleri için GP kartı kullanılmıştır; ek bilgi için eke bakın. Aşağıdaki işlemlerin tümü, üreticinin talimatlarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Prosedür şunları içerir:

1- Süspansiyon yapısı

Bir uçak test tüpünde, üç mililitre normal saline(normal tuzlu su çözeltisi)dolu izole bir koloni ile enfekte edildi. Test tüpü, McFarland standart solüsyonuna (1.5 x 108 CFU/ml) koloni standardizasyonu için yoğunluk kontrol makinesine yerleştirildi.

2- Aşılama

Standartlaştırılmış inokulumlar kasete yerleştirildi ve bir barkod kullanılarak bilgisayar programına bir numune kimlik numarası yüklendi. VITEK 2 kart tipi daha sonra üretim sırasında karta takılan barkodu okur ve bu nedenle kart numune kimlik numarasına bağlanır.

3- Aşılama

Standartlaştırılmış inokulumlar kasete yerleştirildi ve bir barkod kullanılarak bilgisayar programına bir numune kimlik numarası yüklendi. VITEK 2 kart tipi daha sonra üretim

sırasında karta takılan barkodu okur ve bu nedenle kart numune kimlik numarasına bağlanır.

4- Kuluçka ve kart mühürleme

Bant dolgu modülüne yerleştirildi. Kaset kartları dolduğunda okuyucu/inkübatör modülüne aktarıldı. Ekipman, inkübasyon sıcaklığının kontrol edilmesi, kartların optik olarak okunması ve test sonuçlarının analiz için sürekli olarak izlenmesi ve bilgisayara aktarılması da dahil olmak üzere sonraki tüm prosedürleri gerçekleştirir.

5- Testlere Tepkiler

Her testin yanıtlarını belirlemek için hamveriler hesaplanır ve eşiklerle karşılaştırılır. Test yanıtı bulguları VITEK 2 Compact üzerinde + veya - olarak gösterilir.

3.8 Antibiyotik Duyarlılık Testi (Modifiye Kirby-Bauer Yöntemi)

Şu şekilde kullanılmıştır (Vandepitte *et al.* 2003):

1. İnokulum hazırlığı (bulanıklık standardı)

5 ml'lik normal salin (NaCl %0,85) tüpüne 3-5 saf izole koloninin aktarılması, iyice karıştırılması ve 1,5*108 CFU/ml'lik bir kültür elde etmek için McFarland bulanıklık standardına (0,5) ayarlanması.

2. Plaka aşılama testi

Plakaları inoküle etmek için steril bir swabı inokulumlara batırın. Çubuğu sıvı seviyesinin üzerindeki tüpün yan tarafında kuvvetlice sıkıştırarak ve döndürerek fazlalığı giderir Swab, her uygulamadan sonra plakayı 60 derecelik bir açıyla döndürerek, ortamın tüm yüzeyine üç kez sürülmüştür. Son olarak, sürüntü, agar

yüzeyinin kenarından geçirildi. İnokulumlar kapalı kapak olarak birkaç dakika oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

3. Test plakalarının aşılanması

İnokulumlara steril bir swab batırarak plakları inoküle edin. Fazla sıvı, tüpün sıvı seviyesinin üzerindeki tarafında bulunan swabın sıkılması ve sert bir şekilde döndürülmesiyle çıkarılır. Her uygulamadan sonra, çubuk, plakayı 60 derecelik bir açıyla döndürerek, ortamın yüzeyi boyunca üç kez silindi. Son olarak, sürüntü, agar yüzeyinin kenarından geçirildi. İnokulumlar kapalı kapak olarak birkaç dakika oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Steril forseps kullanarak antibiyotik diskini aşılanmış plakanın üzerine koyulur (her plakada 3-4 disk bulunur). Diskler, agar yüzeyine yerleştirilmeden önce oda sıcaklığına ısıtılmalı ve forseps ile hafifçe aşağı itilmelidir. Plakalar etiketlidir. Plakalar, 37 oC'de 18-24 saat süreyle ters çevrilerek inkübe edilir

4. Sonuçların incelenmesi

İnkübasyonun ardından, tüm inhibisyon bölgesinin çapları gözlemlendi ve bir metrik cetvel kullanılarak milimetre cinsinden ölçüldü. Her antibiyotik diski için inhibisyon bölgesinin çapı, klinik ve laboratuvar standartları enstitüsü inhibisyon kriterleriyle karşılaştırılarak hassas, orta ve dirençli kategorilere çevrildi (CLSI 2018).

3.9 Biyofilm Oluşumu Testi (Kantitatif) (Smith *et al.* 2008)

Bakterilerin gece kültürleri BHIB'de 37oC'de 24 saat büyütüldü. İnkübasyon periyodunun sonunda bakteri kültürleri (BHIB) içinde glikoz ile 1:50 oranında seyreltildi ve steril bir 96 oyuklu polistiren mikrotitre plakasının kuyularında biriktirildi ve sabit koşullar altında 37oC'de 24 saat inkübe edildi.

Biyofilm aşağıdaki şekillerde keşfedildi:

1. İnkübasyondan sonra, oyukların içeriği aspire edildi ve oyuklar, bağlanmamış hücreleri çıkarmak için fosfat tamponlu tuzlu su ile üç kez yıkandı. (Not: kontrol, ortam içeren ancak kültür içermeyen üç kuyudur).
2. Mikrotitre plakasının her kuyucuğu 200µL %0.1 kristal viyole solüsyonu aldı ve oda sıcaklığında 10-15 dakika inkübe edildi.
3. Plaka, suya daldırılarak, şiddetle çalkalanarak ve fazla hücreleri ve rengi çıkarmak için bir kağıt havlu yığını üzerinde lekelenerek 3-4 kez D.W ile yıkandı.
4. Mikrotitre plakası, saatlerce veya gece boyunca baş aşağı kurutuldu.
5. Kristal menekşeyi çözündürmek için, mikrotitre plakasının her bir oyuğu, 10 dakika boyunca 200uL %33 glasiyal asetik asit aldı. Mikrotitre plakası oda sıcaklığında inkübe edildi.
6. 200 uL'lik çözünürleştirilmiş kristal menekşe hacmi, taze, düz tabanlı bir mikrotitre kabına aktarıldı.
7. Emicilik, %33'lük bir asetik asit boşluğu kullanılarak 630 nm'de bir plaka okuyucu üzerinde belirlendi.

Biyofilm derecesi şu şekilde tahmin edildi: OD1-ODc = Biyofilm. Her kuyunun optik yoğunluğu (OD), 360 nm'de bir ELISA otomatik okuyucu kullanılarak ölçüldü. Bu test üç kopya halinde yapılır ve ortalama belirlenir. Kesme optik yoğunluğu (O.Dc), negatif kontrolün ortalama O.D'sinden 3 standart sapma (S.D) olarak belirlendi ve bakteri suşları, biyofilm üreticileri veya üreticisi olmayanlar olarak kategorize edilebilir.

3.10 *S. aureus* İzolatının Bakımı ve Muhafazası

Tarafından tanımlanabilir.

3.10.1 Kısa saklama

Saf bakteri izolatları, 20 ml'lik slant steril BHI agar üzerinde evrensel tüplerde yetiştirildi ve daha sonra 1 aya kadar 4 C'de tutuldu (Harley ve Prescott 1996).

3.11 PCR Yöntemi ile PVL Geninin Tespiti

1- DNA Ekstraksiyonu

Geneaid gram pozitif bakteri kiti bileşeni ve reaktif hacmi Çizelge 3.11'de listelenmiştir.

