ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KLİNİK VE GIDA ORJİNLİ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*'TA BİYOFİLM KODLAMA GENİNİN MOLEKÜLER TESPİTİ

Ahmed Mahmood Hussein HUSSEIN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2022

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Ahmed Mahmood Hussein HUSSEIN tarafından hazırlanan **"Klinik ve Gıda Orjinli *Staphylococcus aureus*'ta Biyofilm Kodlama Geninin Moleküler Tespiti"** adlı tez çalışması 26/10/2022 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 : Dr. Öğr. Üyesi Marwa Hameed ALKHAFAJI

Jüri Üyeleri :

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

Üye **:** Prof. Dr. Aysel SARI
Fen Fakültesi, Kimya Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi Yıldız Teknik Üniversitesi

Üye **:** Dr. Öğr. Üyesi İlkay ÇORAK ÖCAL
Biyoloji Anabilim Dalı
Yıldız Teknik 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 "**Klinik ve Gıda Orjinli *Staphylococcus aureus*'ta Biyofilm Kodlama Geninin Moleküler 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 (26/10/2022).

Ahmed Mahmood Hussein HUSSEIN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KLİNİK VE GIDA ORJİNLİ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*'TA BİYOFİLM KODLAMA GENİNİN MOLEKÜLER TESPİTİ

Ahmed Mahmood Hussein HUSSEIN

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Seçil AKILLI ŞİMŞEK
Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Marwa Hameed ALKHAFAJI

Staphylococcus aureus, hem insanları hem de hayvanları etkileyen yaygın bir bakteriyel hastalıktır. Deri enfeksiyonları, menenjit, endokardit, septisemi ve toksik şok sendromuna neden olur. Topladığımız 150 örnekten 37'si (%60) insan omurilik sıvısı, 18'i (%29) süt, 20'si (%10) balık olmak üzere farklı kaynaklardan 61 *Staphylococcus aureus* elde ettik. Numuneler, Al-Kadhimiya Devlet Eğitim Hastanesin, Bağdat Valiliği ve bazı harici laboratuvarlara başvuran hastalardan alındı. Mannitol tuzlu agar besiyerinde kültür özellikleri, DNA ekstraksiyonu öncesi tanı sürecindeki doğruluğu artırmak için Gram pozitif küresel şekilli bakteri ve biyokimyasal testler gözlemlenerek mikroskobik incelemeye dayalı olarak örnekler teşhis edildi. Biyofilm oluşumunun organizmanın hayatta kalmasına yardımcı olan ve dolayısıyla patojenik güçlerine katkıda bulunan en önemli virülans faktörlerinden biri olduğu düşünülmektedir. Toplanan 150 örnek arasında sadece 82 izolatta *staphylococcus* türüne rastlandı, bunların 61 tanesinde bulunan *S. aureus* suşlarının 13 (%21)'ü orta derece, 48 (%78,6)'i güçlü biyofilm üretti. PCR tekniği kullanılarak 61 örnekten DNA izole edildi, özel gen primerleri kullanılarak 302 baz çifti büyüklüğünde eno geni tespit edildi.

2022, 44 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: *Staphylococcus aureus*, Biyofilm oluşumu, Besin kaynağı, Klinik izolatlar

ABSTRACT

Master of Science Thesis

MOLECULAR DETECTION OF BIOFILM CODING GENE IN CLINICAL AND FOOD-ORIGIN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Ahmed Mahmood Hussein HUSSEIN

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

Advisor: Prof. Dr. Seçil AKILLI ŞİMŞEK
Co-Advisor: Asst. Prof. Dr. Marwa Hameed ALKHAFAJI

Staphylococcus aureus is a common bacterial disease that affects both humans and animals. It causes skin infections, meningitis, endocarditis, septicemia and toxic shock syndrome. Among the 150 isolates we collected, we got 61 *Staphylococcus aureus* from different sources included 37 (60%) including human spinal fluid, 18 (29%) milk, 20 (10%) sample of fish). The samples were taken from patients attended Al-Kadhimiya Governmental Teaching Hospital and some external laboratories Baghdad Governorate and marketes. Samples were diagnosed based on cultured characteristics on Mannitol salt agar medium, microscopic examination by observing the Gram-positive spherically shaped bacterium, bacteria and biochemical tests. to increase accuracy in the diagnostic process before DNA extraction. Biofilm formation is thought to be one of the most important virulence factors that helps the survival of the organism and thus contributes to its pathogenic powers. Among 150 samples were collected only 82 isolates *staphylococcus* spp were *staphylococcus aureus* 61 isolates; 48 was produced strong biofilm, 13 were moderate. The number of isolates produced biofilm formation were 48 (78.6%) and moderate biofilm producer was 13 (21%). DNA was isolated from 61 samples *S. aureus*, using the PCR technique, the eno gene was detected of the size of 302 base pairs using specialized gene primers.

2022, 44 pages

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Biofilm formation, Food source, Clinical isolates

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmamın her safhasında yakın ilgi ve önerileri ile beni yönlendiren, her türlü yardımını esirgemeyen, her zaman destekleyen ve inanılmaz bir anlayış gösteren değerli hocam Prof. Dr. Seçil AKILLI ŞİMŞEK başta olmak üzere, çalışmanın yönlendirilmesinde ve yürütülmesinde yol gösteren herkese sonsuz teşekkür ederim.

Ahmed Mahmood Hussein HUSSEIN
Çankırı, Ekim 2022

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **iii**
İÇİNDEKİLER ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **vi**
KISALTMALAR DİZİNİ ..... **vii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **viii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **ix**
1. GİRİŞ **1**
2. LİTERATÜR ÖZETİ **3**
2.1 Biyofilm **3**
2.2 *Staphylococcus Aureus* Biyofilmleri **5**
2.3 Biyofilm Oluşumunun Aşamaları **5**
2.4 Biyofilmde Hücre Dışı Polimerik Maddenin Rolü **6**
2.5 Biyofilm Oluşumunda Hücre Dışı DNA Rolü **6**
2.6 *Staphylococcus Aureus* Biyofilmle İlgili Enfeksiyonlar **8**
2.7 *Staphylococcus Aureus* Biyofilminde Yer Alan Genler **8**
2.8 Gıda Kaynaklı *Staphylococcus Aureus* **9**
2.9 *S. Aureus* ve Antibiyotik Direnci **11**
3. MATERYAL VE METOT **13**
3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Diğer Malzemeler **13**
3.2 Kullanılan Ekipmanlar **13**
3.3 Morfolojik Özellikler **14**
3.4 Mikroskopik İnceleme **14**
3.5 Biyokimyasal Test **14**
3.5.1 Katalaz testi **14**
3.5.2 İndol testi **14**
3.5.3 Metil kırmızı testi **15**
3.5.4 Üreaz testi **15**
3.5.5 Koagülaz **15**

3.6 Yöntem **15**
3.6.1 Sterilizasyon **15**
3.6.2 Kültürel medyanın hazırlanması **16**
3.7 Biyofilm Miktar Tayini **17**
3.8 Genomik DNA Saflaştırma Kiti **18**
3.9 DNA Ekstraksiyonu ve PCR Amplifikasyonu **18**
3.10 Biyofilm Oluşumunun Kantitatif Tespiti **19**
3.11 Agaroz Jel Elektroforezi **22**
3.12 Agaroz Jelin Hazırlanması **22**
3.13 Numunenin Hazırlanması **22**
3.14 RedSafe Nükleik Asit Boyama Solüsyonu **24**
4. BULGULAR VE TARTIŞMA **25**
4.1 Numunelerin Toplanması **25**
4.2 Numunelerin Aktivasyonu **28**
4.3 Doku Kültürü Plakası (TCP) Kullanılarak Biyofilm Oluşturma Deneyleri **28**
4.4 ELISA Testi Sonuçları **29**
4.5 DNA Ekstraksiyonu **30**
4.6 PCR Koşullarının Optimizasyonu **30**
4.7 Etkileşimde Kullanılan Primerler **31**
4.8 Maxime PCR PreMix Kiti (i-Taq) 20 µL rxn **31**
4.9 Gen Teşhisi **32**
5. SONUÇ VE ÖNERİLER **34**
KAYNAKLAR **36**
ÖZGEÇMİŞ **44**

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
°C	Santigrat derece
g	Gram
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Millimetre
α	Alfa
μm	Mikrometre

KISALTMALAR DİZİNİ

CRA	Kongo kırmızı agar yöntemi
EPS	Hücre dışı polimerik maddeler
MDR	Çoklu ilaca dirençli
MIC	Minimum inhibitör konsantrasyonları
MRSA	Metisiline Dirençli *S. aureus*
PCR	Polimeraz zincirleme reaksiyonu
TBE	Tris borat EDTA Tamponu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Biyofilm gelişiminin aşamaları (Moormeier and Bayles 2017) 6
Şekil 2.2 Biyofilm gelişiminin çoğalma aşaması sırasında hücresel etkileşimlerin modeli (Moormeier and Bayles 2017) 7
Şekil 3.1 Mannitol tuzlu agarda bakteriyel büyüme 17
Şekil 3.2 Optimum durum için Multigene Optimax 19
Şekil 3.3 Mikrotitre Plakasında Biyofilm 21
Şekil 3.4 İnkübatör DH3600BII 21
Şekil 3.5 Otomatik ELISA okuyucusu PKL PPC 230 21
Şekil 3.6 Çok kanallı mikropipet 22
Şekil 3.7 Elektroforez sisteminin çalışması (I) 23
Şekil 3.8 Elektroforez sisteminin çalışması (II) 23
Şekil 3.9 Elektroforez sisteminin çalışması (III) 24
Şekil 4.1 Mannitol tuzlu agar bakteri büyümesi 27
Şekil 4.2 Besin agarda bakteriyel büyüme 28
Şekil 4.3 Bakteri numunelerinden genomik DNA ekstraksiyonunun jel elektroforezi, 40 dakika boyunca 5 hacim/cm^2'de %1 agaroz jel 31
Şekil 4.4 PCR ürünü bant boyutu 302 bp. Ürün %2 agaroz üzerinde 5 volt:cm^2. 1x TBE tamponunda 1 saat elektroforez yapıldı. N:DNA ladder 100 33

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Tıbbi cihazlarda biyofilm oluşturan bakteriler 3
Çizelge 2.2 Gıda endüstrisinde biyofilm oluşturan patojenler (Carrascosa *et al.* 2021) 10
Çizelge 4.1 Monitol tuz ortamı ile teşhis yüzdesi 26
Çizelge 4.2 *Staphylococcus* için biyokimyasal testler ve sonuçlar 26
Çizelge 4.3 Biyofilm sonuçları 29
Çizelge 4.4 Kit içeriği 30
Çizelge 4.5 Eno geninin spesifik primerleri 31
Çizelge 4.6 Optimum algılama koşulu 33

1. GİRİŞ

Biyofilmler, bir yüzeye, arayüze veya birbirine kalıcı olarak yapışan mikrobiyal hücreler tarafından oluşturulan topluluklardır. Mikrobiyal hücreler, kendi ürettiği hücre dışı polimerik maddelerden (EPS) oluşan bir matrise implante edilir ve büyüme hızları ve gen transkripsiyon özellikleri değiştirilir (Flemming and Wingender 2010). Biyofilmler, kalıcı enfeksiyonlara yol açmaları nedeniyle giderek daha fazla tanınmaktadır. Bunun nedeni, canlı dokular, tıbbi cihazlar ve implantlar üzerinde büyüyerek insan sağlığını tehdit edebilecek enfeksiyonlara yol açmalarıdır (Cheng *et al.* 2013, Kamaruzzaman *et al.* 2017).

Staphylococcus aureus, çeşitli dokuları kolonize edebilen ve hem bağışıklığı baskılanmış hem de sağlıklı insanlarda ciddi hastalıklara neden olabilen yaygın bir insan patojenidir. Dayanıklılıkları nedeniyle, zorlu tedavi müdahaleleri karşısında bile, bu bakteri türlerinin ürettiği biyofilm enfeksiyonları önem arz etmektedir. Çoklu ilaca dirençli (MDR) *S. aureus*, ciddi hastane enfeksiyonlarının yaygın nedenlerinden biridir. Gastrointestinal sistem de bulaşmanın önemli bir kaynağıdır. Enfeksiyonların şiddeti; septisemi, menenjit, zatürree ve endokardit gibi hafif ile şiddetli olarak sınıflandırılan ve yaşamı tehdit eden enfeksiyonlar oluşturmaktadır. Enfeksiyon, sağlık hizmetleri kaynaklarına yüksek ve artan bir yük getirmenin yanı sıra artan morbidite ve mortaliteye neden olur (Delmain *et al.* 2020).

İnsan vücudundaki biyofilmlerle ilişkili enfeksiyonlar genellikle idrar yolu enfeksiyonları, endokardit, kateterle ilişkili enfeksiyonlar, diş plağı oluşumu, eklem protezleri ve kalp kapakçıkları gibi kalıcı cihazların enfeksiyonları şeklindedir (Bjarnsholt 2013, Wu and Belmonte 2015). Vücudun bağışıklık sistemi biyofilme gömülü hücrelere nüfuz edemediğinden ve bu hücreleri yok edemediğinden, oluşan enfeksiyonun tedavisi genellikle zordur. Ayrıca, birçok geleneksel antimikrobiyal tedavi, biyofilmlerin bu antimikrobiyallere karşı uyguladığı direnç mekanizmaları nedeniyle yalnızca planktonik hücrelere karşı etkilidir (Kamaruzzaman *et al.* 2017). Şimdiye kadar, biyofilmleri kontrol etmek veya yok etmek için çeşitli stratejiler kullanılmıştır. Ancak

henüz tam bir başarı sağlanamadığından biyofilm ile ilişkili enfeksiyonları etkili bir şekilde önlemek için alternatif yaklaşımlara ihtiyaç vardır (Chen *et al.* 2010, Kamaruzzaman *et al.* 2017, Wu and Belmonte 2015).

Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızın amacı, klinik ve gıda kaynaklı *Staphylococcus aureus*'un biyofilm oluşturma yeteneğinin değerlendirilmesi ve biyofilm kodlayan gen eno'nun moleküler tespitinin yapılmasıdır.

