ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

STAPHYLOCOCCUS AUREUS İZOLATLARININ BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER OLARAK TANIMLANMASI, PVL GENİNİN SAPTANMASI

Dhuha Yahya Raheem RAHEEM

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

CANKIRI
2023

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Dhuha Yahya Raheem RAHEEM, tarafından hazırlanan **"*Staphylococcus aureus* İzolatlarının Biyokimyasal ve Moleküler Olarak Tanımlanması, PVL Geninin Saptanması"** adlı tez çalışması 13/01/2023 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 AL-SAMARIA

Jüri Üyeleri :

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

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Hayrettin SAYGIN
Moleküler Biyoloji
Ondokuz Mayıs Üniversitesi

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 "***Staphylococcus aureus* İzolatlarının Biyokimyasal ve Moleküler Olarak Tanımlanması, PVL Geninin Saptanması**" 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 (13/01/2023).

Dhuha Yahya Raheem RAHEEM

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

STAPHYLOCOCCUS AUREUS İZOLATLARININ BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER OLARAK TANIMLANMASI, PVL GENİNİN SAPTANMASI

Dhuha Yahya Raheem RAHEEM

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Şeçil AKILLI ŞİMŞEK
Eş Danışman: Prof. Dr. Najwa Shihab Ahmed AL-SAMARIA

Bu çalışma, Irak hastanelerindeki yara ve yanık hastalarında *Staphylococcus aureus*'un antibiyotik direnci ile ilgili risk faktörlerini belirlemeyi ve bu virülansı PVL geni ile ilişkilendirmeyi amaçlamaktadır. Al-Yarmuk Genel Eğitim ve Bağdat Tıp Şehri Hastanesi'nde yanık ve yara enfeksiyonu olan hastalardan 200 klinik örnek alınmıştır. Bunların incelenmesi sonucunda 103 örnekte *S. aureus* belirlenmiştir. 50 örnek biyokimyasal olarak test edilirken kalan 53'ü VITEK2 sistemi kullanılarak tanımlanmıştır. VITEK2 sisteminde antimikrobiyal duyarlılık testi için dört antibiyotik kullanılmıştır. İncelenen izolatların, Sefoksitin (% 100), Benzilpenisilin (% 96,2), Oksasilin (% 94,3) dirençli ve Gentamisin'e (% 96,2) duyarlı olduğunu ve tüm izolatların Metisiline Dirençli olduğu tespit edilmiştir. 16S rRNA geninin saptanması ve PVL virülans geni'nin saptanması için 53 izolatta *Staphylococcus aureus*'un moleküler tanımlaması için geleneksel PCR yapılmıştır. Bunun sonucunda test edilen izolatlarda 16S rRNA (% 100) ve PVL (% 35,8) agaroz jelde görüntülenmiştir. Daha sonra 16SrRNA geni için 12 bakteri izolatına ve PVL geni için 5 bakteri izolatına dizileme uygulanmış, ve NCBI'deki dizilim 16S rRNA geni %99 ve PVL geni %99 özdeşliklerini göstermiştir. Daha sonra Gerçek zamanlı PCR uygulandı. PVL prevalansı %41.5 idi. PVL'nın kat geni ekspresyonu 2,1, 16S rRNA'nın ise 0,8 olarak bulunmuştur. PVL önceki çalışmalara göre MRSA klinik izolatlarında daha yüksek prevalansa sahip olduğu ve MRSA'nın virülans ve patojenitesini arttırdığı, ayrıca bu MRSA'ların test edilen antibiyotiklere karşı yüksek çoklu ilaç direncine sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

2023, 67 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: *Staphylococcus aureus*, PVL geni, 16S rRNA, MRSA

ABSTRACT

Master of Science Thesis

BIOCHEMICAL AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLATES, DETECTION OF PVL GENE

Dhuha Yahya Raheem RAHEEM

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

Advisor: Prof. Dr. Şeçil AKILLI ŞİMŞEK
Co-Advisor: Prof. Dr. Najwa Shihab Ahmed AL-SAMARIA