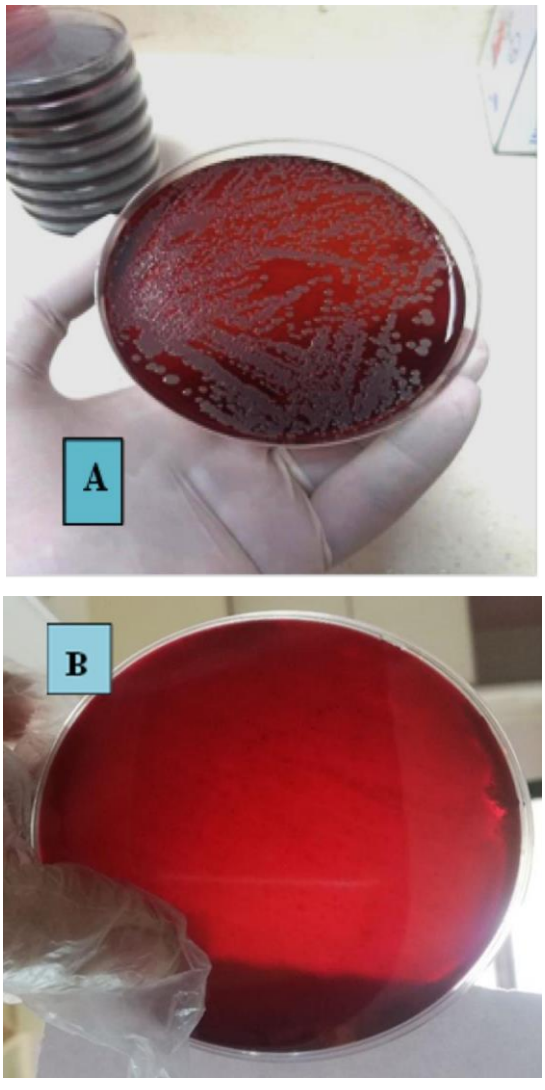
3.12 İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada veriler sayı ve yüzde olarak verilmiş ve verilerin değerlendirilmesinde Ki-kare testi kullanılmıştır. İstatistiksel analiz sistemi uygulamasının kullanılması IBM Sosyal Bilimler İstatistik Paketi(SPSS) İstatistik sürüm 25 (2017) (Lu *et al.* 2015). P değeri 0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilirken, P değeri 0,01 istatistiksel olarak oldukça anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 *S. aureus*'un İzolasyonu ve Tanımlanması

Bu araştırma, hastalardan alınan 150 numuneyi (86 yara sürüntüsü, 62 burun sürüntüsü ve 12 balgam) içermiştir. Bu örnekler gece boyunca 37 °C'de büyük koloni grisi ve beta hemoliz gösteren kanlı agarda Şekil 4.1, ve altın renkli koloniler gösteren mannitol tuzlu agarda kültürlendi Şekil 4.2.

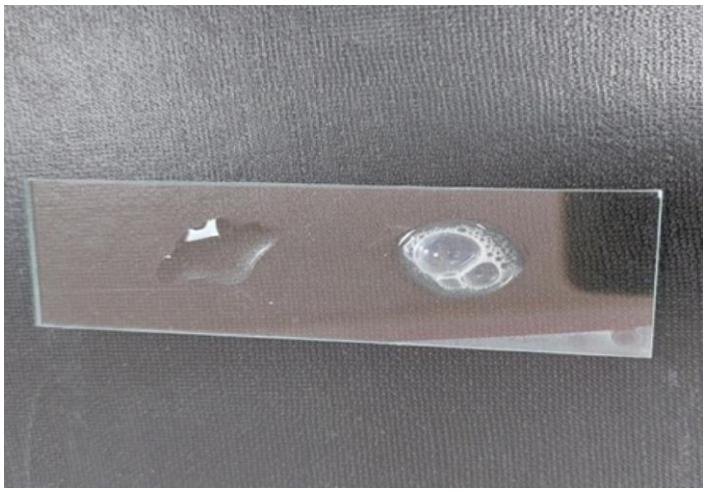


Şekil 4.1 Örneklerin Kanlı Agarda incelenmesi Kanlı agar üzerinde *S. aureus* (A) büyük gri koloniler (B) Beta hemoliz gösterir

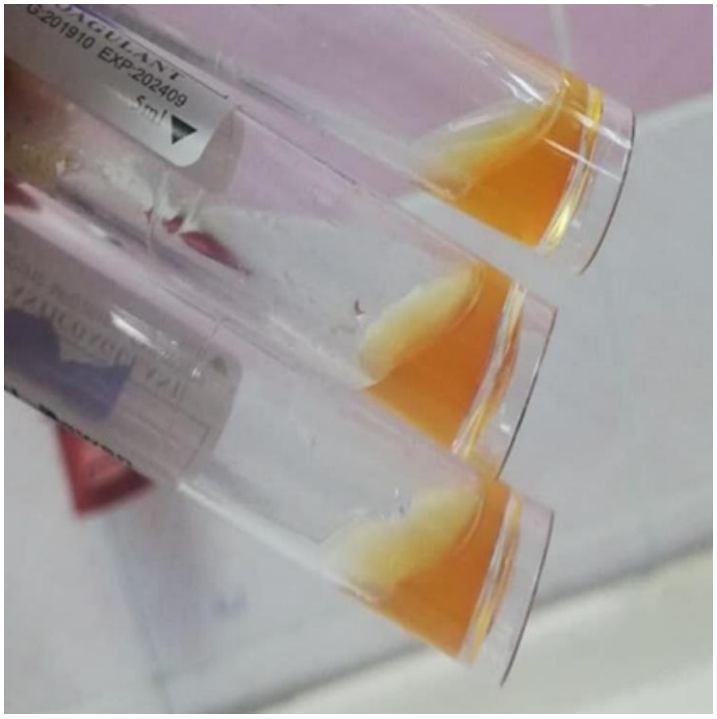


Şekil 4.2 Mannitol tuzlu agar üzerinde *S. aureus*

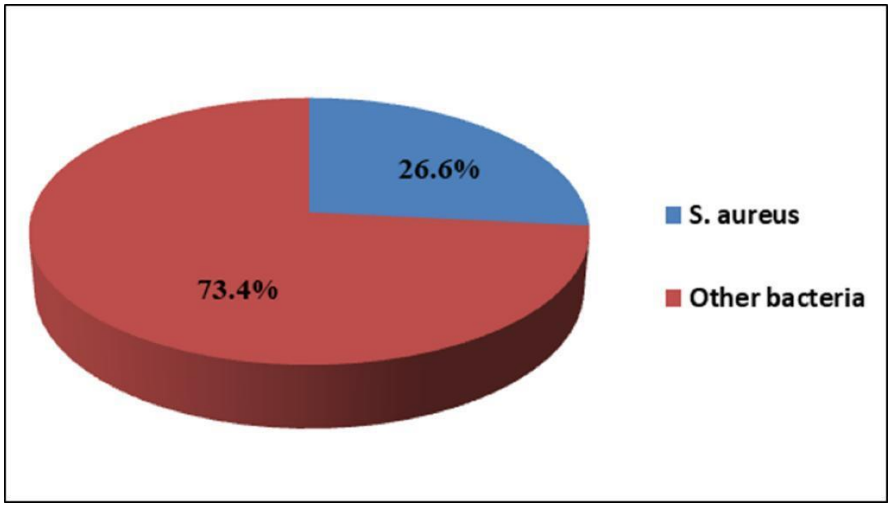
Katalaz testi (Şekil 4.3) ve gram boyama, 90 örneğin gram pozitif bakteri olduğunu ve koagülaz tüp tekniği testi, 55 izolatın *Staphylococcus aureus*'tan şüphelenildiğini ortaya çıkardı (Şekil 4.4). Son olarak, kalan numuneler kimlik doğrulaması için VITEK-2 sistemine dahil edildi. Bulgular, izolatların 40'ının (%26,6) *S. aureus* olduğunu ortaya koydu (bkz. Ek 1).