2. LİTERATÜRÖZETİ

2.1 Biyofilm

Biyofilm, bir alt tabakaya, arayüze veya birbirine bağlı hücrelerle karakterize edilen, hücre dışı bir polimerik malzeme matrisine daldırılmış ve çoğalma, gen ifadesi ve protein üretimi açısından değiştirilmiş bir fenotip sergileyen mikrobiyal olarak türetilmiş bir topluluktur (Donlan and Costerton 2002). Biyofilm üretimi, çeşitli biyotik ve abiyotik yüzeylere bakteriyel yapışmayı sağlar, sert çevresel güçler (örneğin, konakçı bağışıklık tepkileri veya antibiyotikler) karşısında bakteri topluluğunun uyum kabiliyetini iyileştirir ve patojenin çıkarılmasını daha da zorlaştırır (Toth *et al.* 2007). Biyofilmlerin sahip olduğu bu özellikler, bazı durumlarda benzersiz sütun, mantar veya değişik şekillerde yapılar oluşturmasına neden olabilir. Biyofilm kalınlığı, tek bir hücre katmanından, viskoz bir polimerik matris ile kaplanmış önemli bir topluluğa kadar değişebilir (Costerton *et al.*1999). Biyofilmin en derin katmanlarında bile, karmaşık kanal ağları bu karmaşık yapıların içinden geçerek hayati besinlere bir miktar erişim sağlar. Kalıcı enfeksiyon için biyofilm üretimi gerekli olmasa da biyofilmlerin temizlenmesi zordur ve sıklıkla cerrahi müdahale gerektirir (Kristian *et al.* 2004). Abiyotik yüzeylerde, birkaç bakteri türü biyofilm üretebilir (Muhammad 2020). Bunlar Çizelge 2.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1 Tıbbi cihazlarda biyofilm oluşturan bakteriler

Tıbbi cihaz	**Biyofilm oluşturan bakteriler**
Rahim içi cihazlar	*Escherichia coli*, *Streptococcus agalactie*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*
İdrar sondaları	*S. aureus, E. faecalis, Pseudomonas aeruginosa*
Mekanik kalp kapakçıkları	*Streptococcus* spp., *S. aureus, S. epidermidis*
Diş implantları	Gram pozitif koklar, Actinomyces spp, Gram negatif anaerobik oral bakteriler
Kontak lens	*P. aeruginosa, S. aureus, S. epidermidis, S. saprophyticus*
Periton diyaliz kateterleri	*S. epidermidis, P. acnes, S. warneri*

Bir stafilokok için in vitro koloni biyofilm modelinde dört metabolik aşama gözlemlenir. Bunlar; aerobik, fermentatif, uykuda (çok yavaş gelişen hücreler ve kalıcılar içerir) ve ölü olarak sıralanmaktadır. Üst hava oksijen açısından zengin arayüze ve alt kısımda sıvı-besin açısından zengin arayüze maruz kalan hücreler metabolik olarak aktifken, hücrelerin çoğu inaktif ve anoksik koşullardadır (Rani *et al.* 2007). Bu nedenle, çeşitli hücre duvarı ile ilişkili proteinlerle biyofilm protein ekspresyonunun değişkenliği ortaya çıkar. Bunlara bağlı olarak hücre düzeyinde diferansiyel ekspresyon saptandığında biyofilm nedeniyle ekspresyonun hücre kümelerinde değiştiği tespit edilmiştir (Brady *et al.* 2007). Karbon, nitrojen ve fosfat gibi çevresel besinler hücre dışı matris tarafından tutulabilir ve konsantre edilebilir (Touhami *et al.* 2004). Konak ve sentetik kaynaklar tarafından üretilen sayısız temizleme mekanizmasından kaçınma yeteneği, biyofilm geliştirmenin diğer bir avantajıdır. Biyofilmleri ortadan kaldırmak için uygulanan antimikrobiyal ve kirlenme önleyici kimyasallar, kesme gerilimi, konak fagositik eliminasyonu, konak radikal ve proteaz savunmalarının tümü başarısız temizleme tekniklerine örneklerdir. Antimikrobiyal dirence, anoksik bir ortama adaptasyon ve gıda kısıtlaması ile oluşturulan uykuda bir fenotip aracılık eder, bu da düşük metabolik seviyelere ve büyük ölçüde azaltılmış hücre bölünme oranlarına neden olur. Bu stresli ortam, yüksek miktarda antibiyotiğe dirençli çok sayıda yavaş büyüyen hücrenin yanı sıra az sayıda kalıcı hücre yani toplam popülasyonun %1'inden azını oluşturur (Lewis 2010).

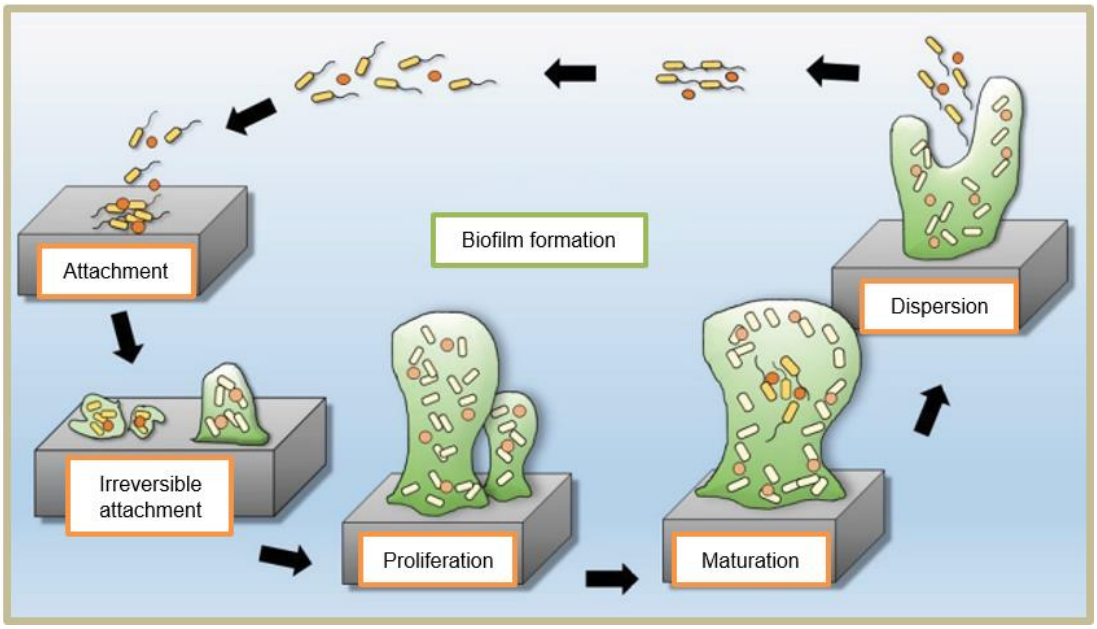
Tohum yayma veya hücresel ayrılma kapasitesi, biyofilm büyümesinin nihai avantajıdır. Mikro koloniler, sıvı mekanik kesme gerilmelerine veya tohum yayılmasını kolaylaştıran genetik olarak belirlenmiş bir reaksiyona tepki olarak ayrılabilir (Boyd and Chakrabarty 1994). Ayrılmış mikro koloniler, ilk biyofilm topluluğundan konağın enfekte olmayan kısımlarına seyahat eder, yapışır ve metastatik bir kanser hücresi gibi yeni oluşan biyofilm üretimini uyarır. *S. aureus* gibi hareketsiz bakteriler için geçerli olmayan, yapışan mikro koloniden tek, hareketli hücrelerin hareketi ile tohum dağılımına aracılık edilebilir (James *et al.* 2008). Sonuç olarak, bu durum antimikrobiyallere ve konakçı bağışıklık tepkisine dirençli, uzun süreli bir bakteri kaynağı popülasyonunun yanı sıra bakteriyel çoğalmaya yardımcı olmak için sürekli dökülme sağlar.

2.2 *Staphylococcus Aureus* Biyofilmleri

Staphylococcus aureus, Gram pozitif, yaygın olarak dağılmış bir bakteridir. Bu bakteri ile insan nüfusunun yaklaşık yüzde 20-25'i kalıcı olarak kolonize olurken, diğer yüzde 75-80'i periyodik olarak veya hiç kolonize olmayabilir (Sakr *et al.* 2018). İstilacı stafilokoklar ya konağın doğuştan gelen bağışıklık sistemi tarafından temizlenir ya da hücre dışı matris proteinlerine yapışarak bir biyofilm oluşturur. Hücre fizyolojisi hızla biyofilm benzeri bir duruma dönüşür. *Staphylococcus aureus*, yabancı cisimle ilişkili enfeksiyonlara artan katılımı, çoklu antibiyotik direncinin hızlı gelişimi ve sergilenmesi ve akut bir enfeksiyondan kalıcı, kronik ve tekrarlayan bir enfeksiyona dönüşme eğilimleri nedeniyle dikkat çekmektedir. Bu bakteri, bir yüzeye bağlı bakteri hücrelerini veya koruyucu bir polimerik hücre dışı matristeki diğer hücreleri kaplayan olgun bir 3D biyofilm oluşturabilir (Ning *et al.* 2019).

2.3 Biyofilm Oluşumunun Aşamaları

İlk bağlanma, olgunlaşma (çoğalma, göç, olgunlaşma) ve son ayrılma veya dağılma, biyofilm gelişiminin üç ana aşamasını oluşturmaktadır. Yerleştirmeden kısa bir süre sonra implant yüzeyini kaplayan konakçı matris proteinleri, ilk yapışmadan sorumludur (Otto 2008). Sonuç olarak, mikrobiyal yüzey bileşenleri, matriks proteinlerini algılayabilir ve bunlara bağlanabilir, bu da bakterilerin kolonize olmasına izin verir. Bunu takiben, biyofilm yapışkan proteinler ve ekzopolimerlerin aracılık ettiği hücreler arası agregasyon nedeniyle olgunlaşır ve üç boyutlu bir görünüm alır (Ning *et al.* 2019). Son olarak, tek hücreler veya hücre kümeleri, biyofilm yapısından ayrılarak, konağın farklı kısımlarını yaymalarına ve kolonize etmelerine izin verir (Şekil 2.1) (Otto 2008).



Şekil 2.1 Biyofilm gelişiminin aşamaları (Moormeier and Bayles 2017)

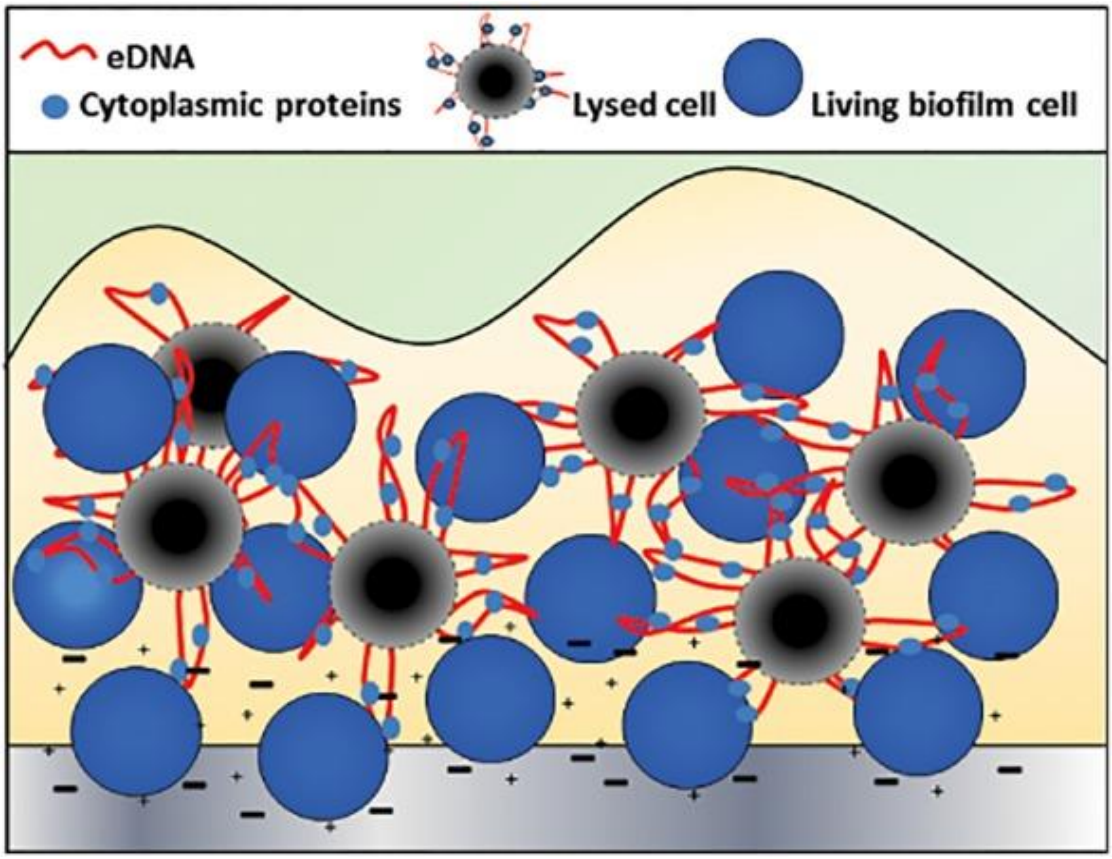
2.4 Biyofilmde Hücre Dışı Polimerik Maddenin Rolü

Biyofilm, hücre dışı bir polimerik malzeme matrisine (EPS) daldırılırken bir yüzeye yapışan ve yapılandırılmış bir mikrobiyal popülasyondur (Karygianni *et al.* 2020). EPS'de ekzopolisakkaritler, nükleik asitler (hücre dışı DNA ve eRNA), lipidler, proteinler ve diğer makromoleküller bulunur. Biyotik ve abiyotik yüzeylere mikrobiyal yapışma, hücre dışı polimerik maddeler tarafından desteklenir. Biyofilm matrisi, fermente olabilen polisakkaritler gibi farklı biyomoleküller için yerel bir beslenme deposu olarak önemli bir kimyasal işleve sahiptir (Bazaka *et al.* 2011).