This study aimed to identify the risk factors for wounds and burns patients in Iraq hospitals by antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus*, and relate that virulence to their associated with PVL gene. 200 clinical samples were taken from patients with burns and wound infections at Al-Yarmuk General Education and Baghdad Medical City Hospital. As a result of their examination, *Staphylococcus aureus* was determined in 103 samples. While 50 samples were tested biochemically, the remaining 53 were identified using the VITEK2 system. Four antibiotics were used for antimicrobial susceptibility testing in the VITEK2 system. It was determined that the examined isolates were resistant to Cefoxitin (100 %), Benzylpenicillin (96.2 %), Oxacillin (94.3 %) and sensitive to Gentamicin (96.2 %), and all isolates were Methicillin-Resistant. Conventional PCR was performed for the molecular identification of *S. aureus* in 53 isolates for the detection of the 16S rRNA gene and the detection of the PVL virulence gene. As a result, 16S rRNA gene (100 %) and PVL gene (35.8 %) were visualized on agarose gel in tested isolates. Then, sequencing was applied to 12 bacterial isolates for the 16SrRNA gene and 5 bacterial isolates for the PVL gene, which gave positive results for two genes, and the alignment in the NCBI showed identities of 16SrRNA gene 99% and PVL gene 99% with global isolates of *Staphylococcus aureus*. Real-time PCR was applied for the detection of PVL genes in 53 isolates. The prevalence of the PVL gene was 41.5%. The fold gene expression of the PVL gene was 2.1 and the 16SrRNA was 0.8. In this study, it was concluded that the PVL virulence gene, which has a role in leukocyte lysis and tissue necrosis, has a higher prevalence in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates compared to previous studies and increases the virulence and pathogenicity of MRSA, as these MRSA had high multidrug resistance to the tested antibiotics.

2023, 67 pages

Keywords: *Staphylococcus aureus*, PVL gene, 16S rRNA, MRSA

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 Şeçil AKILLI ŞİMŞEK ve Prof. Dr. Najwa Shihab Ahmed AL-SAMARIA 'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dhuha Yahya Raheem RAHEEM
Çankırı, Ocak 2023

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **iii**
İÇİNDEKİLER ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **vi**
KISALTMALAR DİZİNİ ..... **vii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **viii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **x**
1. GİRİŞ **1**
2. LİTERATÜR ÖZETİ **3**
2.1 *S. aureus*'un Genel Tanımı **3**
2.2 *S. aureus* Genomu **4**
2.3 Epidemiyoloji **5**
2.4 *S. aureus'un* Patogenezi **6**
2.5 Metisiline Dirençli *S. aureus* **7**
2.6 Virülans Faktörleri **8**
2.6.1 Hücre yüzeyi ile ilgili faktörler **9**
2.6.2 Hücre dışı enzimler **9**
2.6.3 Toksinler **10**
2.7 Panton-Valentine Lökosidin (PVL) Geni **11**
2.8 16S rRNA Geni **13**
3. MATERYAL VE METOT **15**
3.1 Materyal **15**
3.1.1 Laboratuvar ekipmanları **15**
3.1.2 Kimyasallar ve solüsyonlar **16**
3.1.3 Kitler **16**
3.1.4 Kültürel ortamlar **16**
3.1.5 Primerler **17**
3.1.6 Çözücüler **18**
3.1.7 Kültür ortamları **19**

3.2 Yöntem **20**
3.2.1 Numune toplanması **20**
3.2.2 *S. aureus'un* tanımlaması **20**
3.2.3 Moleküler tanı **23**
4. BULGULAR VE TARTIŞMA **31**
4.1 *S. aureus*'un İzolasyonu ve Tanımlanması **31**
4.2 Mikroskobik İnceleme **32**
4.3 Biyokimyasal Test Sonuçları **33**
4.4 *S. aureus* İzolatları için Antimikrobiyal Duyarlılık Testi **35**
4.5 *S. aureus*'un Moleküler Tanısı **36**
4.5.1 *S. aureus* izolatlarından DNA ekstraksiyonu **36**
4.5.2 PCR ile *S. aureus* izolatlarından 16S rRNA ve PVL genlerinin tespiti **37**
4.5.3 Gen dizileme **39**
4.5.4 PVL gen ifadesinin tahmini **49**
5. SONUÇ VE ÖNERİLER **54**
KAYNAKLAR **55**
ÖZGEÇMİŞ **67**

SİMGELER DİZİNİ

bp	Baz çifti
°C	Santigrat derece
CFU	Koloni oluşturma birimi
CT	Eşik döngüsü
dk	Dakika
g	Gram
Ib/In²	İnç kare başına pound
Kb	Kilobaz
L	Litre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Millimeters
ng	Nanogram
pg	Petagram
pmol	Pikomol
Vol	Voltaj
xg	Merkezkaç kuvveti anlamına gelir
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
ΔCT	Delta CT
ΔΔCT	Delta delta CT
%	Yüzde
*	Önemli