Şekil 4.3 Katalaz testinin sonucu



Şekil 4.4 *S. aureus* izolatlarının pozitif koagülaz sonuçları



Şekil 4.5 Çalışmadaki *S. aureus* izolatlarının sıklığı

Bulgularımız, bademciklerde *S. aureus* sıklığını inceleyen Fadhil *et al.* çalışması (%25) (Fadhil ve Mohammed 2022, Mohammed *et al.* 2021) (%22.1) çalışmaları ile benzer sonuçlara sahipti.

“*S. aureus*, şiddeti değişen bir dizi hastalıkla ilişkilendirilmiştir ve AIDS, tüberküloz ve viral hepatitin toplamından daha yüksek ölüm oranlarıyla potansiyel olarak ölümcül olduğu bilinmektedir (Dweba *et al.* 2019). Yara enfeksiyonuna, karbonkül ve selülite neden olabilir, ancak kan dolaşımına yayılarak sepsis ve osteomiyelit, septik artrit, endokardit, epidural apse (Almousawi *et al.* 2020) bakteriyemi ve pnömoni gibi çeşitli diğer ciddi sistemik durumlara neden olabilir, (Bae *et al.* 2021).

Çizelge 4.1 *S. Aureus* İzolatların örneklere göre dağılımı

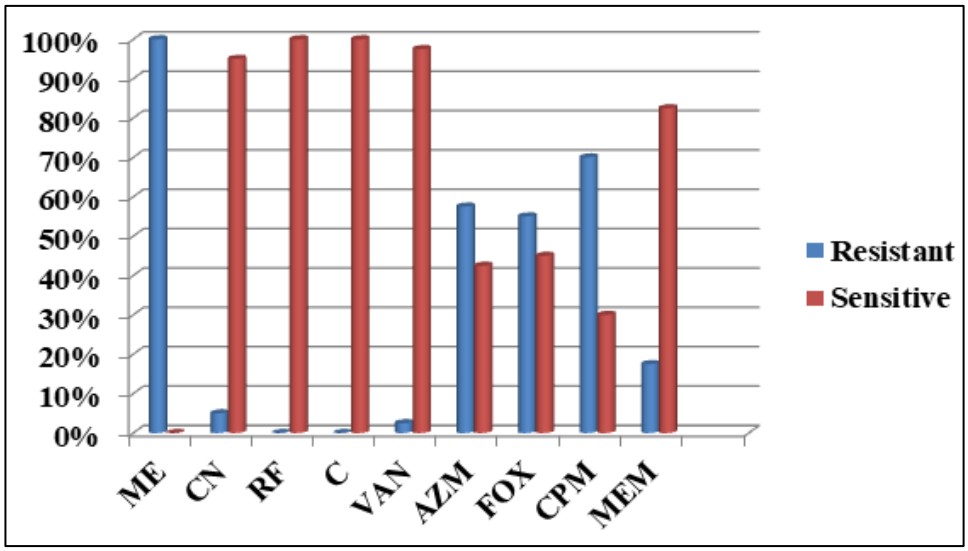
Örnek türü	**Frekans**
Yara	26 (65%)
Burun	13 (32.5%)
Balgam	1 (2.5%)
Toplam	40 (100%)

4.2 *S. aureus* İzolatlarının Örneklerin Kaynağına Göre Dağılımı

Örnek türüne göre izolatların prevalansına göre (Çizelge 4.1) %65'i yaralardan, %32,5'i nazal örneklerden ve %2,5'i balgam örneklerinden izole edilmiştir. Bu analize dahil edilen örneklerin büyük çoğunluğunu yara ve burun örneklerinin oluşturduğu göz önüne alındığında, yaralardan ve nazal sürüntülerden izole edilen *S. aureus*'un balgamla karşılaştırıldığında yüksek oranı tahmin edilmiştir.

4.3 İzolatların Antibiyotik Duyarlılıkları

İnsan patojenlerinin antibiyotik profilinin incelenmesi, özellikle toplum kökenli enfeksiyonlarda bu patojenlerin neden olduğu hastalıkların yönetiminde önemli bir adımdır. Bu çalışmaya dahil edilen *S. aureus* izolatlarının antibiyotik duyarlılık profilini araştırmak için Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılmış ve sonuçlar Şekil 4.6 ve Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.



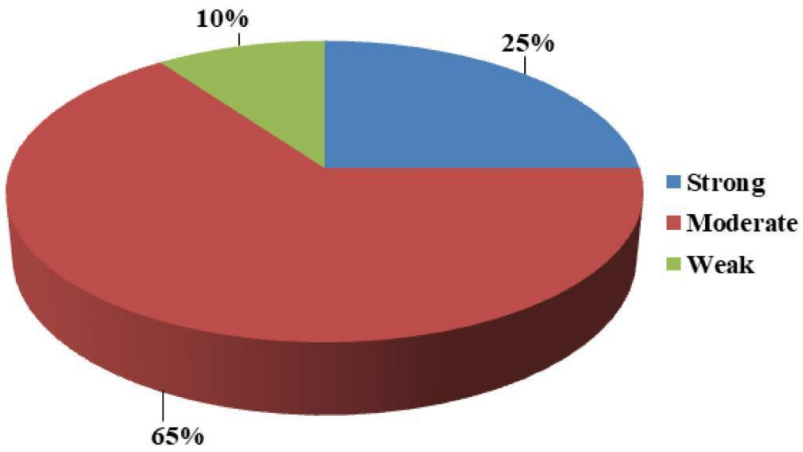
Şekil 4.6 *S. aureus* izolatlarına karşı antibiyotik duyarlılık testi ME:Metisilin, CN: Gentamisin, RF: Rifampisin, C: Kloramfenikol, VAN: Vankomisin, FOX: Sefoksitin, CPM: Sefepim, MEM: Meropenem

Çizelge 4.2 İzolatların antibiyotik duyarlılık sonuçları

Antibiyotikler	**duyarlılık**	**Direnç**	**p/değeri**
Metisilin	0 (0%)	0 (100%)	0.0001
Gentamisin	38 (95%)	2 (5%)	0.0001
Kloramfenikol	40 (100%)	0 (0%)	0.0001
Rifampisin	40 (100)	0 (0 %)	0.0001
Venkomisin	39 (97.5%)	1 (2.5%)	0.0001
Azitromisin	17 (42.5%)	23 (57.5%)	0.207
Sefoksitin	18 (45%)	22 (55%)	0.493
Sefapim	12 (30%)	28 (70%)	0.0001
Meropenem	33 (82.5%)	7 (17.5%)	0.0001

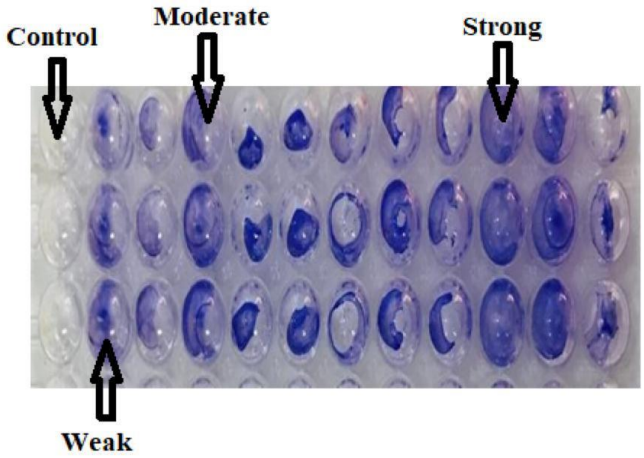
Araştırmamızda metisilin direnç izolatları (%100) bulundu. Erbil'den (Rafiq *et al.* 2017) ve Baladroz/Diyala'dan (Hatem 2017) tarafından yapılan diğer çalışmalar sırasıyla %95 ve %93,42 idi. Bu direnç, çoğu beta-laktam antibiyotik için düşük bir afiniteye sahip olan ve dolayısıyla hepsine çapraz dirence aracılık eden yeni bir PBP, PBP2a'nın elde edilmesinin sonucudur. PBP2a, muhtemelen antibiyotiklerle doyurulmuş temel PBP'lerin yerini alabilir ve hücre duvarı montajı için gerekli işlevleri yerine getirebilir (Straume *et al.* 2020).