2.5 Biyofilm Oluşumunda Hücre Dışı DNA Rolü

Hücre dışı DNA, stafilokokal biyofilmin (eDNA) bir diğer önemli bileşenidir. Bu materyalin daha önce P. aeruginosa' daki biyofilmlerin önemli bir bileşeni olduğu tespit edilmiştir (Allesen-Holm *et al.* 2006). Bu durum, DNaz tedavisinin erken, olgunlaşmamış biyofilmleri kaldırabileceği in vitro keşfiyle desteklenmektedir. Ek olarak, kistik fibroz hastalarının tedavisinde antibiyotik tedavisi ile DNaz'ın başarılı klinik kullanımı, in vivo biyofilmlerde eDNA'nın uygunluğunu (Gibson *et al.* 2003) ve deri hücrelerinde bulunan

DNaz'ın biyofilm oluşumunu azaltabileceği bulgusu desteklemektedir (Eckhart *et al.* 2007). Anyonik EPS bileşenleri ve eDNA, katyon şelatörleri olarak hizmet edebilir ve potansiyel olarak katyon eksikliği olan bir ortam oluşturarak antimikrobiyal direnci artırabilir (De Francesco *et al.* 2017). Yapılan bir çalışmada, murein hidrolaz aktivitesinin bir efektörünü kodlayan ve hücre ölümünü düzenleyen cidA genindeki mutasyonların, daha az yapışkan olan ve daha az genomik DNA içeren bir biyofilm oluşturduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, DNaz I tedavisinin, cidA mutantında biyofilm gelişimi üzerinde sadece küçük bir etkisi olurken, orijinal suş ciddi şekilde inhibe edilmiştir. Buna bağlı olarak cidA geninin hücre lizizinde rol oynayan bir holin homologu olduğu keşfedilmiştir. Elde edilen bu veriler, DNA salınımı ve biyofilm oluşumu için hücre lizizinin gerekli olduğunu göstermektedir (Rice *et al.* 2007). Uygun biyofilm oluşumu için hücre lizizi ve ardından genomik DNA salınımının olması gerekmektedir (Şekil 2.2) (Mann *et al.* 2009).



Şekil 2.2 Biyofilm gelişiminin çoğalma aşaması sırasında hücresel etkileşimlerin modeli (Moormeier and Bayles 2017)

Bir biyofilm çoğalma aşamasına ulaştığında hücre alt popülasyonu ölür ve parçalanır (siyah daireler), hücre dışı DNA (kırmızı çizgiler) ve sitoplazmik proteinler (açık mavi ovaller) hücre dışı ortama salınır ve kalan canlı hücreleri (mavi daireler) Sitoplazmik proteinler ve genomik DNA karışımını oluşturur (Moormeier and Bayles 2017).

2.6 *Staphylococcus Aureus* Biyofilmle İlgili Enfeksiyonlar

Biyofilm üretimi nedeniyle *Staphylococcus aureus*'un neden olduğu enfeksiyonların tedavisi zordur. İnsan bağışıklık sistemi ve ilaçlar *S. aureus* biyofilmine karşı etkisiz olduğundan, kalıcı ve bulaşıcı hastalıklar ortaya çıkması kaçınılmazdır (Reffuveille *et al.* 2017).

Sağlık tesislerinde, *S. aureus*'un çeşitli yüzeylerde, implantlar ve cerrahi aletler gibi tıbbi cihazlarda biyofilm oluşturma yeteneği çok yüksektir. Yüzeyle ilgili ve tıbbi cihazla ilişkili *S. aureus* biyofilmleri, uygun şekilde sterilize edilmez ve tedavi edilmezse hastalarda enfeksiyonlara neden olabilir (Archer *et al.* 2011). Tıbbi cihazlardaki biyofilmler genellikle cihazın çıkarılmasını ve değiştirilmesini gerektiren cerrahi riskler oluştururlar (Reffuveille *et al.* 2017).

S. aureus, enfekte olmuş konakçı dokuların içinde biyofilmler oluşturur. Antibiyotik direnci nedeniyle, bu tür enfeksiyonların tedavisi daha zordur ve hastalıklı dokuların çıkarılması gerekir (Khatoon *et al.* 2018). Biyofilm tarafından sarılmış kalıcı hücrelerin (bazı uyuyan *S. aureus* hücreleri) varlığı, biyofilmle ilişkili antimikrobiyal dirence neden olur. Bu hücreler antimikrobiyal tedavi boyunca uykuda kalır ve tedavi durdurulduğunda yeniden uyanarak kronik bir enfeksiyona neden olur (Arciola *et al.* 2018).

2.7 *Staphylococcus Aureus* Biyofilminde Yer Alan Genler

Bazı biyofilm ile ilişkili genler, mikrobiyal biyofilm gelişiminde rol oynar (Sauer *et al.* 2002). Kollajen bağlayıcı protein (can) geni, hücreler arası adezyon (icaA, B, C ve D) geni, fibronektin bağlayıcı protein (fnbA ve fnbB) geni, kümelenme faktörü (clfA ve B),

laminin bağlayıcı protein (eno), elastin bağlayıcı protein (ebps) ve fibrinojen bağlayıcı protein (fib) geninin tümü *S. aureus*'un biyofilm oluşumunda önemli rol oynar (Nourbakhsh and Namvar 2016). Hücreler arası yapışma genleri icaA, B, C, D hücreden hücreye yapışma sürecini kodlar ve biyofilm oluşumunu başlatır (Azmi *et al.* 2019). Aynı zamanda *S. aureus*'ta, birleşik fnbAB genlerinin ifadesi, biyofilm oluşumunu destekler ve bakterilerin konakçı hücrelere girmesine yardımcı olan invazinler olarak işlev görür. Bulara ek olarak ayrı olarak bulunan fnbA ve fnbB genleri de bakterilerin biyofilm oluşturmasına yardımcı olur (O'Neill *et al.* 2008).

ClfA ve clfB'nin kümelenmesine neden olan genler, konakçının yüzey fibrinojenine yapışan hücre duvarı proteinleridir. ClfAB genleri tarafından kodlanan kümelenme faktörleri A ve B'nin bağlanması, *S. aureus* kolonizasyonunu arttırarak biyofilm oluşumunu teşvik eder ve çözünür fibrinojeni bağlayarak patojeniteye neden olur (Herman-Bausier *et al.* 2018). Serin-aspartat tekrar faktörleri C ve D (SdrCD), pul pul dökülmüş epitel hücrelerine bağlanmayı ve nazal kolonizasyonu arttırırken, SdrE, tamamlayıcı faktör H'ye bağlanarak immün kaçışa neden olur. Aynı zamanda Sdr genleri, bu proteinleri farklı işlevleri için kodlar (Foster *et al.* 2014). Elastin bağlayıcı proteinlerin ve laminin bağlayıcı proteinlerin ilgili genleri, ebps ve eno genleri tarafından kodlanmayı, konakçının kolonizasyonunu ve biyofilm oluşumunu kolaylaştırır (Kot *et al.* 2018).

2.8 Gıda Kaynaklı *Staphylococcus Aureus*

Gıda işleme tesislerinde mikroplar ve toksik kimyasallar hızla yayılır. *Staphylococcus aureus*; akut, subakut ve kronik mastite neden olan en sık bakterilerden biridir (Rocha *et al.* 2019). Bu hastalık aynı zamanda süt endüstrisi için de ciid bir zoonotik endişe oluşturmaktadır. *S. aureus* üreticiden tüketiciye bulaştığında gıda zehirlenmesi ve diğer enfeksiyonlar meydana gelebilir. *S. aureus*, meme bezine nüfuz edebilir ve diğer virülans faktörlerinin yanı sıra toksinler ve yapışkanlar yoluyla enfeksiyona neden olabilir (Grunert *et al.* 2018). Çizelge 2.2'de genellikle gıda endüstrisinde biyofilm oluşturan patojenler listelenmiştir (Carrascosa *et al.* 2021).

Çizelge 2.2 Gıda endüstrisinde biyofilm oluşturan patojenler (Carrascosa *et al.* 2021)

Patojen	**Kontamine olmuş gıda**	**Semptomlar**
Bacillus cereus	Süt ürünleri, pirinç, sebzeler, et	İshal ve kusma Semptomlar
Campylobacter jejuni	Hayvanlar, kümes hayvanları, pastörize edilmemiş süt	Kanlı ishal, ateş, Mide krampı, mide bulantısı ve kusma
Escherichia coli	Çiğ süt, taze et, meyve ve sebzeler	İshal salgınları ve hemolitik üremik sendrom
Listeria monocytogenes	Süt ürünleri, et, hazır ürünler, meyveler, yumuşak peynirler, dondurma, pastörize edilmemiş süt, şekerlenmiş elmalar, dondurulmuş sebzeler, kümes hayvanları	Yaşlılarda listeriyoz, Hamile kadınlar ve bağışıklığı baskılanmış hastalar
Salmonella enterika	Kanatlı eti, büyükbaş, küçükbaş, domuz, balık	Gastroenterit veya Septisemi
Staphylococcus aureus	Salatalar, unlu mamüller, özellikle krema dolgulu hamur işleri ve kekler ve sandviç dolguların yanı sıra et, tavuk, yumurta ve süt ürünleri	Metisilin direnci, kusmaya neden olabilir ve ishal
Pseudomonas spp.	Meyveler, sebzeler, et yüzeyleri ve düşük asitli süt ürünleri, peynir	İshal

Biyofilmler, bakterilerin antibiyotiklere ve konakçının bağışıklık sistemine göre planktonik mikroplardan daha dirençli büyümesini sağlar (Resende *et al.* 2021).

Biyofilmin biyolojik ve kimyasal tehlikeleri kapsamlı bir şekilde tartışılmıştır. Biyofilm, gıda işleme sırasında, özellikle ötrofik bir ortamda ısıl işlem sırasında kolayca oluşur ve kimyasal bir endişe yaratır. Gıda ısıtıldığında (özellikle kuru ısıda), gelişmiş glikasyon ürünleri (AGE'ler) oluşur. Daha sonra oksidatif stres ve kronik inflamasyon meydana gelerek metabolik ve kardiyovasküler sorun riskini ortaya çıkar (Saha *et al.* 2017). AGE'ler biyofilmler içinde oluşabilir çünkü EPS bir polisakkarit matrisinden ve biyolojik aktiviteye sahip proteinlerden oluşur. Biyolojik ve kimyasal kirleticiler böylece gıda işleme sırasında biyofilm tarafından korunur. N-karboksimetil-lisin (CML), gıdalarda AGE'lerin üretimi için sıklıkla bir belirteç olarak kullanılan, iyi çalışılmış bir AGE'dir ve hem serbest hem de bağlı formda bulunur (Assar *et al.* 2009).

Biyofilm gıdaların ısıl işlemi sırasında CML'ye neden olabileceğinden tüketiciler *S. aureus* kontaminasyonundan endişe duymaktadır. Gıda kaynaklı patojenlerin çoğu, gıda işinde biyofilm, özellikle gelişmiş biyofilm oluşturarak normal sterilizasyondan (yüksek

sıcaklık ve basınç, mekanik yıkama gibi) kaçma potansiyeline sahiptir (Miao *et al.* 2019). Ayrıca, gıda bileşenleri, biyofilm oluşumu için ötrofik bir ortamın yanı sıra biyofilm içindeki metabolizmayı sağlar, bu da KML gibi bir metabolit birikimine yol açar. Yapılan çalışmalar, insan vücudunda KML birikimi ile kardiyovasküler hastalıklar, sarkopeni ve böbrek hastalıkları arasında istatistiksel bir ilişki olduğunu göstermiştir (Baumann and Butler 2012).

2.9 *S. Aureus* ve Antibiyotik Direnci

S. aureus, daha önce belirtildiği gibi, keşfedilen hemen hemen tüm antimikrobiyal moleküllere karşı hızla antibiyotik direnci kazanma potansiyeline sahiptir. Antibiyotiklere direnç, sıklıkla diğer türlerden veya cinslerden HGT yoluyla edinilirken, kromozomal değişiklikler de dirence katkıda bulunabilir. HGT, direnç kazandıran önceden birleştirilmiş gen kümelerinin edinilmesine izin verir (örneğin sırasıyla mec kompleksi veya sırasıyla metisilin veya vankomisin direnci için vanA kompleksi), mutasyonlar ise doğal analogları olmayan yeni veya sentetik antibiyotiklere direnç verebilir ve doğada bulunmayan direnç belirleyicileridir. Antibiyotik direnci belirleyicileri, farklı MRSA soyları tarafından edinilmiştir. Bu nedenle, belirli MRSA klonu, karakteristik direnç özellikleri veya kalıpları ile ilişkilendirilebilir (Pierson and Friedman 1992). Örneğin CA-MRSA soyları beta-laktam olmayan ilaçların çoğuna duyarlıdır, ancak USA300 eritromisin ve siprofloksasine karşı dirençlidir (David and Daum 2010). Avrupa CA-MRSA ST80 klonu fusidik asit ve tetrasikline dirençlidir (Monecke *et al.* 2011). LA-MRSA, tarım endüstrisinde en çok kullanılan antibiyotik olan tetrasikline karşı yaygın olarak dirençlidir (Tang *et al.* 2007). En yeni gelişen klonlar sınırlı bir antibiyotik spektrumuna dirençli olsa da HA-MRSA soyları aminoglikozidler de dahil olmak üzere çok çeşitli ilaçlara dirençlidir. ST22 (EMRSA-15) florokinolonlara ve makrolidlere karşı dirençlidir, ancak gentamisin buna karşı etkilidir (Johnson *et al.* 2005). Lyon klonu (ST8) florokinolonlara dirençlidir, gentamisine, aminoglikozitlere ve makrolidlere duyarlıdır. Stafilokok enfeksiyonlarını tedavi etmek için en sık kullanılan antibiyotiklere karşı dirence katkıda bulunan süreçler ve genetik değişkenler kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Lipoglikopeptitler (vankomisin veya telavancin ve dalbavancin gibi teikoplanin türevleri) ve seftobiprole ve seftarolin gibi yeni antistafilokokal

sefalosporinler, anti-MRSA aktivitesine sahip yeni geliştirilmiş antibiyotiklerin örnekleridir (Morata *et al.* 2015). Bu iki bileşik, tüm beta-laktam antibiyotikler gibi PBP'lerin substrat analoglarıdır ve bunların inhibisyonu, zayıf hücre duvarı oluşumu ve hücre ölümü ile sonuçlanır. Bununla birlikte, diğer beta-laktamların aksine hem seftobiprol hem de seftarolin, PBP2a'ya yüksek afinite gösterir, bu da *S. aureus*'ta metisilin direncini kolaylaştırarak onları MRSA'ya karşı etkili kılar (Sauer *et al.* 2002). Klinik kullanımları çok sınırlı olduğundan, bu bileşiklerle direnç gelişimi hakkında çok az şey bilinmektedir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Diğer Malzemeler

- Agarose(8100,11), Conda/ABD'de
- Kırmızı güvenli boyama ruhu (2141), Intron/Kore
- 6X Yükleme Boyası (21161), Intron/Kore
- Merdiven 100 bp (24075), Intron/Kore
- Premix pcr (25025), Intron/Kore
- TBE buffer 10 X (IBS.BT004), Conda/ABD
- Primer (---), Entegre DNA teknolojileri/ABD
- ZR Fungal/Bacterial/Yeast DNA MiniPrep™ (D6005), ZYMO/USA

3.2 Kullanılan Ekipmanlar

- AURA TM PCR Kabini (euroclone), İtalya'da üretilmiştir.
- Microspin 12, Yüksek Hızlı Mini Santrifüj (Bio San), Almanya'da üretilmiştir.
- V-1 plus, Tüpler için Kişisel Vorteks (Digsystem), Almanya'da üretilmiştir.
- Bio TDB-100, Almanya'da yapılan kuru blok termostatlı (Bio San).
- Almanya'da yapılan Biopette Değişkeni (labnet).
- MultiGeneOptiMax Gradyan Termal Döngüleyici (Labnet), ABD'de üretilmiştir.
- Elektroforezler (CBS, Scientific), ABD'de üretilmiştir.
- Fransa'da yapılan UV iletimi (Vilber lourmat).
- Mikrospin (Biosan), Litvanya'da üretilmiştir.
- Litvanya'da yapılan Combi-spin (Biosan).
- Almanya'da yapılan denge (Kernpfb).
- Çin'de yapılan kuluçka (Jrad).
- Çin'de yapılan mikrodalga (Gosonic).