KISALTMALAR DİZİNİ

16S rRNA	16S ribozomal RNA
agr	Yardımcı gen düzenleyiciye
AST	Antimikrobiyal duyarlılık testi
CA-MRSA	Toplumla ilişkili Metisiline duyarlı Staphylococcus aureus
CC30	Klonal kompleks 30
cDNA	Tamamlayıcı DNA
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
HA-MRSA	Sağlık bakımıyla ilişkili Metisiline duyarlı Staphylococcus aureus
H.K.G	Temizlik geni
MDR	Çoklu ilaç direnci
MGEs	Mobil genetik elemanlardan
MR	Metil Kırmızısı
mRNA	Mesajcı RNA
MRSA	Metisiline duyarlı staphylococcus aureus
MSA	Mannitol tuzlu ağar
MSCRAMMs	Yapışkan matris moleküllerini tanıyan mikrobiyal yüzey bileşenleri
NCBI	Ulusal biyoteknoloji bilgi merkezi
ORFs	Açık okuma çerçevesi
PBP2a	Penisilin bağlayıcı protein 2a'yı
PCR	Polimeraz zincirleme tepkimesi
PMN	Polimorfonükleer nötrofil
PVL	Panton-Valentine lökositin
qRT–PCR	Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR
RNA	Ribonükleik asit
RQ	Nispi niceleme
S. aureus	*Staphylococcus aureus*
SCCmec	Stafilokokal kaset kromozomal mec'in
SD	Standart sapma
TBE	Tris-borat-EDTA
TSS	Toksik şok sendromu
TSST	Toksik şok sendromu toksini
TSST-1	TSS toksin-1
UV	Ultraviyole
VP	Voges-Proskauer

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 *S. aureus'un* virülans faktörlerini gösteren grafik. Panel A, büyüme fazına göre yüzeyi ve üretilen proteinleri gösterir. Panel B ve C, hücre zarfının enine kesitlerini göstermektedir. Şekil (Lowy 1998)'den alınmıştır 11
Şekil 2.2 Doku nekrozunu başlatmak için PVL modeli (Boyle-Vavra and Daum 2007) 12
Şekil 3.1 VITEK 2 sistemi 22
Şekil 4.1 Mannitol tuzlu agarda *S. aureus* üremesi 31
Şekil 4.2 Mannitol tuzlu agarda *S. aureus* üremesi 32
Şekil 4.3 Kanlı agarda *Staphylococcus aureus* üremesi 32
Şekil 4.4 Gram boyama ile *S. aureus* tanımlaması 33
Şekil 4.5 VITEK 2 GP sisteminde *S. aureus* izolatlarının tanımlanması 35
Şekil 4.6 % 1 agaroz jel elektroforezi kullanan PCR ürünü (genomik DNA) 36
Şekil 4.7 *S. aureus* 16S rRNA geninin geleneksel PCR amplifikasyon ürünleri 1-25 37
Şekil 4.8 *S. aureus* 16S rRNA geninin geleneksel PCR amplifikasyon ürünleri 26-53 . 38
Şekil 4.9 *S. aureus* PVL geninin geleneksel PCR amplifikasyon ürünleri 38
Şekil 4.10 16S rRNA geninin 1 numaralı izolat için hizalama sonuçları ID: MK000713.1 40
Şekil 4.11 16S rRNA geninin 2 numaralı izolatının hizalama sonuçları ID: MW453043.1 41
Şekil 4.12 16S rRNA geninin 3 numaralı izolatının hizalama sonuçları ID: MK000713.1 41
Şekil 4.13 16S rRNA geninin 4 numaralı izolatının hizalama sonuçları ID:MK000713.1 42
Şekil 4.14 16S rRNA geninin 5 numaralı izolat için hizalama sonuçları ID: MK000713.1 42
Şekil 4.15 16S rRNA geninin 6 numaralı izolat için hizalama sonuçları ID: KP728240.1 43
Şekil 4.16 16S rRNA geninin 7 numaralı izolat için hizalama sonuçları ID: KY971290.1 43
Şekil 4.17 16S rRNA geninin 7 numaralı izolat için hizalama sonuçları ID: KY971290.1 44
Şekil 4.18 16S rRNA geninin 9 numaralı izolat için hizalama sonuçları ID: KY971290.1 44
Şekil 4.19 16S rRNA geninin 10 numaralı izolat için hizalama sonuçları:ID KY971290.1 44
Şekil 4.20 16S rRNA geninin 11 numaralı izolatı için hizalama sonuçları ID: KY971290.1 45
Şekil 4.21 16S rRNA geninin 12 numaralı izolat için hizalama sonuçları ID: KY971290.1 46
Şekil 4.22 PVL geninin 1 numaralı izolatı için hizalama sonuçları ID: AP023034.1 47