Gentamisin, aminoglikozit grubuna aittir. Dünya çapında *S. aureus* enfeksiyonlarının tedavisi için diğer antibiyotiklerle kombinasyon halinde en sık kullanılan antibiyotiklerden biridir. Antibiyotikleri hedefleyen bakterisidal ribozom sadece aminoglikozitlerdir. Bu, çeviri sırasında yanlış okumaya neden olan farklı etki mekanizmalarından kaynaklanmaktadır. *S. aureus*, genetik elementler tarafından kodlanan aminoglikozit değiştirici enzimler (AME'ler) tarafından antibiyotik inaktivasyonu yoluyla bu antibiyotik sınıfına direnç geliştirmiştir (Rahimi 2016). *S. aureus*'un Gentamisine duyarlılığı %95 idi. Bu sonuçlar, Kerkük'ten (Khalaf *et al.* 2020) %95,4 oranındaki çalışma ile uyumludur Şekil 4.7.



Şekil 4.7 *S. aureus* izolatlarının biyofilm üretiminin sonuçları

Sonuçlar, izolatların %100'ü biyofilm fenotip pozitif olduğundan, *S. aureus* izolatlarının biyofilm üretme kapasitesinin dikkate değer bir yüksek olduğunu kanıtladı (şekil 4.8). Bu, *S. aureus*'un tüm izolatlarının biyofilm üretme yeteneğine sahip olduğunu bildiren ve şu sonuçları veren (Omar ve Mohammed 2021) çalışmasıyla aynı fikirdeydi: zayıf (%17.3), orta (%52.7), güçlü ve (Jaddoa ve Al- Mathkhury 2018). ayrıca tüm (%100) *S. aureus* izolatlarının biyofilm üretme kapasitesine sahip olduğunu bildirmiştir.



Şekil 4.8 İzolatların biyofilm oluşturma kapasitesi

Biyofilm derecesini tahmin etmek için 630 nm'de absorbansı ölçmek için bir mikroplaka okuyucu kullanıldı. Buna göre, absorbans değerleri, mikrotitre kuyusunun yüzeyinde incelenen izolatların oluşturduğu biyofilm kalınlığının derecesini temsil eder. Elde edilen sonuçlar üç gruba ayrıldı (zayıf, orta ve güçlü).

Mevcut çalışma, 40 MRSA izolatından 4'ünün (%10) zayıf bir biyofilm oluşturduğunu, 26'sının (%65) orta düzeyde bir biyofilm oluşturduğunu ve 10'unun (%25) güçlü bir biyofilm oluşturduğunu bulmuştur. Sonuçlarımız, (%9.09) zayıf biyofilm üreticileri, (%69.69) orta düzeyde biyofilm üreticileri ve (%21.2) güçlü biyofilm üreticileri bildiren (Jaddoa ve Al-Mathkhury 2018) çalışmasına yaklaşık olarak benzerdi.

Bakteriyel biyofilmin çeşitli tıbbi hastane enfeksiyonlarında enfeksiyona katkıda bulunan bir virülans faktörü olduğu uzun zamandır düşünülmektedir. Biyofilm fizyolojisi, yapısı ve bileşiminin daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunan biyofilm çalışmaları için birkaç yeni metodoloji yakın zamanda geliştirilmiş veya uyarlanmıştır (Azeredo *et al.* 2017).

S. aureus biyofilm üreten izolatların kabiliyeti, zenginleştirilmiş ortam, TSI ile takviye edilmiş TSI kullanılarak ekzopolisakarit üretiminin arttırılmasına dayalı olarak, biyofilm biyokütlesinin tespiti için standart bir test olarak kabul edilen önceden sterilize

edilmiş 96 oyuklu polistiren mikrotitre plakaları kullanılarak değerlendirildi. %1 glikoz ve kristal menekşe lekeli ortam ile desteklenmiş TSI işlemi yapılmıştır(Atshan *et al.* 2012).

Bu teknik, karboksilik asit, sülfürik asit ve fosforik asit grupları gibi anyonlara (negatif yüklü) seçici olarak bağlanan ve tüm biyofilmin genel bir ölçüsünü veren katyonik bir boya olan kristal ihlal lekesine dayanıyordu. Çeşitli Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerde hücre eklerine ve biyofilm oluşumuna hızla erişmek için standart bir teknik olarak kullanılmış ve biyofilm ile ilişkili enfeksiyonu teşhis etmek ve ölçmek için daha uygun bir yöntem olarak ele alınmıştır (Wu *et al.* 2009).

4.5 Moleküler Tahlil

Tarafından tanımlanabilir.

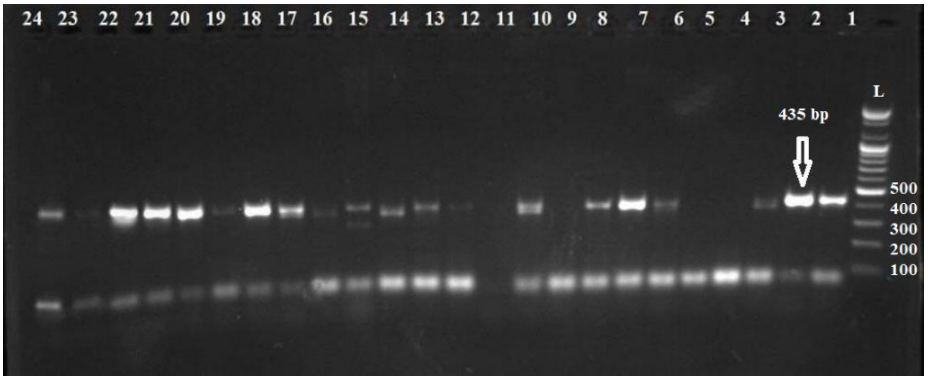
4.5.1 Genomik DNA ekstraksiyonu

40 *S. aureus* izolatının bir gecelik kültürlerinden elde edilen tüm genom DNA'sı, PrestoTM Mini gDNA Bacteria Kit Quick Protocol (Geneaid) ile ekstre (çıkarma) edildi. Ayrıca, kullanılan ekstraksiyon yönteminin etkinliğini gösteren, ekstrakte edilmiş DNA'nın tek bir bandının varlığını doğrulamak için ekstrakte edilen DNA'yı elektroforez yoluyla çalıştırdık.

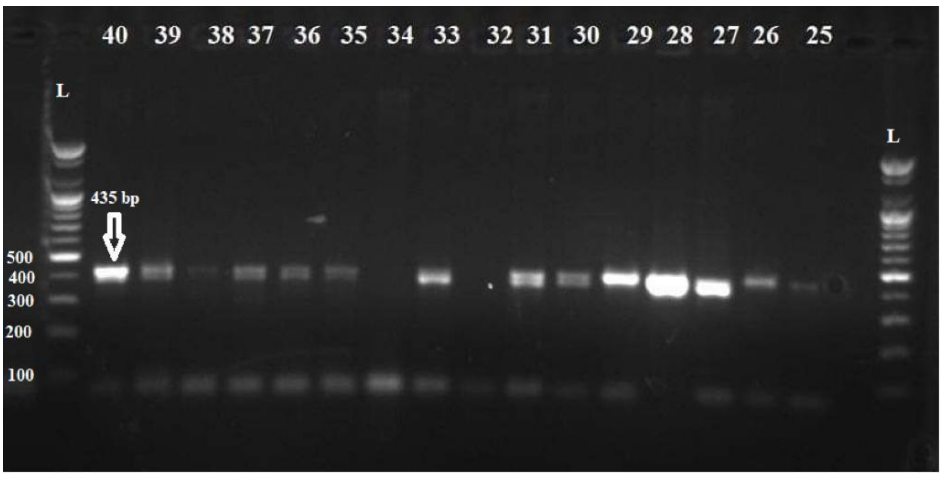
4.5.1.1 PVL geninin tespiti

S. aureus izolatlarında lökotoksin [Panton-Valentine superantigen Toxin (PVL)] geninin saptanması, bu gen için PCR tekniği ile monopleks patern kullanılarak çoğaltılan bakteri DNA'sının üçüncü bölümde listelenen spesifik primerler kullanılarak ve optimum koşul üçüncü bölümde gösterilen PCR'de bu geni amplifiye etmek için. Agaroz jel elektroforezi ile teyit edilen ve Şekil 4.9, 4.10 ve Ek (3)'te gösterilen

ultraviyole (UV) transillüminatör altında fotoğraflanan PVL geni, (435) bp'lik bir ürünü ortaya çıkarmak için amplifikasyondu.