3.3 Morfolojik Özellikler

Staphylococcus aureus hücreleri Gram pozitiftir ve şekil olarak küreseldir. Genellikle Gram boyamadan sonra ışık mikroskobu altında gözlemlendiğinde asmalara benzeyen kümeler halinde görünürler (Kiel *et al.* 2022).

3.4 Mikroskopik İnceleme

Staphylococcus aureus hücreleri Gram pozitiftir ve şekil olarak küreseldir. Gram boyamadan sonra ışık mikroskobu altında gözlemlendiğinde genellikle asmalara benzeyen kümeler halindedirler (Gomez *et al.* 2012). "Stafilokok" adı, bir üzüm (stafil) ve çilek (kokkos) kümesi anlamına gelen Yunancadan türetilmiştir. Elektron mikroskobunda pürüzsüz bir yüzeye sahip küresel hücreleri ortaya çıkar ve kalınlaşmış hücre duvarı, karakteristik sitoplazmik membran ve amorf sitoplazma gözlenir (Touhami *et al.* 2004). Hücrelerin çapı 0,5 ile 1,0 um arasında değişir (Foster 1996).

3.5 Biyokimyasal Test

3.5.1 Katalaz testi

Test edilecek bakteri kolonilerinin bir kısmı temiz bir cam lam üzerine yerleştirilir ve ardından %3 konsantrasyonda bir damla hidrojen peroksit solüsyonu eklenir. Artan gaz kabarcıkları ve Oksijen, testin pozitif sonucunun ve izolatın katalaz enzimi üretme yeteneğinin bir göstergesidir (Forbes 2007).

3.5.2 İndol testi

Peptonlu su içeren tüpler MacConkey katı besiyerinde üreyen bakterilerle üretici firmanın talimatlarına göre aşılanır. Daha sonra 37°C'de 24-48 saat inkübe edilir ve 5 damla Kovac's reaktifi eklenir. İzolatlarda amino asit triptofandan indol üretimi olursa test negatif olarak değerlendirilir (Forbes 2007).

3.5.3 Metil kırmızı testi

Metil red-Fox Proscauer sıvı besiyeri içeren tüpler, MacConkey besiyerinde büyüyen bakterilerle aşılanır ve daha sonra 24 saat 37°C'de inkübe edilir. Ardından her tüpe 5-6 damla metil kırmızısı reaktifi eklenir. Kırmızı rengin ortaya çıkması testte pozitifliğin kanıtıdır (Forbes 2007).

3.5.4 Üreaz testi

Test, üre ortamına sürme yöntemiyle katı MacConkey ortamı üzerinde büyüyen bakterilerin aşılanmasıyla gerçekleştirilir. Bu işlemden sonra 37°C'de 48 saat inkübasyon yapılır. Ortamın renginin pembeye dönmesi, besiyerinde bulunan fenol kırmızısı reaktifinin rengindeki değişiklikten dolayıdır. Bu durum testin pozitif olduğunun kanıtıdır ve üreaz enziminin varlığını gösterir (Forbes 2007).

3.5.5 Koagülaz

Test, tek bir koloni *Staphylococcus* spp bakterilesi ile az miktarda insan kan plazmasının karıştırılması ve (plazma pıhtılaştırıcı enzim üretimini araştırmak için) cam slayta atarılması ile yapılır. Pıhtılaşma 10 saniye içinde gerçekleşirse reaksiyon pozitiftir ve bakterileri bir damla steril fizyolojik çözelti ile karıştırarak negatif kontrol yapılır (Forbes 2007).

3.6 Yöntem

3.6.1 Sterilizasyon

- Bunsen lambası ile aşılama halkaları aşılamadan önce ve sonra sterilize edilir.
- Kullanılacak olan araç gereçler kuru konveksiyon fırınında 180°C sıcaklıkta iki saat sterilize edilir.

- Daha sonra malzemeler 15 pound basınç altında 121°C sıcaklıkta 15 dakika boyunca otoklavlanır.

3.6.2 Kültürel medyanın hazırlanması

3.6.2.1 MacConkey agarı

50 g kuru besiyeri tartılıp bir kaba konulduktan sonra bir litre distile su içinde bir litre MacConkey agar yapmak için çözülür. 10 dakika dinlendirildikten sonra 1 dakika kaynayıncaya kadar düzenli karıştırılarak ısıtılır. Bundan sonra 20 dakika boyunca 121°C'de bir otoklavda sterilize edilir. Otoklavdan çıkarılır ve steril petri kaplarında laminer akış davlumbazı içinde veya Bunsen beki önünde 45°C'ye kadar soğumaya bırakılır. Kullanıma hazır olana kadar 2-8°C'de ters çevrilmiş bir plaka tutucuda sertleşmesine izin verilir. Proteus cinsinin terlemesini durduran MacConkey agar elde etmek için düşük tuzlu MacConkey agar kullanılır (Al-Sallaqi 2012).

3.6.2.2 Kan agarı

Agarının üretici firmanın talimatları doğrultusunda 15 dakika boyunca 121°C'lik bir sıcaklıkta otoklav ile steril edilir. Daha sonra Kan agar içeriği 50°C'de bir su banyosuna aktarılır ve ortam eklenir. Ortam soğutulduğunda, oda sıcaklığında kan eklenir (kanın iyi sterilize edildiğinden emin olmak için sterilizasyon filtrelenerek yapılır). Sterilize edilmiş kan agarını inkübe etmek için her tabağa 15 mL dökülür. Nem kaybını önlemek için 2 ile 8 santigrat derece sıcaklıkta, tercihen plastik torbalarda 4 hafta boyunca bozulmadan saklanabilir.

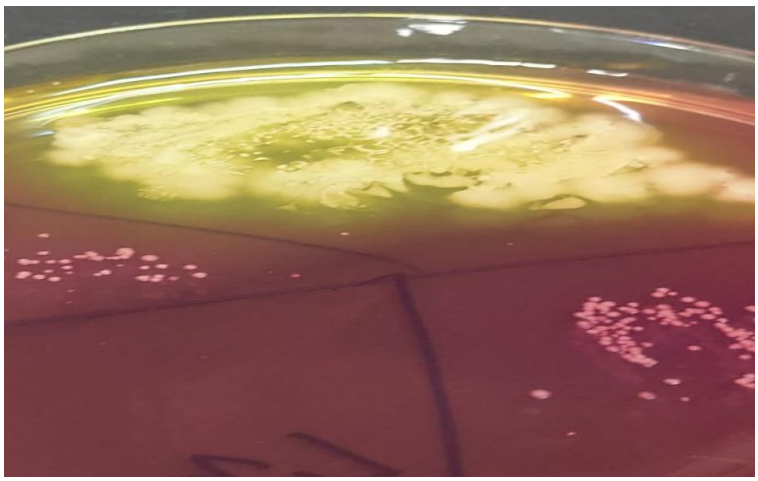
3.6.2.3 Besin agarı

1 litre distile suda çözülmüş 28 g besleyici agar tozu, tüm bileşenleri uygun şekilde çözmek için karıştırılarak ısıtılır. Çözünmüş karışımı 121 santigrat derecede 15 dakika otoklavlanır. Daha sonra agarın soğuması sağlanır ancak otoklavlamadan sonra

sertleşmemesine dikkat edilmelidir. Her plaka besin agarla doldurulur ve agar sertleşene kadar steril bir yüzeyde bekletilir.

3.6.2.4 Mannitol tuzlu agar

Şişe içindeki agar tamamen eriyene kadar (kapak kısmen çıkarılmış) 100°C'de bir su banyosunda çözülür (Şekil 3.1). Ardından kapak kapatılır ve çözünmüş ortam homojenlik açısından inceleyin; eğer öyleyse, şişe ters çevrilir. Ardından 45-50°C'ye soğutulur, köpürmeyi en aza indirmek için iyice karıştırın ve aseptik olarak petri kaplarına dağıtılır. Mannitol fermantasyonu nedeniyle *Staphylococcus aureus*, sarı bir hare ile çevrili yapraklı, pigmentli koloniler üretir. Patojenik olmayan stafilokoklar, besiyerinin rengini değiştirmeyen küçük kırmızı koloniler oluşturur.



Şekil 3.1 Mannitol tuzlu agarda bakteriyel büyüme

3.7 Biyofilm Miktar Tayini

82 örnekten 61'u biyofilm oluşturma duyarlılığı açısından test edildi İzolatlarda biyofilm oluşumunun miktarı mikrotitre plaka testi kullanılarak yapılır. Testler, düz tabanlı ve doku kültürü işlemine sahip 96 oyuklu önceden sterilize edilmiş polistiren mikrotitre plakalarında gerçekleştirilir (Woo *et al.* 2017).

3.8 Genomik DNA Saflaştırma Kiti

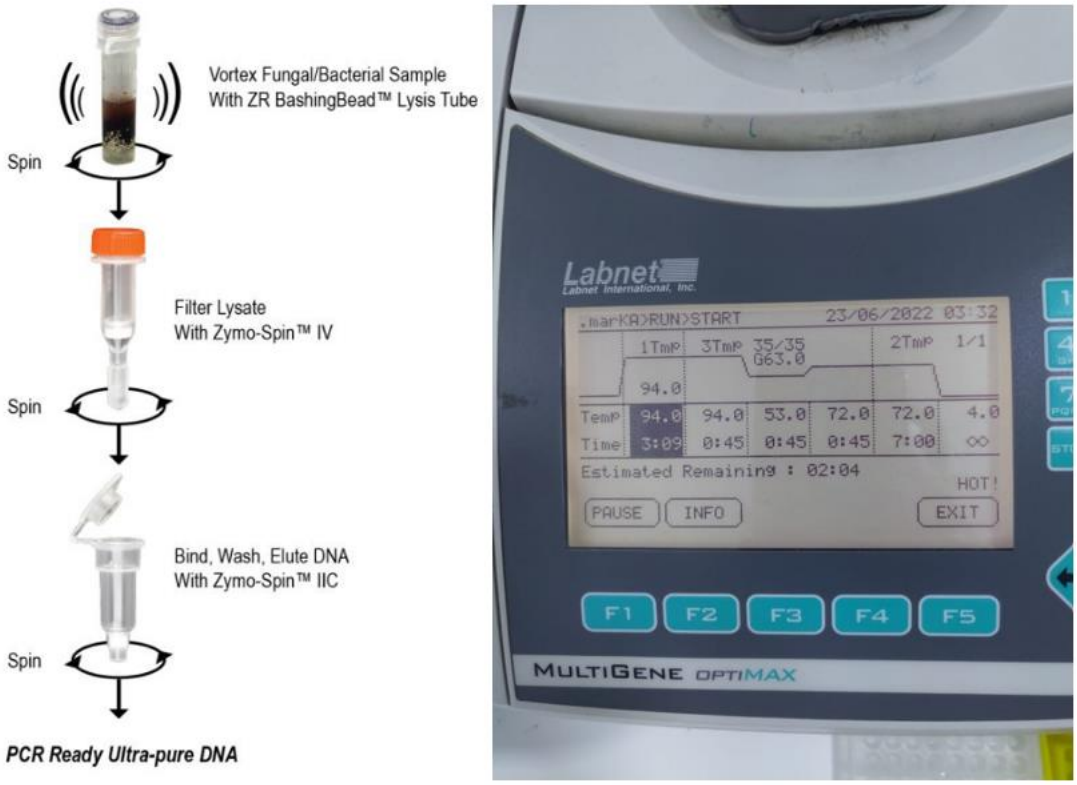
Wizard Genomic DNA Purification Kit, basit bir çözüme dayalı yaklaşım kullanarak beyaz kan hücrelerinden, doku kültürü hücrelerinden, hayvan dokusundan, bitki dokusundan, mayadan ve Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerden DNA'nın izole edilmesini sağlar). Bu teknikle izole edilmiş DNA ile Amplifikasyon, restriksiyon endonükleazları ile sindirim ve membran hibridizasyonları (örneğin, Southern ve dot/slot blots) gerçekleştirmek mümkündür.

3.9 DNA Ekstraksiyonu ve PCR Amplifikasyonu

Optimum performans için, ungal/Bacterial DNA Binding Buffer'a beta-merkaptoetanol (kullanıcı tarafından sağlanır) ilave edilerek nihai seyreltme %0,5 (v/v) yani 100 mL başına 500 µL elde edilir. (Şekil 3.2). Protokolün aşamaları aşağıdadır.

