ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DİYABETİK AYAKLI ENFEKSİYON HASTALARINDA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*'UN VİRÜLANS FAKTÖRLERİNİN TESPİTİ

Hayder Shukur Ghulam GHULAM

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2022

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Hayder Shukur Ghulam GHULAM tarafından hazırlanan **"Diyabetik Ayaklı Enfeksiyon Hastalarında *Staphylococcus Aureus*'un Virülans Faktörlerinin Tespiti"** adlı tez çalışması 24/11/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Seçil AKILLI ŞİMŞEK

Eş Danışman : Prof. Dr. Najwa SHIHAB AHMED

Jüri Üyeleri :

Başkan : : Prof. Dr. Seçil AKILLI ŞİMŞEK
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Aysel SARI
Kimya Anabilim Dalı
Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi

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

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. İbrahim ÇİFTÇİ

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum "**Diyabetik Ayaklı Enfeksiyon Hastalarında *Staphylococcus Aureus*'un Virülans Faktörlerinin 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 (01/06/2022).

Hayder Shukur Ghulam GHULAM

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

DİYABETİK AYAKLI ENFEKSİYON HASTALARINDA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* 'UN VİRÜLANS FAKTÖRLERİNİN TESPİTİ

Hayder Shukur Ghulam GHULAM

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Seçil AKILLI ŞİMŞEK
Eş Danışman: Prof. Dr. Najwa Shıhab AHMED

Birçok insan, dünyadaki en yaygın halk sağlığı sorunlarından biri olan diyabetik ayak enfeksiyonu (DFi) olarak bilinen bir durumdan muzdariptir. Amputasyona yol açan kronik ülserler, diyabet hastalarının yaşam kalitesini olumsuz etkileyebilecek ciddi bir durumdur. Aralık 2021 ile Mart 2022 arasında, Al-Kindy Eğitim Hastanesine yatırılan 30-89 yaşları arasındaki diyabetik ayak ülseri hastalarından 300 örnek toplanmıştır. Çalışmada elde edilen 300 örnekten 171 Gram + özellik göstermiştir. *Staphylococcus aureus* (150 Adet) bakterisinin tespiti için Vitek 2 ve biyokimyasal testler kullanılmıştır. Elde edilen verilerde erkeklerin kadınlara oranla daha sık enfekte olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada sunulan verilere göre erkeklerde HbAIC değerleri kadınlara göre daha yüksek olarak bulunmuştur. Vitek2 AST cihazı ile yapılan antibiyotik testlerinde, Oksasilin, Benzil Penisilin'e karşı %100 direnç tespit edilirken. Siprofloksasin, Levofloksasin ve Tigesiklin'e karşı %100 duyarlılık bulunmuştur. MecA geninin tespiti PCR ile yapılmıştır. Aynı zamanda PCR tekniği kullanılarak bakteri izolatları arasında %97 oranında NorA geninin prevalansı tespit edilmiştir. Çalışmamızda ilk defa tanımlanan Irak izolatı, NCBI'de NorA geni için ON2442431 kimlik numarası ve MecA geni için ID: ON551387 ile kaydedilmiştir.

2022, 79 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: DFI, MecA, NorA, PCR, *Staphylococcus aureus*, NCBI.

ABSTRACT

Master of Science Thesis

DETECTION VIRULENCE FACTORS *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* IN DIABETIC FOOT INFECTION PATIENTS

Hayder Shukur Ghulam GHULAM

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

Advisor: Prof. Dr. Seçil AKILLI ŞİMŞEK
Co-Advisor: Prof. Dr. Najwa Shihab AHMED

Many people suffer from a condition known as diabetic foot infection (DFi), which is one of the most common public health problems in the world. Chronic ulcers leading to amputation are a serious condition that can negatively affect the quality of life of diabetics. Between December 2021 and March 2022, A total of 300 samples were collected from diabetic foot ulcer patients aged 30-89 years admitted to Al-Kindy Teaching Hospital. Of the 300 isolates obtained in the study, 171 Gram + showed properties. Vitek 2 and biochemical tests were used for the detection of *Staphylococcus aureus* bacteria. In the data obtained, it has been determined that men are infected more frequently than women. In addition, according to the data presented in this study, HbAIC values were found to be higher in men than in women. In the antibiotic tests performed with the Vitek2 AST device, 100% resistance was detected against Oxacillin, Benzyl Penicillin, and 100% sensitivity against Ciprofloxacin, Levofloxacin and Tigecycline. Detection of the MecA gene was made by PCR. At the same time, the prevalence of NorA gene was determined as 97% among bacterial isolates using PCR technique. The Iraqi isolate identified for the first time in our study was registered in NCBI with the identification number ON2442431 for the NorA gene and ID: ON551387 for the MecA gene.

2022, 79 pages

Keywords: DFI, MecA, NorA, PCR, *Staphylococcus aureus*, NCBI

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Hayatımdaki tüm zorluklara benimle göğüs geren, hayatımın her aşamasında bana destek olan, yakın ilgi ve önerileriyle her aşamada bana rehberlik eden en değerlilerim canım aileme teşekkür ederim.

Çalışmalarımda her türlü yardımdan kaçınmayan, beni her zaman destekleyen, büyük bir anlayış gösteren ve bana yol gösteren değerli hocalarım Prof. Dr. Seçil AKILLI ŞİMŞEK ve Prof. Dr. Najwa Shıhab AHMED'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hayder Shukur Ghulam GHULAM

Çankırı, Kasım 2022

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **iii**
İÇİNDEKİLER ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **vii**
KISALTMALAR DİZİNİ ..... **viii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **ix**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **x**
1. GİRİŞ **1**
2. LİTERATÜR ÖZETİ **3**
2.1 *Staphylococcus aureus*'un tarihçesi **3**
2.1.1 *Staphylococcus aureus* **3**
2.2 Şeker Hastalığı (DM) **4**
2.2.1 Diyabet komplikasyonu. **4**
2.3 Diyabet Ayak Enfeksiyonu (DFI) **5**
2.3.1 Diyabetik ayak ülseri **5**
2.3.2 Diyabetli ayak ülserlerinin sınıflandırılması **6**
2.4 Epidemiyoloji **6**
2.5 *Staphylococcus Aureus*'un Virülans Faktörleri **7**
2.6 Hücre Dışı Enzimler **7**
2.7 DFI'lerde *Staphylococcus aureus* Toksinleri **8**
2.8 *Staphylococcal* Enterotoksinler ve Enterotoksin Benzeri Toksinler **9**
2.9 Antibiyotik Direncine Genel Bakış **10**
2.9.1 Metisilin direnci **11**
2.9.2 Florokinolon direnci **13**
2.10MRSA'da MecA Geni **13**
2.11Akış Pompası **14**
2.11.1 Bakteriyel akış pompası çeşitleri **15**
2.11.2 *Staphylococcus aureus*'ta akış pompaları. **15**
2.12*Staphylococcus aureus*'un Patofizyolojisi **16**

2.13*Staphylococcus Aureus*'un Genom Yapısı 17
2.14Moleküler Tanımlama 17
3. MATERYAL VE METOT 19
3.1 Materyal 19
3.1.1 Cihaz ve ekipman 19
3.1.2 Kültür ortamı 20
3.1.3 Kimyasallar 20
3.1.4 Kitler 20
3.1.5 Antibiyotikler 21
3.2 Yöntem 21
3.2.1 Sterilizasyonlar 22
3.2.2 Reaktiflerin hazırlanması 23
3.3 Çözeltilerin Hazırlanması 24
3.3.1 Primer çözeltisi 24
3.3.2 Tris borat EDTA tamponu (TBE) 24
3.4 Kültürel Medyanın Hazırlanması 24
3.4.1 Sentetik ortamın hazırlanması 24
3.5 Örneklerin Toplanması 25
3.6 Bakteriyel İzolatın Tanımlanması 25
3.6.1 Mikroskobik inceleme 25
3.6.2 Biyokimyasal test 26
3.7 İzolatların Kayıt Altına Alınması 26
3.8 Vitek 2-Gp Tanı Kiti Kullanılarak Bakteriyel İzolatların Doğrulayıcı Tanısı 27
3.9 Bakteri İzolatlarının Antibiyotiklere Duyarlılığı 27
3.9.1 Vitek-2 Ast Kompakt Sistemi İle Antibiyotik İçin Minimal İnhibitör Konsantratörlerinin Belirlenmesi 28
3.10Moleküler Tayin 29
3.10.1 *Staphylococcus aureus* İzolatları İçin Genomik DNA'nın Ekstraksiyonu 29
3.10.2Nanodrop Aparatı Kullanılarak DNA'nın Saflık Ve Konsantrasyonunun Belirlenmesi 30
3.10.3 DNA Jel Elektroforezi 31
3.10.4 DNA'nın Yüklenmesi 31
3.11Çalışmada Kullanılan Primerler 32

3.12Sıralama ve Sıra Hizalama 33
3.13İstatistik Analitiği 33
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 34
4.1 Diyabetik Ayak Ülserinden Patojenik Bakterilerin İzolasyonu (DFU) 34
4.2 Hastaların Yaş Grupları ve Cinsiyeti 37
4.3 Vitek 2-Gp Kullanarak Doğrulayıcı Tanı Testi 39
4.4 Seçilmiş İzolatların Antibiyotiğe Duyarlılığı 40
4.5 Vitek 2AST Cihazı Kullanılarak Antibiyotiklerin Alt Limitlerinin Tahmini .. 42
4.6 Moleküler Çalışma 43
4.6.1 Bakteriyel Genomik DNA Ekstraksiyonu 43
4.6.2 Meca Gen Amplifikasyonu 44
4.6.3 Nora Gen Amplifikasyonu 45
4.7 MecA Geninin Dizi Analizi 46
4.8 NorA Geninin Dizi Analizi 48
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 53
KAYNAKLAR 59
EKLER 70
ÖZGEÇMİŞ 77

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
°C	Derece santigrat
m2	Metrekare
mL	Mililitre
nm	Nanometre
pmol	Pikomol
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre

KISALTMALAR DİZİNİ

AST	Antibiyotik duyarlılık testi
BLAST	Temel yerel hizalama arama aracı
DF	Diyabetik ayak
DFI	Diyabetik ayak enfeksiyonu
DFU'lar	Diyabetik ayak ülserleri
DNA	Deoksiribo nükleik asit
GÖRH	Gastro özofagus reflü hastalığı
NCBI	Ulusal merkezi biyoteknoloji bilgileri
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
SCCmec	Kaset kromozom mec
TBE	Tris borat EDTA tamponu
TMS	İkincil taşıyıcılar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Antimikrobiyal direnç mekanizmaları(Reygaert 2018)..... 11
Şekil 2.2 MRSA'ya karşı aktif olan antibiyotiklerin bakteriyel (Jousselin *et al.* 2015). 12
Şekil 3.1 Çalışma tasarımı 22
Şekil 4.1 Diyabetik ayak ülserinden izole edilen bakteri türlerinin sayısı..... 34
Şekil 4.2 *Staphylococcus* spp'nin B-hemolizin de koloni oluşumu..... 35
Şekil 4.3 MSA'daki büyüme paterni, Katı tuzlu mannitol ortamı 36
Şekil 4.4 MacConkey agar üzerinde bakteri üremememesi 36
Şekil 4.5 Katalaz ve koagülaz pozitif 37
Şekil 4.6 Enfeksiyon süresi..... 39
Şekil 4.7 Antibiyotik yüzdeleri 42
Şekil 4.8 Bakteriyel genomik DNA, bir saat boyunca santimetre başına 5 voltluk bir voltajda yüzde 1'lik bir agaroz jel üzerinde elektroforezi..... 44
Şekil 4.9 MecA geni PCR ürünü bant boyutu 126 bp. Ürün, 70 volt/cm2'de %1,5 agaroz üzerinde elektroforezdi. 1 saat boyunca 1x TBE tamponu. N: DNA merdiveni (100). 45
Şekil 4.10 NorA geni PCR ürünü bant boyutu 620 bp. Ürün, 70 volt/cm2'de %1,5 agaroz üzerinde elektroforezdi. 1 saat boyunca 1x TBE tamponu. N: DNA merdiveni (100)..... 46
Şekil 4.11 *Staphylococcus aureus*'un nükleotid dizisi MecA geni, ID: CP092561,1 47
Şekil 4.12 *Staphylococcus aureus*'un nükleotid dizisi MecA geni, ID: CP092561 47
Şekil 4.13 *Staphylococcus aureus'un* MecA geninin nükleotid dizisi, *Staphylococcus aureus* subsp. için dizi referans suşu ile hizalama olarak. ID: CP092561,1 altında Gen Bankası (NCBI) kromozomu. 48
Şekil 4.14 *Staphylococcus aureus'un* NorA geninin nükleotid dizisi, *Staphylococcus aureus* subsp. için dizi referans suşu ile hizalama olarak. ID: CP088157,1 altında Gen Bankası (NCBI) kromozomu 49
Şekil 4.15 *Staphylococcus aureus'un* NorA geninin nükleotid dizisi, *Staphylococcus aureus* subsp. için dizi referans suşu ile hizalama olarak. ID: CP088157,1 altında Gen Bankası (NCBI) kromozomu. 50
Şekil 4.16 *Staphylococcus aureus'un* NorA geninin nükleotid dizisi, *Staphylococcus aureus* subsp. için dizi referans suşu ile hizalama olarak. ID: CP088157,1 altında Gen Bankası (NCBI) kromozomu 51
Şekil 4.17 *S. aureus*'un yerel Irak izolasyon kimlikleri ON244243. 52

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Cihaz ve ekipmanlar 19
Çizelge 3.2 Kültür ortamları 20
Çizelge 3.3 Kimyasallar 20
Çizelge 3.4 Kit listesi 20
Çizelge 3.5 Antibiyotik listesi 21
Çizelge 3.6 DNA ekstraksiyonu için kullanılacak kimyasallar 30
Çizelge 3.7 Çalışmada kullanılan Primerlerlerin dizisi MecA (Oliveira and Lencastre 2002) NorA (Pourmand *et al.* 2014) 32
Çizelge 3.8 Maxime PCR PreMix kitinin bileşenleri (i -Taq) 32
Çizelge 3.9 PCR'nin reaksiyon bileşenleri 32
Çizelge 3.10 MecA geni için PCR döngü programı 33
Çizelge 3.11 NorA geni için PCR döngü programı 33
Çizelge 4.1 Hastaların yaş grupları ve cinsiyeti 38
Çizelge 4.2 Diyabetik ayak enfeksiyonu olan diyabetli hastalarda ABO gruplarının dağılımı. 38
Çizelge 4.3 HbAIC düzeyleri ile demografik 38
Çizelge 4.4 Biyokimyasal test sonuçları 40
Çizelge 4.5 Antibiyotik direnci sonuçları 41
Çizelge 4.6 MIC antibiyotiklerin sınırları 43

1. GİRİŞ

Staphylococcus aureus mukoza zarında ve deride bulunan, ölümcül patojenik özelliklere sahip olan, farklı hastane ve toplum enfeksiyonlarına yol açan bir bakteridir (Altaee *et al.* 2020). *S. aureus* ağırlıklı olarak hastanede kaynaklı bir patojendir ve hastanelerdeki ölümlerin başlıca nedenidir. Ancak *S. aureus* hastane ortamı haricinde toplum arasında hızla enfeksiyon meydana getirmesi nedeniyle önemini giderek artırmıştır. *S. aureus'*un önemli klinik enfeksiyonları arasında bakteriyemi, osteoartiküler enfeksiyonlar, plöropulmoner enfeksiyonlar, cilt enfeksiyonları ve enfektif endokardit yer alır. Ayrıca epidural apse, idrar yolu enfeksiyonları, toksik şok sendromu, orta kulak iltihabı ve menenjiti gibi içerir hastalıklara da sebep olmaktadır (Rasheed *et al.* 2020).

Diyabetik ayak enfeksiyonu (DFI) en yaygın ve tehlikeli diyabet komplikasyonlarından biri olarak bilinmektedir. Diyabetik ayak ülserlerinin (DFU) tanı anında enfekte olanları enfeksiyonsuz DFU'lara kıyasla daha yüksek ekstremite amputasyon riskini sahiptir (Xie *et al.* 2017). DFU'lar için risk faktörleri arasında bulunan nöropati, diyabet, şok, periferik vasküler hastalık ve zayıf enfeksiyon direnci dünya genelinde hala alt ekstremite amputasyonlarının önde gelen sebepleri arasındadır (Spichler *et al.* 2015). Akut enfeksiyonlu hastalarda lezyonların çoğu aerobik gram pozitif koklardan (genellikle monomikrobiyal enfeksiyonlar) oluşurken, kronik enfeksiyonlar ve daha önce tedavi edilmiş enfeksiyonlar sıklıkla aerobik veya fakültatif anaerobik gram negatif bakteriler tarafından oluşmaktadır (Charles *et al.* 2015). *Proteus* spp., *Klebsiella pneumoniae, E. coli, Streptococcus, Enterococcus, Acinetobacter baumannii, Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas* spp. gibi bakteriler yaralarda bulunuyorsa genellikle kronik hastalıklara neden olurlar (Mottola 2017, Dursun *et al.* 2018).

Hemen hemen her insan yaşamı boyunca bir veya daha fazla *S. aureus* enfeksiyonuna maruz kalır. Aynı zamanda toplum ediniminden sorumlu birincil patojenik bakteridir. Nozokomiyal enfeksiyonlar, insanlarda her iki cinsiyette ve her yaş grubunda farklı enfeksiyon sekellerine sebep olan en yaygın bakterilerinden biridir (Shahini Shams-Abadi *et al.* 2018). *S. aureus,* metisiline dirençli Beta-laktam antibiyotikleri ve penisilin

bağlayıcı protein 2'yi kodlayan mecA geni elde edildiğinde daha dirençlidir. Penisilin bağlayıcı protein 2, beta-laktam ilaçları için zayıf afiniteye sahip olduğu için beta-laktam direnci sağlar.

NorA'nın bir üyesi olarak, 12 Trans membran segmentine sahip 388 amino asit proteini, ikincil taşıyıcıların (TMS) Ana Kolaylaştırıcı Süper Ailesine (MFS) aittir. NorA, mecA geninden üretilmektedir (Wijesundara *et al.* 2019, Costa *et al.* 2019).

NorA geninin *S. aureus* üzerinde moleküler çalışmaları içeren araştırmalar Irak'ta gerekli önemi görmemiştir. Buna bağlı olarak bu çalışmada diyabetik ayak enfeksiyonu (DFI) hastalarında *S. aureus* virülans faktörlerinin moleküler ekspresyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır. Öncelikle, diyabetik ayak enfeksiyonları (DFI) hastalarından biyokimyasal test ve Vitek-2 teknikleri kullanılarak *S. aureus*'un izolasyonu ve tanımlanması gerekmektedir. Daha sonra ise MecA ve NorA genlerini içeren bazı virülans faktörlerinin saptanması ve dizilimlerinin global veri tabanına gönderilmesi bundan sonra yapılacak olan çalışmalara referans olacaktır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 *Staphylococcus aureus'*un tarihçesi

Staphylococcus cinsi ilk olarak 1871'de Recklinghausen tarafından insan piyojenik lezyonlarında tanımlanmıştır (Ananthanarayan 2006), ardından *Staphylococcus aureus* 1880 yılında, ameliyat sonrası yaraları olan hastalardan *Staphylococcus* olarak adlandırılan pürülan bir akıntının muayenesi sırasında mikroskop altında üzüm benzeri bakteri kümelerini (Yunanca stafil) fark eden doktor Sir Alexander Ogston tarafından keşfedilmiştir (Newsom 2008). Bundan sonra 1884'te Rosenbach *Staphylococcus* cinsini dünya literatürüne tanımlayarak saf kültürde *Staphylococcus aureus'*un apselerini izole etmeyi başarmıştır (Kluytmans *et al.* 1997). *Staphylococcus* adı Yunanca kökenli üzüm salkımı (staphyle) ve dut (kokkos) anlamına gelen bir sözcükten türetilmiştir (Licitra 2013). Dünyadaki en çok yönlü mikroskobik organizmalardan biri olan *Staphylococcus aureus* tüm dünyada mevcuttur ve önemli bir hastalık nedenidir. *Stafilokoklar* ayrıca üst gastrointestinal sistem (GIT), ürogenital sistem, solunum mukozal yüzeyleri ve memelilerin ve kuşların derisinin bakteri florasında bulunmaktadır (Werckenthin *et al.* 2001).

2.1.1 *Staphylococcus aureus*

Stafilokoklar, genellikle üzüm benzeri düzensiz kümeler, tek koklar, çiftler, dörtlüler ve zincirler halinde düzenlenmiş, yaklaşık 1 μm çapında gram-pozitif küresel hücrelerdir. Sıvı kültürlerde ve diğer ortam türlerinde bulunabilirler, metabolik olarak aktiftirler, karbonhidratları sindirebilirler ve koyu sarıdan beyaza kadar değişen renklerde pigmentler üretebilirler. Hareketsizdirler ve spor oluşturmazlar (Riedel *et al.* 2022). *Staphylococcus aureus* yuvarlak koloniler oluşturur ve 10°C ile 46°C arasında gelişebilmesine rağmen 37°C'lik uygun bir sıcaklıkta büyür. CO_2 ve O_2 varlığında büyüme sağlaması nedeniyle seçici anaerobiktir (Talaro *et al.* 2013). Bakteri, dört tip hemolizin (alfa, beta, gama ve delta) üretme kabiliyeti nedeniyle kanlı agar üzerinde hemolitiktir. Temel olarak *Staphylococcus aureus* izolatları, organizmanın tanınmasına ve teşhisine katkıda bulunan bir virülans faktörü olan koagülaz enzim üreticileridir. *S.*

aureus mannitol tuzlu agar üzerinde %7,5 NaCl ile gelişebilen tuza dayanıklıdır; ayrıca oksidaz negatif ve katalaz için pozitiftir (Gnanamani *et al.* 2017).

2.2 Şeker Hastalığı (DM)

Diabetes mellitus veya temel olarak diyabet, hastanın vücudu tarafından insülin üretimi ve/veya kullanımındaki kusurların bir sonucu olarak ortaya çıkan, kan şekeri seviyesindeki artış ile tanımlanan bir grup bozukluktur. Diyabet ve ilgili durumlar, metabolik sendromların birikimi olarak kabul edilir (Lehrke and Marx 2017). Diyabet, ağırlıklı olarak son on yıllarda artmıştır ve 2035 yılına kadar 592 milyon kişide görüleceği düşünülmektedir (Guariguata *et al.* 2014). Diyabetin uzun süreli hiperglisemisi, diyabetli hasta için büyük bir sorun oluşturan kan damarlarının yanı sıra böbrek, gözler, sinirler, kalp gibi çeşitli organlarda işlev bozukluğunu içeren uzun süreli mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyon bozukluğu ile ilişkilidir (Hsia *et al.* 2015). Ayrıca, diyabet çeşitli tiplere ayrılmıştır. En yaygın tipler arasında Tip 1 (T1DM), Tip 2 (T2DM) ve gestasyonel diyabet bulunmaktadır (Solis-Herrera *et al.* 2018). Uluslararası Diyabet Federasyonu'na (IDF) göre, dünyada 20 ile 79 yaş arasındaki yetişkinlerde Tip1ve Tip2 diyabetin (kombine hem teşhis edilmiş hem de teşhis edilmemiş) tahmini prevalansı 463 (dünya nüfusunun %9,3'ü) milyondur. Irak'ta ise nüfusun %7,7'si bu sorunla karşı karşıyadır. Salgınla mücadele için yeterli önlemler alınmadığı takdirde, 2030 yılına kadar 578 milyon kişinin (nüfusun %10,2'si) diyabetli olacağı tahmin edilmektedir. 2045 yılına kadar, bu rakamın dünya çapında 700 milyona (%10,9) ulaşacağı tahmin edilmektedir (Atlas 2015).

2.2.1 Diyabet komplikasyonu.

Diyabet, tüm türlerinde vücudun birçok organında ciddi komplikasyonlara yol açabilir ve erken ölüm risklerini artırabilir. Diyabetin beklenen komplikasyonları arasında kalp krizi, inme, böbrek yetmezliği, diyabetik ayak ve görme kaybının yanı sıra sinir hasarı da bulunmaktadır. Gebelikte, kötü kontrol edilen diyabetli kadın, fetal kayıp ve diğer bazı komplikasyon riskleri ile karşılaşmaktadır (Harding *et al*. 2019).

2.3 Diyabet Ayak Enfeksiyonu (DFI)

Diyabet ayak enfeksiyonunun, tedavisi zor olan ve karmaşık bir patogeneze sahip hastalık türüdür. Diyabetik ayak enfeksiyonları, daha derindeki yumuşak ve kemik dokuları (selülit ve osteomiyelit) etkileyerek, ampütasyon riskini önemli ölçüde artırdığından, diyabetin sık görülen ve tehlikeli bir sonucudur. Ek olarak diyabetik popülasyon, periferik vasküler hastalık (PVD), yetersiz bağışıklık ve nöropati geliştirme riski altındadır (Harding *et al*. 2019). Başka bir şekilde ifade etmek gerekirse, patojenik mikroplar açık bir yaranın etrafındaki canlı dokuya nüfuz ederek, bağışıklık sisteminin tepkilerini tetikleyerek iltihaplanmaya neden olarak doku hasarına ve iyileşmenin gecikmesine yol açtığında bir yara enfeksiyonu meydana gelir (Sibbald *et al.* 2006). Çizikler ve enfekte saç kökleri kendi kendine iyileşen yaralanmalara örnektir. Uygun şekilde bakılmadığı takdirde yaşamı tehdit edebilecek çeşitli ek yaralanmalar vardır. Yaralı cildi kolonize eden ilk mikroorganizmalar, orada alışkanlıkla bulunan stafilokok suşlarıdır. Bazı enfeksiyonlar vücudun diğer bölgelerine yayılırken, diğerleri tek bir bölgeyle sınırlı kalır. Bu bakteriler dolaşıma girerek (bakteriyemi) tüm vücuda yayılarak çok çeşitli hastalıklara (yara enfeksiyonları, apseler) neden olabileceğinden dikkat edilmesi gereklidir (Bessa *et al.* 2018). Ayaktaki yumuşak doku ve kemik enfeksiyonları diyabetik hastalarda diyabetik olmayanlara göre en az on kat daha yaygındır (Latt *et al.* 2019).