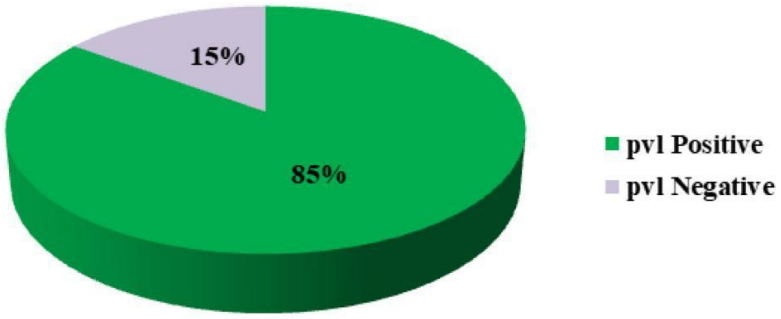


Şekil 4.9 *S. aureus*'un PCR amplifikasyonu üreten (PVL) geninin agaroz jel elektroforezi, beklenen amplifikasyon ürünleri 435 bp'dir (şerit 1-24: örnekler, hat L: merdiven 1000bp, %2 agroz jel ve 45 için 125 Volt) TBE tamponlarında min



Şekil 4.10 *S. aureus*'un PCR amplifikasyonu üreten (PVL) geninin agaroz jel elektroforezi, beklenen amplifikasyon ürünleri 435 bp'dir (şerit 25-40:numuneler, şerit L: merdiven 1000bp, %2 agroz jel ve 45 dakika TBE tamponlarında

Hastanın toplam 40 *S. aureus* izolatından 34'ü (%85) Şekil (4.11)'de gösterilen PVL geni için pozitif bulundu.



Şekil 4.11 *S. aureus* izolatlarında PVL geninin sonuçları

Bu gen için yapılan önceki araştırmalar (Shahmoradi *et al.* 2019) klinik izolatlarda bu genin % 2 prevalansını ortaya koyarken (Anwar, Hussein ve Salih, 2020) izolatların hiçbirinde bu genin bulunmadığını ortaya koymuş, bu da bunun şu anlama geldiğini ima etmektedir: genin diyabetik yara enfeksiyonlarında daha az yaygın olduğunu, (Cavalcante *et al.*, 2021), Atopik Dermatit izolatlarının %70,9'unda bu gene sahip olduğunu elde etmiş olup bu da kutanöz enfeksiyonlarda rol oynadığını düşündürmektedir. Bununla birlikte, AD hastalarının yıllarca süren kronik yaraları olduğunu ve bu türlerle kolonize olan bu insanları sürekli olarak invaziv enfeksiyonlara karşı savunmasız hale getirdiğini belirtmek önemlidir. (Motallebi ve arkadaşları, 2021) tarafından yapılan bir araştırma % 0 bildirmekte olup PVL geninin SCCmec IV üzerinde taşınan toplumdan edinilmiş MRSA'nın moleküler bir belirteci olduğunu öne sürerken, pemfigus ile hastaneye yatırılan ve SCCmec II ve III'e taşınan hastalar çalışmasındaki MRSA suşlarının hastaneden izole edilen MRSA suşları olduğunu ileri sürmektedir.

S. aureus izolatlarında PVL geninin sıklığındaki farklılıklar, toplanan örneklerde bulunan MRSA suşlarının sayısına da bağlanabilir (Shahmoradi *et al.* 2019).

Ülkeler arasındaki yaygınlık oranlarındaki büyük eşitsizlik, enfeksiyon kontrol politikalarındaki farklılıklardan ve bu alandaki diğer faktörlerden kaynaklanıyor olabilir. MRSA kolonizasyon oranı arttıkça, ilaca dirençli yara enfeksiyonları geliştirme

riski de artmaktadır. Sonuç olarak, enfeksiyondan mümkün olduğunca kaçınılmalıdır. MRSA'nın hızlı ve doğru tespiti, hem hastane hem de toplum temelli tipler dahil olmak üzere yaraların uygun klinik yönetimi için kritik öneme sahiptir. Doğruluğu ve tekrarlanabilirliği nedeniyle, PCR ile mecA saptaması, MRSA'yı belirlemek için standart yöntem olarak kabul edilmiştir (Kareem Al-Jubori ve Ali 2015).

PVL geni, dünya çapında CA-MRSA suşları arasında oldukça yaygındır. Araştırmalara göre, dünya çapında CA MRSA izolatlarının saptanmasında bir belirteç olarak kullanılan bu gen için TK-MRSA izolatlarının yüzde 98'inde yapılan testler pozitif çıkmıştır. Klinik çalışmalara göre PVL, nekrotizan hastalıkta önemli bir virülans faktörüdür (Divyakolu ve arkadaşları 2019).

Bu toksinin bir bileşeni olan LukS-PV, nekrotizan pnömoni hastalarının akciğerlerinde bulunmuş olup bu da PVL'nin apoptozu indüklediğini ve doğrudan nekrotizan pnömoni patolojisine dahil olduğunu ima etmektedir (Dweba, Zishiri ve El Zowalaty 2019). Ancak, PVL ve CA-MRSA arasındaki bağlantı tartışmalıdır. TK-MRSA için bir tarama belirteci olarak kullanılabilmesine rağmen, PVL-pozitif HA-MRSA suşlarının varlığı nedeniyle saptanması zordur. HA-MRSA sonucunda toksisitesi artmış çoklu ilaca dirençli HA-MRSA izolatları ortaya çıkabilmektedir. Mevcut MRSA'dan gelen PVL fajlarının diğer HA-MRSA suşlarına yayılması beklendiğinden, HA-MRSA enfeksiyonları hastane kaynaklı veya toplum kaynaklı olarak sınıflandırılmalıdır (Bae *et al.* 2021).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuçlar

1. *S. aureus* klinik izolatların %26,6'sında pozitif bulundu.
2. Yara örnekleri en fazla izolat verirken, balgam örnekleri en az izolat verdi.
3. Tüm izolatlar metisiline dirençli (%100) iken Rifampisin ve Kloramfenikole duyarlıydı. Vankomisine dirençli suşlar da keşfedildi.
4. Çoğunluğu orta düzeyde biyofilm potansiyeline sahip olmakla birlikte, farklı düzeylerde de olsa hepsi biyofilm yapıcıydı.
5. PVL geni klinik izolatların %85'inde bulundu.

Öneriler

1. PVL gen tespiti, CA-MRSA için bir belirteç olmasına rağmen, HA-MRSA suşlarında da bulunur. Bu genin ekspresyonunu her iki MRSA izolatında karşılaştırmak için gelecekteki çalışmalar gereklidir.
2. Vankomisine dirençliliğe neden olan mutasyon tipini belirlenebilir.
3. Irak hastanelerinde tıbbi cihaz bağlantılı enfeksiyonlarda S.aureus prevalansının araştırılması yapılabilir.

KAYNAKLAR

Abdelraheem, W. M., Khairy, R. M., Zaki, A. I. and Zaki, S. H., 2021. Effect of ZnO nanoparticles on methicillin, vancomycin, linezolid resistance and biofilm formation in Staphylococcus aureus isolates. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 20(1): 54.