- Bir ZR BashingBead ™ Lizis Tüpüne (0,1 mm & 0,5 mm) 200 µL'ye kadar su veya izotonik tampon (örn. PBS) veya 200 mg'a kadar dokuya yeniden yerleştirilmiş 50-100 mg (ıslak ağırlık) mantar veya bakteri hücresi 2. Tüpe ise 750 µL Lizis Çözeltisi eklenir.
- Tüp, 2 mL'lik bir tüp tutucu düzeneği ile donatılmış bir boncuk çırpıcıya sabitleyin ve ≥5 dakika boyunca maksimum hızda karıştırılır.
- Daha sonra ZR BashingBead™ Lysis Tüp'ü bir mikrosantrifüjde 10,000 xg'de 1 dakika santrifüjlenir.
- 400 µL'ye kadar olan süpernatant Toplama Tüpündeki bir Zymo-Spin IV Spin Filtresine (Turuncu Üst) aktarılır ve 1 dakika boyunca 7,000 x g'de santrifüjlenir.
- 4. Adımdaki Toplama Tüpündeki filtrata 1,200 µL Fungal/Bakteriyel DNA Bağlama Tamponu eklenir.
- Adım 5'teki karışımın 800 µL'sini Toplama Tüpünde bir Zymo-Spin™ IIC Sütunu3'e aktarılır ve 1 dakika boyunca 10,000 x g'de santrifüjlenir.
- Toplama Tüpünden gelen akış atılır ve 6. Adım tekrarlanır.

- Yeni bir Toplama Tüpünde Zymo-Spin™ IIC Sütununa 200 µL DNA Ön Yıkama Tamponu eklenir ve 10,000 xg'de 1 dakika santrifüjlenir.
- Zymo-Spin™ IIC Sütununa 500 µL Fungal/Bacterial DNA Wash Buffer ekleyin ve 1 dakika boyunca 10,000 xg'de santrifüjlenir.
- Zymo-Spin™ IIC Kolonunu 1,5 mL'lik temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılır ve doğrudan kolon matrisine 100 µL (minimum 35 µL) DNA Elüsyon Tamponu eklenir. En son olarak DNA'yı ayrıştırmak için 10,000 xg'de 30 saniye santrifüjlenir (Pournajaf *et al.* 2016).



Şekil 3.2 Optimum durum için Multigene Optimax

3.10 Biyofilm Oluşumunun Kantitatif Tespiti

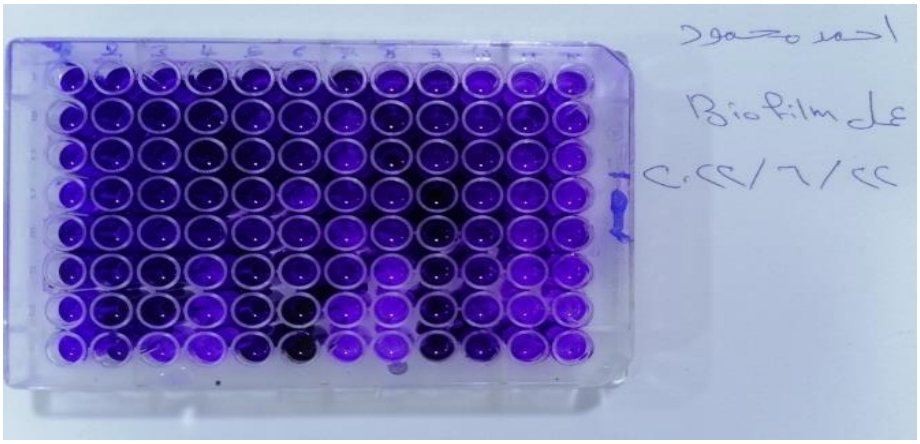
61 numune test edildi, *S. aureus* izolatı mikrotitre plakası (MTP) yöntemi ile biyofilm oluşturma yetenekleri açısından kantitatif olarak taranmış ve (Christensen *et al.* 1985) tarafından modifiye edilmiştir (Merritt *et al.* 2011).

96 mikroplakada biyofilm kültürü

- Plakanın kuyuları 180 µL beyin kalp suyu (BHI) ile doldurulduu. Daha sonra, her bir kuyucuğa 20 µL ayarlanmış 0,5 McFarland bakteri süspansiyonu ilave edildi.
- Her tabakta İnoküle edilen plak bir kapakla kapatıldı ve aerobik olarak 24 saat 37°C statik koşullar altında inkübe edildi (Şekil 3.4).
- İnkübasyondan sonra plak üç kez distile su ile dikkatlice yıkandı ve oda sıcaklığında 15 dakika kurumaya bırakıldı.
- Plaka, oda sıcaklığında 15 dakika boyunca 200 mikrolitre %0,1 kristal viyole solüsyonu ile boyandı.
- Fazla boya distile su ile yıkandı.
- Plaka 20 dakika kurutuldu.
- Yapışık hücre, 200 mikrolitre %95 etanol ile çözündürüldü.
- Her bir kuyunun optik yoğunluğu, mikroplaka okuyucu kullanılarak 630 nm'de okunarak belirlendi.

Verilerin basitleştirilmesi ve hesaplanması için bireyler için elde edilen OD değerlerine dayalı olarak Tablo 2.1'de özetlenen bakteri yapışmasının sınıflandırılması kullanılmıştır (Şekil 3.3).

Negatif kontrolü (OD) belirlemek için aşılanmamış ortam kontrol olarak kullanıldı. Sınır değer (ODc), negatif kontrolün ortalama OD değeri+3×negatif kontrolün standart sapması olarak hesaplanmıştır. Deney her bir suş için ayrı ayrı üç kez tekrarlanmış ve ortalama değerler standart ile hesaplanmıştır (Shevchenko *et al.* 2013).



Şekil 3.3 Mikrotitre Plakasında Biyofilm

Üretilen biyofilm, önceki testten elde edilen oyukların destain'ini gidermek için 250 µL etanol-asetik asit (95:5 hacim/hacim) eklenerek nicelendirildiği, ardından her bir oyuktan 100 µL yeni bir mikrotitre plakasına aktarıldı ve optik yoğunluk (OD) çözeltinin 630 nm dalga boyunda bir mikrotitre plaka okuyucusu kullanılarak ölçüldü (Şekil 3.5) (Şekil 3.6).



Şekil 3.4 İnkübatör DH3600BII



Şekil 3.5 Otomatik ELISA okuyucusu PKL PPC 230



Şekil 3.6 Çok kanallı mikropipet

3.11 Agaroz Jel Elektroforezi

61 izolatı *S. aureus*, Elektroforez, ekstraksiyon işleminden sonra DNA parçalarını belirlemek veya standart DNA'nın mevcudiyeti sırasında PCR etkileşiminin sonucunu saptamak ve Agaroz jel üzerindeki PCR etkileşiminin sonucunun demet boyutunu ayırt etmek için yapılmıştır (Şekil 3.7).

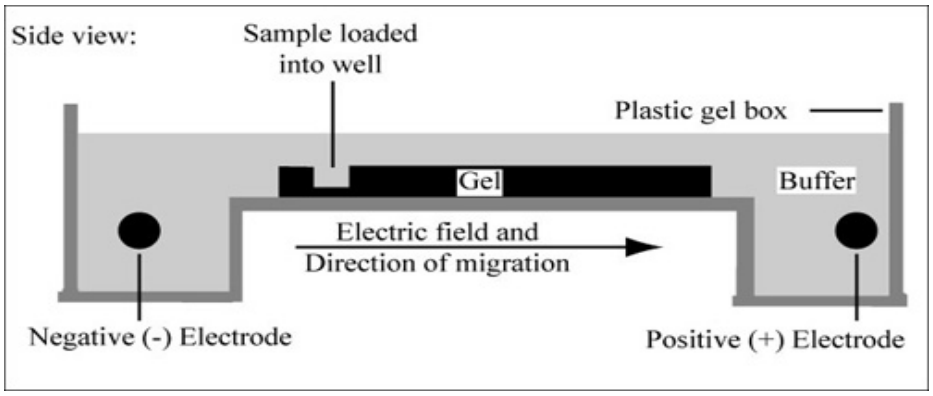
3.12 Agaroz Jelin Hazırlanması

(Sambrook *et al.* 1989)'a göre, agaroz jeli, daha önce yapılmış 100 mL TBE tamponunda 1,5 g agaroz eritilerek %1,5 yoğunlaştırmada yapılmıştır. Agaroz kaynama noktasına kadar ısıtılmış ve daha sonra (45-50^{o}C) soğumaya bırakılmıştır. Jel, numuneleri tutacak delikler açmak için tarak sabitlendikten sonra, agaroz destek plakasının hazırlandığı dökme plakasına dökülmüştür. Jel hava kabarcığı kalmayacak şekilde dökülerek 30 dakika soğumaya bırakılmıştır. Tarak, katı agearozdan dikkatlice çıkarılarak plaka, Elektroforezde kullanılan tankın temsil ettiği Elektroforez yatay ünitesinde standına sabitlenmiştir. Tank, jel yüzeyini kapladığı TBE tamponu ile doldurulmuştur (Şekil 3.8).

3.13 Numunenin Hazırlanması

3 µL işlemci yükleme tamponu (Intron/Kore) 5 µL elektroforez (boya yükleme) olduğu varsayılan DNA ile karıştırılmıştır, karıştırma işleminden sonra artık jelin deliklerine yükleme işlemine geçilmiştir. Tentür jelin diğer tarafına ulaşana kadar 1-2 saat 7 v\c^{2}'lik

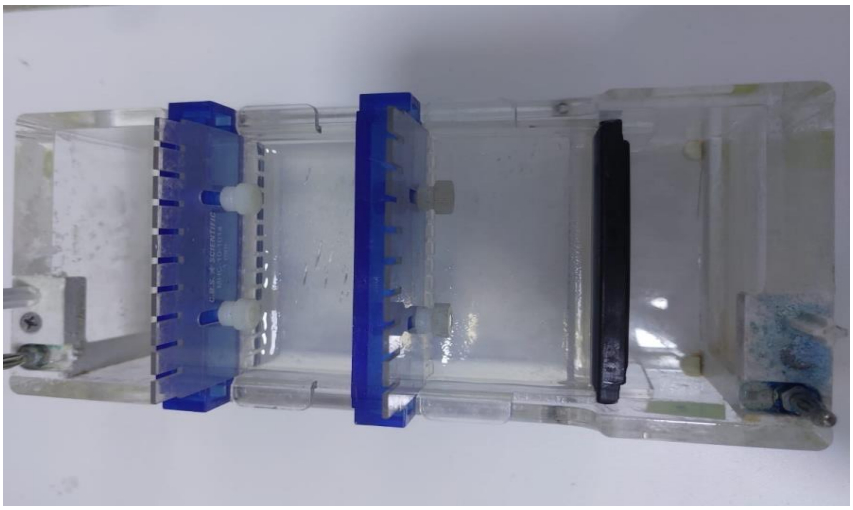
bir Elektrik akımına maruz bırakılmıştır. Jel, 30 µL Kırmızı güvenli Nükleik asit boyama solüsyonu ve distile sudan 500 mL içeren havuza konduktan sonra 336 nm UV kaynağı ile test edilmiştir.



Şekil 3.7 Elektroforez sisteminin çalışması (I)



Şekil 3.8 Elektroforez sisteminin çalışması (II)



Şekil 3.9 Elektroforez sisteminin çalışması (III)

3.14 RedSafe Nükleik Asit Boyama Solüsyonu

RedSafe Nükleik Asit Boyama Solüsyonu (20,000x), agaroz jellerdeki nükleik asidi saptamak için geleneksel etidyum bromür (EtBr) boyamasına bir alternatif olan yeni ve güvenli nükleik asit boyamadır. DNA veya RNA'ya bağlandığında yeşil floresan renk yaymaktadır. Bu boya, biri 309 nm'de ve diğeri 419 nm'de merkezlenmiş nükleik aside bağlandığında iki floresan uyarma maksimumuna sahiptir. Ek olarak, 514 nm'de bir görünür uyarım vardır. DNA'ya bağlı Red Safe'in floresan emisyonu 537 nm'de ortalanır. RedSafe Nükleik Asit Boyama Solüsyonu (20,000x), EtBr kadar hassastır. Red Safe Nükleik Asit Boyama Solüsyonu (20,000x) için boyama protokolü EtBr için olana benzerdir. Güçlü mutajen olarak bilinen EtBr ile karşılaştırıldığında, RedSafe Nükleik Asit Boyama Solüsyonu (20,000x), Ames testinde çok daha az mutasyona neden olur. Ayrıca RedSafe Nükleik Asit Boyama Solüsyonu (20,000x), fare iliği kromofil eritrosit mikronükleus testi ve fare sperma spermatosit kromozomal sapma testinde negatif sonuca sahiptir. Bu nedenle, agaroz jellerdeki nükleik asidi saptamak için EtBr yerine RedSafe Nükleik Asit Boyama Solüsyonu (20,000x) seçmek daha uygundur.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Numunelerin Toplanması

İlk izolasyon sonuçları, kolonilerin nitelikleri göz önüne alındığında toplanan 150 örnekten 82'sinde *Staphylococcus* spp izolatının bulunduğunu göstermiştir. Bu örnekler, monitol tuz agar besiyerinde kültürlendiğinde laktoz fermentasyonu yapabilme özelliğine sahiptir (Şekil 4.1) ve *Staphylococcus* cinsi için seçici ve ayırıcı besiyeri olarak kabul edilen mannitol tuz agarının önemli özelliklerinden biri olan kırmızı zonlu renksiz veya kırmızı koloniler oluşturur (Benson *et al.* 2001). Bazı izolatlar, mannitol şekerini fermente etme ve geniş sarı bölgelerle çevrili büyük altın koloniler oluşturma yeteneğine sahipti ve besiyerinin rengini pembeden sarıya çevirdi. Diğerleri, *S epidermidis* gibi küçük pembe koloniler veya *S kromojenleri* gibi büyük koyu sarı ile koyu turuncu koloniler olarak görünen mannitol non fermentördür ve her iki durumda da orta mikroskobik incelemede renk değişikliği gözlenmemiştir.

Kültür özelliği ve biyokimyasal testler (Çizelge 4.1) sonucunda toplam 150 örnekten 82 izolatın (%54,6) *Staphylococcus* spp pozitif sonuç verdiği gözlemlenmiş olup, bu yüzde bu cinsin diğer patojenler arasındaki önemini açıklamaktadır.

Kan agar plakalarında, *Staphylococcus aureus* kolonileri sıklıkla berrak beta-hemoliz bölgeleriyle çevrilidir. 82 adet *Staphylococcus* spp izolatından oluşan örnekleri Monitol salt ager ile test ettiğimizde, bazı suşların altın görünümlü olduğu tespit edildi ve bu yöntem biyokimyasal testlerde pozitif sonuç veren *Staphylococcus* spp'yi ayırt etmek için kullanıldı (Çizelge 4.2).