2.3.1 Diyabetik ayak ülseri

Diyabetik bir hastanın ülserli alt ekstremite ayağı, nöropati ve periferik arter hastalığı ile bağlantılıdır. DFU'lar genellikle iyileşmez ve alt ekstremitenin amputasyonunu gerektirir (Yazdanpanah *et al.* 2015). Ampütasyona neden olan kronik ülserler, diyabet hastalarının yaşam kalitesi üzerinde yıkıcı bir etkiye sahip olabilir (Rathur and Boulton 2007). Diyabetik ayak ülserleri kendi kendine ortaya çıkmasa da genellikle hastanın fark etmediği travmalardan kaynaklanır. Bu tür yaralanmalar, uygun olmayan ayakkabılar, çıplak ayakla yürümek, yabancı cisimler veya sıcak sudan kaynaklanan yanmalardan da kaynaklanabilir (Rathur and Boulton 2007). Ülser yüzeysel ise, dermisten daha derine ulaşmayan tam kalınlıkta bir cilt lezyonu veya dermisten daha derine fasya, kas, tendon veya kemik dahil olmak üzere deri altı dokulara nüfuz eden tam kalınlıkta bir cilt lezyonu

oluşturabilir. Yara iyileşme süreci, her biri ayrı bir role sahip olan bir dizi karmaşık biyolojik sistem tarafından başlatılır. Diyabetik ayak ülserinin iyileşmesi, ülserin yeri, diyabetin uzunluğu, ülser süresi, kalp yetmezliği ve periferik arter hastalığının olup olmaması gibi nedenlere göre değişmektedir (Pickwell *et al.* 2013).

2.3.2 Diyabetli ayak ülserlerinin sınıflandırılması

Wagner tarafından belirlenen diyabetik ayak ülserleri sınıflandırması aşağıda belirtilmiştir (Wagner 1987). Buna göre:

- **Derece 1:** Yüksek riskli ayakta ülser yok.
- **Derece 2:** Derinin tüm kalınlığını kapsayan ancak alttaki dokuları içermeyen yüzeysel ülser.
- **Derece 3:** Derin ülser, bağlara ve kaslara kadar uzanır, ancak kemik tutulumu veya apse gelişimi yoktur.
- **Derece 4:** Selülitli ülser veya apse büyümesi, sıklıkla osteomiyelit eşlik eder.
- **Derece 5:** Bölgesel kangren.

2.4 Epidemiyoloji

Staphylococcus aureus hem normal florada görülen hem de insanlar için patojenik olan bir bakteri türüdür. İnsan popülasyonlarının yaklaşık %30'u vücutlarında *S. aureus'*a sahiptir (Wertheim *et al*. 2005). *Staphylococcus aureus* mukoza zarında ve ciltte sağlıklı bireyler tarafından taşınır. Kendileri için bir enfeksiyon rezervuarı ve fomit kontaminasyonu veya gıda kontaminasyonu gibi diğer hastalıklar için de bir vektör görevi görürler (Harvey 2007). *S. aureus'*taki artışın bir sonucu olarak metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) gibi önemli sorunlar ortaya çıkmıştır. Bu durum ile ilgili özellikle mahkumlarda, sporcularda ve ilkokul çağındaki çocuklarda birkaç salgın rapor edilmiştir. Burada bildirilen enfeksiyonlar cilt lezyonlarıyla temas yoluyla bulaşır ve tedavisi ve yönetimi son derece zordur (Talaro *et al.* 2013).

2.5 *Staphylococcus Aureus*'un Virülans Faktörleri

- **Kapsül**

Stafilokok bakterileri, bazıları metisiline dirençli suşlara ait olan yaklaşık 11 serotipe sahiptir (Lei and Lee 2018). Kapsül, bağışıklık sisteminde fagositoz sürecini engelleyerek *Staphylococcus aureus* korumasının tanıtılmasına katkıda bulunur (Sibbald *et al.* 2006).

- **Biyofilm oluşumu**

Bu hastalığın patogenezi, hücre-hücre etkileşimleri gibi çeşitli virülans faktörlerinden kaynaklanabilir ve ısı, asitlik ve yüksek nem gibi sert dış koşullara karşı koruma sağlar Vázquez-Sánchez *et al.* 2014).

2.6 Hücre Dışı Enzimler

- **Katalaz enzimi**

Bu enzim, bakterilerin Hidrojen Peroksitin (H_2 O_2) toksik etkisinden korunmasına katkıda bulunan önemli enzimlerden biridir. Çünkü onu parçalayarak su ve oksijene dönüştürür, böylece fagositik hücrelerin içinde bakterilerin oluşan serbest radikallerden korunması sağlanır (Brooks *et al.* 2007).

- **Koagülaz enzimi**

Bu enzim, Staphylococcus aureus bakterilerini teşhis etmek için kullanılan enzimlerden biridir. Koagülaz, plazma pıhtılaşmasını destekler ve bakterilerin dokuda lokalize olmasına yardımcı olur(Thilli 2016).

Enfekte konakçının bakteri hücrelerini fibrin ile kaplamak için çalıştığı önemli bir faktördür, bu da bakteri hücresini fagositoz ve hücresel savunma mekanizmalarından

korur. Opsonizasyon, bakterilerin doku içinde çoğalmasına ve büyümesine izin verir (Johnson *et al.* 2002).

- **Beta – laktamaz Enzim.**

β-laktamaz Penisilini yok eden ilk enzimler arasındadır. *Staphylococcus aureus* da dahil olmak üzere birçok bakteri tarafından üretilir. Stafilokok laktamaz, beta-laktam antibiyotiklerin amid bağını hidrolize eder ve bu da tüm laktam antibiyotiklere direnç kazanılmasına katkıda bulunur. Laktamaz inhibitörleri, aktivitelerini eski haline getirmek için eski laktam antibiyotiklerle birleştirilebilir. Bu da antibiyotik direnç mekanizmasının üstesinden gelmek için etkili bir yöntem olarak bilinmektedir. *S. aureus*, laktamazın varlığı nedeniyle dünyada antibiyotiğe en dirençli bakterilerden biridir (Kesharwani and Misra 2019).

2.7 DFI'lerde *Staphylococcus aureus* Toksinleri

Staphylococcus aureus' un DFI'yi indükleme potansiyeline katkıda bulunan virülans değişkenleri arasında salgılanan toksinlerin varlığı, kolonizasyon, kalıcılık ve bağışıklık sisteminin zayıflaması yer almaktadır (Vandenesch *et al.* 2012). Bu toksinler gözenek üretenleri, pul pul dökülenleri ve epidermal hücrelerin gelişimini engelleyenleri (örn. Sarkma) olarak farklı özelliklere sahiptir. Bu sitolitik toksinler konakçı hücre zarlarına zarar vererek hücre parçalanmasına neden olabilir (Grumann *et al*. 2014). Hemolitik ve glikolitik olarak iki tip lökotoksin vardır.

- **Gözenek Oluşturan Toksinler**

Staphylococcuc aureus (PFT) toksinleri, gözenek oluşturucu ve proinflamatuar etkileri sayesinde konakçı hücreleri parçalayabilir. Örneğin, tek bileşenli toksin 'hemolizin' olarak da bilinir ve fenolde çözünür (Foster 2005).

- **α-Toxin**

Staphylococcus aureus'un çoğunluğu suda çözünür bir monomer olarak α-toksin salgılar. Fakat çok az araştırma *S. aureus* tarafından üretilen bu hemolizinin DFI'daki rolüne odaklanmıştır. Buna bağlı olarak Fransa'da yapılan bir çalışmada, elde edilen suşların hepsinde toksin kodlayan gen HLA tespit edilmiştir (Xiong *et al.* 2006).

- **Fenolde Çözünür Modüller**

Bu toksinler zarar veren toksinlerdir. Yapısal olarak yedi küçük amfipatik alfa-sarmal peptit grubundan oluşurlar. 1'den 4'e kadar olan PSM'ler delta toksin olarak tanımlanmıştır. LukAB gibi, DFI'deki yüksek toksisiteleri nedeniyle önemli bir patojenik mekanizma olan fagositozun ardından insan nötrofil lizizini oluştururlar (Surewaard *et al.* 2013).

- **İki Bileşenli Lökotoksinler**

Hemen hemen tüm *Staphylococcus aureus* suşları bu özelliğe sahiptir. Bu toksinler, septik artrit ile bağlantılıdır ve DFI enfeksiyonunu takiben oluşan MRSA'nın (CA-MRSA) insan kanında hayatta kalmasına yardımcı olur (Malachowa *et al.* 2011).

- **Eksfolyatif Toksinler**

Staphylococcus aureus bakterileri, serin proteazlar olan ovma toksinleri salgılar. Bu toksinin dört farklı serotipinden üçü (ETA, ETB ve ETD) insan enfeksiyonu ile ilgilidir. Eksfoliyatörler, "moleküler makas" gibi davranarak bakteriyel deri penetrasyonunu teşvik eder (Nhan *et al.* 2011).

2.8 *Staphylococcal* Enterotoksinler ve Enterotoksin Benzeri Toksinler

Bu toksinler, proinflamatuar sitokinlerin salgılanmasına yol açan T hücrelerini aktive eder. Bu süreç, enfekte olmamış DFU'larda kronik bir enflamatuvar duruma yol açarak yaraların gecikmeli veya iyileşmemesine neden olur (Diegelmann and Evans 2004).

- **Toksik Şok Sendromu Toksini 1**

Staphylococcus aureus'un bilinen en tehlikeli antijeni, Toksik Şok Sendromuna (TSS) neden olan 22 kDa Toksik Şok Sendromu (TSST-1) proteinidir. Buna ek olarak SEl- X, *Staphylococcus aureus*'un yeni bir üyesidir. MRSA300 suşu, *Staphylococcus aureus* nekrotizan pnömoni enfeksiyonlarında çok önemli bir rol oynar ve bu suş SAg ailesinin bir üyesidir (Wilson *et al.* 2011).

2.9 Antibiyotik Direncine Genel Bakış

Antibiyotik, bakterilerin büyümesini engelleyen veya durduran bir maddedir. 1923'te antimikrobiyal ilaçların keşfinden bu yana, birçok bulaşıcı hastalık ortadan kalkmıştır. Antimikrobiyaller genellikle temel metabolik bileşenlere yapışarak, fonksiyonel makromoleküllerin oluşumunu engeller veya normal hücresel aktivitelere müdahale ederek bakterileri öldürür (De Freitas Almeida and Sundberg 2020).

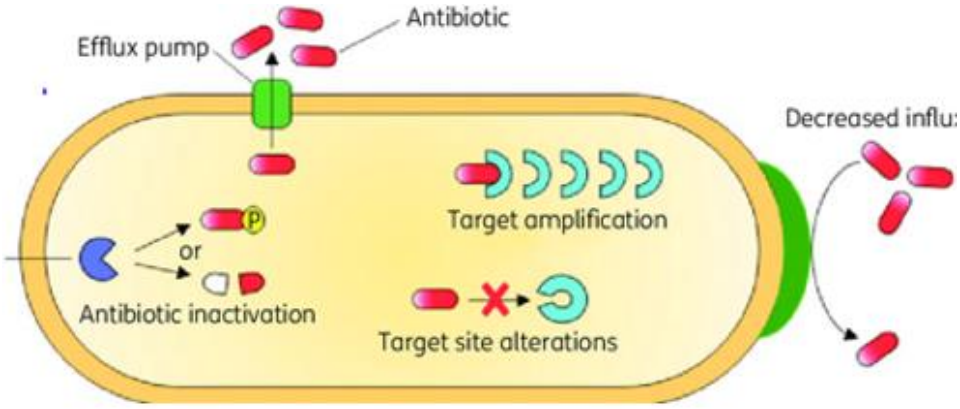
Antibiyotikler çeşitli şekillerde işlev görür. Bazı antimikrobiyal ilaçlar, bakteri hücre duvarı üretimini engeller. Bu ajanlar, mono laktamlar ve -laktamaz inhibitörlerine ek olarak penisilinler (penisilin G, ampisilin ve metisilin), sefalosporinler ve karbapenemler gibi -laktam kimyasallarını içerir. Laktamlar, murein üretiminde sondan bir önceki adımı bloke eder. Bilinmeyen bir mekanizma ile bu, murein hidrolazlarının hücreyi parçalamasına neden olur (Vilvanathan 2021). Glikopeptitler, vankomisin ve teikoplanin, hücre duvarı üretiminde ayrı bir fazı inhibe eden benzer bir antibiyotik kategorisinin parçasıdır. Diğer antibakteriyel ilaçlar, antibakteriyel etkilerini gerçekleştirmek için protein sentezini engeller. Aminoglikozitler, tetrasiklinler, makrolidler ve kloramfenikol gibi ribozom fonksiyonunun inhibitörleri bu kategoriyi içerir. Ayrıca kinolonlar, florokinolonlar ve sülfonamidler gibi antibiyotikler DNA sentezini azaltır. Direnç, bir mikroorganizmanın ilaçların veya antiseptikler ve debridman kimyasalları gibi diğer tedavilerin etkilerine dayanma kapasitesini ifade eder. Doğal olarak meydana gelen genetik mutasyon ve doğal seleksiyon süreci sayesinde bakteri direnci ortaya çıkar. Söz konusu organizma, antibiyotik varlığında öldürme veya büyüme kapasitesi kazanabilir (Paterson 2020). Dört tip antimikrobiyal direnç mekanizması vardır (Şekil 2.1). Bunlar;

1- Antibakteriyel substratı bozan veya değiştiren enzimler.

2- Bir florokinolon hedefi olan DNA giraz gibi hedef bölge modifikasyonu.

3-Diğer süreçler tarafından ikame edilen metabolik yolları

4- Penetrasyon önleyici bariyer veya ajanı dışarıda bırakan akış pompaları (Reygaert 2018)



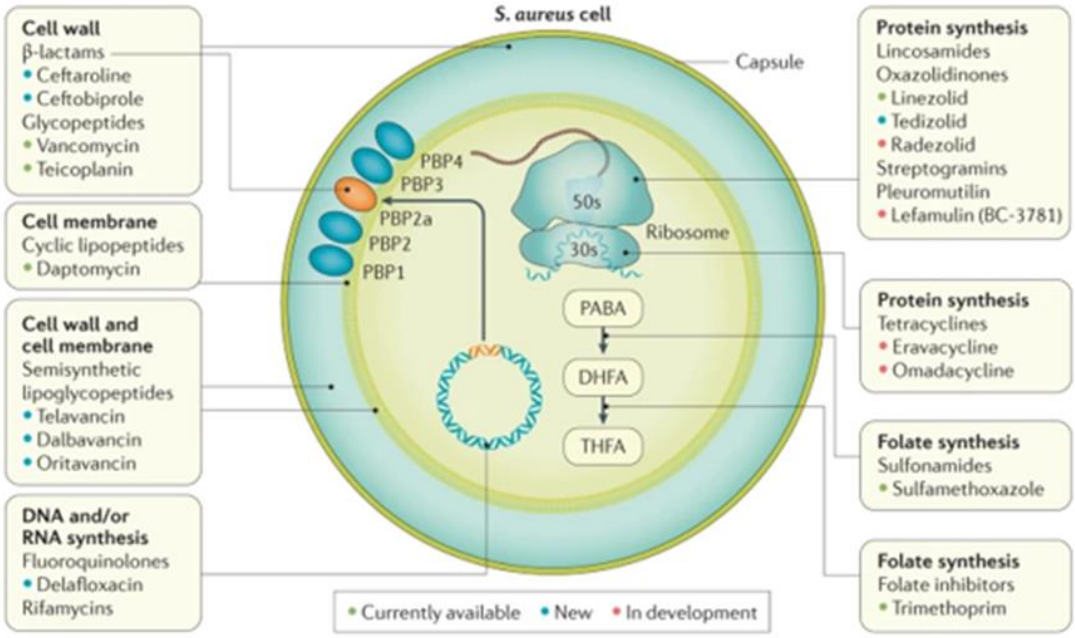
Şekil 2.1 Antimikrobiyal direnç mekanizmaları(Reygaert 2018)

2.9.1 Metisilin direnci

Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşları mecA geni taşır ve PBP2A ek penisilin bağlayıcı proteini kodlar (metisilin, nafsilin ve oksasilin) (Akil and Muhlebach 2018). Beta-laktam antibiyotikler, bakteri hücre duvarının oluşumu için gerekli enzimler olan penisilin bağlayıcı proteinleri (PBP'ler) inaktive ederek antibakteriyel etkilerini gösterirler. Bununla birlikte, bu antibiyotiklerin PBP2A için zayıf bir afinitesi vardır; bu nedenle, bu enzim inaktivasyondan kaçınır ve önemli PBP'lerin işlevini yerine getirir, bu da beta-laktam antibiyotiklerin varlığında hücre duvarı inşası ve bakteriyel hayatta kalma ile sonuçlanır. MecA'nın varlığı nedeniyle, hemen hemen tüm beta-laktam ilaçları MRSA'ya karşı etkisizdir (Mahasenan *et al.* 2017).

Stafilokokal kaset kromozomu olan mecA regülatörleri mecI-mecR1 ile, hareketli bir genetik elementtir (SCCmec). Çok sayıda çalışmada, mecA geninin koagülaz negatif

stafilokok türlerinden *S. aureus*'a karşı in vivo transferi ve daha etkili *S. aureus* klonlarının geliştirilmesi açıklanmıştır (Paterson GK2020). Şimdiye kadar; Mec A, B, C1, C2 ve D ve CCR AB1, AB2, AB3, AB4 ve CCRC komplekslerinin ve J alanlarının 1, 2, 3 olarak adlandırılan kombinasyonların temelinde, 11 SCCmec türleri tanımlanmıştır (Ruiz *et al.* 2021). Homolog MecC'ye sahip olan tip XI dışında, tüm SCCmec tipleri, bir peptidoglikan transpeptidaz olan penisilin bağlayıcı protein 2A'yı (PBP2A) kodlayan MecA'ya sahiptir. Dört doğal *S. aureus* penisilin bağlayıcı proteinin (PBP1, PBP2, PPB3 ve PBP4) etkisini engelleyen -laktam antibiyotiklerin varlığında, PBP2A, peptidoglikan üretiminin transpeptidaz rolünü üstlenebilir (Şekil 2.2) (Jousselin *et al.* 2015).



Şekil 2.2 MRSA'ya karşı aktif olan antibiyotiklerin bakteriyel (Jousselin *et al.* 2015).

Hayvan ve insan izolatlarından türetilen birçok *S. aureus* klonunda MecC olarak adlandırılan bir MecA varyasyonu bulunmuştur (Diaz *et al.* 2016). MecC, ilk olarak MRSA suşu LGA251'den geri kazanılan PBP2A LGA'yı kodlar. LGA251 suşundaki -laktam direncinin kontrol yöntemi MecA taşıyan MRSA suşlarındaki direnç mekanizması ile karşılaştırılır. LGA251 suşunda, metisilin direncinin miktarı suşun genetik arka planındaki MecC ve genlere bağlıdır. Yapılan çalışmalarda *S. aureus* MecB'ye dayalı plazmit kaynaklı metisilin direnci bulunmuştur ancak MecB tarafından kodlanan direnç mekanizması henüz açıklanamamıştır (Milheiriço *et al.* 2017). MecA'nın ekspresyonu

öncelikle MecI, MecR1 ve MecR2 genleri tarafından kodlanan düzenleyiciler ve ayrıca blaZ, blaI ve blaRI ekspresyon düzenleyicileri tarafından kontrol edilir (Arêde *et al.* 2012).

İlk olarak, antibiyotik mupirosin kaynaklı katı stres tepkisi (yani, amino asit, yağ asidi ve demir kısıtlaması ve ısı şoku gibi çeşitli stres koşullarına bakteriyel tepkiler), MecA transkripsiyonunu değiştirmeden PBP2A aktivitesini arttırır (Kim *et al.* 2013).

İkincisi, VraS'nin (hücre duvarı peptidoglikan biyosentezinin düzenlenmesinde rol oynayan sensör proteini VraS ve yanıt düzenleyici protein VraR'den (VraS – VraR) oluşan iki bileşenli düzenleyici sistem) inaktivasyonu MecA transkripsiyonunu arttırır ancak PBP2A aktivitesini arttırmaz. Üçüncüsü, şaperon kıvrım proteini PrsA, zardaki doğru katlanmış PBP2A miktarını ve dolayısıyla MecA transkripsiyonunu etkilemeden metisilin direncini değiştirir (Jousselin *et al.* 2015).

2.9.2 Florokinolon direnci

Florokinolon antibiyotik ailesi, DNA giraz enzimlerini kodlayan GyrA ve GyrB genlerini ve topoizomeraz IV'ü kodlayan ParC ve ParE genlerini hedefleyerek DNA sentezini baskılar. Florokinolon direnci, hedef giraz veya topoizomeraz IV'teki mutasyonlardan veya antibiyotiğin bakteri hücresine geçirgenliğinin değiştirilmesinden kaynaklanır. Ek olarak, florokinolon direnci gelişimine çoklu ilaç akış pompası sistemi neden olur ve NorA geni aracılık eder (Bitrus *et al.* 2018).

2.10 MRSA'da MecA Geni

MecA geni, *Staphylococcus aureus* kromozomu üzerinde belirli bir yere yerleştirilen ve diğer bakteri türlerinden geçtiği düşünülen mec DNA olarak bilinen büyük bir DNA parçasının bileşenidir. Mec DNA'nın bulunması, *stafilokokal* metisilin direnci için ilk genetik ihtiyaç olarak kabul edilir. MRSA suşu doğrulaması için laktam antibiyotiklere karşı afinitesi azalmış olan penisilin bağlayıcı protein 2A'yı (PBP2A) üreten mecA

geninin tanımlanması gereklidir. Penisilin bağlayıcı protein PBP2A'yı kodlar ve yarı sentetik penisilin dahil olmak üzere tüm beta-laktam antibiyotiklere karşı hemen hemen tam direnç kazandırır (Liu *et al.* 2016).

Metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus* izolatları, genlerin klonlandığı ve dizilendiği beş PBP üretir: PBP1, PBP2, PBP2A, PBP3 ve PBP4. MRSA suşları, B-laktam antibiyotikler için düşük bir afiniteye sahip olan ve B-laktamlar tarafından bloke edildiklerinde hücre duvarı üretiminde diğer PBP'lerin yerini alan, PBP2' veya PBP2A olarak adlandırılan yeni bir PBP kazanmıştır (Gagetti *et al.* 2021).

PBP'ler, bakteri hücre duvarı inşasının son aşamalarından biri olan peptidoglikan polimerleri arasındaki çapraz bağlanma sürecini katalize eden enzimlerdir. PBP2A'nın metisilin varlığında hücre duvarı üretimini etkileme kapasitesi, doğal PBP2'nin transglikosilaz alanından iş birliğine ihtiyaç duyar. Bu nedenle -laktam antibiyotikler hücre duvarı üretiminin güçlü inhibitörleridir (Matsuo *et al.* 2019).

2.11 Akış Pompası

Bakteri hücrelerinin yanı sıra ökaryotik ve prokaryotik hücrelerin antibiyotikler ve diğerleri gibi toksik bileşenlere karşı direnci, akış pompa sistemleri adı verilen özel mekanizmalardan kaynaklanmaktadır (Marquez 2005). Akış pompaları, hücrelerin sitoplazmik zarlarında bulunan protein kompleksleridir. Zararlı maddeleri eleyerek hücre dışına atarlar. Akış pompaları, püskürttükleri malzemeler için oldukça seçicidir. Belirli bir hedefe yönelik farklı kompozisyonlar ve formlar içerirler. Fonksiyonel olarak bazı akış pompaları, diğerleri olmadan belirli bir antikoru pompalamakta uzmanlaşır ve bu durum antibiyotiklere karşı direncin bir kısmını açıklar (Webber 2002).

Bazı sistemler tarafından yayılan maddeler, yükleri, yapıları ve kimyasal işlevleri nedeniyle farklılık gösterir. Pozitif, negatif veya nötr yüklü olabilirler ve çözücüler gibi hidrofobik veya hidrofilik polaritede veya hem hidrofobik hem de hidrofobik kutuplara sahip amfoterik polaritede olabilirler (Piddock 2003)..

Bazı akış pompaları sadece antibiyotik akışıyla sınırlı olmayıp, bunun ötesinde boyaların, toksik maddelerin, dezenfektanların, sterilizatörlerin, kanser önleyici ilaçların, ağır metallerin, organik kirleticilerin ve doğal yan ürünlerin akışından sorumlu olabilirler (Blanco *et al.* 2016). Ayrıca, antibiyotik direncinin mekanizmaları, hücre dışına atılmaları veya hücre içindeki konsantrasyonlarının azaltılması ile sınırlı değil, aynı zamanda antibiyotik direnç mutasyonlarının birikmesinin teşvik edilmesiyle de sınırlıdır (Sun *et al.* 2014). Akış pompalarının zararlı maddeleri dışarı atmadaki başarısına rağmen, bakterilerin birçok antibiyotiğe karşı dirençleri dünya çapında insanlar için yaşamı tehdit eden birçok hastalık suşunun oluşmasına neden olmuştur haline gelmiş(Du *et al.* 2018).