Almousawi, A. E., Alhatami, A. O. and Alaraji, F. 2020. An overview: the virulence capacity, resistance mechanism, integron association, biofilm formation ability, and methicillin-resistance traits among *Staphylococcus aureus*. Kufa Journal For Veterinary Medical Sciences, 11(2).

Anwar, K., Hussein, D. and Salih, J. 2020. Antimicrobial Susceptibility Testing and Phenotypic Detection of MRSA Isolated from Diabetic Foot Infection. International Journal of General Medicine, 13: 1349.

Atshan, S. S., Nor Shamsudin, M., Sekawi, Z., Lung, L. T. T., Hamat, R. A., Karunanidhi, A., Mateg Ali, A., Ghaznavi-Rad, E., Ghasemzadeh-Moghaddam, H., Chong Seng, J. S. and Nathan, J. J., 2012. Prevalence of adhesion and regulation of biofilm-related genes in different clones of *Staphylococcus aureus*. Journal of BioMedicine and Biotechnology, 2: 21.

Azeredo, J., Azevedo, N.F., Briandet, R., Cerca, N., Coenye, T., Costa, A.R., Desvaux, M., Di Bonaventura, G., Hébraud, M., Jaglic, Z. and Kačániová, M., 2017. Critical review on biofilm methods. Critical Reviews in Microbiology, 43(3): 313-351.

Azmi, K., Qrei, W. and Abdeen, Z. 2019. Screening of genes encoding adhesion factors and biofilm production in methicillin resistant strains of *Staphylococcus aureus* isolated from Palestinian patients. BMC Genomics, 20(1): 1-12.

Bae, J., Jin, H., Kim, J., Park, M., Lee, J. and Kim, S. 2021. Molecular Characteristics and Exotoxins of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Biomedical Science Letters, 27(4): 195-207.

Bartlett, A. H. and Hulten, K. G. 2010. '*Staphylococcus aureus* pathogenesis: secretion systems, adhesins, and invasins, The Pediatric Infectious Disease Journal, 29(9): 860-861.

Bellanger, X., Payot, S., Leblond-Bourget, N. and Guédon, G. 2014. Conjugative and mobilizable genomic islands in bacteria: evolution and diversity. FEMS Microbiology Reviews, 38(4): 720-760.

Benson, H. J. 2002. Bacterial population counts, microbiological applications 8th Edition. Published by New York: McGraw Hill, 5: 87.

Berkowitz, F. E. and Jerris, R. C. 2016. Practical medical microbiology for clinicians. John Wiley and Sons, 2: 44.

Bien, J., Sokolova, O. and Bozko, P. 2011. Characterization of virulence factors of *Staphylococcus aureus*: novel function of known virulence factors that are implicated in activation of airway epithelial proinflammatory response. Journal of Pathogens, 2: 11-20.

Bokarewa, M. I., Jin, T. and Tarkowski, A. 2006. *Staphylococcus aureus*: staphylokinase. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 38(4): 504-509.

Cavalcante, F. S., Saintive, S., Carvalho Ferreira, D., Rocha Silva, A. B., Guimarães, L. C., Braga, B. S., Dios Abad, E. D., Ribeiro, M. and Netto dos Santos, K. R. 2021. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus from infected skin lesions present several virulence genes and are associated with the CC30 in Brazilian children with atopic dermatitis. Virulence, 12(1): 260-269.

Clauditz, A., Resch, A., Wieland, K. P., Peschel, A., and Götz, F. 2006. Staphyloxanthin plays a role in the fitness of Staphylococcus aureus and its ability to cope with oxidative stress. Infection and Immunity, 74(8): 4950-4953.

Corbeil, A., Labrie, J., Goetz, C., Dufour, S., Doghri, I., Rivière, L., and Jacques, M. 2019. Search for superantigen genes in coagulase-negative staphylococci isolated from bovine milk in Canada. Journal of Dairy Science, 102(3): 2008-2010.

Divyakolu, S., Chikkala, R., Ratnakar, K. S., and Sritharan, V. 2019. Hemolysins of Staphylococcus aureus—An update on their biology, role in pathogenesis and as targets for anti-virulence therapy. Advances in Infectious Diseases, 9(2): 80-104.

DuMont, A. L. and Torres, V. J. 2014. Cell targeting by the *Staphylococcus aureus* pore-forming toxins: it's not just about lipids. Trends in Microbiology, 22(1): 21–27.

Dunyach-Remy, C., Ngba Essebe, C., Sotto, A., and Lavigne, J. P. 2016. *Staphylococcus aureus* toxins and diabetic foot ulcers: role in pathogenesis and interest in diagnosis. Toxins, 8(7): 209.

Dweba, C. C., Zishiri, O. T. and El Zowalaty, M. E. 2019. Isolation and molecular identification of virulence, antimicrobial and heavy metal resistance genes in livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Pathogens, 8(2): 79.

Evangelista, S. de S. and Oliveira, A. C. de 2015. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a global problem. Revista Brasileira de Enfermagem, 68: 136–143.

Fadhil, H. and Mohammed, B. J. 2022. Molecular and Classical identification of *Staphylococcus aureus*, Isolated from Iraqi Patients with Recurrent Tonsillitis. Medico-Legal Update, 22(1): 76-79.

Forbes, B. A., Sahm, D. F. and Weissfeld, A. S. 2002. Pseudomonas, Burkholderia, and similar organisms. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology, 11: 448–461.

Forbes, B. A., Sahm, D. F. and Weissfeld, A. S. 2007. Diagnostic microbiology, pp. 288-302, St Louis: Mosby.

Funke, B. R., Tortora, G. J. and Case, C. L. 2016. Microbiology (5MB/6MB): Adapted from microbiology: an introduction. Pearson Education South Asia Pte Limited, 1: 9.

Guo, Y., Song, G., Sun, M., Wang, J., and Wang, Y. 2020. Prevalence and therapies of antibiotic-resistance in *Staphylococcus aureus*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 10: 107.

Prescott, L. M. and Harley, J. P. 1996. Microbiology. Dubuque, IA: Brown, 2: 34-37.

Hatem, Z. A. 2017. Investigation of virulence factors of *Staphylococcus. aureus* that ısolated from different clinical ınfections in baladroz city (Iraq). Diyala Journal For Pure Science, 13(3-2).

Hiramatsu, K., Katayama, Y., Matsuo, M., Sasaki, T., Morimoto, Y., Sekiguchi, A., and Baba, T. 2014. Multi-drug-resistant *Staphylococcus aureus* and future chemotherapy. Journal of Infection and Chemotherapy, 20(10): 593-601.

Jaddoa, N. T. M. and Al-Mathkhury, H. J. F. 2018. Gentamicin modulates the gene expression of hla in methicillin resistance *Staphylococcus aureus* biofilm. Journal Global Pharma Technolgy, 10(07): 61–70.

Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A. and Kamil, M. A. 2018. Bacterial biofilm and associated infections. Journal of the Chinese Medical Association, 81(1): 7-11.

Kadariya, J., Smith, T. C. and Thapaliya, D. 2014. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. Biomed Research International, 2: 14-20.

Kareem, S. M., Al-Jubori, S. S. and Ali, M. R. 2015. Prevalence of erm genes among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* MRSA Iraqi isolates. International Journal Curr Microbiology Science, 4(5): 575–585.

Khalaf, S. A., Mahdi, N. B. and Ismail, A. K. M. 2020. Molecular detection of sea gene and antimicrobial susceptibility pattern of *Staphylococcus aureus* strains ısolated from food handlers in Kirkuk city, Iraq. Science, 1: 7.

Kloos, W. E. and Schleifer, K. H. 1975. Isolation and characterization of staphylococci from human skin II. descriptions of four new species: Staphylococcus warneri, Staphylococcus capitis, Staphylococcus hominis, and Staphylococcus simulans1. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 25(1): 62-79.