Şekil 4.23 PVL geninin 2 numaralı izolatı için hizalama sonuçları ID: CP038229.1.....47
Şekil 4.24 PVL geninin 3 numaralı izolat için hizalama sonuçları ID: AP023034.1.....47
Şekil 4.25 PVL geninin 4 numaralı izolatı için hizalama sonuçları ID: AP023034.1.....48
Şekil 4.26 PVL geninin 5 numaralı izolatı için hizalama sonuçları ID: CP038229.1.....48
Şekil 4.27 RT-qPCR ile PVL amplifikasyonu 54

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan cihazları ve araçları 15
Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan kimyasallar 16
Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan kitlar 16
Çizelge 3.4 Çalışmada kullanılan kültür besiyerleri 17
Çizelge 3.5 Çalışmada kullanılan primerler 17
Çizelge 3.6 Gen ekspresyonu için primerler 17
Çizelge 3.7 Klinik kaynaklar ve izolat sayısı 20
Çizelge 3.8 Maxime PCR PreMix tüpleri (i-Taq) içindekiler 25
Çizelge 3.9 16S rRNA'nın PCR aşamaları 25
Çizelge 3.10 PVL geninin PCR aşamaları 26
Çizelge 3.11 cDNA Sentezi için reaksiyon bileşenleri ve hacmi 28
Çizelge 3.12 Gen ifadesi için reaksiyon bileşenleri ve hacmi 29
Çizelge 3.13 qRT-PCR aşamaları ve sıcaklığı 29
Çizelge 3.14 qRT-PCR aşamaları ve sıcaklığı 30
Çizelge 3.15 qRT-PCR aşamaları ve sıcaklığı 30
Çizelge 4.1 *S. aureus* izolatları için kültürel testlerin pozitif sonuçları 31
Çizelge 4.2 *S. aureus* izolatlarının biyokimyasal test sonuçları 34
Çizelge 4.3 VITEK Sistemi sonuçlarına göre antimikrobiyal duyarlılık testi 36
Çizelge 4.4 16S rRNA geni için hizalama ve konum varyasyonları analizi 39
Çizelge 4.5 PVL geni için hizalama ve varyasyon analizi 46
Çizelge 4.6 *S. aureus* klinik izolatları için 16SrRNA ve PVL genlerinin Ct değerleri ve katı gen ekspresyonu 48

1. GİRİŞ

S. aureus, ışık mikroskobunda incelendiğinde üzüm salkımına benzeyen yapıdaki bakterilerdir. Bu bakteriler Gram pozitif olup büyüklüğü 0,5-1,5µm'dir (Brooks 2007; Budiarso *et al.* 2019). *S. aureus* hareketsizdir ve spor üretmezler. Birkaçı, onları kapsüllenmemiş suşlardan çok daha öldürücü yapan kapsüller veya psödokapsüller oluşturmaktadır. Aerobik solunum veya fermantasyon yoluyla üreyen fakültatif anaeroblar (Holt *et al*. 1994). Aynı zamanda çok hızlı bulaşabilen bir patojendir (Kluytmans *et al.* 1997). Özellikle hastane ve halk arasında çok çabuk yayılım göstermesi nedeniyle en tehlikeli bakteriyel enfeksiyonlardan biri olarak bilinmektedir (Valaperta *et al.* 2010). Bu bakterier, folikülit, impetigo dahil çok çeşitli hastalıklar geliştirebilir (Dhawan *et al.* 2015), apse üretebilir, kan dolaşımı yoluyla yayılabilir (bakteremi) (Fowler *et al.* 2006), kalp kapakçıklarına zarar verebilir (endokardit) (Fernández Guerrero *et al.* 2009) pnömoni (Gillet *et al.* 2002), kemiklerlerde hasar (osteomyelitis) (Elasri *et al.* 2002), idrar yolu enfeksiyonları ve hatta menenjite neden olabilir (Sibbald *et al.* 2006). *S. aureus*'un neden olduğu çok çeşitli hastalıklar, yüzeylere yapışmasına, bağışıklık sistemine nüfuz etmesine veya bağışıklık sisteminden kaçmasına ve konak için zararlı toksik sonuçlara neden olmasına izin veren çeşitli virülans faktörlerinden kaynaklanmaktadır (Holmes *et al.* 2005; Gordon and Lowy 2008).