2.11.1 Bakteriyel akış pompası çeşitleri

Akış pompaları; yapısal özelliklerine, proteini oluşturan amino asitlerin sırasına ve enerji kaynağının yönüne göre beş ana gruba ayrılmıştır (Poole 2007).

1- Büyük Kolaylaştırıcı Süper Ailesi (FMS).

2- Küçük Çoklu İlaç Direnç Ailesi (SMR).

3- Direnç Nodülasyon-Bölünme Ailesi (RND).

4- Çoklu ilaç ve Toksin atıkları Ailesi (EŞ).

5- ATP bağlayıcı Kaset ailesi (ABC).

İlk dört grup akış pompaları, bir enerji kaynağı olarak proteinlerin itici gücüne bağlıyken, son grup ABC ailesindeki ATP'nin hidrolizine bağlıdır. *Staphylococcus aureus'*taki akış pompalarının çoğu MES ve MATE aileleri olarak sınıflandırılır(Poole 2007).

2.11.2 *Staphylococcus aureus*'ta akış pompaları.

Staphylococcus aureus için akış pompalarının önem, izolatların çeşitliliklerinden ve farklı antibiyotik türlerinin akışına katılımlarından kaynaklanmaktadır (Du *et al.* 2018).

- **Akış pompaları *Staphylococcus aureus* NorA**

NorA akış pompası, *Staphylococcus aureus* izolatlarında en sık görülen sistemdir ve MFS ailesi altında sınıflandırılır. İlk olarak 1986 yılında bir Japon hastanesinde Florokinolon dirençli izolatlarda keşfedilmiştir (Costa *et al.* 2013). NorA akış pompaları, NorA geni tarafından, birbirinden nükleotid dizisinin %10'u kadar farklı olan üç mekanizma ile kromozomal olarak kodlanır (Noguchi *et al.* 2004). Florokinolon bileşiklerine karşı dirençteki artış, NorA akış pompası düzenleyici protienini kodlayan NorA geninin gen ekspresyonundaki artıştan kaynaklanmaktadır (Kaatz and Seo 2004). Bazı çalışmalar, NorA geninin stimülasyon bölgesine bazı dizilerin silinmesinin veya eklenmesinin, NorA genindeki mRNA'nın stabilitesinde bir artışa yol açtığını göstermiştir (Du *et al.* 2018).

2.12 *Staphylococcus aureus'*un Patofizyolojisi

Staphylococcus aureus insanlarda en sık görülen bakteriyel enfeksiyonlardan biridir. Pnömoni, ampiyem, impetigo, folikül iltihabı, fronkül, selülit, deri sendromu, bakteriyemi, endokardit, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, osteomiyelit, septik artrit, protez cihaz enfeksiyonları, akciğer enfeksiyonlarına neden olur. *Staphylococcus aureus* enfeksiyonunun patofizyolojisi, enfeksiyonun türüne bağlı olarak büyük ölçüde değişir (De Jong *et al.*2019). Anti-fagositik bir kapsülün oluşturulması, konakçının sekestre edilmesi Protein A tarafından antikorlar veya antijen maskeleme, biyofilm oluşumu, hücre içi hayatta kalma ve lökositlerin kemo taksilerinin önlenmesi, bunların tümü, konakçı bağışıklık tepkisinden kaçma mekanizmalarıdır (Kinney *et al.*2019). Fibrinojen bağlama gibi bakteriyel hücre duvarı ile ilişkili proteinler, kümelenme faktörleri ve teikoik asitler, enfekte endokarditte hücre dışı matris proteinlerine ve fibronektine bakteriyel bağlanmayı kolaylaştırır. (Le and Otto 2015). Enfeksiyöz endokardit, sepsis ve toksik şok sendromunun tümü, virülans faktörleri olarak *Staphylococcal* süperantijenlerinden TSST-1 veya toksik şok sendromu toksini 1 içerir (Stefani *et al.* 2012).

2.13 *Staphylococcus Aureus'*un Genom Yapısı

Son zamanlarda yapılan çalışmaların dahil edilmesi ile GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) 18 açıklamalı tam genom dizisine sahip olduğunu belirtmiştir. Ayrıca birçok ek suş kısmen dizilenmiş ve sunulmuştur (Spichler *et al.* 2015). Bu büyük miktardaki verinin karşılaştırılması, genomun yapısının üç ana bileşenden oluştuğunu göstermektedir. İlk olarak, tüm suşlarda bulunan ve yüksek oranda korunan (yüzde> 97) bir çekirdek gen, ikinci olarak, 700'den fazla değişken çekirdek (CV) gen kümesi (CV genlerinin dağılımı değişkendir ve dağılım modelleri *S. aureus* soylarını tanımlar) ve son olarak da mobilizasyon fonksiyonlarını kodlayan ve rekombinasyon belirtileri gösteren büyük, farklı DNA segmentleri olan MGE'ler vardır (Raghav *et al.* 2018).

2.14 Moleküler Tanımlama

Son yıllarda, farklı mikrobiyal taksonların karakterizasyonunu ve filogenetik sınıflandırmalarını sağlayan bir dizi moleküler belirteç tanımlanmıştır. Filogenetik belirteçler, spesifik protein kodlayan veya yapısal genlerin katılımını, belirli genlerin ve bunların varyantlarının kombinasyonunu, elementlerin eklenmesi ve tekrarlanmasını içermektedir (Srinivasan *et al.* 2015).

Bakteriler ayrıca türleri ayırarak ve fenotipik özelliklerini, özellikle morfolojik kültür ve biyokimyasal etkileşimler için kriter olan gram boyama ile tanımlanırlar (Woo *et al.* 2003). Bununla birlikte, bu geleneksel yöntemlerin bazı dezavantajları vardır. Birincisi, zaman alıcı ve zordur. İkincisi, birçok bağlamsal koşuldan kaynaklanan kültürel farklılıklar belirsiz sonuçlar sağlayabilir. Üçüncüsü, tanımlamanın bozulmamış bir kültüre ihtiyacı vardır, bu da mikroorganizmaların tanımlanmasını zorlaştırır ve çoğu zaman imkânsız hale getirir (Tshikhudo *et al.* 2013). Ek olarak, fenotipik modeller, aynı türün bireyleri arasında görülen değişen özellikleri hesaba katarak, tekrarlanan deneylerde zayıf doğrulukla sonuçlanabilir (Brisse *et al.* 2002). Fenotipik tekniklere dayalı bir filogenetik ağaç oluşturmak, çok sayıda değişken özelliklerin karşılaştırmasını içerdiğinden ve fenotipik metodolojiye dayalı kladistik çalışmalar yürütmek zor

olduğundan daha zor olabilir. 16S rRNA geni türler arasında ve aynı cinsin türleri içinde yüksek oranda korunduğundan, bakteri türlerini tanımlamak için alternatif bir yöntem olarak kullanılabilir (Mukhtar *et al.* 2018). Genotipik bakteri tanımlaması, PCR ürününde karşılık gelen gen (ler)in nükleotid dizi analizi ile başlar, ardından veri tabanında tanınan dizilerle bir karşılaştırma yapar (Mukhtar *et al.* 2018). Son zamanlarda, araştırmacılar bakterileri tespit etmek için moleküler testlere yönelmiştir (Noor 2019) Direnç geni MecA ve NorA'nın saptanmasını ve ayrıca gen ekspresyonunun çalışmasını içeren bakterileri saptamak için de PCR kullanılmaktadır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

Araştırma materyali Aralık 2021- Mart 2022 yılları arasında (EK 6) Bağdat Al-Kindy Eğitim Hastanesine başvuran Diyabetik Ayak (DF) hastalarından temin edilmiştir. Çalışma için toplamda 300 örnek alınmıştır. Araştırma için öncelikle etik kurul izni alınmıştır. Daha sonra katılımcıların cinsiyet, yaş, diyabet tipi ve yara boyutu gibi demografik ve klinik özelliklerinin yanı sıra HbA1C gibi ek diyabetik problemlerin öyküsü ve ayak ülseri uzunluğu kaydı toplanmıştır.

3.1.1 Cihaz ve ekipman

Bu araştırmada kullanılan cihaz ve ekipmanlar Çizelge 3.1'de listelenmiştir. (EK 1)

Çizelge 3.1 Cihaz ve ekipmanlar

Numara	Cihaz	Menşei	Şirket
1	AURA TM PCR Kabini	İtalya	
2	Microspin 12, Yüksek Hızlı Mini Santrifüj	Almanya	Biyo San
3	V-1 plus Tüpler	Almanya	Digsistemi
4	Bio TDB-100, Kuru blok termostatlı	Almanya	Biyo San
5	Biyopet Değişkeni Hacim 0,5-10 µL Cilt 2-20 µL Cilt 10-100 µL Hacim 100-1000 µL	Almanya	
6	Mini Güç Kaynağı 300V, 2200V	Almanya	
7	MultiGeneOptiMax Gradyan Termal Döngüleyici	ABD	
8	Elektroforez	ABD	CBS
9	Belge sistemi	ABD	
10	UV iletimi	Farans	Vilber lourmat
11	Mikrospin	Lativa	Biyo San
12	Kombi-spin	Lativa	Biyo San
13	Denge	Almanya	Gosonik
14	Kuluçka makinesi	Çin	Jrad
15	Mikrodalga	Çin	
16	Su damıtma cihazı	Çin	
17	Vitek2 sistemi	Fransa	Biomerieux
18	Brülör	Türkiye	Amal
19	Fırın	Almanya	Mammart

3.1.2 Kültür ortamı

Çalışmada kullanılan kültür ortamları, Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2 Kültür ortamları

NUMARA	Ortam	Şirket	Menşei
1	Kanlı ağar	Himdi	Hint
2	MacConkey ağarı	Oksoid	Birleşik Krallık
3	Manitol tuzlu agar	Himdi	Hint
4	Besin ağarı	Oksoid	Birleşik Krallık

3.1.3 Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasallar Çizelge 3.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.3 Kimyasallar

Kitler	Şirket/Menşe
Agaroz (Kat.no. 8100,11)	Conda/ABD
Kırmızı güvenli boyama (Kat.no. 21141)	Intron/Kore
6X Yükleme boyası (Kat.no. 21161)	Intron/Kore
SiZer DNA Markörleri (100) (Cat.no.24073)	Intron/Kore
Ön karışım PCR (Kat.no. 25025)	Intron/Kore
TBE arabelleği 10 X (Cat.no. IBS.BT004)	Conda/ABD
Primer	ALFa, DNA
Hidrojen peroksit %3 (H_2O_2)	İngiltere
Gram boyama reaktifleri	İngiltere
Koagülaz reaktifi	İngiltere

3.1.4 Kitler

Bu çalışmada kullanılan kitler Çizelge 3.4'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.4 Kit listesi

NUMARA.	Kitler	Şirket
1	AST (Vitek2) P592-GP580	BioMerieux Fransa
2	VITEK 2 GP	BioMerieux Fransa

3.1.5 Antibiyotikler

Mevcut çalışmada kullanılan antibiyotikler Çizelge 3.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.5 Antibiyotik listesi

Antibiyotik Adı	Sembol	İçerik µg /mL
Sefoksitin**	CX	6
Benzilpensilin **	Ben	1
Oksasilin**	OXS	2
Antibiyotik**	CN	64
Tobramisin**	TOB	64
Levofloksasin**	LEV	8
Moksifloksasin**	RX	8
Eritromisin**	EM	2
Klindamisin**	CLN	2
Linezolid*	Lin	2
Teikoplanin**	TEI	16
Vankomisin**	VAN	16
Tetrasiklin**	TC	2
Tigesiklin**	Tig	1
Ciprofloxacin*	CIP	4
Nitrofurantin **	F	64
Fusidik asit**	FUS	4
Rifampisin**	Rif	2
Trimetoprim – sülfametoksazol **	TS	60/832

Kullanılan kit no: *P592 norA. gen direnci hakkında

**P580 Antibiyotik levofloksin içerir ve siprofloksin içermez.

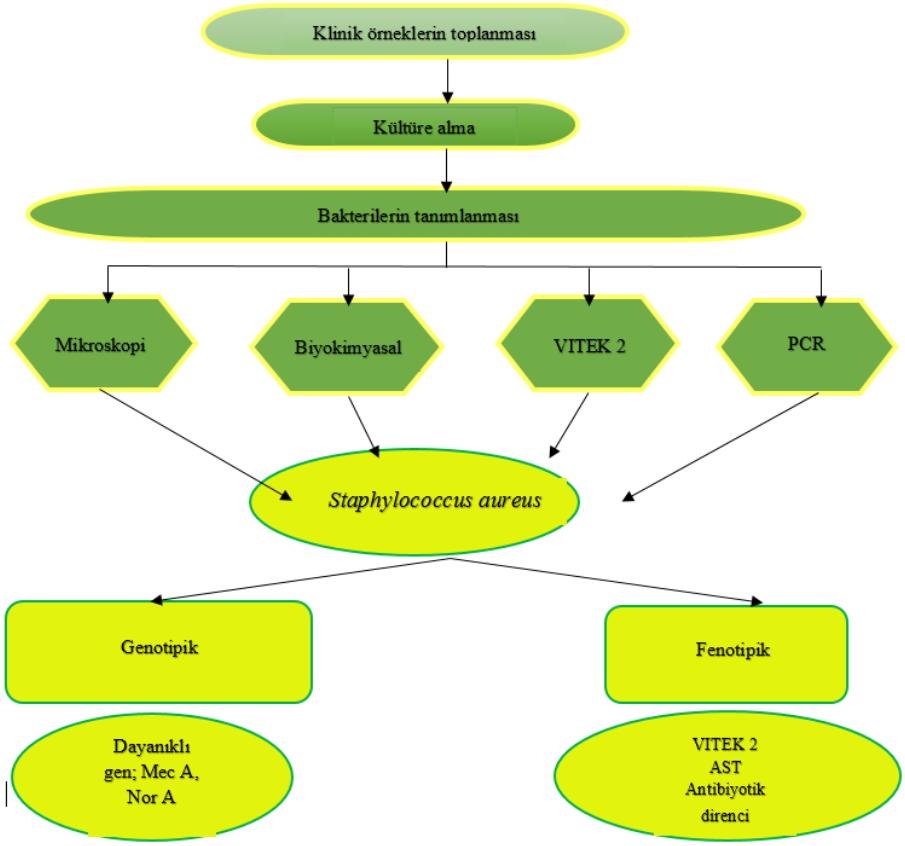
3.2 Yöntem

Çalışma tasarımı Şekil 3.1'de gösterildiği gibidir.

Hastalardan toplanan klinik örnekler, Staphylococcus aureus izolatlarını diğer türlerden ayırt etmek için bir dizi teşhis adımına tabi tutuldu. Ek 2, çalışmamıza kabul edilen Irak Sağlık Bakanlığı / Al-Kindi Eğitim Hastanesi'ndeki patolojik vakaların (diyabetik ayak)

resimlerini içermektedir. Irak'ta Al-Nahrain Üniversitesi, Al-Kindi Eğitim Hastanesi ve Biyoteknoloji Araştırma Merkezi'nde laboratuvar testleri, teşhis ve moleküler genetik analizler yapıldı.

Teşhis adımları, kanlı agar, mannitol agar ve McConkey agar besiyeri üzerine örneklerin tohumlanmasını ve ayrıca bakteri yaymalarının Gram boyamasını ve ayrıca izolatların katalaz ve koagülaz enzimleri üretme kabiliyetinin test edilmesini içerir.



Şekil 3.1 Çalışma tasarımı

3.2.1 Sterilizasyonlar

Hazırlanan ve sentetik besiyerleri 121 °C sıcaklık ve 15 kg/inç basınçta 10-15 dakika süreyle üretici firmanın talimatlarına göre otoklavlanmıştır. Daha sonra 37°C 18 saat

boyunca bir kapta tutularak, kullanılana kadar buzdolabında saklanarak kontaminasyondan arındırılmıştır.

3.2.2 Reaktiflerin hazırlanması

Çalışmanın gereksinimlerine göre aşağıdaki reaktifler ve yöntemler kullanılmıştır.

3.2.2.1 Plazma koagülaz testi için reaktif yöntemleri

Bakteri izolatlarının plazma pıhtılaştırıcı enzimi üretme kabiliyetini tespit etmek için slayt testi yöntemi kullanılmıştır. Bunun için Al-Kindy Eğitim Hastanesi kan bankasından elde edilen insan kan plazmasını kullanılmıştır ve kan agarı ortamına aktarılmıştır (Tille 2015). Daha sonra steril tahta çubuklar kullanarak bir damla insan kan plazması ile iyice karıştırılır ve temiz, kuru bir cam slayta aktarıldı. 10 saniye içinde bir yumru veya pıhtılaşma ortaya çıktığında sonuç pozitif olarak değerlendirildi (Nouaille *et al.* 2006).

3.2.2.2 Katalaz tanımlaması

Katalaz enzimini tespit etmek için %3'lük bir konsantrasyonda hidrojen peroksit çözeltisi H_2O_2 kullanılmıştır (reaktif %25 ile 88 mL damıtılmış su konsantrasyonunda 12 mL H_2O_2 ilave edilerek ve kullanılana kadar 4°C'lik bir sıcaklıkta steril bir şişede tutalarak muhafaza edilmiştir). Kan agar ortamı haricinde kırmızı kan hücreleri tarafından paraziti önlemek için, çalışmada kullanılan katı kültür ortamlarından herhangi birinde gelişmekte olan tek kolonilere hazırlanan reaktiften 1 damla eklenerek karşılaştırıldı. Oksijenin bir madde olarak salınmasından kaynaklanan hava kabarcıklarının ortaya çıkması testin olumlu sonuçlandığının göstergesidir (Tille 2015).

3.3 Çözeltilerin Hazırlanması

3.3.1 Primer çözeltisi

10 pmol/L'lik Alfa DNA primer konsantrasyonu yapmak için,10 litre stok çözeltisi 90 litre serbest ddH_2O su içinde çözülür ve daha sonra elde edilen çözelti 100 litrelik bir hacme dönüştürmek için filtrelendi. Daha sonra, primerler kurutularak 100 pmol/L'lik bir nihai konsantrasyon elde etmek için elde edilen 100 litrelik stok çözeltisi içinde çözüldü.

3.3.2 Tris borat EDTA tamponu (TBE)

Jel Elektroforez deneyleri yapılırken TBE solüsyonu, 10x konsantrasyonlu 100 mL TBE solüsyonu ile 900 mL steril distile su karıştırılarak, Dart Transfer konsantrasyonu solüsyonu elde edilecek şekilde (%1) TBE solüsyonu hazırlandı. Hazırlanan konsantrasyon kullanılana kadar buzdolabında saklandı.

3.4 Kültürel Medyanın Hazırlanması

Bu çalışmanın deneyleri, iki tür hazır kültür ortamına ve kan laktat için sentetik ortama bağlıdır. Bu ortamlar, üreticinin talimatlarına göre, uygun miktarda damıtılmış su içinde çözülerek, ardından pH'ı ayarlanarak ve kültür ortamı bir otoklav ile sterilize edilerek hazırlandı. Bu ortamlar arasında Mannitol tuzlu agar, Macchonkay agar ve Nutrient agar bulunmaktadır.

3.4.1 Sentetik ortamın hazırlanması

Katı kanlı agar besiyeri, bakteriyel izolatların bu besiyerinde kırmızı kan hücrelerini parçalama kabiliyetini incelemek amacıyla sentetik bir ortam olarak hazırlandı. 40 gm katı kan ortamını hazırlamak için, kanlı agar bazı bir litre distile suda çözülür, sonra otoklav ile sterilize edilir, ardından 45°C sıcaklıkta soğutalar yavaş yavaş ve kademeli olarak insan kanı eklendi. Hazırlanan besiyerinin %5'i oranında iyice karıştırılır, ardından

sterilize edilmiş plastik kaplara dağıtılarak soğuyana kadar oda sıcaklığında bekletilir (Wanger *et al*. 2017).

3.5 Örneklerin Toplanması

Çalışma materyali Al-Kindy Eğitim Hastanesi'nde yatan diyabetik ayak ülseri olan hastalardan Aralık 2021-Mart 2022 döneminde temin edilmiştir. Toplamda 150 kişiden 300 klinik örnek alındı. Numuneler daha sonra kan agarı ve MacConkey agarı ortamındaki petri kaplarına planlı bir şekilde ekildi. Daha sonra 37°C sıcaklıkta tutularak 24 saat boyunca ters çevrildi ve transfer edilen tek koloniler katı tuzlu manito-manitou ortamına aktarıldı. MAS ortamında yetişen kolonilerin altın rengi alanlar not alındı. Belirlenen bakterilerin *Staphylococcus aureus*'a ait olduklarından emin olmak için fenotipik testlerin yanı sıra izolatlar üzerinde gerekli biyokimyasal testler yapıldı (Drinka *et al*. 2012).

3.6 Bakteriyel İzolatın Tanımlanması

Çalışma örnekleri olarak test edilen bakteri izolatlarının tanısında mikroskobik incelemeler ve bazı testler bulunmaktadır. Bakteriyel izolatlar başlangıçta MAS ortamının üzerinde büyüyen tek kültür fenotipik özelliklerinden, mentol şekerini fermente etme kabiliyetlerinden ve parlak altın rengi oluşturmaları ile teşhis edildi.

3.6.1 Mikroskobik inceleme

Örnekler, kanlı agar besiyerinde üreyen ve tek gelişen kolonilerden bakteri yayması yapılarak mikroskobik çalışma ile teşhis edildi. Ardından gram boyama yöntemine göre boyanarak ve gruplaşma ve şekilsel özelliklerine göre ışık mikroskobu altında incelendi (Benson 2002).

3.6.2 Biyokimyasal test

Çalışma izolatlarını teşhis etmek için biyokimyasal testler kullanıldı. Bu testler aşağıda açıklanmıştır.

3.6.2.1 Koagülaz testi

S. aureus bakteri izolatlarının plazma pıhtılaştırıcı enzimi üretme kabiliyetini tespit etmek için slayt testi yöntemi kullanıldı.

3.6.2.2 Katalaz testi

Katalaz enzimini tespit etmek için %3'lük bir konsantrasyonda hidrojen peroksit çözeltisi H_2O_2 kullanıldı. Reaktif %25 ile 88 mL damıtılmış su konsantrasyonunda 12 mL H_2O_2 ilave edildi ve kullanılana kadar 4°C'lik bir sıcaklıkta steril bir şişede tutalarak muhafaza edildi.

3.7 İzolatların Kayıt Altına Alınması

- **Kısa süreli koruma**

Çalışma izolatları inokülasyondan sonra planlama yöntemiyle besin agar besiyerinde günlük kullanım için tutuldu ve 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Daha sonra döllenen tüpler, numunenin iki haftada bir yenilenmesi dikkate alınarak kullanılıncaya kadar buzdolabında 4°C'de muhafaza edildi.

- **Uzun süreli koruma**

0,8 mL steril kalp-beyin infüzyon ortamı içeren ve 37 °C'de 24 saat tutulan aşılanmış tüplerin üzerine her tüpe 0,2 mL steril gliserol olacak şekilde eklendi. Numuneler kullanılıncaya kadar dondurularak saklandı.

3.8 Vitek 2-Gp Tanı Kiti Kullanılarak Bakteriyel İzolatların Doğrulayıcı Tanısı

Staphylococcus cinsine ait bakteri izolatları arasındaki çözülmemiş farklılıkları azaltmak için, Fransız şirketi Bio merierieux tarafından sağlanan Vitek2-GP cihazını kullanarak doğrulayıcı bir teşhis yapılmıştır. Bu yöntem, biyokimyasal testlere dayanan temel reaksiyon malzemelerinden oluşan 64 kuyucuk bulunan teşhis kiti içermektedir. Testin yapılması için gerekli olan adımlar aşağıda belirtilmiştir;

1. MSA ortamında 37°C'de 24 saat boyunca yetiştirilen tek saf koloniler kültürlenerek 3 mL önceden hazırlanmış fizyolojik çözelti içeren şeffaf plastik test tüplerine aktarılmıştır.
2. Vitek2-GP cihazına takılan Densichek TM bulanıklık cihazı ile bakteri süspansiyonunun optik yoğunluğu (0,63-0,5) karşılaştırılmıştır.
3. Test tüpleri, test kartlarının aşılanması için ayrılmış bölüme takıldıktan sonra cihazdaki ince tüplere otomatik olarak bağlanan tüp tutucu ünitesine (Gard-Transfer Unit) manuel olarak aktarılmıştır.
4. Cihaz, test çukurlarının otomatik aşılama işlemini gerçekleştirmiş ve cihaz içindeyken uygun şekilde aşılanıp inokule edilmediği araştırılmıştır. Cihaz ayrıca aşılama işlemi tamamlandıktan sonra test kartları, 8 saatlik bir süre boyunca 35,5°C sıcaklıkta inkübatöre aktarılmıştır.
5. İnkübasyon işlemi ile cihaz, izolatların biyokimyasal paternleri hakkındaki bilgileri tek tek analiz etmiş ve saklamıştır. Cihazda saklanan bilgilere göre sonuçların yorumları oluşturularak teşhis bilgileri basılı ve her biri bir karta olacak şekilde ayrı ayrı hazırlanmıştır.