Kloos, W. E. and Schleifer, K. H. 1975. Simplified scheme for routine identification of human Staphylococcus species. Journal of Clinical Microbiology, 1(1): 82–88.

Lade, H. and Kim, J. S. 2021. Bacterial targets of antibiotics in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antibiotics, 10(4): 398.

Licitra, G. 2013. Etymologia: *Staphylococcus*. Emerging Infectious Diseases, 19(9): 1553.

Lin, Y. C. and Peterson, M. L. 2010. New insights into the prevention of *staphylococcal* infections and toxic shock syndrome. Expert Review of Clinical Pharmacology, 3(6): 753–767.

Lipsky, B. A., Kollef, M. H., Miller, L. G., Sun, X., Johannes, R. S., and Tabak, Y. P. 2010. Predicting bacteremia among patients hospitalized for skin and skin-

structure infections: derivation and validation of a risk score. Infection Control and Hospital Epidemiology, 31(8): 828-837.

Lister, J. L. and Horswill, A. R. 2014. *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 4: 178.

McPherson, R. A. and Pincus, M. R. 2021. Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods E-book. Elsevier Health Sciences, 3: 67-69.

Menyhárt-Laub, K. 2017. The epidemiology of *Staphylococcus aureus* nasal carriage in preschool children and university students in Hungary. MSc. Thesis, Semmelweis University, 44-50 page, Hungary.

Miklasińska-Majdanik, M., Kępa, M., Wojtyczka, R. D., Idzik, D., and Wąsik, T. J. 2018. Phenolic compounds diminish antibiotic resistance of Staphylococcus aureus clinical strains. International Journal of Environmental Research and Public Health, 15(10): 2321.

Mohammed, K. A., Abdulkareem, Z. H., Alzaalan, A. R. and Yaqoob, A. K. 2021. typing of Isolated from Clinical Specimens from Outpatients in Iraq. Polish Journal of Microbiology, 70(1): 79-85.

Monteiro, R., Hébraud, M., Chafsey, I., Chambon, C., Viala, D., Torres, C., Poeta, P. and Igrejas, G. 2015. Surfaceome and exoproteome of a clinical sequence type 398 methicillin resistant Staphylococcus aureus strain. Biochemistry and Biophysics Reports, 3: 7-13.

Motallebi, M., Jabalameli, F., Asadollahi, K., Taherikalani, M. and Emaneini, M. 2016. Spreading of genes encoding enterotoxins, haemolysins, adhesin and biofilm among methicillin resistant Staphylococcus aureus strains with staphylococcal cassette chromosome mec type IIIA isolated from burn patients. Microbial Pathogenesis, 97: 34-37.

Motallebi, M., Alibolandi, Z., Aghmiyuni, Z. F., van Leeuwen, W. B., Sharif, M. R. and Moniri, R. 2021. Molecular analysis and the toxin, MSCRAMM, and biofilm genes of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains isolated from pemphigus wounds: A study based on SCCmec and dru typing. Infection, Genetics and Evolution, 87: 104644.

Rafiq, S., Salih, R. and HAMAD, P. 2017. Vancomycin resistance among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples in Erbil city, Iraq. Kirkuk University Journal-Scientific Studies, 12(2): 108–120.

Nabiel, Y. and Barakat, G. 2017. Correlation of virulence determinants of *Staphylococcus aureus* to the severity of diabetic foot ulcers in a tertiary care centre, Egypt. Microbiology Research Journal International, 1: 8.

Neopane, P., Nepal, H. P., Shrestha, R., Uehara, O. and Abiko, Y. 2018. In vitro biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from wounds of hospital-admitted patients and their association with antimicrobial resistance. International Journal of General Medicine, 3: 25-32.

Oliveira, D., Borges, A. and Simões, M. 2018. *Staphylococcus aureus* toxins and their molecular activity in infectious diseases. Toxins, 10(6): 252.

Omar, N. N. and Mohammed, R. K. 2021. A molecular study of toxic shock syndrome toxin gene (tsst-1) in β-lactam resistant *Staphylococcus aureus* clinical ısolates. Iraqi Journal of Science, 5(33): 825-837.

Otto, M. 2013. *Staphylococcal* infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. Annual Review of Medicine, 64: 175-188.

Pai, V., Rao, V. I. and Rao, S. P. 2010. Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [MRSA] isolates at a tertiary care hospital in Mangalore, South India. Journal of Laboratory Physicians, 2(02): 82-84.

Panchal, V. V., Griffiths, C., Mosaei, H., Bilyk, B., Sutton, J. A., Carnell, O. T., Hornby, D. P., Green, J., Hobbs, J. K., Kelley, W. L. and Zenkin, N. 2020. Evolving MRSA: High-level β-lactam resistance in *Staphylococcus aureus* is associated with RNA Polymerase alterations and fine tuning of gene expression. PLoS Pathogens, 16(7): e1008672.

Rahimi, F. 2016. Characterization of resistance to aminoglycosides in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from a tertiary care hospital in Tehran, Iran. Jundishapur Journal of Microbiology, 1: 9.

Rocchetti, T. T., Martins, K. B., Martins, P. Y. F., Oliveira, R. A. D., Mondelli, A. L., Fortaleza, C. M. C. B. and Cunha, M. D. L. R. D. S. D. 2018. Detection of the

mecA gene and identification of Staphylococcus directly from blood culture bottles by multiplex polymerase chain reaction. Brazilian Journal of Infectious Diseases, 22: 99-105.

Rossi, C. C., Pereira, M. F. and Giambiagi-deMarval, M. 2020. Underrated Staphylococcus species and their role in antimicrobial resistance spreading. Genetics and Molecular Biology, 5: 43.

Santos, V. M., Martins, H. B., Rezende, I. S., Barbosa, M. S., Andrade, E. F., Souza, S. G., Campos, G. B., Oliveira, P. S., Sousa, D. S., Da Silva, D. C. and Amorim, A. T. 2014. Virulence factor profile of Staphylococcus aureus isolated from bovine milk from Brazil. Food and Nutrition Sciences, 3: 20.

Shahmoradi, M., Faridifar, P., Shapouri, R., Mousavi, S. F., Ezzedin, M. and Mirzaei, B. 2019. Determining the biofilm forming gene profile of Staphylococcus aureus clinical isolates via multiplex colony PCR method. Reports of Biochemistry and Molecular Biology, 7(2): 181.

Spaulding, A. R., Salgado-Pabón, W., Kohler, P. L., Horswill, A. R., Leung, D. Y. and Schlievert, P. M. 2013. *Staphylococcal* and *streptococcal* superantigen exotoxins. Clinical Microbiology Reviews, 26(3): 422-447.

Straume, D., Piechowiak, K. W., Olsen, S., Stamsås, G. A., Berg, K. H., Kjos, M., Heggenhougen, M. V., Alcorlo, M., Hermoso, J. A. and Håvarstein, L. S. 2020. Class A PBPs have a distinct and unique role in the construction of the pneumococcal cell wall. Proceedings of the National Academy of Sciences, 117(11): 6129-6138.

Taylor, T. A. and Unakal, C. G. 2017. *Staphylococcus aureus,* Statpearls. Publishing: Treasure Island, FL, USA, 1: 5.

Taylor, T. A. and Unakal, C. G. 2021. *Staphylococcus aureus* in StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing.

Truant, A. L. 2016. Manual of commercial methods in clinical microbiology. John Wiley and Sons, 3: 45.

Vandepitte, J., Verhaegen, J., Engbaek, K., Piot, P., Heuck, C. C., Rohner, P. and Heuck, C. C. 2003. Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. World Health Organization, 2(33): 445-449.

Viswanathan, V., Pendsey, S., Radhakrishnan, C., Rege, T. D., Ahdal, J. and Jain, R. 2019. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in diabetic foot infection in India: a growing menace. The International Journal of Lower Extremity Wounds, 18(3): 236-246.