Metisiline duyarlı *S. aureus* enfeksiyonlarına kıyasla, metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) enfeksiyonları daha yüksek ölüm oranı ile ilişkilidir (Cosgrove *et al.* 2003). Hastane enfeksiyonlarının en yaygın nedenidir (Šiširak *et al.* 2010). Bu bakterinin çoklu ilaç direnci MRSA suşlarında yaygın olarak görülmektedir. Bu rurum aynı zamanda tedavi başarısızlığının ve maliyet artışlarının da başlıca nedenidir (Köck *et al.* 2010).

*S. aureus'*taki ana virülans faktörlerinden biri Panton-Valentine lökositin PVL'dir. Konağın sitoplazmik zarına giren ve bir gözenek oluşturmak için hetero-oligomerize olan iki üretilen proteine (LukF-PV ve LukS-PV) bağımlı olan iki bileşenli bir sitolizindir (Kaneko and Kamio 2004). Sitolizinler, ciddi nekrotizan pnömoni ve enfeksiyöz cilt enfeksiyonlarına yol açan lökositler için yüksek bir afiniteye sahiptir (Foster 2005).

Ayrıca kalsiyum kanal aktivasyonuna ve gen transkripsiyon değişikliklerine neden olmaktadır (O'Hara *et al.* 2008).

Araştırmalara göre, toplum kökenli MRSA izolatlarının % 77'sinde luk-pv bulunurken, hastane kökenli MRSA izolatlarının sadece % 4'ünde bulunmaktadır (Yoong and Torres 2013). PVL, önemli bir *S. aureus* toksini ve akut *S. aureus* enfeksiyonlarının epidemiyolojik bir biyolojik belirteci olduğu için araştırmacılar tarafından çok ilgi görmektedir (Vandenesch *et al.* 2003).

Bu çalışma, Irak hastanelerindeki yara ve yanık hastalarında *S. aureus*'un antibiyotik direnci ile ilgili risk faktörlerini belirlemeyi ve bu virülansı PVL geni ile ilişkilendirmeyi amaçlamaktadır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 *S. aureus*'un Genel Tanımı

S. aureus, 1881'de cerrah olan Sir Alexander Ogston tarafından ilk defa tanımlanmıştır. Ameliyat sonrası yarası olan kişilerin pürülan akıntılarını mikroskop altında inceledikten sonra, üzüm benzeri bakteri kümelerini fark ederek belirlediği bu yapıya Yunanca bir üzüm salkımı anlamına gelen staphylé adını vermiştir. Daha sonra 1884'te Rosenbach, apsedeki sarı bakteri kolonilerini izole etmiş ve ona Latince "altın" anlamına gelen "aureus" kelimesini ekleyerek *S. aureus* adını bilimsel olarak tanımlamıştır (Fluit *et al.* 2003).

Stafilokoklar, ışık mikroskobu altında üzüm salkımına benzeyen ve yaklaşık 0,5-1,5 μm büyüklüğünde olan gram pozitif koklardır (Brooks 2007; Budiarso *et al.* 2019). Stafilokoklar hareketsizdir ve spor üretmezler. Birkaçı, onları kapsüllenmemiş suşlardan çok daha öldürücü yapan kapsüller veya psödokapsüller oluşturmaktadır. Aerobik solunum veya fermantasyon yoluyla üreyen fakültatif anaeroblar. Katalaz pozitif ve sitokromlar normalde mevcuttur, oksidaz negatif olsa da, genellikle nitratı nitrite ve ara sıra serbest nitrojene dönüştürür, lizostafin enzimine duyarlıdır ve sert çevre koşullarına toleranslıdır (Holt *et al.* 1994; Prescott 2002). *Staphylococcus* 36 türü ve birçok alt türü olan bir cinstir (Götz *et al.* 2006).