3.9 Bakteri İzolatlarının Antibiyotiklere Duyarlılığı

Çalışma kapsamındaki bakteri izolatlarının duyarlılığını test etmek amacıyla, Vitek2 AST cihazı kullanılarak izolatların antibiyotiklere duyarlılık testi yapılmıştır.

1. Bakteriler, şirketin talimatlarına göre MSA Agar besiyerinde kültürlenerek 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir.
2. Kart kapağından çıkarılarak model numarası cihaz kayıt defterine kaydedilmiştir.
3. Yeterli sayıda saf kültür kolonisi plastik test tüplerinde 3 mL fizyolojik solüsyonda süspanse edilmiştir. İkinci tüp sadece %45'lik bir konsantrasyonda normal ketenin fizyolojik bir solüsyonu olarak elde edilir. Daha sonra ilk asılı tüpten 280 mikron ikinci tüpe ve karta aktarılmıştır.
4. Teşhis edilecek izolatın askıda kalan maddesi TM Vitek 2 cihazının bulanıklığı ile ölçülmüştür.
5. Kart, tüp tutucu üzerinde taşınan ve uzun kısmı test tüpüne batırılarak transfer tüplerine bağlanan kart transfer ünitesine aktarılmıştır.
6. Tutucu, kart içine sabitlendiğinde ve muayene doğru yapıldığında ve cihaz transfer tüpünü kestiğinde, cihazın içindeki kartların aşılanması için belirlenen parçanın içine taşınmıştır. Kartlar daha sonra 35°C'de inkübasyon için inkübatöre aktarılarak en fazla 8 saat v sonra sonuç okunmuştur.
7. Aşılama döneminde bu cihaz etkin olmayan antibiyotikleri kontrol etmiş, cihaz yazılımı bu kalıpları analiz etmiş ve Biomweieux'un talimatlarına göre İnkübatör Okuyucusunun içindeki her kart için bir teşhis raporu yazdırılmıştır.

3.9.1 Vitek-2 Ast Kompakt Sistemi İle Antibiyotik İçin Minimal İnhibitör Konsantratörlerinin Belirlenmesi

Duyarlılık test kartı, Antibiyotik duyarlılık Testi Serisi (AST) olarak bilinen Vitek-2 AST Kompakt Sistemi ile yapılmıştır. Antibiyotiklerin inhibitör konsantrasyonlarının belirlenmesi için 64 kuyucuğa, her antibiyotik için 3 farklı konsantrasyon olacak şekilde yükleme yapılmıştır. Daha sonra çalışmadaki izolatlar test edilerek pozitif kontrol ile kuyucuklardaki büyüme değerleri cihaza kaydedilmiştir. Elde edilen sonuçlar antibiyotikler ile bakteri izolatları arasında karşılaştırma yapılması için otomatik olarak kaydedilmiştir.

3.10 Moleküler Tayin

Bu çalışmada seçilen izolatların moleküler karakterizasyonu yer almaktadır.

3.10.1 *Staphylococcus aureus* İzolatları İçin Genomik DNA'nın Ekstraksiyonu

Genomik DNA ekstraksiyonunu gerçekleştirmek için uygulanacak olan aşamalar aşağıda belirtilmiştir. Bu aşamalarda kullanılacak kimyasal maddeler de Çizelge 3.6'da gösterilmektedir.

1- Pelet bakterileri 1 dakika süreyle 13.000 rpm'de santrifüj edildi, ardından 50 mL süpernatant dışında tümü atılarak kalan süpernatant tekrar vorteksleme yoluyla süspanse edildi.

2- Numune tüpü 100 mL Tampon MP ve 3 mL lizozim çözeltisi ile doldurulduu ve 30 saniye boyunca vortekslendi. Daha sonra pipetlenerek yeniden süspanse edildi.

3- Elde edilen izolat 37°C'de 15 dakika inkübe edildi.

4- İzolat oda sıcaklığında 1 dakika 13.000 rpm'de santrifüjlendi ve süpernatant atıldı. Tüm sıvının uzaklaştırıldığından emin olundu. Daha sonra hücre peleti tamamen parçalanana kadar vortekslenerek veya dokunarak yeniden yerleştirildi.

5- 200 mL Buffer MG, 20 mL Proteinaz K ve 5 mL RNase A solüsyonunu numune tüpüne yerleştirildi ve yeniden süspanse etmek için hızla vortekslendi.

6- Lizat 65°C'de 15 dakika inkübe edildi.

7- Tam lizizden sonra lizata 250 mL Buffer MB eklendi ve pipetleme veya hafifçe ters çevirerek 5 ile 6 kez karıştırıldı.

8- Lizata 250 mL %80 etanol eklendi ve pipetleme yapılarak veya hafifçe ters çevrilerek 5-6 kez karıştırıldı.

9- Döndürme kolonunda bulunan toplama tüpüne 8 adımdaki karışımdan 750 mL pipetlendi. Akış ve toplama tüpleri çıkarıldı ve 1 dakika boyunca 13.000 rpm'de (RT) santrifüjlendi.

10- Döndürme kolonu yeni 2,0 mL'lik bir toplama tüpüne aktarıldı. 700 mL Buffer MW eklendi ve 1 dakika 13.000 rpm'de santrifüjlendi. Membranı kurutmak için akış çıkarıldı ve 1 dakika daha santrifüjlendi.

11- DNA'yı ayrıştırmak için, doğrudan kolon matrisine 50 μL Tampon ME ilave edildi ve 1 dakika boyunca 13.000 rpm'de santrifüj edildi.

Çizelge 3.6 DNA ekstraksiyonu için kullanılacak kimyasallar

No	**İçerikler**	**50 sütun**
1	Tampon MYP (Yeast Pre-Lysis Buffer için)	12 mL ×1
2	Tampon MP (Lizis Öncesi Tampon)	7 mL ×1
3	Tampon MG	15 mL ×1
4	Tampon MB	15 mL ×1
5	Tampon MW (Konsantrasyon)	10 mL ×1
6	Tampon ME	20 mL l ×1
7	Döner Kolon (Mavi Renkli O-Ring)	50 Sütun
8	Toplama Tüpü	100 tüp
9	RNaz A liyofilize	6 mg ×1 tüp
10	Proteinaz K liyofilize	12 mg ×1 tüp
11	Lizozim liyofilize	30 mg ×1 tüp
12	Manuel	1

3.10.2 Nanodrop Aparatı Kullanılarak DNA'nın Saflık Ve Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Nanodrop, DNA'nın saflığını ve konsantrasyonunu belirlemek için kullanıldı. Aygıt, önce optik yüzey üzerine iki litre deiyonize su dökülerek ve kaldıraç kolu birkaç saniye kapatılarak boşaltıldı ve temizleme işlemi yapıldı. Cihaza 2 mL DNA örneği eklendi ardından cihazdaki yazılım, 260 nm dalga boyunda nükleik asit içeriğini (ng/L) otomatik olarak belirledi. 260 nm ve 280 nm'de, DNA'nın saflığını ölçmek için absorbans oranı kullanıldı. DNA saflık oranları 1,7–2,0 arasında olmalıdır (Li *et al.* 2014).

3.10.3 DNA Jel Elektroforezi

3.10.3.1 Agaroz Jel Hazırlama GAT. 8100,11

- 1,5 g agaroz tozu 100 mL'lik bir balonda 100 mL 1x TBE içinde çözülerek, sıcak bir blokta agarozun çözelti berraklaşıncaya kadar eritilmesi ve daha sonra eşit soğutma sağlamak için şişenin düzenli olarak döndürülmesiyle agaroz çözeltisi oluşturuldu.
- Isıtılmış jele 3 mL kırmızı boya eklendikten sonra döküm tepsisinin uçlarını kapatmak için iki kalınlıkta bant kullanıldı.
- Taraklar jel döküm tepsisine yerleştirildi.
- Döküm tepsisi erimiş agaroz solüsyonu ile dolduruldu.
- Jelin içine konulduğunda elektroforez TBE (1x) tamponu ile dolduruldu ve agarozun oda sıcaklığında sertleşmesi için eklendikten sonra tarak nazikçe çıkarılıldı.
- DNA örnekleri (5 mL) üzerine 3 mL DNA yükleme tamponu eklenerek agaroz jel kuyularına konuldu.
- Agaroz jel elektroforezi 70V, 65Amp'de 1 saat çalıştırıldı.
- Daha sonra elde edilen DNA, bir UV transillüminatör kullanılarak incelendi.

3.10.4 DNA'nın Yüklenmesi

DNA (5 mL), elektroforez için yükleme boyası (3 mL) ile birleştirildikten sonra jel kuyucukları dolduruldu. Ekstraksiyondan sonra DNA bantlarını ve PCR ile virülans geninin saptanmasından sonra PCR ürününü gözlemlemek için elektroforez 1 saat ve 70 volt çalıştırıldı. Negatif elektrotlardan pozitif elektrotlara aktarılan DNA ve PCR ürünü ve jel üzerindeki DNA bantları, UV transillüminatör (537 nm) aracılığıyla görüntülenidi

3.11 Çalışmada Kullanılan Primerler

Hedef gen ve endojen gen dahil tüm primerler 10 pmol konsantrasyonda hazırlanmıştır. Çizelge 3.7, Çizelge 3.8 ve Çizelge 3.9 sırasıyla primerlerin dizisini, Maxime PCR PreMix kitini ve PCR'nin Reaksiyon bileşenlerini göstermektedir.

Çizelge 3.7 Çalışmada kullanılan Primerlerlerin dizisi MecA (Oliveira and Lencastre 2002) NorA (Pourmand *et al.* 2014)

Primer dizisi	Genler	Tm (°C)	% GC	Ürün boyutu	Referans
5'-TCCAGATTACAACTTCACCAGG-3'	MecA	64	69,45	162 bp	Oliveira and Lencastre 2002
5'-CCACTTCATATCTTGTAACG-3'		56	64,15		
5'-TTCACCAAGCCATCAAAAAG-3'	NorA	56	64,15	620bp	Pourmand *et al.* 2014
5'-CTTGCCTTTCTCCAGCAATA-3'		58	66,20		

TM. Astar erime sıcaklığı

Çizelge 3.8 Maxime PCR PreMix kitinin bileşenleri (i -Taq)

Bileşen	Reaksiyon boyutu 20 µL
i -Taq TM DNA Polimeraz(5U/ µL)	2,5 U
DNTP'ler	Her biri 2,5 mM
Reaksiyon Tamponu (10x)	1x
Jel Yükleme tamponu	1x

Çizelge 3.9 PCR'nin reaksiyon bileşenleri

Bileşen	25 µL (Son hacim)
Taq PCR Ön Karışımı	5 µL
İleri primer	10 pikomol/µL (1 µL)
Ters primer	10 pikomol/µL (1 µL)
DNA	1,5 µL
Distile su	16,5 µL

MecA geni için, bir dizi deney sonra PCR aşamlarından olan ilk denatürasyon ve tavlama için optimum şartlar ele alındığında sıcaklık tüm numuneler için 50, 51, 53, 55, 57; NorA geni için ise 56, 58, 60, 62 olarak belirlenmiştir. Daha sonra DNA şablonu

konsantrasyonu ilk denatürasyon ve tavlama için 1,5-2 mL arasında değiştirilmiştir. Çizelge 3.10 ve Çizelge 3.11'de, sırasıyla MecA ve NorA geni için PCR döngü programı göstermektedir.

Çizelge 3.10 MecA geni için PCR döngü programı

Adımlar	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü
Enzim aktivasyonu	95°C	5 dakika	1
Denatürasyon	95°C	30 saniye	35
Tavlama	55°C	1 dakika	
Bağlanma	72°C	1 dakika	
Son uzatma	72°C	10 dk	1

Çizelge 3.11 NorA geni için PCR döngü programı

Adımlar	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü
Enzim aktivasyonu	95°C	5 dakika	1
Denatürasyon	95°C	30 saniye	35
Tavlama	60°C	30 saniye	
Bağlanma	72°C	1 dakika	
Son uzatma	72°C	7dk	1

3.12 Sıralama ve Sıra Hizalama

MecA ve NorA genlerinin konvansiyonel PCR ile amplifikasyonunu doğruladıktan sonra, bu gen için 50 µL ileri primer ile 20 µL PCR reaksiyonundan olmak üzere hazırlanan numuneler, bu genlerdeki DNA dizilimini belirlemek için Makrojen şirketine gönderilmiştir. Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi'nde (NCBI) çevrimiçi olarak erişilebilen homoloji aramasını yapmak için Temel Yerel Hizalama Arama Aracı (BLAST) aracı kullanılmıştır (http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

3.13 İstatistik Analitiği

Değerler arsındaki anlamlı farklılıkları belirlemek için SPSS istatistik paketi sürüm 28,0 (IBM Corp. 2021) kullanılmıştır.

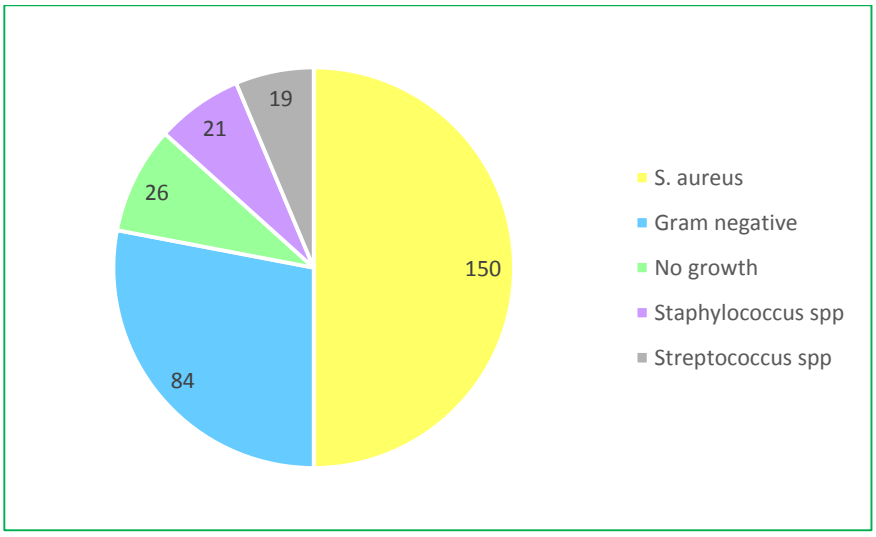
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Diyabetik Ayak Ülserinden Patojenik Bakterilerin İzolasyonu (DFU)

Hastalardan toplanan klinik örnekler, *Staphylococcus aureus* izolatlarını diğer türlerden ayırmak için bir dizi tanı adımına tabi tutulmuştur. EK 2 çalışmamızda kabul edilen Irak Sağlık Bakanlığı / El-Kindy Eğitim Hastanesi'ndeki patolojik vakaların (diyabetik ayak) resimlerini içermektedir. Laboratuvar testleri, tanı ve moleküler genetik analizler Irak'taki Al-Nahrain Üniversitesi, Al-Kindy Eğitim Hastanesi ve Biyoteknoloji Araştırma Merkezi'nde yapılmıştır.

Teşhis adımları; örneklerin kanlı agar, Mannitol agar ve MacConkey agar besiyerine ekilmesinin yanı sıra bakteriyel swabların Gram boyama ile boyanmasını ve ayrıca izolatların katalaz ve koagülaz enzimleri üretme yeteneklerinin test edilmesini içermektedir.

Sonuçlar incelendiğinde toplamda alınan 300 örnek sadece 171 izolatta *S. aureus* (150) ve *Staphylococcus* spp (21) tanımlanmıştır. Şekil 4.1, diyabetik ayak ülserinden izole edilen bakteri türlerinin sayısını göstermektedir.



Şekil 4.1 Diyabetik ayak ülserinden izole edilen bakteri türlerinin sayısı

Kanlı agar besiyerinde büyütülen izolatlar; pürüzsüz, dışbükey, parlak ve ışık geçirmeyen yuvarlak kenarları olan 1-3 mm boyutlarında grimsi bir renk gösteren *Staphylococcus* cinsine ait koloniler oluşturacak şekilde görüntülenmiştir. Şekil 4.2 B-hemolizin ayrışması ile koloni etrafında oluşan şeffaf Staphylococcus spp. Göstermektedir.



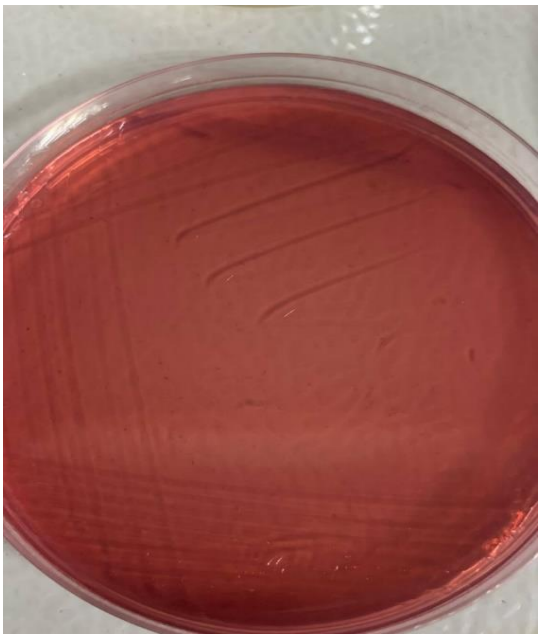
Şekil 4.2 *Staphylococcus* spp'nin B-hemolizin de koloni oluşumu

Katı salin mannitol besiyeri üzerindeki izolatlar, bu besiyerinde ana bileşen olarak %7,5'lik bir konsantrasyonda büyümeye dayanma yeteneğinin yanı sıra mannitol şekerini fermente etme ve ortamın rengini pembeden altın sarısına değiştirme konusunda yüksek yetenek göstermiştir. Seçilen izolatlar ayrıca gelişme yetenekleri ve 12 saatten daha kısa sürede pozitif bir sonucun ortaya çıkması ile ayırt edilmiştir (Şekil 4.3)



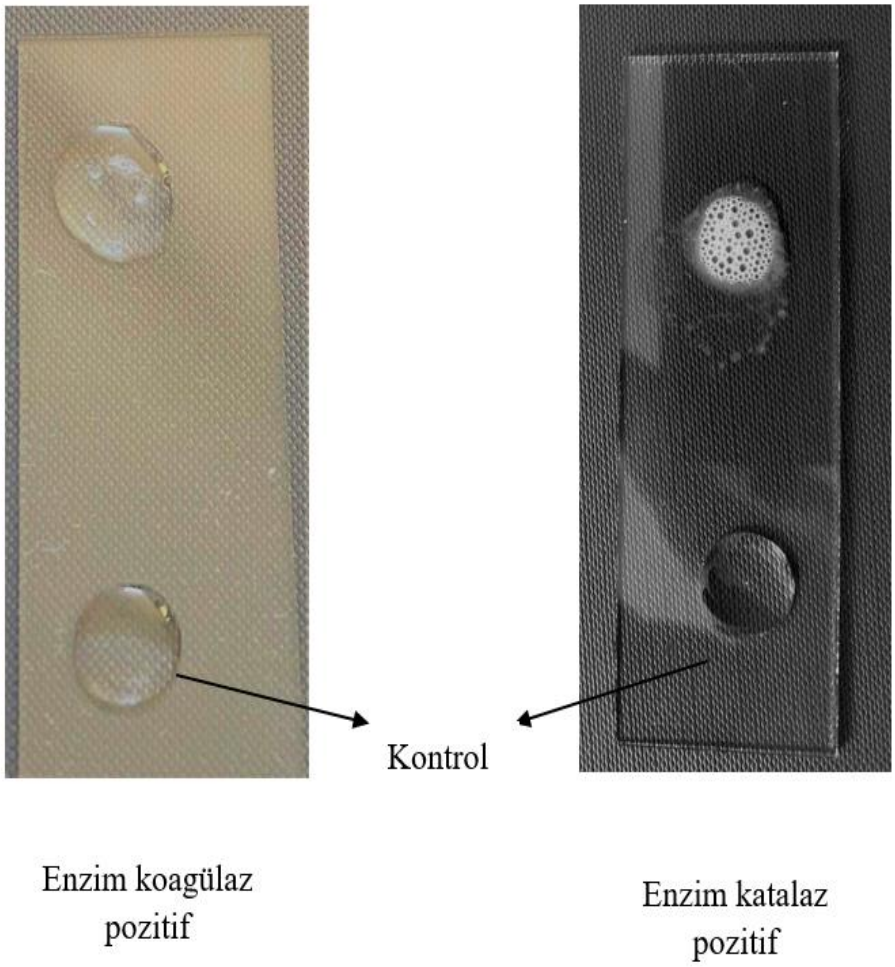
Şekil 4.3 MSA'daki büyüme paterni, Katı tuzlu mannitol ortamı

MacConkey agar, üzerinde pozitif bakteriler üremediğinden, Gram-pozitif bakteriler ve Gram-negatif bakteriler arasında bir ayrım olarak ele alınmıştır. Bu agar üzerinde bakterilerin üremediği Şekil 4.4'te gösterilmiştir.



Şekil 4.4 MacConkey agar üzerinde bakteri üremememesi

Staphylococcus aureus'un karakteristik biyokimyasal testlerine gelince, bu türü diğer cinslerden ayırt etmek için benimsenen bakteriler, cam slaytlara aktarılan bakteri sürüntülerine eklenen hidrojen peroksit H_2O_2'yi parçalama kabiliyeti ve pozitif sonucun ortaya çıkmasıyla katalaz enziminin üretimi olacak şekilde iki test içermektedir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 Katalaz ve koagülaz pozitif

4.2 Hastaların Yaş Grupları ve Cinsiyeti

Çalışmamızda, diyabetik hastalardan alınan *Staphylococcus aerus*' un 150 yara örneğinin yaş gruplarına ve cinsiyete göre dağılımı Çizelge 4.1'de gösterilmiştir

Çizelge 4.1 Hastaların yaş grupları ve cinsiyeti

Yaş Grupları (yıllar)	Erkek	Kadın
30-39	6(6%)	0
40-49	29(29%)	6(12%)
50-59	38(38%)	25(50%)
>60	27(27%)	19(38%)
Total	100	50

Çizelge 4.2 Diyabetik ayak enfeksiyonu olan diyabetli hastalarda ABO gruplarının dağılımı.

Yaş Grupları (yıllar)	Mean ± SD		P değeri
	Erkek	Kadın	
30-39	7.9±1.0	-	-
40-49	8.9±1.5	9.8±2.4	0.236NS
50-59	9.1±1.8	9.1±1.9	0.646NS
>60	8.6±1.3	9.0±1.4	0.436
Verilerin analizinde T-bağımsız kullanıldı, ns: önemsiz			

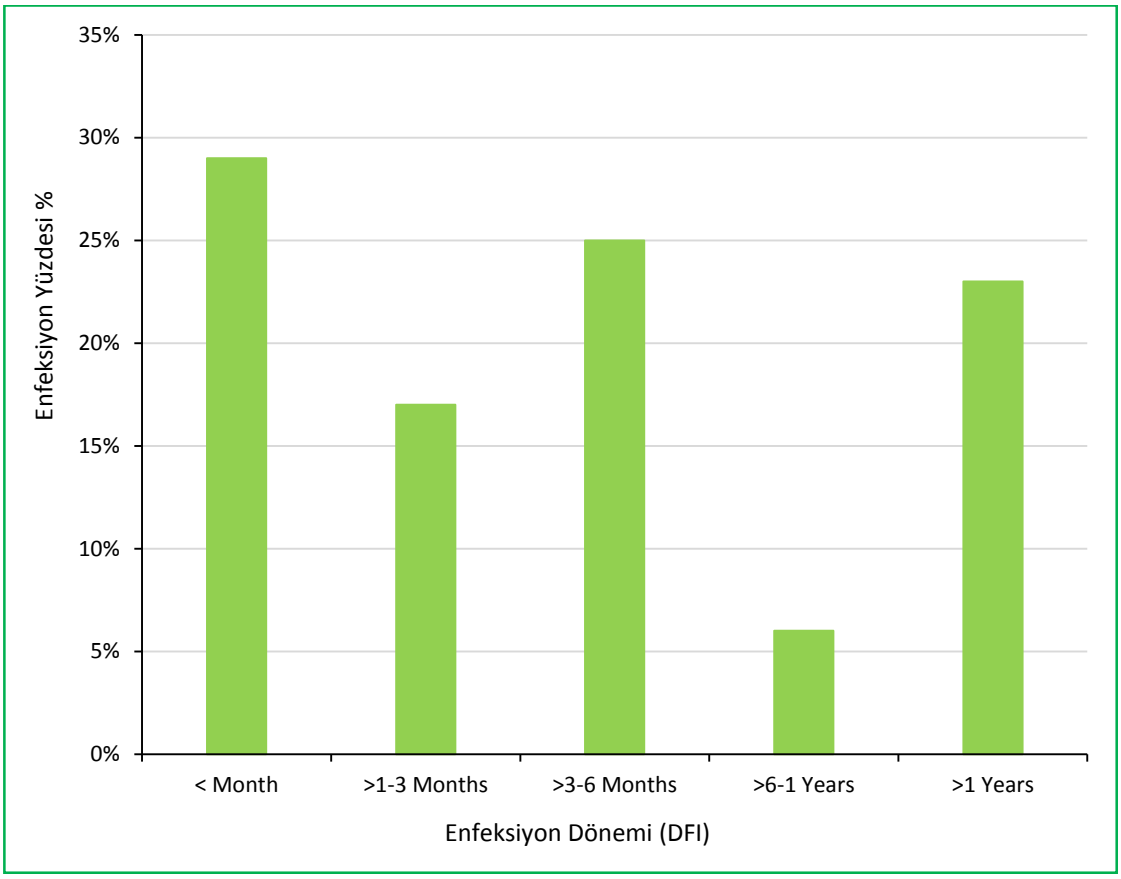
Çizelge 4.3'de Kontrolsüz diyabetin, yaşı ve hastalığın şiddeti ile kadınlardan daha fazla erkekleri etkilediği açıktır.