Wang, D., Zhang, L., Zhou, X., He, Y., Yong, C., Shen, M., Szenci, O. and Han, B. 2016. Antimicrobial susceptibility, virulence genes, and randomly amplified polymorphic DNA analysis of Staphylococcus aureus recovered from bovine mastitis in Ningxia, China. Journal of Dairy Science, 99(12): 9560-9569.

Wang, F., Zhou, H., Olademehin, O. P., Kim, S. J. and Tao, P. 2018. Insights into key interactions between vancomycin and bacterial cell wall structures. ACS Omega, 3(1): 37-45.

Wang, F. D., Wu, P. F. and Chen, S. J. 2019. Distribution of virulence genes in bacteremic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from various sources. Journal of Microbiology, Immunology and Infection, 52(3): 426–432.

Wu, J., Xu, H., Tang, W., Kopelman, R., Philbert, M. A. and Xi, C. 2009. Eradication of bacteria in suspension and biofilms using methylene blue-loaded dynamic nanoplatforms. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 53(7): 3042-3048.

Zhen, X., Lundborg, C. S., Zhang, M., Sun, X., Li, Y., Hu, X., Gu, S., Gu, Y., Wei, J. and Dong, H. 2020. Clinical and economic impact of methicillin-resistant Staphylococcus aureus: a multicentre study in China. Scientific Reports, 10(1): 3900.

EKLER

Ek 1: Mevcut çalışmanın antibiyotik duyarlılık sonuçları

Ek 2: S. aureus izolatlarında biyofilm oluşturma kapasitesinin sonuçları

Ek 3: *S. aureus* izolatları arasında PVL geninin sonuçları.

Ek 4: Vitek 2 sisteminin sonuçları.

Ek 1: Mevcut çalışmanın antibiyotik duyarlılık sonuçları

No.	ME	CN	RF	C	VAN	AZM	FOX	CPM	MEM
1	R	S	S	S	S	R	R	R	R
2	R	S	S	S	S	S	S	R	S
3	R	S	S	S	S	S	S	S	S
4	R	S	S	S	S	R	R	R	S
5	R	S	S	S	S	R	R	R	S
6	R	S	S	S	S	S	S	S	R
7	R	S	S	S	S	R	R	R	S
8	R	R	S	S	R	S	S	R	S
9	R	S	S	S	S	R	R	R	R
10	R	S	S	S	S	S	S	S	S
11	R	S	S	S	S	R	R	R	S
12	R	S	S	S	S	S	S	R	S
13	R	S	S	S	S	R	R	R	S
14	R	S	S	S	S	R	R	R	S
15	R	S	S	S	S	R	R	R	S
16	R	R	S	S	S	R	R	R	R
17	R	S	S	S	S	S	S	S	S
18	R	S	S	S	S	R	R	R	S
19	R	S	S	S	S	R	R	R	S
20	R	S	S	S	S	R	R	R	S
21	R	S	S	S	S	S	S	S	S
22	R	S	S	S	S	S	S	S	S
23	R	S	S	S	S	R	S	R	R
24	R	R	S	S	S	R	R	R	S
25	R	S	S	S	S	S	S	S	S
26	R	S	S	S	S	S	S	R	S
27	R	S	S	S	S	R	R	R	S
28	R	S	S	S	S	S	S	S	S
29	R	S	S	S	S	R	R	R	R
30	R	S	S	S	S	S	S	S	S
31	R	S	S	S	S	R	R	R	S
32	R	R	S	S	S	R	R	R	S
33	R	S	S	S	S	S	S	R	S
34	R	S	S	S	S	R	R	R	S
35	R	S	S	S	S	R	R	R	S
36	R	S	S	S	S	S	S	S	S
37	R	S	S	S	S	S	S	S	S
38	R	S	S	S	S	R	R	R	S
39	R	S	S	S	S	R	R	R	R
40	R	R	S	S	S	S	S	S	S

Ek 2: *S. aureus* izolatlarında biyofilm oluşturma kapasitesinin sonuçları

İzole No	Biyofilm kapasitesi	İzole No	Biyofilm kapasitesi
1	Zayıf	21	Güçlü
2	Zayıf	22	Orta
3	Orta	23	Orta
4	Orta	24	Orta
5	Zayıf	25	Güçlü
6	Orta	26	Güçlü
7	Orta	27	Orta
8	Orta	28	Orta
9	Güçlü		Güçlü
10	Güçlü	30	Orta
11	Zayıf	31	Orta
12	Orta	32	Orta
13	Orta	33	Orta
14	Orta	34	Orta
15	Orta	35	Orta
16	Orta	36	Güçlü
17	Orta	37	Orta
18	Orta	38	Güçlü
19	Güçlü	39	Orta
20	Orta	40	Güçlü

Ek 3: *S. aureus* izolatları arasında PVL geninin sonuçları

İzole No	*PVL* geni	İzole No	*PVL* geni
1	Positive	21	Positive
2	Positive	22	Positive
3	Positive	23	Positive
4	Negative	24	Positive
5	Negative	25	Positive
6	Positive	26	Positive
7	Positive	27	Positive
8	Positive	28	Positive
9	Negative	29	Positive
10	Positive	30	Positive
11	Negative	31	Positive
12	Positive	32	Negative
13	Positive	33	Positive
14	Positive	34	Negative
15	Positive	35	Positive
16	Positive	36	Positive
17	Positive	37	Positive
18	Positive	38	Positive
19	Positive	39	Positive
20	Positive	40	Positive

Ek 4: Vitek 2 sisteminin sonuçları

bioMérieux Customer
System#:

Laboratory report

Printed Mar 3, 2022 18:45 CST
Autoprint

Patient Name:
Isolate: 25-1 (Qualified)

Patient ID:

Card Type: GP Bar Code: 2421424103470573 Testing Instrument: 000015F22E89 (12914)
Setup Technologist: Laboratory Administrator (Labadmin)

Bionumber: 0104020627632 21
Organism Quality **Selected Organism : Staphylococcus aureus**

Comments:	

Identification Information	**Card:** GP **Completed:** Mar3, 2022 18:45 CST	**Lot Number:** 2421424103 **Status:** Final	**Expires:** Oct 20, 2022 13:00 CDT **Analysis Time:** 4.07 hours
Organism Origin	VITEK 2		
Selected Organism	99% Probability **Staphylococcus aureus** **Bionumber:** 0104020627632 21		**Confidence:** Excellent Identification
SRF Organism			
Analysis Organism and Tests to Separate:			
Analysis Messages:			
Contraindicating Typical Biopattern(s)			

Biochemical Details

2	AMY	-	4	PIPLC	-	5	dXYL	-	8	ADH1	+	9	BGAL	-	11	AGLU	-
13	APPA	-	14	CDEX	-	15	AspA	-	16	BGAR	-	17	AMAN	-	19	PHOS	+
20	LeuA	-	23	ProA	-	24	BGUR	-	25	AGAL	-	26	PyrA	+	27	BGUR	-
28	AlaA	-	29	TyrA	-	30	dSOR	-	31	URE	-	32	POLYB	+	37	dGAL	+
38	dRIB	-	39	ILATk	+	42	LAC	-	44	NAG	+	45	dMAL	+	46	BACI	+
47	NOVO	-	50	MDL5	+	52	dMAN	+	53	dMNE	+	54	MBDG	+	56	FUL	-
57	dRAF	-	58	O129R	+	59	SAL	-	60	SAC	-	62	DTRE	+	63	ADH2s	-
64	OPTO	+															

Installed VITEK 2 systems Version: 08.01
MIC Interpretation Guideline:
AES Parameter Set Name:

Therapeutic Interpretation Guideline:
AES Parameter Last Modified:

Page 1 of 1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Safauldeen Abdulkareem Mousa MOUSA

Eğitim

Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2021-Halen
Lisans	Osouleldeen Üniversitesi Fen Fakültesi Patolojik Analiz Teknikleri Bölümü	2013-2017