S. aureus, S.epidermidis ve *S.saprophyticus*, klinik öneme sahip en yaygın olarak kabul edilen türlerdir. DNA-DNA hibridizasyon verilerine dayalı olarak, birçok *Staphylococcus* türü, gruplar halinde sınıflandırılmıştır (Morello *et al.* 2004). *S. aureus,* fibrinojeni birleştirip ve onu çözünmeyen fibrine dönüştüren ve agregasyona neden olan koagülaz pozitifdir (Götz *et al.* 2006). *S. aureus* tipik olarak mannitolü fermente eder (Thakur *et al.* 2017), ve hücre duvarına kovalent olarak entegre edilmiş bir antifagositik virülans faktörü olan protein A'ya sahiptir (Uebele *et al.* 2020). Stafilokoklar, aerobik veya mikrofilik ortamlarda kolayca çoğalırlar ve 10-45°C (ideal: 30-37°C) arasında değişen sıcaklıklarda yüksek konsantrasyonda tuz (örneğin % 10 Sodyum klorür) içeren

ortamlarda ve 4,2-9,3 (optimum PH 7,0-7,5) arasında değişen PH oranlarında büyüyebilirler (Collins 1981).

Stafilokoklar karbonhidratları fermente eder ve beyazdan zengin sarıya kadar değişen pigmentleri serbest bırakır; bunlar normalde 37 °C'de 18 ile 24 saatlik büyümeden sonra görülür, ancak kültürleri 24 ile 48 saat daha oda sıcaklığında tutulduğunda ve ortamda gliserol monofosfat veya monoasetat olduğunda daha da belirgindir. Anaerobik veya sıvı kültürlerde genellikle pigment oluşmaz (Brooks *et al.* 2007). Katı besiyerinde koloniler küresel, pürüzsüz, kabarık ve çok canlı bir görünüme sahiptir. *S. aureus* kolonileri genellikle gri ile altın sarısı renktedir (Riedel *et al.* 2019). *S. aureus* opaktır, 1 ile 3 mm çapındadır ve kanlı agarda kültürlendiğinde kremsi sarı bir renk alır. Kolonilerin çevresinde yaygın olarak beta hemolitik bölgeler tespit edilir (Cogen *et al.* 2007).

S. aureus bakterilerinin hücre duvarı, peptidoglikan ve teikoik asit kopolimerinden oluşan çok katmanlı (20-40 nm) bir yapıdır (Shockman and Barrett 1983). Peptidoglikan, hücre duvarının ağırlıkça % 50'sini sağlayan 1, 4 β-bağlı N-asetil glikoz amin ve N-asetil muramik asitin tekrarlanan şeker birimlerinden oluşan bir polimerdir (Murray *et al.* 2020). Teikoik asitler ise hücre duvarı ağırlığının yaklaşık % 40'ını oluşturan fosfat içeren ve peptidoglikanın muramik asit kalıntısına kovalent olarak bağlı tekrarlanan alditol fosfat gruplarından oluşan bir anyonik polimerdir (Knox ve Wicken 1973).

2.2 *S. aureus* Genomu

Stafilokok genomu 2509 ile 2892 açık okuma çerçevesi (ORF'ler) içeren çift sarmallı dairesel molekülüdür. İki alana bölünmüştür: "çekirdek genom" ve "aksesuar genom". Çekirdek alan, genellikle *S. aureus* suşları arasında korunan genleri içerir (Shittu *et al.* 2007). Genler, *S. aureus* genomunun yaklaşık % 75'ini oluşturan dikey olarak iletilen çekirdek alanda bulunur. (Chan *et al.* 2006). DNA replikasyonu, protein sentezi ve çekirdek metabolik vb. dahil olmak üzere kritik hücre süreçleri için gerekli olan tüm temizlik genlerini içerir. Toksinler, ekzoenzimler ve kapsül biyosentetik grubu, genomdaki virülansa yol açan aktiviteleri kodlayan genlerden sadece birkaçıdır. Virülans gen seti çok değişkendir (Shittu *et al.* 2007).