Kan grupları	Erkek	Kadın
A-VE	4(4%)	3(6%)
A+VE	18(18%)	8(16%)
AB-VE	10(10%)	4(8%)
AB+VE	18(18%)	10(20%)
B-VE	8(8%)	1(2%)
B+VE	9(9%)	5(10%)
O-VE	3(3%)	0
O+VE	30(30%)	19(38%)
Total	100	50

Çizelge 4.3 HbAIC düzeyleri ile demografik

HbAIC değerleri	Mean ± SD		P değeri
HbAIC değerleri	Erkek	Kadın	0.296ns
	9.1±1.	8.8±1.5	
Verilerin analizinde T-bağımsız kullanıldı, ns : non-significant			

Şekil 4.6 incelendiğinde, tabloda en yüksek enfeksiyon yüzdesinin bir aydan az olduğu ve hasta sayısının 44 (%29), ardından üç aydan altı aya kadar 37 (%25), bir yıldan fazla 34 (% 23), bir ile üç ay, 26 (% 17) ve altı aydan 1 yıla kadar (% 6) olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.6 Enfeksiyon süresi

4.3 Vitek 2-Gp Kullanarak Doğrulayıcı Tanı Testi

Vitek 2-Gp tanı kiti, bu çalışmadan seçilen izolatların saflığını doğrulamak amacıyla benimsenmiştir. Elde edilen sonuçlar izolatların saflığını gösteren cihaz belleğinin sonuçlarıyla %100 aynıdır. Bu cihazla yapılan teşhisin 64 biyokimyasal test içermesine ek olarak daha doğru ve olumlu sonuçlar vermesi tercih nedenlerinden biridir. Çizelge 4.4 biyokimyasal test, EK 3 ise bakteri teşhisi için Vitek 2-Gp cihazının bazı sonuçlarını göstermektedir.

Çizelge 4.4 Biyokimyasal test sonuçları

Biyokimyasal sonuçlar																	
2	AMY	+	4	PIPLC	-	5	dXYL	-	8	ADH1	+	9	BGAL	-	11	AGLU	-
13	APPA	-	14	CDEX	-	15	AspA	-	16	BGAR	-	17	BİRADAM	-	19	FOS	-
20	LeuA	+	23	ProA	-	24	BGURr	-	25	AGAL	-	26	PyrA	+	27	BGUR	-
28	AıaA	-	29	TyrA	-	30	dSOR	-	31	ÜRE	+	32	POLİB	+	37	dGAL	+
38	dRIB	+	39	ILATk	+	42	LAC	-	44	DIRDIRETMEK	+	45	dMAL	+	46	BAGL	+
47	NOVO	-	50	NC6,5	+	52	dMAN	+	53	dMNE	+	54	MBdG	+	56	PUL	-
57	dRAF	-	58	O129R	+	59	SAL	-	60	SAC	+	62	dTRE	+	63	ADH2S	-
64	OPTO	+															

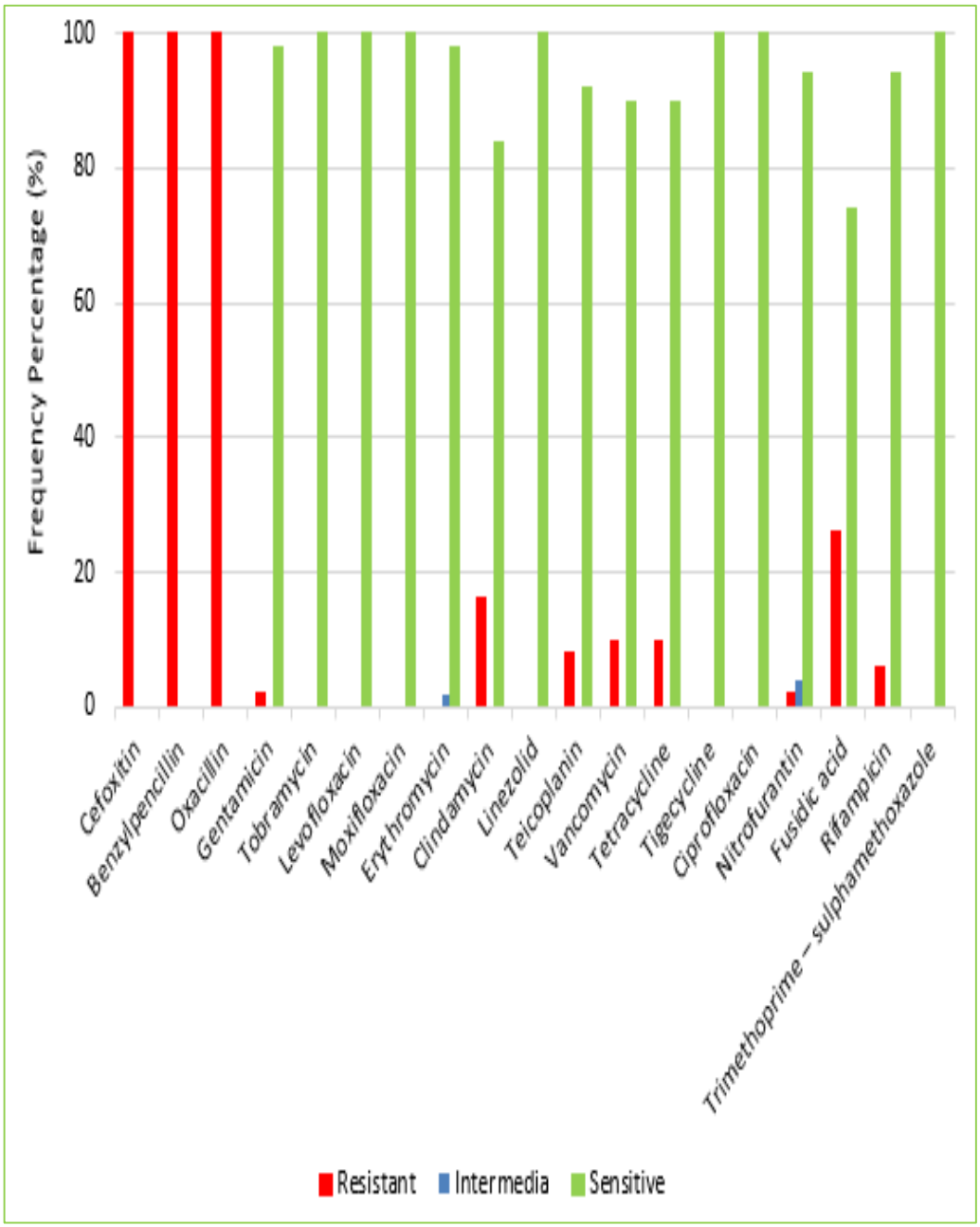
4.4 Seçilmiş İzolatların Antibiyotiğe Duyarlılığı

Bu çalışmada, Vitek 2 AST cihazını kullanılarak bakteri izolatlarının 19 çeşit antibiyotiğe karşı direnci tespit edilmiştir. Çizelge 4.5 antibiyotik direncinin sonuçlarını, Şekil 4.7 antibiyotik yüzdelerini ve EK 4, seçilmiş izolatların antibiyotiğe duyarlılığını göstermektedir. Duyarlılık test kartı, Antibiyotik duyarlılık Testi Serisi (AST) olarak bilinen Vitek-2 AST Kompakt Sistemi ile yapılmıştır. Antibiyotiklerin inhibitör konsantrasyonlarının belirlenmesi için 64 kuyucuğa, her antibiyotik için 3 farklı konsantrasyon olacak şekilde yükleme yapılmıştır. Daha sonra çalışmadaki izolatlar test edilerek pozitif kontrol ile kuyucuklardaki büyüme değerleri cihaza kaydedilmiştir. Elde edilen sonuçlar antibiyotikler ile bakteri izolatları arasında karşılaştırma yapılması için otomatik olarak kaydedilmiştir. Konsantrasyon testin üreticisi tarafından bilinmelidirGösterildiği gibi, EK4'teki testlerin bazı resimleri, çalışmanın fizyolojik aparatın içinde gerçekleştiğini göstermektedir, çünkü tedaviye dirençli ve hassas

bakterileri gösterir ve aparatın içine odaklanmak için nüksetme üç aşamada gerçekleştirilir. Ayrıca konsantrasyonlar AST üreten firma tarafından üretilmektedir.

Çizelge 4.5 Antibiyotik direnci sonuçları

Antibiyotikler	**Konsantrasyon µg /mL**	**Dayanıklı R (%)**	**Orta düzey (%)**	**Duyarlı S (%)**	**P değeri**
Sefoksitin	6	150	0	0	
Benzilpensilin	1	150	0	0	
Oksasilin	2	150	0	0	
Antibiyotik	64	3	0	147	P< 0.001
Tobramisin	64	0	0	150	
Levofloksasin	8	0	0	150	
Moksifloksasin	8	0	0	150	
Eritromisin	2	0	3	147	P< 0.001
Klindamisin	2	24	0	126	P< 0.001
Linezolid	2	0	0	150	
Teikoplanin	16	12	0	138	P< 0.001
Vankomisin	16	15	0	135	P< 0.001
Tetrasiklin		15	0	135	P< 0.001
Tigesiklin	1	0	0	150	
Siprofloksasin	4	0	0	150	
Nitrofurantin	64	3		141	P< 0.001
Fusidik Asit	4	39	0	111	P< 0.001
Rifampisin	2	9	0	141	P< 0.001
Trimetoprim – Sülfametoksazol	/608 32	0	0	150	



Şekil 4.7 Antibiyotik yüzdeleri

4.5 Vitek 2AST Cihazı Kullanılarak Antibiyotiklerin Alt Limitlerinin Tahmini

Staphylococcus aureus tedavisi için 19 antibiyotiğin alt sınırlarını tahmin etmek için Vitek 2AST cihazı kullanılmıştır. Bu cihaz diğer geleneksel yöntemlere göre daha doğru sonuçlar vermektedir Bu işlem Vitek 2AST cihazının içinde gerçekleştiğinden, MIC Aşağıdaki tabloda gösterildiği gibi mikropun inkübe edilmesinden 24 saat sonra mikrop

büyümesini açıkça engelleyebilen en düşük antimikrobiyal konsantrasyonu olan minimum inhibitör konsantrasyon bakterileri öldürmeye yardımcı olan tedavinin minimum inhibitör konsantrasyonu olarak kabul edilir. belirtildiği gibi Çizelge 4.6

Çizelge 4.6 MIC antibiyotiklerin sınırları

Antibiyotikler	Dayanıklı		Orta seviye		Duyarlı	
		MIC		MIC		MIC
Sefoksitin	150(100)	>=4				
Benzilpensilin	150(100)	>=0,5				
Oksasilin	150(100)	POS				
Antibiyotik	3(2)	>=16			147(98)	<=0,5
Tobramisin	-				150(100)	<=1
Levofloksasin	-				150(100)	<=0,12
Moksifloksasin	-				150(100)	<=0,25
Eritromisin			3(2)	2	147(98)	<=0,25
Klindamisin	24(16)	4			126(84)	<=0,25
Linezolid					150(100)	<=0,5
Teikoplanin		>=32	12(8)	32	138(92)	<=0,5
Vankomisin	15(10)	>=32			135(90)	<=0,5
Tetrasiklin	15(10)	2			135(90)	<=1
Tigesiklin					150(100)	<=0,12
Siprofloksasin					150(100)	<=0,5
Nitrofurantin	3(2)	128	6(4)	64	141(94)	<=16
Fusidik Asit	39(26)	4			111(74)	<=0,5
Rifampisin	9(6)	1			141(94)	<=0,5
Trimetoprim – Sülfametoksazol					150(100)	<=10

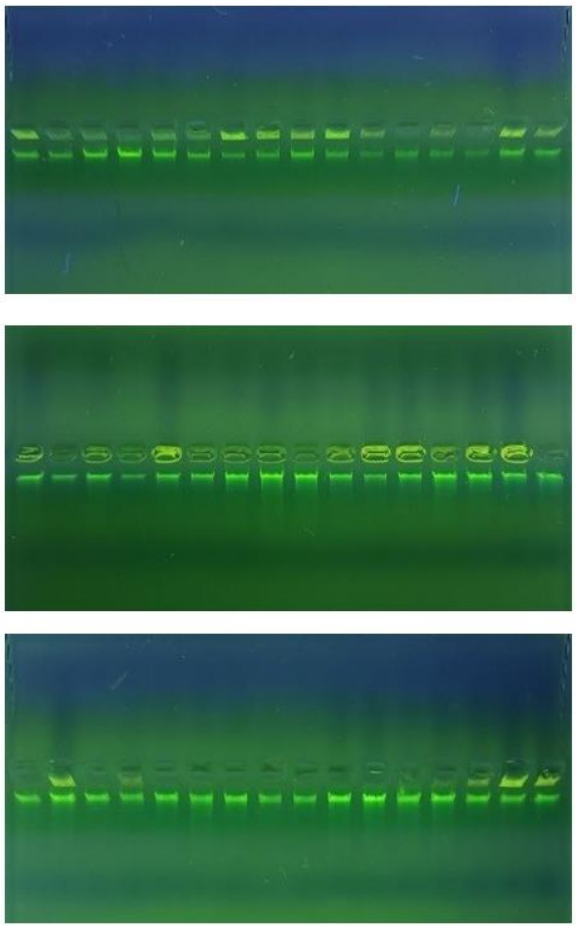
4.6 Moleküler Çalışma

Bu çalışmanın ilk moleküler adımı, MecA antibiyotik direnci kullanılarak çalışma izolatlarının moleküler tanımlanmasıdır ve ikincisi, tedavinin ekstrüzyonunu kontrol eden antiflorokinoidlerin norA tarafından temsil edilen akış pompalarını içeren izolatlardan sorumlu genlerin keşfidir bakterilerin dışında.

4.6.1 Bakteriyel Genomik DNA Ekstraksiyonu

Tüm numuneler, ekstrakte edilmiş genomik DNA'ya sahiptir. Bulaşma olmadan farklı bantlar ortaya çıkaran DNA örneklerini incelemek için bir saat boyunca santimetre başına

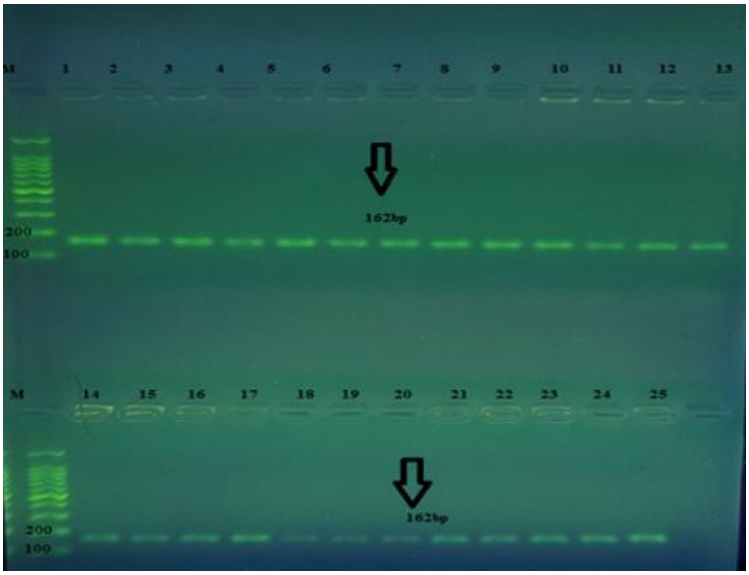
5 voltluk bir voltajda %1'lik bir agaroz jel üzerinde Jel elektroforezi yapılmıştır (Şekil 4.8).



Şekil 4.8 Bakteriyel genomik DNA, bir saat boyunca santimetre başına 5 voltluk bir voltajda yüzde 1'lik bir agaroz jel üzerinde elektroforezi

4.6.2 Meca Gen Amplifikasyonu

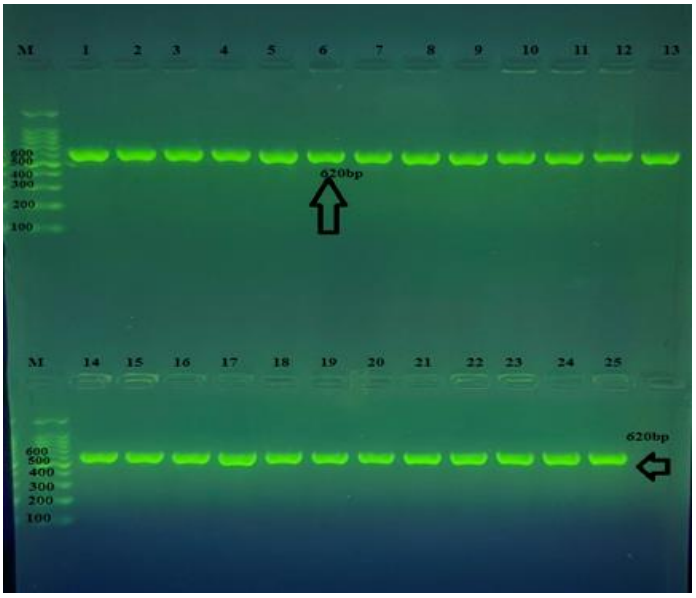
*Staphylococcus aureus'*ta MecA geninin varlığını test etmek için geleneksel bir PCR protokolü kullanılmıştır. (Şekil 4.9) PCR ürünü bant boyutu 126 bp. Ürün, 70 volt/cm2'de %1,5 agaroz üzerinde elektroforezdi. 1 saat boyunca 1x TBE tamponu. N: DNA merdiveni (100).



Şekil 4.9 MecA geni PCR ürünü bant boyutu 126 bp. Ürün, 70 volt/cm2'de %1,5 agaroz üzerinde elektroforezdi. 1 saat boyunca 1x TBE tamponu. N: DNA merdiveni (100).

4.6.3 Nora Gen Amplifikasyonu

NorA gen primerleri, DNA amplifikasyonu ve elektroforez sonrasında akış pompaları ile çalışılan izolatların sahipliğini saptamak için kullanılmıştır. Şekil 4.10, NorA geninin DNA parçalarını göç ettiren çalışma izolatlarından 147 izolatın, moleküler ağırlığı 620 bp olan bu gene sahip olduğunu göstermektedir. PCR ürünü bant boyutu 620 bp. Ürün, 70 volt/cm2'de %1,5 agaroz üzerinde elektroforezdi. 1 saat boyunca 1x TBE tamponu. N: DNA merdiveni (100).



Şekil 4.10 NorA geni PCR ürünü bant boyutu 620 bp. Ürün, 70 volt/cm2'de %1,5 agaroz üzerinde elektroforezdi. 1 saat boyunca 1x TBE tamponu. N: DNA merdiveni (100).

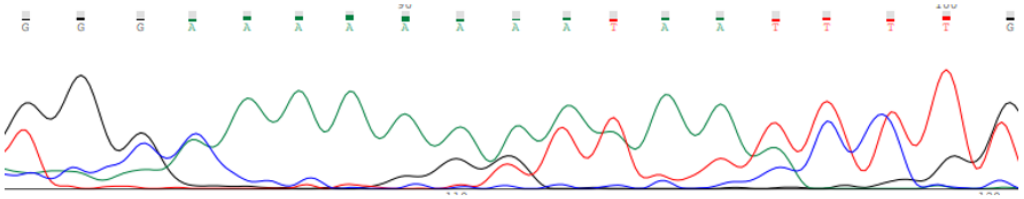
4.7 MecA Geninin Dizi Analizi

Genlerin dizileme PCR ürünü (MecA ve NorA), çoğu antibiyotiğe dirençli izolatlar için elektroforez ile ortaya çıkarılan PCR ürünleri ve dizileme Applied Biosystem kapiler sistemi (Macrogen, Kore) kullanılarak tespit edilmiştir. Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi'nin (NCBI) PCR dizilerinin değerlendirilmesini ve sorguların eşleşmesini (BLAST) gerektirmektedir. Sonuçları sıralamak, salgına neden olan bakterileri belirlememizi sağlamıştır. MecA geni için, Genbank'ın referans suşu ID: CP092561,1 ile %98 uyumludur ve MecA'nın 40016 nükleotid bölgesinde bir tip ikame (dönüştürme G/T) ile ortaya çıkmıştır. İkinci numune için, referans gen bankası ID: GP092561,1 ile eşleşme yüzdesi %97 olarak bulunmuştur ve 39911 konumunda T'den A'ya 3 tip transversiyon ve 40016 konumunda G/T ve 40024 konumunda A/T ve boşluk numarası ile ortaya çıkmıştır. Üçüncü örnek, ID: CP092561,1 için, gen bankası ile uyumluluk yüzdesi %95 ve 39921 nükleotit konumunda GAP gösterdi ve 39923 konumunda iki geçiş G/A, 39962 konumunda T/C ve dört trans versiyon (G/T 39962, A/T 42991, G/T 40016 ve A/T 40024 olacak şekilde belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.11, Şekil 4.12 ve Şekil 4.13 'de gösterilmiştir.

Puan	Beklenti	Kimlikler	Boşluklar	Sonuç
212 bit (234)	4e-56	120/122(98%)	0/122(0%)	Pozitif/Pozitif

```
Sorgu 5 GATTTATCTTTTTGCCAACCTTTACCATCGATTTATAACTTGTTTTATCGTCTAATGTT 64
|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||
Sbjct 39906 GATTTATCTTTTTGCCAACCTTTACCATCGATTTTATAACTTGTTTTATCGTCTAATGTT 39965

Sorgu 65 TTGTTTATTTAACCCAATCATTGCTGTTAATATTTTTTGAGTTGAACCTGG G GAAGTTG A A 124
|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||| |
Sbjct 39966 TTGTTATTTAACCCAATCATTGCTGTTAATATTTTTTGAGTTGAACCTGG T GAAGTTG T A
40025
```

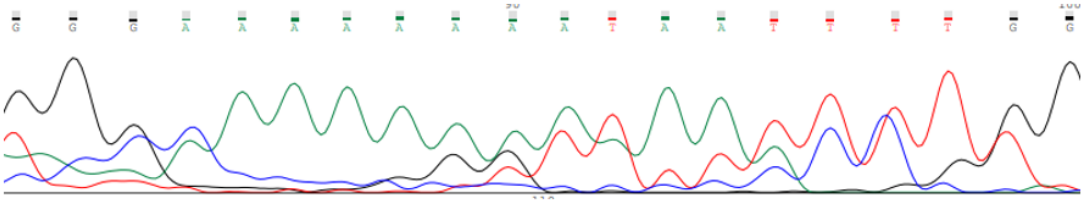


Şekil 4.11 *Staphylococcus aureus*'un nükleotid dizisi MecA geni, ID: CP092561,1

Puan	Beklenti	Kimlikler	Boşluklar	Sonuç
206 bit (228)	2e-54	122/126(97%)	1/126(0%)	Pozitif/Pozitif

```
Sorgu 7 TTT T TCTTTTTGCCAACCTTTACCATCGATTTATAACTTGTTTTATCGTCTAATGTTTT 66
||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||
Sbjct 39908 TTT A TCTTTTTGCCAACCTTTACCATCGATTTTATAACTTGTTTTATCGTCTAATGTTTT
39967

Sorgu 67 GTTATTTAACCCAATCATTGCTGTTAATATTTTTTGAGTTGAACCTGG G GAAGTTG A AAT 126
|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||| |||
Sbjct 39968 GTTATTTAACCCAATCATTGCTGTTAATATTTTTTGAGTTGAACCTGG T GAAGTTG T AAT
40027
```

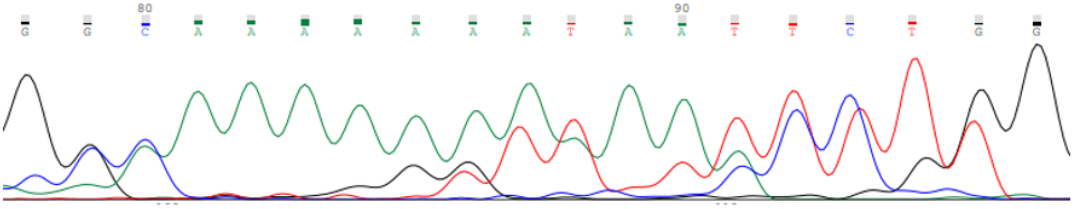


Şekil 4.12 *Staphylococcus aureus*'un nükleotid dizisi MecA geni, ID: CP092561

Puan	Beklenti	Kimlikler	Boşluklar	Sonuç
171 bit (189)	1e-43	107/114 (%95)	1/114(0 %)	Pozitif/Pozitif

```
Sorgu 8 CTTTTTGC - A G C T TTTACCATCGATTTTATAACTTGTTTTATCGTCTAA G GTTTTGTTAT
66
|||||||| | | ||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||
Sbjct 39913 CTTTTTGC C A C C TTTACCATCGATTTTATAACTTGTTTTATCGTCTAA T GTTTTGTTAT
39972

Sorgu 67 TTAACCCAATCATTGCTGT A AATATTTTTTGAGTTGAACCTGG G GAAGTTG A AA 120
|||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||| ||||||| ||
Sbjct 39973 TTAACCCAATCATTGCTGT T AATATTTTTTGAGTTGAACCTGG T GAAGTTG T AA 40026
```



Şekil 4.13 *Staphylococcus aureus'un* MecA geninin nükleotid dizisi, *Staphylococcus aureus* subsp. için dizi referans suşu ile hizalama olarak. ID: CP092561,1 altında Gen Bankası (NCBI) kromozomu.