Tüm izolatların teşhisinde türler arasında çeşitlilik olduğu gözlemlendi ve en yüksek oran, daha önce yapılmış diğer çalışmalarla uyumlu olarak (Paterson *et al.* 2014), %74,4 (61 izolat) ile *Staphylococcus aureus* olarak tespit edilirken, bunu %14,6 ile (12 izolat) *S. chromogenes* ve %11 (9 izolat) ile *S. epidermidis* takip etti.

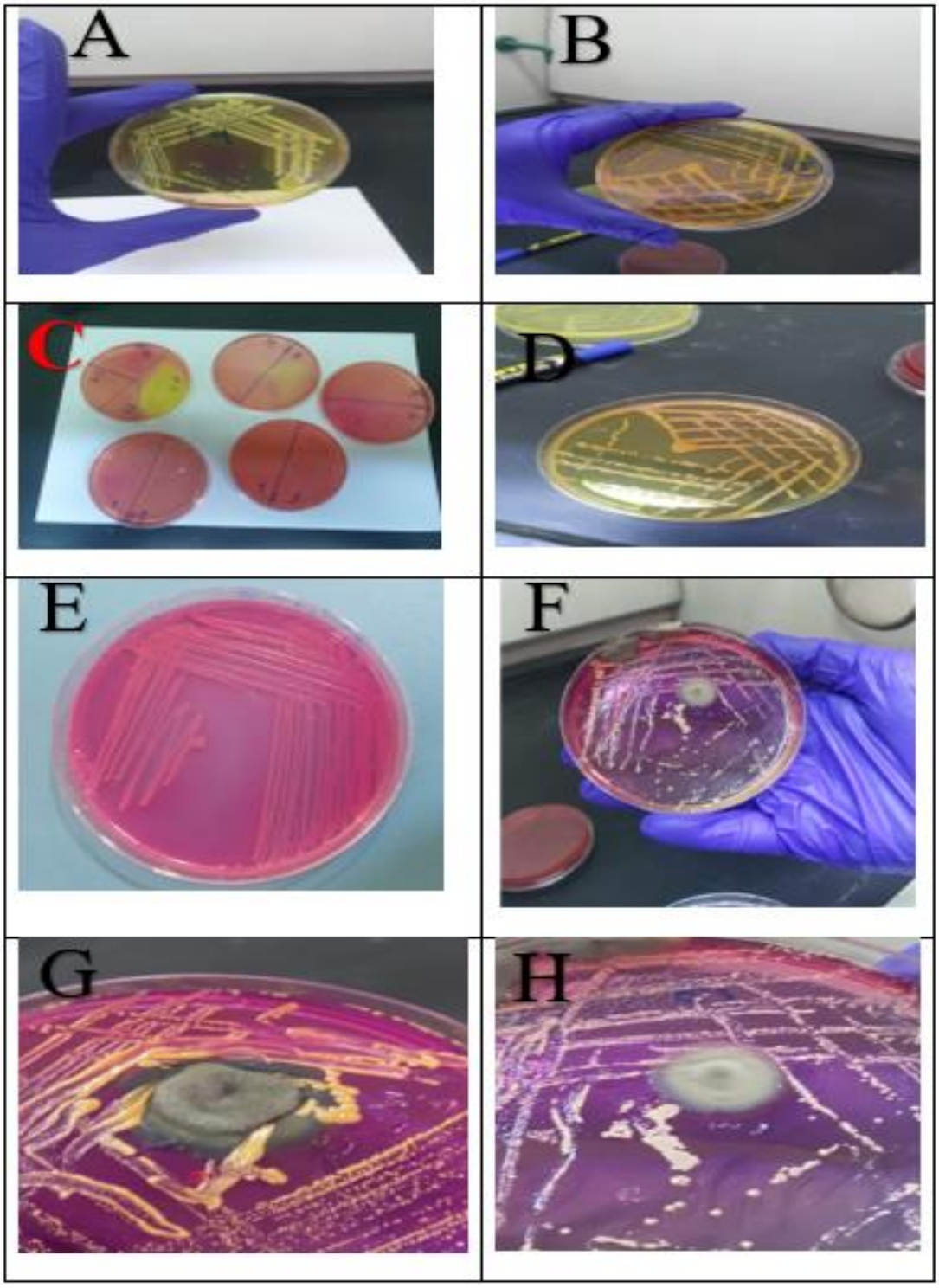
Çizelge 4.1 Monitol tuz ortamı ile teşhis yüzdesi

Kaynak / İzolasyon	İnsan omurilik sıvısı	Süt	Balık	Toplam
Staphylococcus aureus	37	18	6	61 (74%)
S. chromogenes	0	7	5	12 (14%)
S. epidermidis	0	4	5	9 (11%)

Bazı çalışmalar *Staphylococcus aureus*'un klinik olarak izole edilmiş *Staphylococcus* türleri arasında %70 oranında baskın tür olduğunu göstermiştir (Achek *et al.* 2020). Çalışmamızdaki 61 *Staphylococcus aureus* izolatının, yüksek bir yüzdesi insan omurilik sıvısından (37 izolat-% 61), kalanı ise süt (18 izolat-%30) ve balıktan (6 izolat-%10) elde edildi.

Çizelge 4.2 *Staphylococcus* için biyokimyasal testler ve sonuçlar

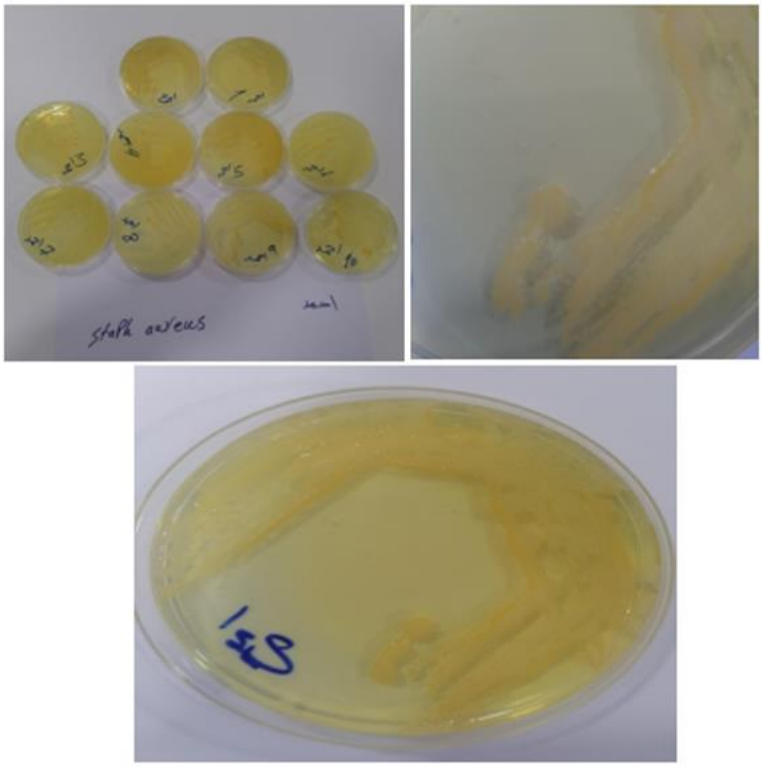
Biyokimyasal testler	**Sonuçlar**		
	S. aureus	***S. chromogenes***	***S. epidermidis***
Gram Boyama	+	+	+
Hareketlilik	-	-	-
Oksidaz	-	-	-
Katalaz	+	+	+
Yüksek İçerikli Ortam Tuzunda Büyüme	+	+	+
Nitrat Kesinti	+	+	+
Asetoin Üretme	+	-	+
Mannitol Fermantasyon	+	+	-
Dnase	+	-	-
Koagülaz	+	-	+



Şekil 4.1 Mannitol tuzlu agar bakteri büyümesi

4.2 Numunelerin Aktivasyonu

DNA ekstraksiyonuna başlamadan önce izolatları besleyici bir besiyerinde kültürleyerek aktive edildi. Besiyeri 28 g tozunun 1000 mL distile suda eritilip 50°C'ye soğutulduktan sonra kaynatılıp otoklavlanarak hazırlanıp, steril plakalara dökülerek kullanılana kadar buzdolabında saklanmıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 Besin agarda bakteriyel büyüme

4.3 Doku Kültürü Plakası (TCP) Kullanılarak Biyofilm Oluşturma Deneyleri

(Hassan *et al.* 2011) tarafından geliştirilen kantitatif testi, biyofilm tespiti için altın standart yaklaşım olarak tanımlamıştır. 82 örnek arasından 61 izolat test edildi *Staphylococcus* örneği, kontamine gıda ve tıbbi kaynaklardan izole edilmiş biyofilmler oluşturma yetenekleri açısından test edilmiştir (Shevchenko *et al.* 2013).

96 mikroplakada biyofilm kültürü: Plakanın çukurcukları, 180 µL beyin kalp suyu (BHI) ile doldurulduu. Daha sonra, her bir çukurcuğa 20 µL ayarlanmış 0,5 McFarland bakteri süspansiyonu ilave edildi. Her plakada; İnoküle edilen plaka kapakla kapatıldı ve aerobik olarak statik koşullar altında 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra plak üç kez damıtık su ile nazikçe yıkandı ve oda sıcaklığında 15 dakika kurumaya bırakıldı.

Plaka, oda sıcaklığında 15 dakika boyunca 200 mikrolitre %0,1 kristal viyole çözeltisi ile boyandı. Fazla boya damıtık su ile yıkandı plaka 20 dak. boyunca kurutuldu. Yapışık hücre 200 mikrolitre etanol %95 ile çözündürüldü. Her bir çukurcuğun optik yoğunluğu, mikroplaka okuyucu kullanılarak 630 nm'de elde edildi.

Kesme değeri (ODc) tüm bakteri izolatları ve negatif kontrol için biyofilm oluşturma kapasitesi hesaplandıktan sonra oluşturulmuştur. Negatif kontrolün ortalama OD'sinin üzerinde üç Standart Sapma (SD) olarak tanımlanır. Kesme değeri=0,197 (kontrol OD 630 artı 3* standart sapmanın ortalaması olarak tanımlanır).

4.4 ELISA Testi Sonuçları

Toplanan 150 örnekten sadece 82 izolat *staphylococcus* spp, 61 izolat *staphylococcus aureus*; 48'i güçlü biyofilm üretti, 13'ü orta düzeydeydi. Biyofilm oluşturan izolat sayısı 48 (%78,6) ve orta düzeyde biyofilm üreten izolat sayısı 13 (%21) idi (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3 Biyofilm sonuçları

	Biyofilm yoğunluğu	**TCP n(%)**
İzolat sayısı (24)	Güçlü	48 (78,6%)
	Orta	13 (21%)
	Zayıf	0

4.5 DNA Ekstraksiyonu

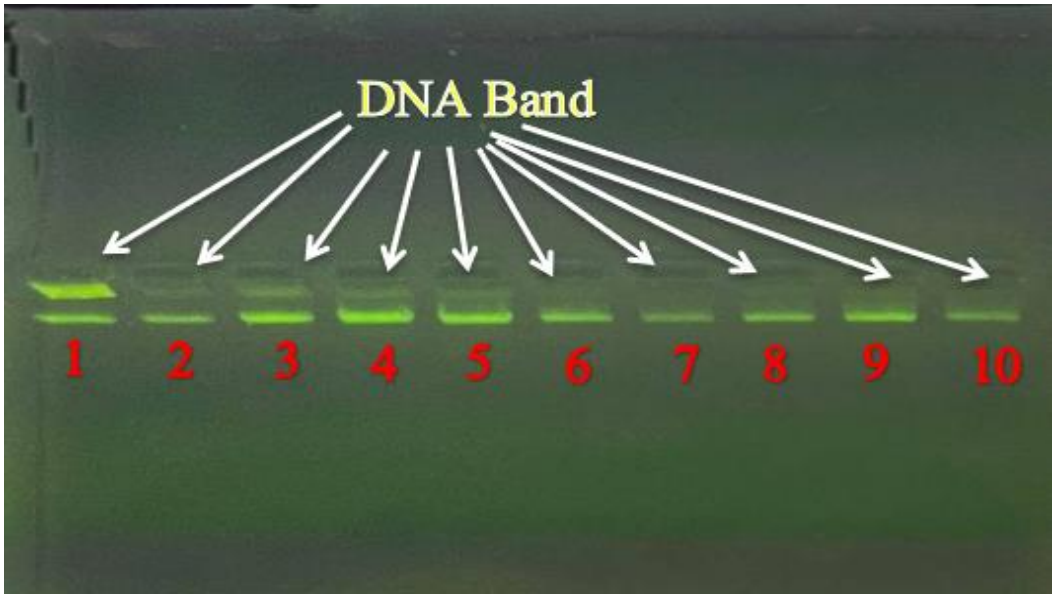
DNA ekstraksiyon kiti Zymo ile 61 (*staphylococcus aureus*) örneğinden DNA ekstrakte edildi. (DNA Mini Kit, ABD, Katalog no: D6005 üreticinin protokolüne göre) (Çizelge 4.4) (Vogelstein and Gillespie 1977). Eno geninin tespiti, eno geninin amplifikasyonu için primerler kullanılarak gerçekleştirildi. 302 bp'lik bir eno parçası, IDT (Integrated DNA Technologies) şirketi tarafından sağlanan bir ileri primer kullanılarak amplifiye edildi (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.4 Kit içeriği

ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ (Kit Boyutu)	**Hacim**	**Depolama sıcaklığı**
ZR BashingBead™ Lysis Tüpleri 1 (0,1 ve 0,5 mm)	50	Oda ısısı
Lizis Çözümü	40 mL	Oda ısısı
Mantar/Bakteriyel DNA Bağlama Tamponu 2	100 mL	Oda ısısı
DNA Ön Yıkama Tamponu 3	15 mL	Oda ısısı
Mantar/Bakteriyel DNA Yıkama Tamponu	50 mL	Oda ısısı
DNA Elüsyon Tamponu	10 mL	Oda ısısı
Zymo-Spin™ IV Döndürme Filtreleri	50	Oda ısısı
Zymo-Spin™ IIC Sütunları	50	Oda ısısı
Toplama Tüpleri	150	Oda ısısı

4.6 PCR Koşullarının Optimizasyonu

İnsan omurilik sıvısından, sütten ve balıktan elde edilen 61 *S. aureus* izolatı besleyici agar ortamında yetiştirdiği bakterileri amaca uygun olarak aktive etti (*Staphylococcus aureus* kolonileri, besin açısından zengin agar besiyeri üzerinde oldukça büyük sarı veya beyaz kolonilerdir). Kolonilere sarı rengi, organizma tarafından üretilen karotenoidler, (Şekil 4.2 A, B, C, D, E) ve ardından DNA ekstraksiyonu verir. PCR kitinin üretici firma talimatlarına göre kullanılmasıyla etkileşim 25 µL hacimde yapıldı. Reaksiyon tamponu, jel yükleme tamponu, dNTP'ler ve Taq polimerazdan oluşan Master Mix'ten 5 µL alındı ve bu, tüm numuneler için sabit hacim olarak kullanıldı. Eno gen 302 bp, Master Mix 5 µL, Forward primer 10 Pico mole, Reverse primer 10 Pico mole, DNA 1,5 µL ve damıtık su. 16,5 µL ve 25 µL değişim koşulunun nihai hacmi kullanıldı. Dökme işlemi, tavlama sıcaklığı, süresi ve döngü sayısının manipülasyonu ve ardından jel elektroforezi yoluyla optimum primer durumuna ulaşmaktı (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 Bakteri numunelerinden genomik DNA ekstraksiyonunun jel elektroforezi, 40 dakika boyunca 5 hacim/cm^2'de %1 agaroz jel

4.7 Etkileşimde Kullanılan Primerler

Primerler liyofilize edildi, stok solüsyonu olarak 100 pmol/µL'lik bir nihai konsantrasyon verecek şekilde serbest ddH_2O içerisinde çözdürüldü ve primer süspansiyon halindeyken 10 pmol/µL konsantrasyon hazırlamak için bir stok -20°Cde saklandı. 10 µL stok solüsyonu, 100 µL nihai hacme ulaşmak için 90 µL serbest ddH_2O su içinde çözdürüldü. IDT (Integrated DNA Technologies company, Canada) kullanılarak araştırıldı.