Aksesuar genom, *S. aureus* genomunun % 25'ini oluşturan ikinci alandır. Aksesuar genom, büyük ölçüde, gelişme ve hayatta kalma için gerekli olan çok çeşitli temel olmayan bileşenleri kodlayan mobil genetik elemanlardan (MGE'ler) oluşur. Patojenite adaları, bakteriyofajlar, kromozomal kasetler, genomik adalar, plazmitler ve transpozonlar bu elementlerin örnekleridir. Bu elementlerin çoğu, klinik olarak önemli suşlar arasında yatay olarak iletilen virülans ve antibiyotik direnç faktörlerini kodlar. (Lindsay ve Holden 2004; Shittu *et al.* 2007). Aksesuar genomu büyük ölçüde değişir. Yeni genleri kolayca kazanma veya kaybetme kapasitesi nedeniyle, gelişmiş virülans ve antibiyotik direnci özelliklerine sahip daha yeni suşların geliştirilmesinde önemli bir faktördür. Aksesuar genomlarındaki çeşitlilik, *S. aureus* genomları arasında 2,8 ile 3,0 bp arasında değişen boyut farklılıklarına neden olmaktadır (Chan *et al.* 2006). Bu durum, antibiyotik direnci veya toksisitesindeki varyasyonları açıklayabilir yine de, bu unsurların tümü hareketliliklerini koruyamaz (Lindsay ve Holden 2004).

2.3 Epidemiyoloji

S. aureus, insan vücudunun hemen her yerinde bulunabilen yaygın bir deri bakterisidir (Lowy 1998). Sonuç olarak, deri veya mukozal yüzey yaralanmalarının bir sonucu olarak kolonize edici suş genellikle steril bir bölgeye ulaştığında enfeksiyon ortaya çıkabilir. Örneğin kalıcı kateterler, deriye veya mukozal yüzeye zarar vererek enfeksiyonların girmesine izin veren müdahaleci bir tedavidir. Bunlar arasında cerrahi, hemodiyaliz ve futbolcular gibi yakın temas sporlarına katılanların yanı sıra mahkumlar gibi birbirine yakın yerlerde yaşayanlar yer almaktadır (Kluytmans *et al.* 1997). Bir yaralanma veya cilt kırılması meydana geldiğinde, taşıyıcılık durumu, enfeksiyonların ilerlemesi ile güçlü bir şekilde bağlantılı olarak tanımlanmaktadır. Nazal olarak *S. aureus* ile kolonize olduğu bildirilen bir hastanın ameliyat sonrası stafilokokal yara enfeksiyonu edinme şansı kolonize olmayan bir hastaya göre çok daha fazladır (Donker *et al.* 2012). Burunda *S. aureus* varlığı enfeksiyonun epidemiyolojisi ve patogenezinde önemli bir rol oynamaktadır (Kluytmans *et al.* 1997; Corne *et al.* 2005).

Amerika Birleşik Devletleri'nde 1998'den 2005'e kadar laboratuvar tabanlı bir izlemede, *S. aureus*, kökeni ne olursa olsun hasta izolatlarından tanımlanan en yaygın tür (tüm

bakteri izolatlarının yüzde 18,7'si) ve dışarıdan tanımlanan en yaygın ikinci tür (yüzde 14,7) olarak tespit edilmiştir (Styers *et al.* 2006). İnsanlarda hastaney ile ilişkili suşlar tüm ülkelerde yaygın olmakla birlikte, fakat (örneğin, birkaç İskandinav ülkesinde) nadir olabilir. Halk arasında bulunan suşlar, Kuzey Amerika gibi bazı bölgelerde yaygındır, ancak diğerlerinde nadirdir (Abdulgader *et al.* 2015).

Coğrafi bölgede MRSA'nın epidemiyolojik olarak anlaşılması, özellikle hastane ortamında antibiyotik kullanımı ve enfeksiyon kontrol stratejileri hakkında faydalı bilgiler verecektir. Iraklı hastalar ve sağlık çalışanları arasında Metisiline dirençli *S. aureus* prevalansının yüksek bulunması, *S. aureus* burun taşıyıcılığının yaygın bir sağlık sorunu olduğunu düşündürmektedir. Bu nedenle, MRSA yayılımıyla yüzleşmek için halk sağlığı uzmanları ve diğer sağlık profesyonelleri, hastane temizlik uygulamalarının ve antimikrobiyal ilaçların işlevini kavramalıdır (Al-Dahbi ve Al-Mathkhury 2013).

2.4 *S. aureus'un* Patogenezi

S. aureus, hastane ve toplum ortamındaki en tehlikeli bakteriyel enfeksiyonlardan biridir (Valaperta *et al.* 2010). *S. aureus'*un neden olduğu enfeksiyonlar İnsanların yaklaşık % 20'si sürekli olarak nazal olarak *S. aureus* ile kolonize olurken, % 30'u aralıklı olarak kontaminedir (Gordon ve Lowy 2008). Bu bakterilerin ürettiği enfeksiyonlar, epidermal veya mukozal tabakanın oluşturduğu bariyeri virülans faktörleri aracılığıyla aşmayı başarırlarsa geniş kapsamlıdır (Dubrac *et al.* 2008; Cheng *et al.* 2009).