4.8 NorA Geninin Dizi Analizi

Sonuç dizilimi, NorA geni için izolatların Gen Bankası'ndaki referans suş ID: CP090871,1 ile %100 uyumlu olduğunu göstermiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.14, 4.15 ve 4.16'te gösterilmektedir.

Puan	Beklenti	Kimlikler	Boşluklar	Sonuç
883 bit (478)	0.0	478/478(100%)	0%)	Pozitif /Pozitif

```
Sorgu 1 TCATTTTAGGACCAGGGATTGGTGGATTTATGGCAGAAGTTTCACATCGTATGCCATTTT 60
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||
Sbjct 713180 TCATTTTAGGACCAGGGATTGGTGGATTTATGGCAGAAGTTTCACATCGTATGCCATTTT 713239

Sorgu 61 ACTTTGCAGGAGCATTAGGTATTCTAGCATTTATAATGTCAATTGTATTGATTCACGATC 120
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||
Sbjct 713240 ACTTTGCAGGAGCATTAGGTATTCTAGCATTTATAATGTCAATTGTATTGATTCACGATC 713299

Sorgu 121 CGAAAAAGTCTACGACAAGTGGTTTCCAAAAGTTAGAGCCACAATTGCTAACGAAAAATTA 180
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||
Sbjct 713300 CGAAAAAGTCTACGACAAGTGGTTTCCAAAAGTTAGAGCCACAATTGCTAACGAAAAATTA 713359

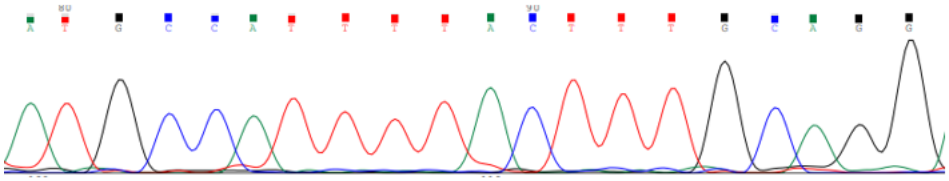
Sorgu 181 ACTGGAAAAGTGTTTATTACACCAGTTATTTTAACACTTGTATTATCGTTTGGTTTATCTG 240
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||
Sbjct 713360 ACTGGAAAGTGTTTATTACACCAGTTATTTTAACACTTGTATTATCGTTTGGTTTATCTG 713419

Sorgu 241 CATTTGAAACATTGTATTCACTATACACAGCTGACAAGGTAAAATTATTCACCTAAAGATA 300
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||
Sbjct 713420 CATTTGAAACATTGTATTCACTATACACAGCTGACAAGGTAAAATTATTCACCTAAAGATA 713479

Sorgu 301 TTTCGATTGCTATTACGGGTGGCGGTATATTTGGGGCACTTTTCCAAATCTATTTCTTCG 360
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||
Sbjct 713480 TTTCGATTGCTATTACGGGTGGCGGTATATTTGGGGCACTTTTCCAAATCTATTTCTTCG 713539

Sorgu 361 ATAAATTTATGAAGTATTTCTCAGAGTTAACATTTATAGCTTGGTCATTATTATATTCAG 420
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||
Sbjct 713540 ATAAATTTATGAAGTATTTCTCAGAGTTAACATTTATAGCTTGGTCATTATTATATTCAG 713599

Sorgu 421 TTGTTGTCTTTAATATTATTAGTTTTTGCTAATGGCTTTGGTCAATAATGTTAATCAG 478
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||
Sbjct 713600 TTGTTGTCTAATATTATTAGTTTTTGCTAATGGCTATTGGTCAATAATGTTAATCAG 713657
```



Şekil 4.14 *Staphylococcus aureus'un* NorA geninin nükleotid dizisi, *Staphylococcus aureus* subsp. için dizi referans suşu ile hizalama olarak. ID: CP088157,1 altında Gen Bankası (NCBI) kromozomu

Puan	Beklenti	Kimlikler	Boşluklar	Sonuç
1003 bit (543)	0.0	543/543 (%100)	0/543(0%)	artı/artı

```
Sorgu 1 TCATTTTAGGACCAGGGATTGGTGGATTTATGGCAGAAGTTTCACATCGTATGCCATTTT 60
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||
Sbjct 713180 TCATTTTAGGACCAGGGATTGGTGGATTTATGGCAGAAGTTTCACATCGTATGCCATTTT 713239

Sorgu 61 ACTTTGCAGGAGCATTAGGTATTCTAGCATTTATAATGTCAATTGTATTGATTCACGATC 120
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||
Sbjct 713240 ACTTTGCAGGAGCATTAGGTATTCTAGCATTTATAATGTCAATTGTATTGATTCACGATC 713299

Sorgu 121 CGAAAAAGTCTACGACAAGTGGTTTCCAAAAGTTAGAGCCACAATTGCTAACGAAAAATTA 180
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||
Sbjct 713300 CGAAAAAGTCTACGACAAGTGGTTTCCAAAAGTTAGAGCCACAATTGCTAACGAAAATTA 713359

Sorgu 181 ACTGGAAAAGTGTTTATTACACCAGTTATTTTAACACTTGTATTATCGTTTGGTTTATCTG 240
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||
Sbjct 713360 ACTGGAAAGTGTTTATTACACCAGTTATTTTAACACTTGTATTATCGTTTGGTTTATCTG 713419

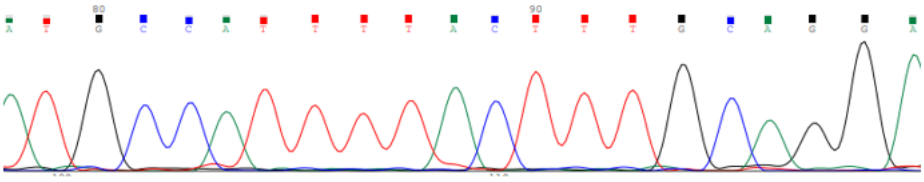
Sorgu 241 CATTTGAAACATTGTATTCACTATACACAGCTGACAAGGTAAAATTATTCACCTAAAGATA 300
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||
Sbjct 713420 CATTTGAAACATTGTATTCACTATACACAGCTGACAAGGTAAAATTATTCACCTAAAGATA 713479

Sorgu 301 TTTCGATTGCTATTACGGGTGGCGGTATATTTGGGGCACTTTTCCAAATCTATTTCTTCG 360
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||
Sbjct 713480 TTTCGATTGCTATTACGGGTGGCGGTATATTTGGGGCACTTTTCCAAATCTATTTCTTCG 713539

Sorgu 361 ATAAATTTATGAAGTATTTCTCAGAGTTAACATTTATAGCTTGGTCATTATTATATTCAG 420
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||
Sbjct 713540 ATAAATTTATGAAGTATTTCTCAGAGTTAACATTTATAGCTTGGTCATTATTATATTCAG 713599

Sorgu 421 TTGTTGTCTAATATTATTAGTTTTTGCTAATGGCTATTGGTCAATAATGTTAATCAGTT 480
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||
Sbjct 713600 TTGTTGTCTAATATTATTAGTTTTTGCTAATGGCTATTGGTCAATAATGTTAATCAGTT 713659

Sorgu 481 TTGTTGTCTTCATAGGTTTTGATATGATACGACCAGCCATTACAAATTATTTTTCTAATA 540
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||
Sbjct 713660 TTGTTGTCTTCATAGGTTTTGATATGATACGACCAGCCATTACAAATTATTTTTTCTAATA 713719
```

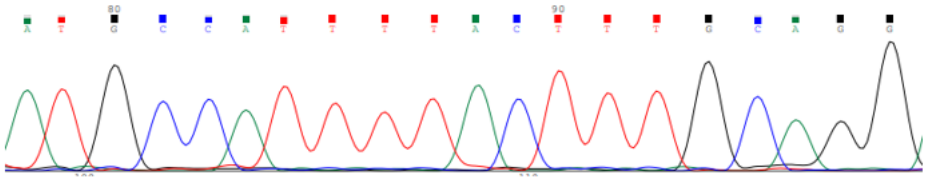


Şekil 4.15 *Staphylococcus aureus'un* NorA geninin nükleotid dizisi, *Staphylococcus aureus* subsp. için dizi referans suşu ile hizalama olarak. ID: CP088157,1 altında Gen Bankası (NCBI) kromozomu.

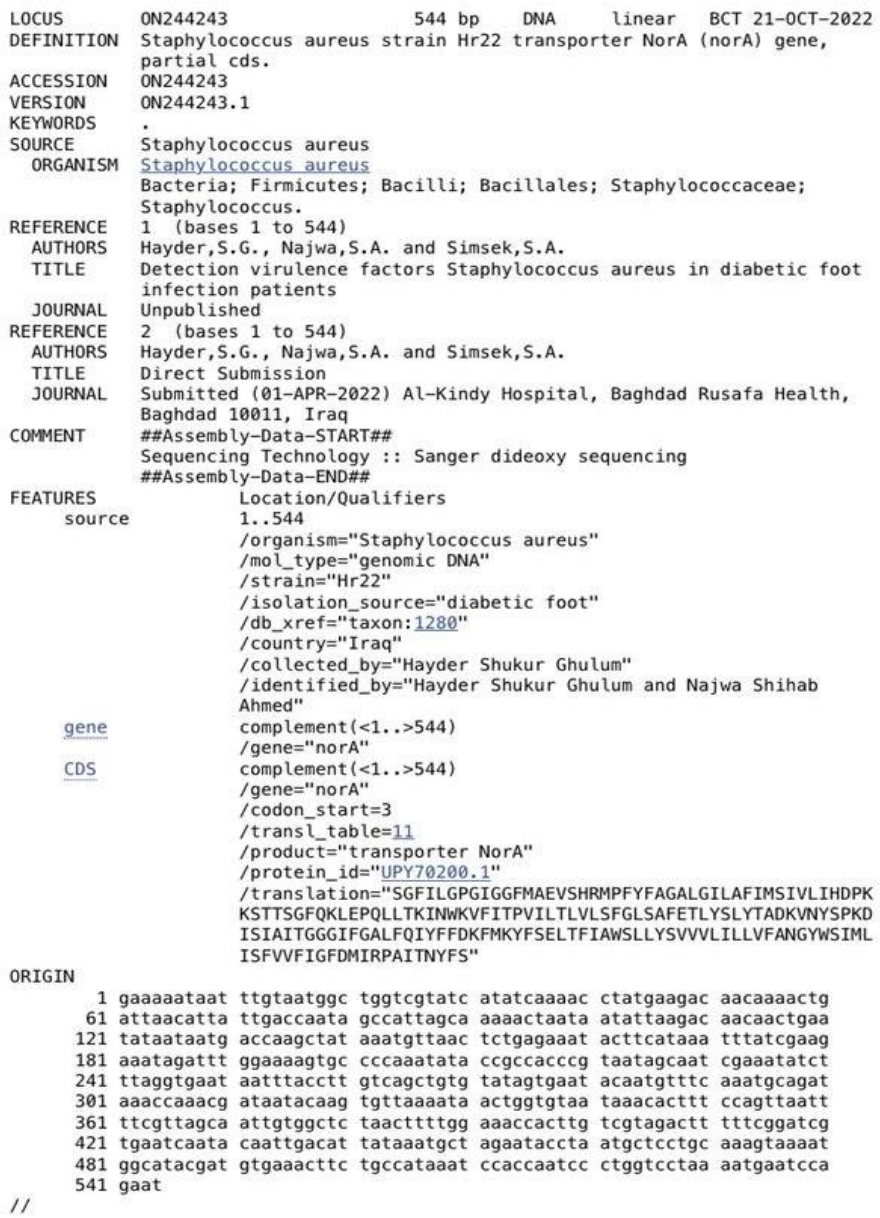
Puan	Beklenti	Kimlikler	Boşluklar	Sonuç
891 bit (482)	0.0	**487/489(%99)**	2/489(0%)	Pozitif/Pozitif

```
Sorgu 1 ATTCTGGATTCATTTTAGGACCAGGGATTGGTGGATTTATGGCAGAAGTTTCACATCGTA 60
|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||
Sbjct 713171 ATTCTGGATTCATTTTAGGACCAGGGATTGGTGGATTTATGGCAGAAGTTTCACATCGTA 713230
Sorgu 61 TGCCATTTTACTTTGCAGGAGCATTAGGTATTCTAGCATTTATAATGTCAATTGTATTGA 120
|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||
Sbjct 713231 TGCCATTTTACTTTGCAGGAGCATTAGGTATTCTAGCATTTATAATGTCAATTGTATTGA 713290
Sorgu 121 TTCACGATCCGAAAAAGTCTACGACAAGTGGTTTCCAAAAGTTAGAGCCACAATTGCTAA 180
|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||
Sbjct 713291 TTCACGATCCGAAAAAGTCTACGACAAGTGGTTTCCAAAAGTTAGAGCCACAATTGCTAA 713350
Sorgu 181 CGAAAATTAACT G GGAAAAGTGTTTATTACACCAGTTATTTTAACACTTGTATTATCGTTT 240
|||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 713351 CGAAAATTAACT - GGAAAAGTGTTTATTACACCAGTTATTTTAACACTTGTATTATCGTTT 713409
Sorgu 241 GGTTTATCTGCATTTGAAACATTGTATTCACTATACACAGCTGACAAGGTAAATTTATTCA 300
|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||
Sbjct 713410 GGTTTATCTGCATTTGAAACATTGTATTCACTATACACAGCTGACAAGGTAAAATTATTCA 713469
Sorgu 301 CCTAAAGATATTTCGATTGCTATTAC G GGGTGGCGGTATATTTGGGGCACTTTTCCAAAT 360
||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 713470 CCTAAAGATATTTCGATTGCTATTAC - GGGTGGCGGTATATTTGGGGCACTTTTCCAAAT 713528

Sorgu 361 CTATTTCTTCGATAAATTTATGAAGTATTTCTCAGTTAACATTTATAGCTTGGTCATT 420
|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||
Sbjct 713529 CTATTTCTTCGATAAATTTATGAAGTATTTCTCAGAGTTAACATTTATAGCTTGGTCATT 713588
Sorgu 421 ATTATATTCAGTTGTTGTCTAATATTATTAGTTTTTGCTAATGGCTATTGGTCAATAAT 480
|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||
Sbjct 713589 ATTATATTCAGTTGTTGTCTAATATTATTAGTTTTTGCTAATGGCTATTGGTCAATAAT 713648
```



Şekil 4.16 *Staphylococcus aureus'un* NorA geninin nükleotid dizisi, *Staphylococcus aureus* subsp. için dizi referans suşu ile hizalama olarak. ID: CP088157,1 altında Gen Bankası (NCBI) kromozomu



```
LOCUS       ON244243                544 bp    DNA     linear   BCT 21-OCT-2022
DEFINITION  Staphylococcus aureus strain Hr22 transporter NorA (norA) gene,
            partial cds.
ACCESSION   ON244243
VERSION     ON244243.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Staphylococcus aureus
  ORGANISM  Staphylococcus aureus
            Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Staphylococcaceae;
            Staphylococcus.
REFERENCE   1  (bases 1 to 544)
  AUTHORS   Hayder,S.G., Najwa,S.A. and Simsek,S.A.
  TITLE     Detection virulence factors Staphylococcus aureus in diabetic foot
            infection patients
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 544)
  AUTHORS   Hayder,S.G., Najwa,S.A. and Simsek,S.A.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (01-APR-2022) Al-Kindy Hospital, Baghdad Rusafa Health,
            Baghdad 10011, Iraq
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..544
                     /organism="Staphylococcus aureus"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="Hr22"
                     /isolation_source="diabetic foot"
                     /db_xref="taxon:1280"
                     /country="Iraq"
                     /collected_by="Hayder Shukur Ghulum"
                     /identified_by="Hayder Shukur Ghulum and Najwa Shihab
                     Ahmed"
     gene            complement(<1..>544)
                     /gene="norA"
     CDS             complement(<1..>544)
                     /gene="norA"
                     /codon_start=3
                     /transl_table=11
                     /product="transporter NorA"
                     /protein_id="UPY70200.1"
                     /translation="SGFILGPGIGGFMAEVSHRMPFYFAGALGILAFIMSIVLIHDPK
                     KSTTSGFQKLEPQLLTKINWKVFITPVILTLVLSFGLSAFETLYSLYTADKVNYSPKD
                     ISIAITGGGIFGALFQIYFFDKFMKYFSELTFIAWSLLYSVVVLILLVFANGYWSIML
                     ISFVVFIGFDMIRPAITNYFS"
ORIGIN
        1 gaaaaataat ttgtaatggc tggtcgtatc atatcaaaac ctatgaagac aacaaaactg
       61 attaacatta ttgaccaata gccattagca aaaactaata atattaagac aacaactgaa
      121 tataataatg accaagctat aaatgttaac tctgagaaat acttcataaa tttatcgaag
      181 aaatagattt ggaaaagtgc cccaaatata ccgccacccg taatagcaat cgaaatatct
      241 ttaggtgaat aatttacctt gtcagctgtg tatagtgaat acaatgtttc aaatgcagat
      301 aaaccaaacg ataatacaag tgttaaaata actggtgtaa taaacacttt ccagttaatt
      361 ttcgttagca attgtggctc taacttttgg aaaccacttg tcgtagactt tttcggatcg
      421 tgaatcaata caattgacat tataaatgct agaataccta atgctcctgc aaagtaaaat
      481 ggcatacgat gtgaaacttc tgccataaat ccaccaatcc ctggtcctaa aatgaatcca
      541 gaat
//
```

Şekil 4.17 *S. aureus*'un yerel Irak izolasyon kimlikleri ON244243.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Diyabetik bireylerde ayak enfeksiyonları dünya çapında yaygın, karmaşık ve tedavisi pahalı bir hastalık olarak karşımıza çıkmaktadır (Rathur and Boulton 2007). Bu çalışma, ayak enfeksiyonu olan 150 diyabetik bireyin virülans değişkenlerini ve mikrobiyolojik profillerini değerlendirmek için yapılmıştır. Çalışma özellikle risk faktörleri ve çoklu ilaca dirençli bakteriler açısından önemlidir. 300 örnekten 150'si metisiline dirençli Staphylococcus aureus, 21'i Staphylococcus aureus ve 84'ü Gram negatif bakteriydi, buna ek olarak 29 izolatta bakteri üremesi görülmedi. Negatif büyümenin sonucu, enfeksiyona, anaerobik bakterilere, mantarlara ve virüslere neden olan diğer etkenlerin bir sonucu olabileceği gibi (Jain and Barman 2017) yaraların o sırada enfekte olmamasından da kaynaklanabilir. Gram pozitif stafilokoklar, DFI'den tanımlanan en büyük mikroorganizma grubudur.

Bu sonuç daha önceki çalışmaların sonuçları ile uyumludur. Çalışmalarında diyabetik ayak yaralanmaları, yaraları ve yanıklarından uzaklaştırılan bakterilerin çoğunun hastane kaynaklı enfeksiyonlar oldukları için Staphylococcus aureus enfeksiyonuna bağlı olduğunu bulmuşlardır ve bu durumu açıklamaktadır. enfekte hastalar arasında hızla yayılır. Gram pozitif Stafilokoklar, DFI'den tanımlanan en büyük mikroorganizma grubudur. (Abdulrazak *et al*. 2005, Rahim *et al*. 2017). Buna karşılık, Irak'ta Bu çalışma, ayak enfeksiyonu olan 150 diyabetik bireyin virülans değişkenlerini ve mikrobiyolojik profillerini değerlendirmek için yapılmıştır. Çalışma özellikle risk faktörleri ve çoklu ilaca dirençli bakteriler açısından önemlidir. 300 örnekten 150'si metisiline dirençli Staphylococcus aureus, 21'i Staphylococcus aureus ve 84'ü Gram negatif bakteriydi, buna ek olarak 29 izolatta bakteri üremesi görülmedi. Gram-negatif bakterilerin, Gram-pozitif bakterilere göre daha baskın olduğunu tespit edilmiştir (Mahmoud *et al*. 2014) Klinik örneklerden elde edilen bakteriyel izolatlar, başlangıçta kültürel morfolojiye ve biyokimyasal testlere dayalı olarak karakterize edilmiştir. Kültür sonuçları, kanlı agar besiyeri üzerindeki kolonilerin, kırmızı kan hücreleri tarafından analiz edilen pürüzsüz, dışbükey, parlak ve ışık geçirmeyen yuvarlak kenarları olan 1-3 mm boyutlarında grimsi bir renk gösteren Staphylococcus cinsinin kloakları olarak seçildiğini gösterdi. Resim 4.2'daki gibi Tip B-hemoliz ayrışması ile koloni etrafında şeffaf bir hale şeklinde görünür.

Kültür sonuçları incelendiğinde izolatlar MacConkey agar üzerinde koloniler oluşturmamıştır bu nedenle MacConkey agar, Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerin ayrımında önemli bir rol üstlenmiştir. Mannitol tuzlu agar üzerinde Staphylococcus aureus sarı koloniler oluşturmuştur. Ayrıca S. aureus'un tanımlanmasında biyokimyasal testlerden kanlı agarda katalaz, koagülaz ve kan hemolizini yapılmıştır. Tüm izolatlar, mannitol tuzlu agar için katalaz ve pıhtılaşma için pozitif sonuçlar verdi ve biyokimyasal testler bu kaynaktan doğrulandı. (McFadden 2000).

Enfeksiyonun cinsiyet bakımından dağılımına bakıldığında erkeklerde kadınlardan daha fazla oranda görüldüğü tespit edilmiştir. Bunun sebebi, erkeklerde şeker hastalığının kadınlardan daha sık görülmesi, açık havada çalışma ve kadınlara kıyasla ayak bakımına daha az önem vermeleri olarak sıralanabilir.

Ayrıca çalışmamızda erkeklerin HbAIC değerleri kadınlara oranla daha yüksek olarak tespit edilmiştir. Bu duruma genetik, beslenme ve hareketsiz yaşam tarzı faktörlerinin neden olduğu düşünülmektedir. Aynı zamanda cinsiyet hormonları enerji metabolizmasını, vücut kütlesini, kan damarı fonksiyonunu ve inflamatuar reaksiyonları etkilemektedir. Bu nedenle erkekler hiperglisemiye kadınlardan daha duyarlıdır.

Elde ettiğimiz sonuçlarda en yüksek enfeksiyon yüzdesi, bir aydan az enfeksiyon süresine sahip olan hastalarda daha sonra sırasıyla üç aydan altı aya kadar, bir yıldan fazla, bir ile üç ay ve altı aydan 1 yıla kadar olarak belirlenmiştir.

Mevcut çalışmanın sonuçları, MRSA'nın MRSA'nın %100'ünde sefoksitine karşı en yüksek direnci sergilediğini, dünya çapında yayıldığını ve MRSA enfeksiyonlarının çoğu, hastaneleri veya sağlık bakım ortamlarını ziyaret eden kişiler arasında ve ayrıca kirli ellerle veya temiz olmayan yüzeyler aracılığıyla insanlara dokunan sağlık çalışanları aracılığıyla meydana gelir, bu nedenle enfekte kişide kazanılmış direnç oluşur. hastane enfeksiyonlarının en yaygın nedenlerinden biri olarak önemli bir halk sağlığı sorunu haline geldiğini göstermiştir. Elde ettiğimiz tüm izolatlar sırasıyla oksasilin ve sefoksitine karşı %100 tam dirence sahiptir. Çalışmamızdaki izolatlar, penisilin ve sefoksitin dahil olmak üzere β-laktam antibiyotiklerine karşı daha yüksek bir direnç ortaya koymuştur.