Çizelge 4.5 Eno geninin spesifik primerleri

Primer	Sekans	Tm (°C)	GK (%)	Ürün boyutu
İleri	5'- ACGTGCAGCAGCTGACT- 3'	54,3	50,0	302 çift bazlı
Tersi	5'- CAACAGGCATYCTTCAGTACCTTC- 3'	49,4	42,1	

4.8 Maxime PCR PreMix Kiti (i-Taq) 20 µL rxn

iNtRON'un Maxime PCR PreMix Kiti, deneyim amacına göre sadece PreMix Kit çeşitlerine değil, aynı zamanda 2X Master mix çözümüne de sahiptir. Maxime PCR Pre Mix Kit (i-Taq), her bileşenin (i-Taq DNA Polimeraz, dNTP karışımı, reaksiyon

tamponu) 1 rxn PCR için tek tüpte karıştırıldığı ve en rahat sistemle en iyi sonucu alabilecek üründür. Bunun ilk nedeni, PCR için tüm bileşenlere sahip olmasıdır, bu nedenle sadece bir şablon DNA, primer seti ve arıtılmış su ekleyerek PCR yapabiliriz. İkinci neden ise elektroforez yapmak için Jel yükleme tamponuna sahip olmasıdır, böylece herhangi bir işlem yapmadan jel yüklemesi yapabiliriz. Bu kit, hızlı ve basit bir şekilde çeşitli numunelerde kullanmaya uygundur.

4.9 Gen Teşhisi

Bu gen, Forward ve Reverse primerlerinden 10 pikomole/µL konsantrasyonunda 1 µL ve DNA şablonundan 1,5 µL kullanıldığında optimal etkileşim koşulunun belirlenmesi yoluyla tanımlanmıştır. Etkileşimi başlatmak amacıyla, bir döngü için 3 dakika boyunca 94°C'lik bir başlangıç sıcaklığının yanı sıra, 40 döngü için 1 dakika boyunca 60°C'lik bir sıcaklık kullanan (García-Fernández *et al.* 2010)'a bağlı olarak 45 saniye boyunca tavlama aşamasında (55°C) kullanılan çeşitli sıcaklıklarda gradyan PCR çalışması yapıldı. Ürün elektriksel olarak ayrıldığında, 302 bp paketi için ürün ve markör DNA'sını gösteren tavlama primerinin optimum sıcaklığının 60°C olduğu ortaya çıktı.

PCR amplifikasyonu, 1,5 µL DNA, 5 µL Taq Master Mix PCR, her bir primer 10 pmol'den 1 µL içeren toplam 25 µL'lik bir hacimde gerçekleştirildi, daha sonra damıtılmış su, toplam 25 µL hacimli bir tüp içine ilave edildi. PCR amplifikasyonu aşağıdaki koşullar altında gerçekleştirildi: 94°C'de 3 dakika, ardından 45 saniye boyunca 94°C'de, bunu takiben 45 saniye boyunca 55°C, 45 saniye boyunca 72°C'de 35 döngü ve Labnet tarafından yapılan bir termal döngüleyici (Çizelge 4.6) kullanılarak 7 dakika boyunca 72°C'lik son bir uzantı yapıldı (Labnet ınternational, Inc, MultiGene OptiMax, Katalog no D600, ABD). PCR ürünleri %1,5 agaroz jel elektroforezi ile ayrıldı ve etidyum bromür boyamadan sonra 302 nm ultra düşük ışığa maruz bırakılarak görselleştirildi (Yong *et al.* 2009).

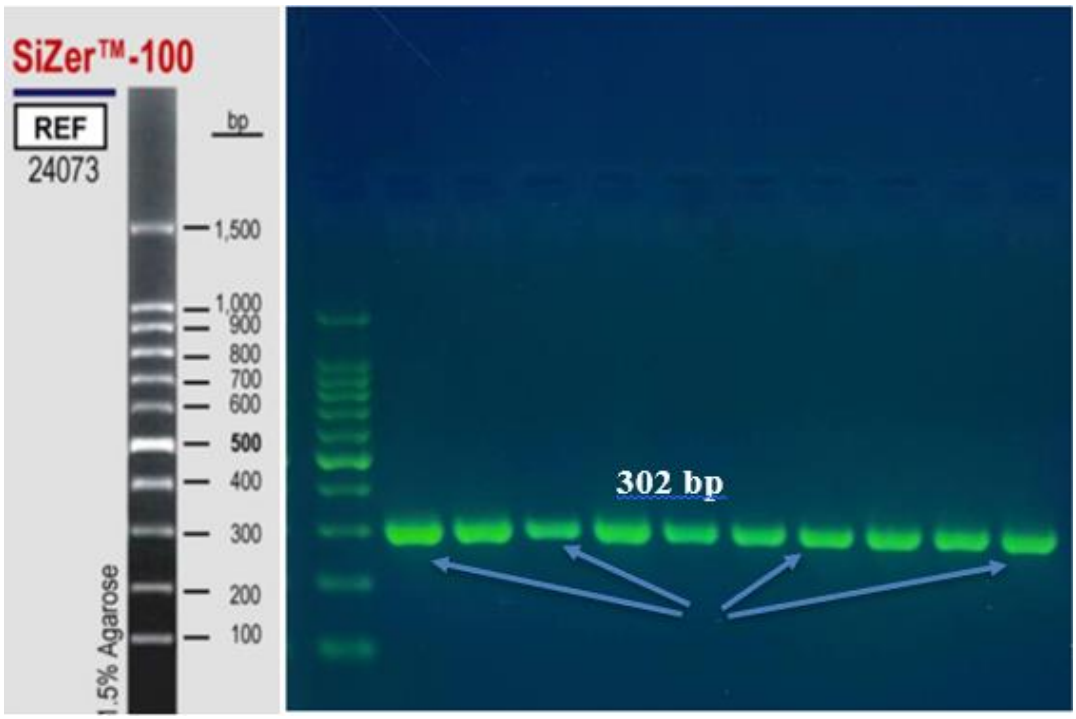
DNA ekstraksiyonundan sonra elektroforez kullanılır. Agaroz jeli, daha önce yapılmış 100 mL TBE tamponunda 1,5 g agaroz eritilerek %1,5 yoğunlaştırmada hazırlanmıştır.

Agaroz kaynama noktasına kadar ısıtılmış ve daha sonra (45-50°C) soğumaya bırakılmıştır.

Laminin bağlayıcı proteini kodlayan eno geninin moleküler tespiti: sonuçlar tüm izolatların eno genine (Şekil 4.4) sahip olduğunu ve tüm bakteri izolatları için aynı seviyede bir demetin ortaya çıkmasıyla 100/100'e ulaştığını göstermiştir. Markör, hacimsel indeks ile karşılaştırıldığında 302 baz çiftinden oluşan demetlerin moleküler ağırlığına eşittir.

Çizelge 4.6 Optimum algılama koşulu

Aşama	**Evre**	**Sıcaklık (°C)**	**Zaman**	**Döngü sayısı**
1-	İlk Denatürasyon	94°C	3 dakika.	1 döngü
2-	Denatürasyon -2	94°C	45sn.	35 döngü
3-	Tavlama	55°C	45sn.	
4-	Uzantı-1	72°C	45sn.	
5-	Uzantı -2	72°C	7 dk.	1 döngü



Şekil 4.4 PCR ürünü bant boyutu 302 bp. Ürün %2 agaroz üzerinde 5 volt:cm^2. 1x TBE tamponunda 1 saat elektroforez yapıldı. N:DNA ladder 100

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Staphylococcus aureus hayvanlarda ve insanlarda çok çeşitli sendromlara neden olabilen zoonotik bir patojendir. Biyofilm üreten *S. aureus*, önemli bir halk ve hayvan sağlığı sorunu olarak kabul edilir. Bu çalışmanın amacı, farklı kaynaklardan izole edilen *S. aureus*'un biyofilm oluşturma yeteneğini araştırmak ve mikrodizi analizi kullanarak biyofilmle ilişkili ve düzenleyici genleri analiz etmektir.

Bu çalışmada, insan izolatlarının %74,4'ü *S. aureus* olup, izolatlar arasında daha sık biyofilm üretebilmiştir. Çalışmamızda, tüm izolatların bir biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olduğu bulunmuştur.

Biyofilmin iki yönü insan enfeksiyonlarının patogenezinde önemli bir rol oynar: birincisi, bakterilerin epitel hücrelerine yapışması, böylece farklı toksinlerin girişini ve salınmasını kolaylaştırır. İkincisi, antimikrobiyal moleküllerin biyofilm matrisine difüzyonunun azalması antibiyotik tedavisinin etkinliğini sınırlar. Ek olarak, gıda endüstrisindeki yüzeylerdeki biyofilmler dezenfektan maddelere karşı direnci arttırmaktadır. *Staphylococcus* türlerinde biyofilm oluşumu kullanılan besiyerinin tipine bağlıdır.

Bu veriler doğrultusunda, birçok antibiyotiğe direnç göstermeleri nedeniyle *Staphylococcus* türlerine karşı korunmaya yönelik bir aşı geliştirilmesi, biyofilm üretiminin artırılması, farklı alanlarda kullanımlarının geliştirilmesi ve son olarak gıda kontaminasyonu konusunda kapsamlı araştırmalar yapılması yönünde çalışmaların arttırılması önerilmektedir

Kontamine olmuş tüm klinik ve gıda örneklerinde *Staphylococcus* türlerinin prevalansı vardır

Staphylococcus aureus izolatlarından DNA ekstraksiyonundan sonra ortaya çıktı. DNA bantları açıkça Şekil 4.3'teki gibidir ve bu, DNA ekstraksiyon çalışmalarımızın doğruluğunu göstermektedir.

PCR ürün bant boyutu 302 bp'dir. Ürün, 1 saat boyunca 5 volt:cm2 1x TBE tamponu içinde %2 agaroz üzerinde elektroforezlendi. (Şekil 4.4)

Çeşitli çalışmalar, *Staphylococcus* bakterilerinin virülans faktörlerinden biri olan eno geni de dahil olmak üzere yapışma süreciyle ilgili bileşikleri kodlayan birçok genin varlığını göstermiştir ve bu, (Ghasemian *et al.* 2015) *S. aureus* bakterilerinin eno genini %59 oranında taşıdığı gerçeğini ortaya koymuştur. Oysa çalışmasında, mastitis ile enfekte olmuş ineklerden izole edilen *S. aureus* bakterilerinin eno genine %100 sahip olduğunu belirtmiştir. Aynı zamanda klinik kaynaklardan izole edilen bakteri izolatlarınında aynı oranlarda eno genine sahip olduğunu ve bunun da genin bakteri izolatları arasında yayılma kabiliyetinden kaynaklandığını belirtmiştir (Kumar *et al.* 2011).

KAYNAKLAR

Achek, R., Hotzel, H., Nabi, I., Kechida, S., Mami, D., Didouh, N., & El-Adawy, H. 2020. Phenotypic and molecular detection of biofilm formation in Staphylococcus aureus isolated from different sources in Algeria. Pathogens, 9(2), 153.

Allesen-Holm, M., Barken, K. B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J. S., Kjelleberg, S., & Tolker-Nielsen, T. 2006. A characterization of DNA release in Pseudomonas aeruginosa cultures and biofilms. Molecular microbiology, 59(4), 1114-1128.

Al-Sallaqi, M. 2012. The Effect of Natural Antimicrobials in Milk on Campylobacter. University of Surrey (United Kingdom).

Archer, N. K., Mazaitis, M. J., Costerton, J. W., Leid, J. G., Powers, M. E., & Shirtliff, M. E. 2011. Staphylococcus aureus biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. Virulence, 2(5), 445-459.

Arciola, C. R., Campoccia, D., & Montanaro, L. 2018. Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion. Nature reviews microbiology, 16(7), 397-409.

Assar, S. H., Moloney, C., Lima, M., Magee, R., & Ames, J. M. 2009. Determination of N ε-(carboxymethyl) lysine in food systems by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry. Amino acids, 36(2), 317-326.

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

Baumann, D. P., & Butler, C. E. 2012. Bioprosthetic mesh in abdominal wall reconstruction. In Seminars in Plastic Surgery (Vol. 26, No. 01, pp. 018-024). Thieme Medical Publishers.