Bu dirence iki mekanizma neden olmaktadır. Birincisi, β-laktam halkasını hidrolize eden ve böylece β-laktamaz enziminin ekspresyonu antibiyotiği inaktif hale getirmesidir. İkincisi ise, β-laktamları bağlamak için zayıf bir eğilime (afiniteye) sahip olan ve penisilin bağlayıcı protein (PBP2A) olarak adlandırılan bir proteini kodlayan gen MecA'yı taşıyan stafilokokal SCCmec'in (Cassette kromozom mec) spesifik edinimidir. Antibiyotiğin hedefi olan endojen PBP enzimi, böylece hücre duvarının sentezinde aktif kalır ve *S. aureus'*un büyümesi ayrıca β-laktamlar tarafından inhibisyona karşı direnci nedeniyle etkilenmez. Ayrıca *S. aureus'*un özel bir sınıfı olarak kabul edilen MRSAçoklu elaç özelliğini gösteren ve MDR direncinin*S. aureus*'a karşı ortaya çıkan herhangi bir yeni antibiyotiğe hızla yanıt verme yeteneği kazandıran direnci artıran ve plazmitler ve kromozomlar üzerinde farklı direnç genleri taşıyabilen mekanizmalar geliştirmektedir. Ayrıca *S. aureus* izolatlarının benzilpenisilin ve oksasiline %100 dirençli olduğu tespit edilmiştir. Elde ettiğimiz bu sonuç diğer çalışmaların sonuçları ile uyumluydu (Al-Jourani ve ark. 2020) (Edabes 2019) (Rahimah ve Abd 2019)Nitrofurantoine karşı direnç oranı %2 iken siprofloksin, levofloksasin ve moksifloksasin tarafından temsil edilen florokinolonlara karşı direnç tespit edilememiştir. Elde ettiğimiz bu sonuç diğer birçok çalışma (Al-Mijalli 2021, Sekhar *et al.* 2014, Noor 2019) ile uyumludur. Kısa süreli antibiyotik tedavileri bakterilerin direç mekanizmalarında ciddi anlamda farklılıklar yaratmaktadır. Genellikle uzun süreli antibiyotik tedavisi bakterilerin antibiyotik direncini arttırmaktadır (Gallagher *et al.* 2018)

Çalışmamızda tespit ettiğimiz *S. aureus* izolatlarının %90'ı mecA genine sahiptir. MecA genini amplifiye etmek için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kullanılmıştır. Elde ettiğimiz sonuç ile *S. aureus* izolatları arasında mecA geninin prevalansının önceki araştırmalara göre %94,33 (Raheema and Abed 2019) ve %75,5 (Kareem *et al.* 2015) olduğu doğrulanmıştır. Ayrıca (Anwar *et al.* 2020) tarafından Irak'ın Kürdistan Bölgesi'nde bulunan Süleymaniye'de yapılan araştırmada gerçek zamanlı konvansiyonel PCR ile, *S. aureus'*un %41,6'sının MecA genine sahip olduğu belirlenmiştir. MecA taşıyan izolatlarda metasilin direncini içeren diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında, çalışmada direnç oranlarının zamanla arttığı ancak ülkeden ülkeye varyasyona göre değişiklik gösterdiği kaydedilmiştir (Mahdi *et al.* 2016). Mısır'da Nijerya'da hastanede

yatan hastalardan *S. aureus*'a ait patolojik izolatlarda metisiline dirençli *S. aureus* izolatlarının yüzdesi 2017'de %38'den %88'e ulaşmıştır (Ezeamagu *et al.* 2018).

Mevcut çalışmamızda metisiline dirençli Staphylococcus aureus'ta norA geninin prevalansı %97'dir. Bu, genin örneklerinde görülme yüzdesinin %97,5 olduğunu bulan araştırmacının (Al-Khazraji 2020) yaptığı çalışmaya karşılık gelmektedir ve bu bizim çalışmamızla tutarlıdır ve aynı zamanda Araştırmacı (Noor 2019) tarafından çeşitli kaynaklardan örnekleri toplanmış ve gen yüzdesinin yaklaşık %100 olduğu tespit edilmiştir.

Bu gen üzerinde yapılan çalışmalar, birçok araştırma ve raporun, üç tip nor pompalarının, bir tipin nor A tarafından temsil edilen hidrofilik antijenlere karşı çalıştığını ve diğer iki tipin norC olduğunu göstermiştir (Truong-Bolduc ve ark. 2006) ve levofloksasin tedavisi ile temsil edilen hidrofobik antijenleri ekstrüde ederek çalışan norB (Truong-Bolduc ve ark.2005). Çalışmada, norA genine etki eden anti-siprofloksin içeren ilaç P592 ve anti-levofloksin içeren ikinci tip P580 olmak üzere iki tip duyarlılık testi kullanıldı.

Bir grup çalışmada, norA direnç geninin Staphylococcus aureus bakterisinin temel genomunun bir parçası olduğunu onayladılar. Ayrıca, norA'nın popülasyon düzeni içinde değiştiği kanıtlanmıştır ve bu daha sonra genin farklı görünümüne ilişkin çalışmalarla kanıtlanmıştır. NorA geninin, antibiyotik direnci olmasa bile çoğu örnekte bulunan bir gen olduğunu kanıtlamak.

NorA geni, london ve GenBank'tan alınan her numunede bulunur, bu da onu her numunenin tek bir genetik varyasyon taşımasıyla çekirdek genomun bir bileşeni haline getirir. Bu bulgu, NorA'nın tüm *S. aureus* genomlarında bulunan *S. aureus* için çekirdek gen olduğu kavramını ispat etmektedir. Ancak bu olgu *S. aureus*'un belirli bir direnç özelliğine sahip olması açısından yetersizdir (Costa *et al.* 2015). Ayrıca araştırmacı (Carla 2016) tarafından yapılan bir çalışmada, inceledikleri tüm izolatlarda NorA geni bulunduğunu ve 19 izolattan 11'inin siprofloksasine duyarlı olduğunu ortaya koymuşlardır. Elde edilen bu sonuç NorA geninin temel bir gen olduğunu göstermiştir.

Genotip ve fenotipik direnç, antibiyotik direnç geni taşıyan ancak ifade etmeyen duyarlı bir suşun o antibiyotiğe dirençli kabul edilmesi anlamına gelmektedir.

Ek araştırmalar, çeşitli ilaçların, özellikle NorA Drug Efflux inhibitörlerinin, gen inaktivasyonunda ve NorA gen inaktivasyonunda bir rolü olduğunu göstermiştir. Alkaloid kimyasallarından berberin ve palmatın, doğrudan pompaya bağlanarak ve ilaç transferini bloke ederek *S. aureus*'un NorA taşıyıcı fonksiyonunu değiştirmektedir (Lomovskaya and Watkins 2001). Gastroözofageal reflü hastalığını (GERD) tedavi etmek için kullanılan bir omeprazol (PPI) ilacının, NorA çoklu ilaç akış pompası yoluyla norfloksasinin ve bu kimyasalın yeni üretilen türev analoglarının taşınmasını engellediği keşfedilmiştir (Vidaillac *et al.* 2007). Buna bağlı olarak çalışmamızda ekler kısmında sunulan sonuçlara göre diyabetik ayak hastalığı olan hastaların büyük çoğunluğuna omeprazol reçete edilmiştir (EK 5).

Elde ettiğimiz verilere göre Iraklı Diyabetik ayak enfeksiyonu bulunan bir hastadan alınan ve MecA ile NorA geni tespit edilen *S. aureus* izolatlarında kapiler bioscimit aplike sistemi ile dizileme yapılmıştır. Bunun sonucunda elde edilen Irak izolatı NCBI'de ON244243,1 kimlik numarasıyla ve 21 –jun 2022'de kaydedilmiştir.

Sonuç olarak, erkeklerde diyabetik ayak yaralanmaları kadınlara göre daha fazla olup, en yüksek sıklık 51-60 yaş grubunda tespit edilmiştir. Aldığımız örneklerden elde ettiğimiz izolatların Oksasilin ve Benzil Penisilin karşı dirençli, Siprofloksasin ve Trimetoprim, Sülfametoksazol karşı duyarlı olduğu bulunmuştur. Buna bağlı olarak metisiline dirençli *S. aureus*'un yaygınlığı hem fenotipik hem de genotipik özelliklere bağlı olarak karşımıza çıkmıştır. Ayrıca çalışmamızda *Staphylococcus spp*. türlerinin tanımlanmasında NorA geni önemli bir bulgu olarak belirtilmiştir. Vitek2 ve PCR gibi modern yöntemlerin kullanılması daha doğru sonuçlara ulaşılmasını mümkün kılmıştır.

Bundan sonra yapılacak olan çalışmalarda, Metisiline dirençli *S. aureus*'ta bulunan her türlü dışa akış pompası ve bunların antibiyotik direnciyle bağlantıları ve efflux pump genlerinin ekspresyonu hakkında çalışmalarda yapılmalıdır. Gerçek zamanlı PCR gibi diğer genetik moleküler yöntemleri kullanılması ile MecA ve NorA virülans genlerine

yönelik gen ekspresyonunu incelenmelidir. Anaerobik bakteri, virüs ve mantarların neden olduğu enfeksiyonları teşhis etmek için daha fazla çalışma yapılmalıdır. Ayrıca Irak Sağlık Bakanlığı'na DFU için virülans geninin saptanmasında genetik moleküler yöntemlerin kullanılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

Abdulrazak, A., Bitar, Z. I., Al-Shamali, A. A. & Mobasher, L. A. 2005. Bacteriological study of diabetic foot infections. Journal of Diabetes and its Complications, 19(3): 138-141.

Akil, N. & Muhlebach, M. S. 2018. Biology and management of methicillin resistant Staphylococcus aureus in cystic fibrosis. Pediatric Pulmonology, 53(S3): S64-S74.

Al-Khazraji, N. Z., Al Jubouri, A. S. & Al Ma, M. F. 2020. Detection of Antiseptic Resistant Genes and Biofilm Formation in Multidrug Resistant Staphylococcus aureus in Baghdad Hospitals. Iraqi Journal of Biotechnology, 19(2).

Al-Mijalli, S. H. S. 2021. Spectral and Antibiotic Susceptibility of Pathogens Isolated from Saudi Patients with Diabetic Foot Infections. Microbiology Research, 12(1): 16-20.

Altaee, M. F., Younis, R. W. & Kamona, Z. K. 2020. Activity of Annona Squamosa peels extracts against two pathogenic bacteria and two blood cancer cell lines. The Iraqi Journal of Agricultural Science, 51(6): 1496-1503.

Ananthanarayan, R. 2006. Ananthanarayan and Paniker's textbook of microbiology. Orient Blackswan.

Anwar, K., Hussein, D. & Salih, J. 2020. Antimicrobial susceptibility testing and phenotypic detection of MRSA isolated from diabetic foot infection. International Journal of General Medicine, 13: 1349.

Arêde, P., Milheiriço, C., de Lencastre, H. & Oliveira, D. C. 2012. The anti-repressor MecR2 promotes the proteolysis of the mecA repressor and enables optimal expression of β-lactam resistance in MRSA. PLoS Pathogens, 8(7): e1002816.

Atlas, D. 2015. International diabetes federation. IDF Diabetes Atlas, 7th edn. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 33.

Benson, H. J. 2002. Microbiological Applications Laboratory manual in General M icrobiology. 8t h ed. M c G raw- Hill. New York.

Bessa, A. S., Ragab, A. M., Nassra, R. A., Piñero, D. P. & Shaheen, M. S. 2018. Expression levels of aldose reductase enzyme, vascular endothelial growth factor, and intercellular adhesion molecule-1 in the anterior lens capsule of diabetic cataract patients. Journal of Cataract & Refractive Surgery, 44(12): 1431-1435.

Bitrus, A. A., Peter, O. M., Abbas, M. A. & Goni, M. D. 2018. Staphylococcus aureus: a review of antimicrobial resistance mechanisms. Veterinary Sciences: Research and Reviews, 4(2): 43-54.

Blanco, P., Hernando-Amado, S., Reales-Calderon, J. A., Corona, F., Lira, F., Alcalde-Rico, M. & Martinez, J. L. 2016. Bacterial multidrug efflux pumps: much more than antibiotic resistance determinants. Microorganisms, 4(1): 14.

Brisse, S., Stefani, S., Verhoef, J., Van Belkum, A., Vandamme, P. & Goessens, W. 2002. Comparative evaluation of the BD Phoenix and VITEK 2 automated instruments for identification of isolates of the Burkholderia cepacia complex. Journal of Clinical Microbiology, 40(5): 1743-1748.

Brooks, G. F., Carroll, K. C., Butel, J. S. and Morse, S. A. 2007. Jawetz, Melnick and Adelbergs Medical Inc. New York, 224-232.

Charles, P. G., Uçkay, I., Kressmann, B., Emonet, S. & Lipsky, B. A. 2015. The role of anaerobes in diabetic foot infections. Anaerobe, 34: 8-13.

Costa, S. S., Sobkowiak, B., Parreira, R., Edgeworth, J. D., Viveiros, M., Clark, T. G. & Couto, I. 2019. Genetic diversity of norA, coding for a main efflux pump of Staphylococcus aureus. Frontiers in Genetics, 9: 710.

Costa, S. S., Viveiros, M., Amaral, L. & Couto, I. 2013. Multidrug efflux pumps in Staphylococcus aureus: an update. The Open Microbiology Journal, 7: 59.

Costa, S. S., Viveiros, M., Rosato, A. E., Melo-Cristino, J. & Couto, I. 2015. Impact of efflux in the development of multidrug resistance phenotypes in Staphylococcus aureus. BMC Microbiology, 15(1): 1-16.

De Freitas Almeida, G. M. & Sundberg, L. R. 2020. The forgotten tale of Brazilian phage therapy. The Lancet Infectious Diseases, 20(5): e90-e101.

De Jong, N. W., Van Kessel, K. P. & Van Strijp, J. A. 2019. Immune evasion by Staphylococcus aureus. Microbiology Spectrum, 7(2): 7-2.

Diaz, R., Ramalheira, E., Afreixo, V. & Gago, B. 2016. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus carrying the new mecC gene—a meta-analysis. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 84(2): 135-140.

Diegelmann, R. F. & Evans, M. C. 2004. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. Front Biosci, 9(1): 283-289.

Drinka, P., Bonham, P. & Crnich, C. J. 2012. Swab culture of purulent skin infection to detect infection or colonization with antibiotic-resistant bacteria. Journal of the American Medical Directors Association, 13(1): 75-79.

Du, D., Wang-Kan, X., Neuberger, A., Van Veen, H. W., Pos, K. M., Piddock, L. J. & Luisi, B. F. 2018. Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. Nature Reviews Microbiology, 16(9): 523-539.

Dursun, A., Özsoylu, S., Kılıç, H., Kılıç, A. U. & Akyıldız, B. N. 2018. Çocuk Yoğun Bakım Ünitesinde Yatan Hastalardan İzole Edilen Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae ve Acinetobacter baumannii Suşlarının Antibiyotik Duyarlılıkları. Turkish Journal of Intensive Care, 16(3).

Ezeamagu, C., Imanatue, I., Dosunmu, M., Odeseye, A., Baysah, G., Aina, D. & Mensah-Agyei, G. 2018. Detection of methicillin resistant and toxin-associated genes in Staphylococcus aureus. Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences, 7(1): 92-97.

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

Gagetti, P., Rosato, R. R. & Rosato, A. E. 2021. Staphylococcus pseudintermedius's PBP4 Is Directly Associated with the Dissociated Oxacillin and Cefoxitin Phenotype. Antibiotics, 10(11): 1299.

Gallagher, J. C., Justo, J. A., Chahine, E. B., Bookstaver, P. B., Scheetz, M., Suda, K. J. & MacDougall, C. 2018. Preventing the post-antibiotic era by training future pharmacists as antimicrobial stewards. American Journal of Pharmaceutical Education, 82(6).

Gnanamani, A., Hariharan, P. & Paul-Satyaseela, M. 2017. Staphylococcus aureus: Overview of bacteriology, clinical diseases, epidemiology, antibiotic resistance and therapeutic approach. Frontiers in Staphylococcus aureus, 4(28): 10-5772.

Grumann, D., Nübel, U. & Bröker, B. M. 2014. Staphylococcus aureus toxins–their functions and genetics. Infection, Genetics and Evolution, 21: 583-592.

Guariguata, L., Whiting, D. R., Hambleton, I., Beagley, J., Linnenkamp, U. & Shaw, J. E. 2014. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. Diabetes Research and Clinical Practice, 103(2): 137-149.

Harding, J. L., Pavkov, M. E., Magliano, D. J., Shaw, J. E. & Gregg, E. W. 2019. Global trends in diabetes complications: a review of current evidence. Diabetologia, 62(1): 3-16.

Harvey, R. A. 2007. Microbiology 2E. Lippincott Williams and Wilkins.

Hsia, D. S., Larrivee, S., Cefalu, W. T. & Johnson, W. D. 2015. Impact of lowering BMI cut points as recommended in the revised American Diabetes Association's Standards of Medical Care in Diabetes—2015 on diabetes screening in Asian Americans. Diabetes care, 38(11): 2166-2168.

IBM Corp. 2021. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 28.0. Armonk, NY: IBM Corp.

Jain, S. K. & Barman, R. 2017. Bacteriological profile of diabetic foot ulcer with special reference to drug-resistant strains in a tertiary care center in North-East India. Indian Journal of Endocrinology and Metabolism, 21(5): 688.

Johnson, A. G., Ziegler, R. J., Lukasewyez, O. A. and Hawley, L. B. 2002. Board review series microbiology and immunology. 4th ed., Lippincott Williams and Wikins, a walters Kluwe com., U. S. A., 88.

Jousselin, A., Manzano, C., Biette, A., Reed, P., Pinho, M. G., Rosato, A. E. & Renzoni, A. 2015. The Staphylococcus aureus chaperone PrsA is a new auxiliary factor of oxacillin resistance affecting penicillin-binding protein 2A. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 60(3): 1656-1666.

Kaatz, G. W. & Seo, S. M. 2004. Effect of substrate exposure and other growth condition manipulations on norA expression. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 54(2): 364-369.

Kareem, S. M., Al-Jubori, S. S. & Ali, M. R. 2015. Prevalence of erm genes among methicillin resistant Staphylococcus aureus MRSA Iraqi isolates. Int J Curr Microbiol Appl Sci, 4(5): 575-585.

Kesharwani, R. K., Misra, K. & Singh, D. B. 2019. Perspectives and challenges of tropical medicinal herbs and modern drug discovery in the current scenario. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 12(1): 1.

Kim, C., Mwangi, M., Chung, M., Milheirço, C., de Lencastre, H. & Tomasz, A. 2013. The mechanism of heterogeneous beta-lactam resistance in MRSA: key role of the stringent stress response. PLoS One, 8(12): e82814.

Kinney, K. J., Tran, P. M., Gibson-Corley, K. N., Forsythe, A. N., Kulhankova, K. & Salgado-Pabón, W. 2019. Staphylococcal enterotoxin C promotes Staphylococcus aureus infective endocarditis independent of superantigen activity. bioRxiv.

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

Latt, T. S., Aye, T. T., Sandar, E., Win, Y. Y., Wint, K. T. & Khin, E. T. 2019. Traditional medicine and diabetes care in Myanmar. Journal of Social Health and Diabetes, 7(01): 016-021.

Le, K. Y. & Otto, M. 2015. Quorum-sensing regulation in staphylococci—an overview. Frontiers in Microbiology, 6: 1174.

Lehrke, M. & Marx, N. 2017. Diabetes mellitus and heart failure. The American Journal of Cardiology, 120(1): S37-S47.

Lei, M. G. & Lee, C. Y. 2018. Repression of capsule production by XdrA and CodY in Staphylococcus aureus. Journal of Bacteriology, 200(18): e00203-18.

Li, X., Wu, Y., Zhang, L., Cao, Y., Li, Y., Li, J. & Wu, G. 2014. Comparison of three common DNA concentration measurement methods. Analytical Biochemistry, 451: 18-24.

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

Liu, J., Chen, D., Peters, B. M., Li, L., Li, B., Xu, Z. & Shirliff, M. E. 2016. Staphylococcal chromosomal cassettes mec (SCCmec): A mobile genetic element in methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Microbial Pathogenesis, 101: 56-67.

Lomovskaya, O. & Watkins, W. 2001. Inhibition of efflux pumps as a novel approach to combat drug resistance in bacteria. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 3(2): 225-236.

MacFaddin, J. 2000. Deoxyribonuclease (DNase) and thermonuclease (Tnase) tests. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria, 3rd ed. by MacFaddin, JF, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA, 136-159.

Mahasenan, K. V., Molina, R., Bouley, R., Batuecas, M. T., Fisher, J. F., Hermoso, J. A. & Mobashery, S. 2017. Conformational dynamics in penicillin-binding protein 2a of methicillin-resistant Staphylococcus aureus, allosteric communication network

and enablement of catalysis. Journal of the American Chemical Society, 139(5): 2102-2110.

Mahdi, W. K., Noha, A. H., Mona, A. E., Safaa, S. H. & Sayed, F. A. 2016. Molecular typing of methicillin resistant Staphylococcus aureus colonizing Egyptian healthcare workers and patients. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci, 5(6): 687-98

Mahmoud, H. M., Ali, S. A. A. A. & Abdul Qadir, D. 2014. Prevalence of bacterial types in Wagner grade three of diabetic foot ulcer. Iraqi Journal of Science, 55(3B): 1232-1235.

Malachowa, N., Whitney, A. R., Kobayashi, S. D., Sturdevant, D. E., Kennedy, A. D., Braughton, K. R. & DeLeo, F. R. 2011. Global changes in Staphylococcus aureus gene expression in human blood. PloS One, 6(4): e18617.

Marquez, B. 2005. Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. Biochimie, 87(12): 1137-1147.

Matsuo, M., Yamamoto, N., Hishinuma, T. & Hiramatsu, K. 2019. Identification of a novel gene associated with high-level β-lactam resistance in heterogeneous vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus strain Mu3 and methicillin-resistant S. aureus strain N315. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 63(2): e00712-18.

Milheiriço, C., de Lencastre, H. & Tomasz, A. 2017. Full-genome sequencing identifies in the genetic background several determinants that modulate the resistance phenotype in methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains carrying the novel mecC gene. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 61(3): e02500-16.

Mottola, C. 2017. Virulence characterization and antimicrobial resistance of major bacterial genera from diabetic foot infections (Doctoral dissertation, Universidade de Lisboa (Portugal)).

Mottola, C., Matias, C. S., Mendes, J. J., Melo-Cristino, J., Tavares, L., Cavaco-Silva, P. & Oliveira, M. 2016. Susceptibility patterns of Staphylococcus aureus biofilms in diabetic foot infections. BMC Microbiology, 16(1): 1-9.

Mukhtar, A. A., Abd Alfadil, N. A., Mohamed, M. S., Altayb, H. N., Elzak, S. G. & Hassan, M. S. 2018. Identification of Proteus mirabilis on banknotes using 16s rRNA gene in Khartoum State. Sudan Journal of Medical Sciences, 13(3): 175-186.

Newsom, S. W. B. 2008. Ogston's coccus. Journal of Hospital Infection, 70(4): 369-372.

Neyfakh, A. A., Borsch, C. M. & Kaatz, G. W. 1993. Fluoroquinolone resistance protein NorA of Staphylococcus aureus is a multidrug efflux transporter. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 37(1): 128-129.

Nhan, T. X., Leclercq, R. & Cattoir, V. 2011. Prevalence of toxin genes in consecutive clinical isolates of Staphylococcus aureus and clinical impact. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 30(6): 719-725.

Noguchi, N., Okada, H., Narui, K. & Sasatsu, M. 2004. Comparison of the nucleotide sequence and expression of norA genes and microbial susceptibility in 21 strains of Staphylococcus aureus. Microbial Drug Resistance, 10(3): 197-203.

Noor, J. A. 2019. "Bacteriological and Molecular Study of Staphylococcus aureus Isolated from Different Clinical Sources" a thesis submitted to the council of the college of education for pure Sciences/ Ibn Al-Haitham University of Baghdad.

Nouaille, S., Morello, E., Cortez-Peres, N., Le Loir, Y., Commissaire, J., Gratadoux, J. J. & Langella, P. 2006. Complementation of the Lactococcus lactis secretion machinery with Bacillus subtilis SecDF improves secretion of staphylococcal nuclease. Applied and Environmental Microbiology, 72(3): 2272-2279.

Oliveira, D. C. & Lencastre, H. D. 2002. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 46(7): 2155-2161.

Paterson, G. K. 2020. Genomic epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus sciuri carrying a SCCmec-mecC hybrid element. Infection, Genetics and Evolution, 79: 104148.

Pickwell, K. M., Siersma, V. D., Kars, M., Holstein, P. E., Schaper, N. C. & Eurodiale Consortium. 2013. Diabetic foot disease: impact of ulcer location on ulcer healing. Diabetes/Metabolism Research and Reviews, 29(5): 377-383.

Poole, K. 2007. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. Annals of Medicine, 39(3): 162-176.

Pourmand, M. R., Yousefi, M., Salami, S. A. & Amini, M. 2014. Evaluation of expression of NorA efflux pump in ciprofloxacin resistant Staphylococcus aureus against hexahydroquinoline derivative by real-time PCR. Acta Medica Iranica, 424-429.

Raghav, A., Khan, Z. A., Labala, R. K., Ahmad, J., Noor, S. & Mishra, B. K. 2018. Financial burden of diabetic foot ulcers to world: a progressive topic to discuss always. Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism, 9(1): 29-31.

Raheema, R. H. & Abed, K. A. 2019. Molecular identification of Virulence genes of Staphylococcus aureus isolated from different clinical isolates. Indian Journal of Public Health Research & Development, 10(2).

Rahim, K., Saleha, S., Zhu, X., Huo, L., Basit, A. & Franco, O. L. 2017. Bacterial contribution in chronicity of wounds. Microbial Ecology, 73(3): 710-721.

Rasheed, H. T., Luti, K. J. & Alaubydi, M. A. 2020. Purification and Characterizatıon of Bacteriocin From Lactobacillus Acidophilus HT1 And İts Applicatıon İn A Cream Formula For The Treatment Of Some Skin Pathoges. The Iraqi Journal of Agricultural Science, 51(5): 1381-1393.

Rathur, H. M. & Boulton, A. J. 2007. The diabetic foot. Clinics in Dermatology, 25(1): 109-120.

Reygaert, W. C. 2018. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. AIMS Microbiology, 4(3): 482.

Riedel, S., Morse, S. A., Mietzner, T. A. & Miller, S. 2022. Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick & Adelberg-28. McGraw Hill Brasil.

Ruiz, R., Barbosa, V. T., Lôbo, T. D. L. G. F., Silva, R. A. D. S., Calumby, R. J. N., Vieira, S. P. & Almeida, L. M. D. 2021. Staphylococcal cassette chromosome mec elements from Staphylococcus intermedius group (SIG) isolates from dogs in a center for veterinary diagnostics in Brazil. Ciência Rural, 51.

Sekhar, S. M., Vyas, N., Unnikrishnan, M. K., Rodrigues, G. S. & Mukhopadhyay, C. 2014. Antimicrobial susceptibility pattern in diabetic foot ulcer: a pilot study. Annals of Medical and Health Sciences Research, 4(5): 742-745.

Shahini Shams-Abadi, M., Halaji, M., Hoseini-Alfatemi, S. M., Gholipour, A., Mojtahedi, A. & Sedigh Ebrahim-Saraie, H. 2018. Epidemiology of toxic shock syndrome toxin-1 harboring Staphylococcus aureus obtained from clinical samples in Iran: a systematic review and meta-analysis. Ann Ig, 30(5).

Sibbald, M. J. J. B., Ziebandt, A. K., Engelmann, S., Hecker, M., De Jong, A., Harmsen, H. J. M. & Van Dijl, J. M. 2006. Mapping the Pathways to

StaphylococcalPathogenesis by Comparative Secretomics. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 70(3): 755-788.

Solis-Herrera, C., Triplitt, C., Reasner, C., DeFronzo, R. A. & Cersosimo, E. 2018. Classification of diabetes mellitus. Endotext [Internet].

Spichler, A., Hurwitz, B. L., Armstrong, D. G. & Lipsky, B. A. 2015. Microbiology of diabetic foot infections: from Louis Pasteur to 'crime scene investigation'. BMC Medicine, 13(1): 1-13.

Srinivasan, R., Karaoz, U., Volegova, M., MacKichan, J., Kato-Maeda, M., Miller, S. & Lynch, S. V. 2015. Use of 16S rRNA gene for identification of a broad range of clinically relevant bacterial pathogens. PloS One, 10(2): e0117617.

Stefani, S., Chung, D. R., Lindsay, J. A., Friedrich, A. W., Kearns, A. M., Westh, H. & MacKenzie, F. M. 2012. Meticillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. International Journal of Antimicrobial Agents, 39(4): 273-282.

Sun, J., Deng, Z. & Yan, A. 2014. Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. Biochemical and Biophysical Research Communications, 453(2): 254-267.

Surewaard, B. G. J., De Haas, C. J. C., Vervoort, F., Rigby, K. M., DeLeo, F. R., Otto, M. & Nijland, R. 2013. Staphylococcal alpha- phenol soluble modulins contribute to neutrophil lysis after phagocytosis. Cellular Microbiology, 15(8): 1427-1437.

Talaro, K., Chess, B., Wiersema, D. S. & Sen, P. 2013. Foundations in Microbiology, 2012. McGraw-Hill.

Tille, P. 2015. Bailey & Scott's diagnostic microbiology-E-Book. Elsevier Health Sciences.

Truong-Bolduc, Q. C., Dunman, P. M., Strahilevitz, J., Projan, S. J. & Hooper, D. C. 2005. MgrA is a multiple regulator of two new efflux pumps in Staphylococcus aureus. Journal of Bacteriology, 187(7): 2395-2405.

Truong-Bolduc, Q. C., Strahilevitz, J. & Hooper, D. C. 2006. NorC, a new efflux pump regulated by MgrA of Staphylococcus aureus. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 50(3): 1104-1107.

Tshikhudo, P., Nnzeru, R., Ntushelo, K. & Mudau, F. 2013. Bacterial species identification getting easier. African Journal of Biotechnology, 12(41).

Vandenesch, F., Lina, G. & Henry, T. 2012. Staphylococcus aureus hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors?. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2: 12.

Vázquez-Sánchez, D., Cabo, M. L., Ibusquiza, P. S. & Rodríguez-Herrera, J. J. 2014. Biofilm-forming ability and resistance to industrial disinfectants of Staphylococcus aureus isolated from fishery products. Food Control, 39: 8-16.

Vidaillac, C., Guillon, J., Arpin, C., Forfar-Bares, I., Ba, B. B., Grellet, J. & Quentin, C. 2007. Synthesis of omeprazole analogues and evaluation of these as potential inhibitors of the multidrug efflux pump NorA of Staphylococcus aureus. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 51(3): 831-838.

Vilvanathan, S. 2021. Penicillins, Cephalosporins, and Other β-Lactam Antibiotics. In Introduction to Basics of Pharmacology and Toxicology (pp. 821-834). Springer, Singapore.

Wagner, F. W. 1987. The diabetic foot. Orthopedics, 10(1): 163-172.

Wanger, A., Chavez, V., Huang, R., Wahed, A., Dasgupta, A. & Actor, J. K. 2017. Microbiology and molecular diagnosis in pathology: a comprehensive review for board preparation, certification and clinical practice.

Webber, M. A. & Piddock, L. J. V. 2003. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 51(1): 9-11.

Werckenthin, C., Cardoso, M., Martel, J. L. & Schwarz, S. 2001. Antimicrobial resistance in staphylococci from animals with particular reference to bovine Staphylococcus aureus, porcine Staphylococcus hyicus, and canine Staphylococcus intermedius. Veterinary Research, 32(3-4): 341-362.

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

Wijesundara, W. M. D. A., Rajapakse, R. G. S. C., Jayatilake, J. A. M. A. & Jayatilake, J. A. M. S. 2019. A preliminary study of mecA gene expression and methicillin resistance in staphylococci isolated from the human oral cavity. Sri Lankan Journal of Infectious Diseases, 9(1).

Wilson, G. J., Seo, K. S., Cartwright, R. A., Connelley, T., Chuang-Smith, O. N., Merriman, J. A. & Fitzgerald, J. R. 2011. A novel core genome-encoded superantigen contributes to lethality of community-associated MRSA necrotizing pneumonia. PLoS Pathogens, 7(10): e1002271.

Woo, P. C., Ng, K. H., Lau, S. K., Yip, K. T., Fung, A. M., Leung, K. W. & Yuen, K. Y. 2003. Usefulness of the MicroSeq 500 16S ribosomal DNA-based bacterial identification system for identification of clinically significant bacterial isolates with ambiguous biochemical profiles. Journal of Clinical Microbiology, 41(5): 1996-2001.

Xie, X., Bao, Y., Ni, L., Liu, D., Niu, S., Lin, H. & Luo, Z. 2017. Bacterial profile and antibiotic resistance in patients with diabetic foot ulcer in Guangzhou, Southern China: focus on the differences among different Wagner's grades, IDSA/IWGDF grades, and ulcer types. International Journal of Endocrinology, 2017.

Xiong, Y. Q., Willard, J., Yeaman, M. R., Cheung, A. L. & Bayer, A. S. 2006. Regulation of Staphylococcus aureus α-toxin gene (hla) expression by agr, sarA and sae in vitro and in experimental infective endocarditis. The Journal of Infectious Diseases, 194(9): 1267-1275.

Yazdanpanah, L., Nasiri, M. & Adarvishi, S. 2015. Literature review on the management of diabetic foot ulcer. World Journal of Diabetes, 6(1): 37.

EKLER

EK 1. Laboratuvar ekipmanları

EK 2. Bazı vakaların resimleri

EK 3. *Staphylococcus aureus* izolatlarının Vitek 2 Compact kullanılarak teşhisi

EK 4. Vitek 2 Compact kullanılarak hastalarda *Staphylococcus aureus* izolatlarının duyarlılık antibiyotiklerinin tespiti

EK 5. Al-Kindy Hastanesi/Bağdad'daki mevcut çalışmada patolojik durumlar için kullanılan tedavilerin model listesi

EK 6. Al-Kindy Hastanesi / Bağdat'ta çalışmak için başlangıç onayı ve Al- Nahrain Üniversitesi/Bağdat'ta iş bitiş onayı

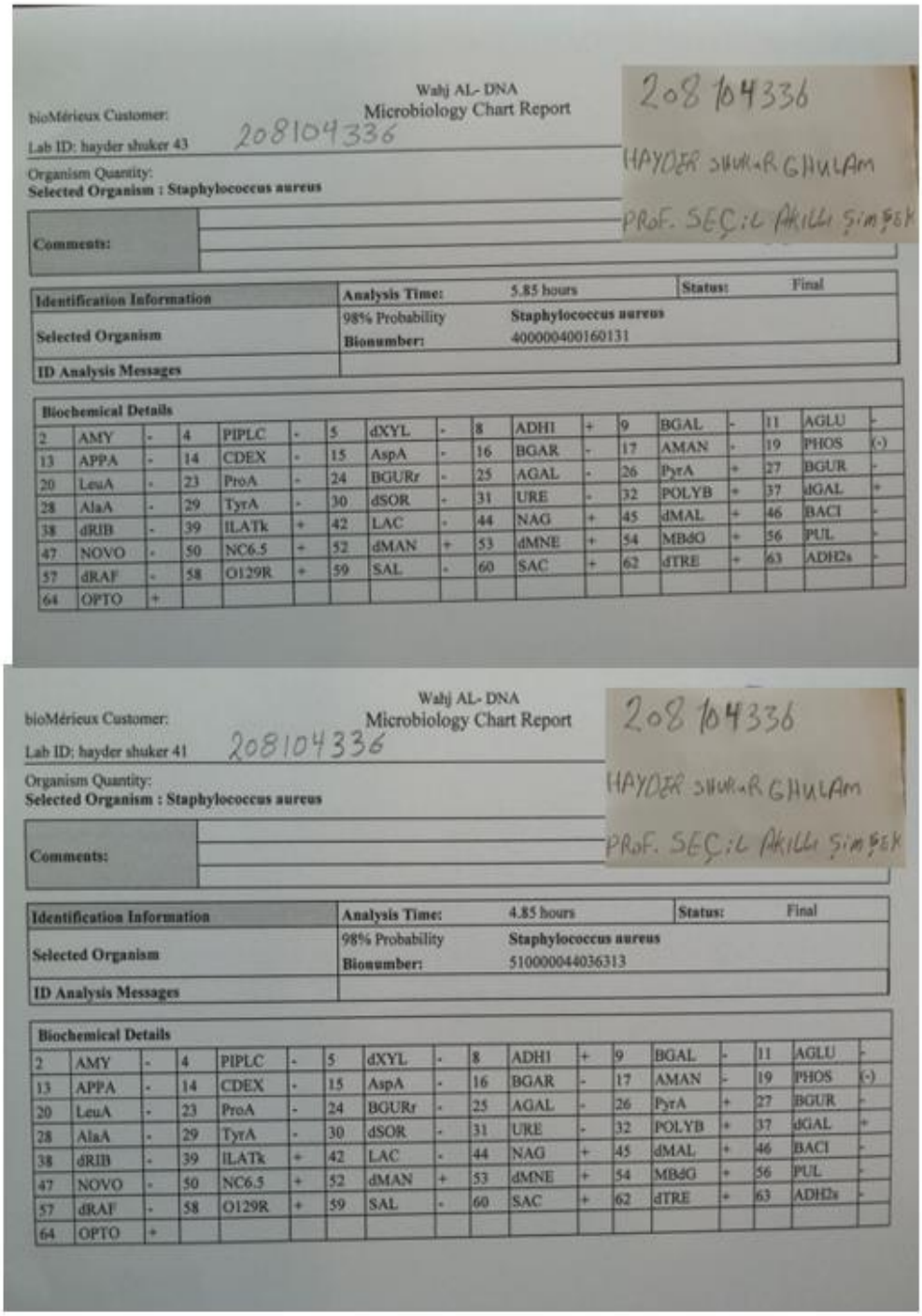
EK 1. Laboratuvar ekipmanları



EK 2. Bazı vakaların resimleri



EK 3. *Staphylococcus aureus* izolatlarının Vitek 2 Compact kullanılarak teşhisi



Wahj AL- DNA
Microbiology Chart Report

bioMérieux Customer:
Lab ID: hayder shuker 43 208104336
Organism Quantity:
Selected Organism : Staphylococcus aureus

208104336
HAYDER SHUKUR GHULAM
PROF. SEÇİL AKKOÇ ŞİMŞEK

Comments:

Identification Information	Analysis Time:	5.85 hours	Status:	Final
Selected Organism	98% Probability	Staphylococcus aureus		
	Bionumber:	400000400160131		
ID Analysis Messages				

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	BGURr	-	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	NC6.5	+	52	dMAN	+	53	dMNE	+	54	MBdG	+	56	PUL	-
57	dRAF	-	58	O129R	+	59	SAL	-	60	SAC	+	62	dTRE	+	63	ADH2s	-
64	OPTO	+																

Wahj AL- DNA
Microbiology Chart Report

bioMérieux Customer:
Lab ID: hayder shuker 41 208104336
Organism Quantity:
Selected Organism : Staphylococcus aureus

208104336
HAYDER SHUKUR GHULAM
PROF. SEÇİL AKKOÇ ŞİMŞEK

Comments:

Identification Information	Analysis Time:	4.85 hours	Status:	Final
Selected Organism	98% Probability	Staphylococcus aureus		
	Bionumber:	510000044036313		
ID Analysis Messages				

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	BGURr	-	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	NC6.5	+	52	dMAN	+	53	dMNE	+	54	MBdG	+	56	PUL	-
57	dRAF	-	58	O129R	+	59	SAL	-	60	SAC	+	62	dTRE	+	63	ADH2s	-
64	OPTO	+																

EK 4. Vitek 2 Compact kullanılarak hastalarda *Staphylococcus aureus* izolatlarının duyarlılık antibiyotiklerinin tespiti



Wahj AL-DNA
Microbiology Chart Report
Printed January 5, 2022 12:26:37 AM CST

Patient Name:
Location:
Lab ID: HAYDER SHUKUR 19 208104336
Organism Quantity:
Selected Organism : Staphylococcus aureus
Source:
Comments:

208104336
HAYDER SHUKUR GHULAM
PROF. SEÇİL AKKOL SİMŞEK

Susceptibility Information	Analysis Time: 12.53 hours				Status: Final
Antimicrobial	**MIC**	**Interpretation**	**Antimicrobial**	**MIC**	**Interpretation**
Cefoxitin Screen	POS	+	Teicoplanin	>= 32	R
Benzylpenicillin	>= 0.5	R	Vancomycin	<= 32	R
Oxacillin	>= 4	R	Tetracycline	2	*R
Gentamicin	<= 0.5	S	Tigecycline	<= 0.12	S
Tobramycin	<= 1	S	Fosfomycin		
Levofloxacin	<= 0.12	S	Nitrofurantoin	32	S
Moxifloxacin	<= 0.25	S	Fusidic Acid	2	R
Inducible Clindamycin Resistance	NEG	-	Mupirocin		
Erythromycin	<= 0.25	S	Rifampicin	1	*R
Clindamycin	4	R	Trimethoprim/ Sulfamethoxazole	<= 10	S
Linezolid	2	S			

*= AES modified **= User modified

AES Findings
Confidence: Consistent

Wahj AL-DNA
Microbiology Chart Report
Printed January 5, 2022 12:56:17 AM CST

Patient Name:
Location:
Lab ID: HAYDER SHUKUR 6 208104336
Organism Quantity:
Selected Organism : Staphylococcus aureus
Source:
Comments:

208104336
HAYDER SHUKUR GHULAM
PROF. SEÇİL AKKOL SİMŞEK

Susceptibility Information	Analysis Time: 11.92 hours				Status: Final
Antimicrobial	**MIC**	**Interpretation**	**Antimicrobial**	**MIC**	**Interpretation**
Cefoxitin Screen	POS	+	Teicoplanin	<= 0.5	S
Benzylpenicillin	0.25	R	Vancomycin	1	S
Oxacillin	>= 4	R	Tetracycline	<= 1	S
Gentamicin	<= 0.5	S	Tigecycline	<= 0.12	S
Tobramycin	<= 1	S	Fosfomycin		
Levofloxacin	<= 0.12	S	Nitrofurantoin	<= 16	S
Moxifloxacin	<= 0.25	S	Fusidic Acid	<= 0.5	S
Inducible Clindamycin Resistance	NEG	-	Mupirocin		
Erythromycin	<= 0.25	S	Rifampicin	<= 0.5	S
Clindamycin	<= 0.25	S	Trimethoprim/ Sulfamethoxazole	<= 10	S
Linezolid	1	S			

AES Findings
Confidence: Consistent

Wahj AL-DNA
Microbiology Chart Report
Printed January 5, 2022 3:25:45 AM CST

Patient Name:
Location:
Lab ID: HAYDER SHUKUR 29 208104336
Organism Quantity:
Selected Organism : Staphylococcus aureus
Source:
Comments:

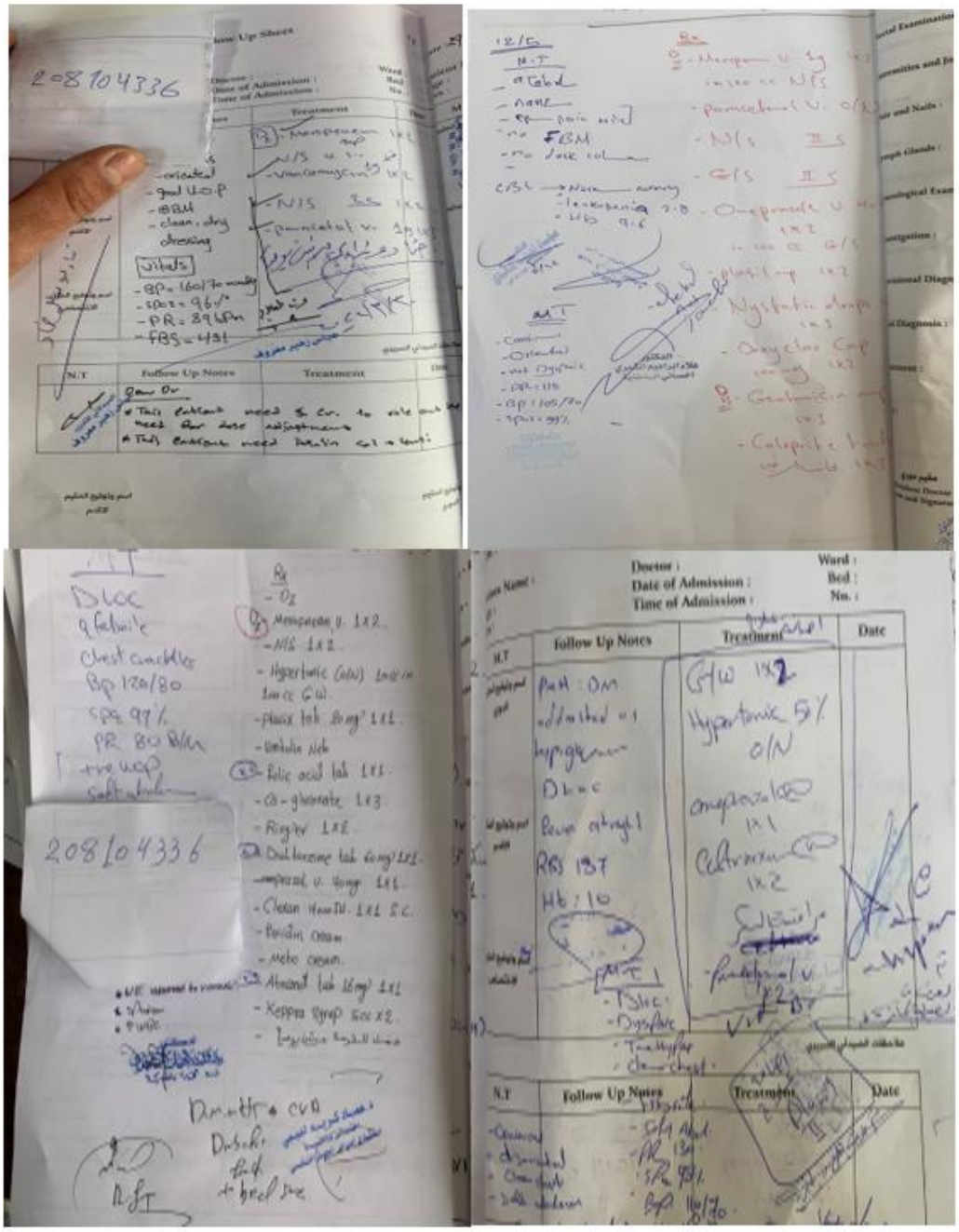
208104336
HAYDER SHUKUR GHULAM
PROF. SEÇİL AKKOL SİMŞEK

Susceptibility Information	Analysis Time: 15.23 hours				Status: Final
Antimicrobial	**MIC**	**Interpretation**	**Antimicrobial**	**MIC**	**Interpretation**
Cefoxitin Screen	POS	+	Teicoplanin	>= 32	R
Benzylpenicillin	>= 0.5	R	Vancomycin	>= 32	R
Oxacillin	>= 4	R	Tetracycline	2	*R
Gentamicin	<= 0.5	S	Tigecycline	<= 0.12	S
Tobramycin	<= 1	S	Fosfomycin		
Levofloxacin	<= 0.12	S	Nitrofurantoin	128*	R
Moxifloxacin	<= 0.25	S	Fusidic Acid	4	R
Inducible Clindamycin Resistance	NEG	-	Mupirocin		
Erythromycin	<= 0.25	S	Rifampicin	<= 0.5	S
Clindamycin	4	R	Trimethoprim/ Sulfamethoxazole	<= 10	S

*= AES modified **= User modified

AES Findings
Confidence: Consistent with correction

EK 5. Al-Kindy Hastanesi/Bağdad'daki mevcut çalışmada patolojik durumlar için kullanılan tedavilerin model listesi



EK 6. Al-Kindy Hastanesi / Bağdat'ta çalışmak için başlangıç onayı ve Al- Nahrain Üniversitesi/Bağdat'ta iş bitiş onayı



جامعة النهرين
مركز بحوث التقنيات الاحيائية

استثمار الطاقة النظيفة طريقنا نحو التنمية المستدامة)

الى/ جامعة جانكيري التركية

م/ تاييد انجاز عمل

تحية طيبة...

نؤيد بأن السيد(حيدر شكر غلام) طالب الماجستر قد انهى الاعمال المتعلقة بمتطلبات بحثه
DetectionVirulence Factors staphylo coccus aureus didabetic
foot infection patients) تحت اشراف الاستاذ الدكتورة (نجوى شهاب احمد) وبناءً
على طلبها وتأييدها بالانجاز تم تزويد الطالب بهذا التأييد .

للتفضل بالاطلاع .. مع التقدير

جامعة النهرين
مركز بحوث
التقنيات الا...

الاستاذ الدكتور
محمد محمود فرحان
مدير عام المركز/ وكالة
١٨ / نيسان/ ٢٠٢٢

LOGO

MÜHÜR
İMZA

Bağdat'a Hizmet Etmek Bizim İçin bir Onurdur.

Al Kindi Eğitim Hastanesine
Görev Kolaylaştırma

Selamlar,

(Detection virulence factors Staphylococcus aureus in diabetic foot infection patients) -
Diyabetik ayak enfeksiyonu hastalarında Staphylococcus aureus virülans faktörlerinin saptanması-
etkisli araştırmayı hastanenizde yapmak üzere,
Türkiye Çankırı Üniversitesi onayına sayılarak,
Bakanlığımız Genel Müdürlüğünün 28.12.2020 tarih ve 13120 sayılı olurl emirleri kapsamında,
Sayın Haydar Shukr Ghulam'ın 02/11/2021 tarihli talebi üzerine araştırma izni içeren yazıdır.

Sağlık Bakanlığına herhangi bir mali külfet yüklenmesi, kontrolsüz ve çalışma bağlamına göre
hastanenizi dışında analiz için laboratuvar numunesi alınmasına izin vermesiyle kayıtlıyla
Hastanenizde hastaların rutin tetkikleri arasında ve tetkikler için laboratuvar numunesi istenirken,
görevini kolaylaştırmak için gerekli olanı almak ve laboratuvar tetkiklerinin sonuçlarını sandbine
ulaştırmasında sıkıntı olmadığını ve araştırmanın kolaylıkla yapabilmesini saygıyla arzederiz.
Saygılarımızla...

Doktor	Danışman Doktor
Muhammed Cihad Cevad	İman Ahmed Al-Ruhaym
A/Genel Müdür	Ala/Danışman Doktor
07/11/2021	Eğitim ve İnsan Gelişimi Merkezi Müdürü

MÜHÜR

Değişen: - Eğitim ve İnsan Gelişimi Merkezi/Araştırma ve Bilgi Yönetimi Bölümü/Araştırma Yönetim Birimi/
Önemli kolaylaştırma Dosyası
* Sağlık Bakanlığı yönerge gönderiyor Personel ve Kaynak Geliştirme Dairesi Idari, Mali ve Hukuk Daireleri'nin
24/12/2020 tarih ve 12743 sayılı bakanlık kararına göre Sağlık Bakanlığı'na bağlı olma görevini kolaylaştırmak
üzerine Sözleşmenin sözleşmesinin içerisi 65621 sayı ve 13/10/2021 tarihli Mali Planlama Bölümüne...

TERCÜMAN BEYANI

Tercüme edilmek üzere bana verilen Arapça dilindeki belgeyi Türkçe diline tam ve doğru olarak çevirdiğini
beyan ederim.

YEMİNLİ TERCÜMAN

ALİ UĞUR 2026701702

[Kurucular Mah. Şehit] K. Ordg. Mustafa Yusuf Sk. No: 1/6 Merkez [ÇANKIRI]

[İMZA]

Bu tercümenin yukarıdaki adreste ikamet noterliğimiz yeminli tercümanı ALİ UĞUR tarafından Arapça dilinden
Türkçe diline tercüme edildiğini onaylarım.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Hayder Shukur Ghulam GHULAM

Eğitim

Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2019-Halen
Lisans	Al- Mustansiriyah Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2000-2004