Bazaka, K., Jacob, M. V., Crawford, R. J., & Ivanova, E. P. 2011. Plasma-assisted surface modification of organic biopolymers to prevent bacterial attachment. Acta biomaterialia, 7(5), 2015-2028.

Benson, T. E., Harris, M. S., Choi, G. H., Cialdella, J. I., Herberg, J. T., Martin, J. P., & Baldwin, E. T. 2001. A structural variation for MurB: X-ray crystal structure of Staphylococcus aureus UDP-N-acetylenolpyruvylglucosamine reductase (MurB). Biochemistry, 40(8), 2340-2350.

Bjarnsholt, T. 2013. The role of bacterial biofilms in chronic infections. Apmis, 121, 1-58.

Boyd, A., & Chakrabarty, A. Á. 1994. Role of alginate lyase in cell detachment of Pseudomonas aeruginosa. Applied and environmental microbiology, 60(7), 2355-2359.

Brady, S. M., Orlando, D. A., Lee, J. Y., Wang, J. Y., Koch, J., Dinneny, J. R., & Benfey, P. N. 2007. A high-resolution root spatiotemporal map reveals dominant expression patterns. Science, 318(5851), 801-806.

Carrascosa, C., Raheem, D., Ramos, F., Saraiva, A., & Raposo, A. 2021. Microbial biofilms in the food industry—A comprehensive review. International Journal of Environmental Research and Public Health, 18(04), 2014.

Chen, S. J., Chen, G. H., Chen, Y. H., Liu, C. Y., Chang, K. P., Chang, Y. S., & Chen, H. C. 2010. Characterization of Epstein-Barr virus miRNAome in nasopharyngeal carcinoma by deep sequencing. PloS one, 5(9), e12745.

Cheng, M., Chen, Y., Xiao, W., Sun, R., & Tian, Z. 2013. NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. Cellular & molecular immunology, 10(3), 230-252.

Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. J., Baddour, L. M., Barrett, F. F., Melton, D. M., & Beachey, E. H. 1985. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. Journal of clinical microbiology, 22(6), 996-1006.

Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science, 284(5418), 1318-1322.

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

De Francesco, A. S., Masloboeva, N., Syed, A. K., DeLoughery, A., Bradshaw, N., Li, G. W., & Losick, R. 2017. Genome-wide screen for genes involved in eDNA release during biofilm formation by Staphylococcus aureus. Proceedings of the National Academy of Sciences, 114(29), E5969-E5978.

Delmain, E. A., Moormeier, D. E., Endres, J. L., Hodges, R. E., Sadykov, M. R., Horswill, A. R., & Bayles, K. W. 2020. Stochastic expression of Sae-dependent virulence

genes during Staphylococcus aureus biofilm development is dependent on SaeS. Mbio, 11(1), e03081-19.

Donlan, R. M., & Costerton, J. W. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clinical microbiology reviews, 15(2), 167-193.

Eckhart, L., Fischer, H., Barken, K. B., Tolker-Nielsen, T., & Tschachler, E. 2007. DNase1L2 suppresses biofilm formation by Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus. British Journal of Dermatology, 156(6), 1342-1345.

Flemming, H. C., & Wingender, J. 2010. The biofilm matrix. Nature reviews microbiology, 8(9), 623-633.

Forbes, J. M. 2007. Voluntary food intake and diet selection in farm animals. Cabi.

Foster, D. W., Yeung, N., & Neighbors, C. 2014. I think I can't: Drink refusal self-efficacy as a mediator of the relationship between self-reported drinking identity and alcohol use. Addictive behaviors, 39(2), 461-468.

Foster, T. 1996. Staphylococcus. Medical Microbiology. 4th edition.

García-Fernández, A., Miriagou, V., Papagiannitsis, C. C., Giordano, A., Venditti, M., Mancini, C., & Carattoli, A. 2010. An ertapenem-resistant extended-spectrum-β-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae clone carries a novel OmpK36 porin variant. Antimicrobial agents and chemotherapy, 54(10), 4178-4184.

Ghasemian, A., Peerayeh, S. N., Bakhshi, B., & Mirzaee, M. 2015. The microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMMs) genes among clinical isolates of Staphylococcus aureus from hospitalized children. Iranian journal of pathology, 10(4), 258.

Gibson, R. L., Burns, J. L., & Ramsey, B. W. 2003. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. American journal of respiratory and critical care medicine, 168(8), 918-951.

Gomez, E., Cazanave, C., Cunningham, S. A., Greenwood-Quaintance, K. E., Steckelberg, J. M., Uhl, J. R., & Patel, R. 2012. Prosthetic joint infection diagnosis using broad-range PCR of biofilms dislodged from knee and hip arthroplasty surfaces using sonication. Journal of clinical microbiology, 50(11), 3501-3508.

Grunert, K. G., Sonntag, W. I., Glanz-Chanos, V., & Forum, S. 2018. Consumer interest in environmental impact, safety, health and animal welfare aspects of modern pig

production: Results of a cross-national choice experiment. Meat science, 137, 123-129.

Hassan, A., Usman, J., Kaleem, F., Omair, M., Khalid, A., & Iqbal, M. 2011. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. Brazilian journal of infectious diseases, 15, 305-311.

Herman-Bausier, P., Labate, C., Towell, A. M., Derclaye, S., Geoghegan, J. A., & Dufrêne, Y. F. 2018. Staphylococcus aureus clumping factor A is a force-sensitive molecular switch that activates bacterial adhesion. Proceedings of the National Academy of Sciences, 115(21), 5564-5569.

James, G. A., Swogger, E., Wolcott, R., Pulcini, E. D., Secor, P., Sestrich, J., & Stewart, P. S. 2008. Biofilms in chronic wounds. Wound Repair and regeneration, 16(1), 37-44.

Johnson, A. P., Pearson, A., & Duckworth, G. 2005. Surveillance and epidemiology of MRSA bacteraemia in the UK. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 56(3), 455-462.

Kamaruzzaman, N. F., Kendall, S., & Good, L. 2017. Targeting the hard to reach: challenges and novel strategies in the treatment of intracellular bacterial infections. British journal of pharmacology, 174(14), 2225-2236.

Karygianni, L., Ren, Z., Koo, H., & Thurnheer, T. 2020. Biofilm matrixome: extracellular components in structured microbial communities. Trends in Microbiology, 28(8), 668-681.

Khatoon, Z., McTiernan, C. D., Suuronen, E. J., Mah, T. F., & Alarcon, E. I. 2018. Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. Heliyon, 4(12), e01067.

Kiel, A., Kaltschmidt, B. P., Asghari, E., Hütten, A., Kaltschmidt, B., & Kaltschmidt, C. 2022. Bacterial Biofilm Formation on Nano-Copper Added PLA Suited for 3D Printed Face Masks. Microorganisms, 10(2), 439.

Kot, B., Sytykiewicz, H., & Sprawka, I. 2018. Expression of the biofilm-associated genes in methicillin-resistant Staphylococcus aureus in biofilm and planktonic conditions. International journal of molecular sciences, 19(11), 3487.

Kristian, S. A., Golda, T., Ferracin, F., Cramton, S. E., Neumeister, B., Peschel, A., & Landmann, R. 2004. The ability of biofilm formation does not influence virulence

of Staphylococcus aureus and host response in a mouse tissue cage infection model. Microbial pathogenesis, 36(5), 237-245.

Kumar, R., Varandani, D., Mehta, B. R., Singh, V. N., Wen, Z., Feng, X., & Müllen, K. 2011. Fast response and recovery of hydrogen sensing in Pd–Pt nanoparticle–graphene composite layers. Nanotechnology, 22(27), 275719.

Lewis, K. 2010. Persister cells. Annual review of microbiology, 64, 357-372.

Mann, E. E., Rice, K. C., Boles, B. R., Endres, J. L., Ranjit, D., Chandramohan, L., & Bayles, K. W. 2009. Modulation of eDNA release and degradation affects Staphylococcus aureus biofilm maturation. PloS one, 4(6), e5822.

Merritt, J. H., Kadouri, D. E., & O'Toole, G. A. 2011. Growing and analyzing static biofilms. Current protocols in microbiology, 22(1), 1B-1.

Miao, J., Lin, S., Soteyome, T., Peters, B. M., Li, Y., Chen, H., & Shirtliff, M. E. 2019. Biofilm formation of Staphylococcus aureus under food heat processing conditions: first report on CML production within biofilm. Scientific reports, 9(1), 1-9.

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

Moormeier, D. E., & Bayles, K. W. 2017. Staphylococcus aureus biofilm: a complex developmental organism. Molecular microbiology, 104(3), 365-376.

Morata, L., Mensa, J., & Soriano, A. 2015. New antibiotics against gram-positives: present and future indications. Current opinion in pharmacology, 24, 45-51.

Muhammad, D. H. 2020. Implementasi Pendidikan Humanisme Religiusitas Dalam Pendidikan Pendidikan Agama Islam Di Era Revolusi Industri 4.0. Edumaspul: Jurnal Pendidikan, 4(2), 122-131.

Ning, B., Han, Q. L., & Zuo, Z. 2019. Practical fixed-time consensus for integrator-type multi-agent systems: A time base generator approach. Automatica, 105, 406-414.

Nourbakhsh, F., & Namvar, A. E. 2016. Detection of genes involved in biofilm formation in Staphylococcus aureus isolates. GMS Hygiene and infection control, 11.

O'Neill, B., Pulver, S., VanDeveer, S., & Garb, Y. 2008. Where next with global environmental scenarios?. Environmental Research Letters, 3(4), 045012.

Otto, K. 2008. Volumetric modulated arc therapy: IMRT in a single gantry arc. Medical physics, 35(1), 310-317.

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

Pierson, C. L., & Friedman, B. A. 1992. Comparison of susceptibility to beta-lactam antimicrobial agents among bacteria isolated from intensive care units. Diagnostic microbiology and infectious disease, 15(2 Suppl), 19S-30S.

Pournajaf, A., Rajabnia, R., Sedighi, M., Kassani, A., Moqarabzadeh, V., Lotfollahi, L., & Irajian, G. 2016. Prevalence, and virulence determination of Listeria monocytogenes strains isolated from clinical and non-clinical samples by multiplex polymerase chain reaction. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 49, 624-627.

Rani, S. A., Pitts, B., Beyenal, H., Veluchamy, R. A., Lewandowski, Z., Davison, W. M., & Stewart, P. S. 2007. Spatial patterns of DNA replication, protein synthesis, and oxygen concentration within bacterial biofilms reveal diverse physiological states. Journal of bacteriology, 189(11), 4223-4233.

Reffuveille, F., Josse, J., Vallé, Q., Gangloff, C. M., & Gangloff, S. C. 2017. Staphylococcus aureus Biofilms and their Impact on the Medical Field. The rise of virulence and antibiotic resistance in Staphylococcus aureus, 11, 187.

Resende, P. C., Naveca, F. G., Lins, R. D., Dezordi, F. Z., Ferraz, M. V. F., Moreira, E. G., & Wallau, G. L. 2021. The ongoing evolution of variants of concern and interest of SARS-CoV-2 in Brazil revealed by convergent indels in the amino (N)-terminal domain of the Spike protein. Virus evolution, 7(2), veab069.

Rice, K. C., Mann, E. E., Endres, J. L., Weiss, E. C., Cassat, J. E., Smeltzer, M. S., & Bayles, K. W. 2007. The cidA murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in Staphylococcus aureus. Proceedings of the National Academy of Sciences, 104(19), 8113-8118.

Rocha, L. S., Silva, D. M., Silva, M. P., Vidigal, P. M. P., Silva, J. C. F., Guerra, S. T., & Ribon, A. D. O. 2019. Comparative genomics of Staphylococcus aureus associated with subclinical and clinical bovine mastitis. PLoS One, 14(8), e0220804.

Saha, S., Chakraborty, M., Padhan, D., Saha, B., Murmu, S., Batabyal, K., & Bell, R. W. 2017. Agronomic biofortification of zinc in rice: Influence of cultivars and zinc application methods on grain yield and zinc bioavailability. Field Crops Research, 210, 52-60.

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

Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W., & Davies, D. G. 2002. Pseudomonas aeruginosa displays multiple phenotypes during development as a biofilm.

Shevchenko, E. K., Makarevich, P. I., Tsokolaeva, Z. I., Boldyreva, M. A., Sysoeva, V. Y., Tkachuk, V. A., & Parfyonova, Y. V. 2013. Transplantation of modified human adipose derived stromal cells expressing VEGF165 results in more efficient angiogenic response in ischemic skeletal muscle. Journal of translational medicine, 11(1), 1-18.

Tang, Y. W., Kilic, A., Yang, Q., McAllister, S. K., Li, H., Miller, R. S., & Limbago, B. 2007. StaphPlex system for rapid and simultaneous identification of antibiotic resistance determinants and Panton-Valentine leukocidin detection of staphylococci from positive blood cultures. Journal of clinical microbiology, 45(6), 1867-1873.

Toth, A. L., Varala, K., Newman, T. C., Miguez, F. E., Hutchison, S. K., Willoughby, D. A., & Robinson, G. E. 2007. Wasp gene expression supports an evolutionary link between maternal behavior and eusociality. Science, 318(5849), 441-444.

Touhami, A., Jericho, M. H., & Beveridge, T. J. 2004. Atomic force microscopy of cell growth and division in Staphylococcus aureus. Journal of bacteriology, 186(11), 3286-3295.

Vogelstein, B., & Gillespie, D. 1977. RNA-DNA hybridization in solution without DNA reannealing. Biochemical and Biophysical Research Communications, 75(4), 1127-1132.

Woo, S. G., Lee, S. Y., Lee, S. M., Lim, K. H., Ha, E. J., & Eom, Y. B. 2017. Activity of novel inhibitors of Staphylococcus aureus biofilms. Folia microbiologica, 62(2), 157-167.

Wu, J., & Belmonte, J. C. I. 2015. Dynamic pluripotent stem cell states and their applications. Cell stem cell, 17(5), 509-525.

Yong, D., Toleman, M. A., Giske, C. G., Cho, H. S., Sundman, K., Lee, K., & Walsh, T. R. 2009. Characterization of a new metallo-β-lactamase gene, bla NDM-1, and a

novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in Klebsiella pneumoniae sequence type 14 from India. Antimicrobial agents and chemotherapy, 53(12), 5046-5054.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Ahmed Mahmood Hussein HUSSEIN

Eğitim

Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2022
Lisans	Bağdat Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2015-2019