S. aureus folikülit ve impetigo dahil olmak üzere lokalize cilt enfeksiyonları yaratmaktadır (Dhawan *et al.* 2015). Ayrıca apse oluşturabilir ve kan dolaşımına yayılabilir (bakteriyemi) (Fowler *et al.* 2006), kalp kapakçıklarına zarar verir (endokardit) (Fernández Guerrero *et al.* 2009) pnömoni (Gillet *et al.* 2002), kemikler (osteomyelitis) (Elasri *et al.* 2002), idrar yolu enfeksiyonları ve son derece nadir durumlarda menenjite neden olabilir (Sibbald *et al.* 2006).

S. aureus ayrıca genellikle kateterle ilişkili enfeksiyonlar ve cerrahi yara enfeksiyonları ile bağlantılıdır. Aslında, intravasküler kateterlerin neden olduğu enfeksiyonlar, nozokomiyal bakteriyeminin önde gelen nedenidir (Eggimann ve Pittet 2002).

S. aureus'un bir biyofilm matrisi oluşturma kapasitesi, insan immünolojik tepkisine direnmesine izin vererek onu opsonizasyon, fagositoz ve antibakteriyel ajanlara karşı korumaktadır (Snowden 2016). Toksik şok sendromu (TSS), gıda zehirlenmesi gibi toksin aracılı enfeksiyonlara sırasıyla TSS toksin-1 (TSST-1) ve enterotoksin üreten *S. aureus* suşları neden olmaktadır. TSS, yüksek sıcaklık, hipotansiyon, deride pullanma ve organ sistemi arızası gibi semptomlarla karakterize ciddi bir multisistem hastalığıdır (Dinges *et al.* 2000).

2.5 Metisiline Dirençli *S. aureus*

Metisilin, penisiline direnç kazandıran bir penisilin yapısal modifikasyonunun bir sonucu olarak 1950'lerin sonlarında ortaya çıkan penisilinin yarı sentetik bir türevidir. Metisilin, diğer penisilinlerin etki şekline benzer şekilde bakteri hücre duvarı oluşumunu engelleyerek bakterileri öldürmektedir (Boswihi ve Udo 2018). Metisilinin ilk klinik kullanımından sonraki bir yıl içinde, metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) keşfedildi ve genomik bilgilere göre metisilin direnci, anti-stafilokokal penisilinlerin ilk klinik kullanımından önce var olmuş olabileceğini gösterdi (Harkins *et al.* 2017). İlk olarak 1960'larda hastanede yatan hastalardan alınan klinik izolatlarda keşfedildi ve 1990'lardan itibaren toplumda hızla yayıldı (Tenover *et al.* 2006).

Metisilin direnci, stafilokokal kaset kromozomal mec'in (SCCmec) yatay transferi ile elde edilen mecA ile sağlanmaktadır (Katayama *et al.* 2000). Metisilin direnci belirleyici mecA'yı içeren bir genomik adanın edinilmesinden sonra, metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA), metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) geliştirdi (Chongtrakool *et al.* 2006). Bu gen (mecA), bakteri hücre duvarı içindeki peptidoglikanların çapraz bağlanmasından sorumlu bir enzim olan penisilin bağlayıcı protein 2a'yı (PBP2a) kodlamaktadır. PBP2a, β-laktam antibiyotikler için zayıf bir afiniteye sahiptir ve bu, onun tüm sınıfına karşı dirence yol açmaktadır (Hartman ve Tomasz 1984). Bu nedenle, çoklu ilaç direnci MRSA

suşlarında özellikle yaygındır ve terapötik başarısızlığın ve maliyet artışlarının başlıca nedenidir (Köck *et al.* 2010). Metisiline duyarlı *S. aureus* enfeksiyonlarına kıyasla , MRSA enfeksiyonları daha yüksek ölüm oranı ile ilişkilidir (Cosgrove *et al.* 2003). Ayrıca hastane enfeksiyonlarının en yaygın nedeni metisiline dirençli *S. aureus*'tur (MRSA) (Šiširak *et al.* 2010). Metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) her yıl yalnızca Avrupa'da yaklaşık 171,000 istilacı enfeksiyondan sorumludur (Anonymous 2009).

MRSA enfeksiyonu tüm dünyada yaygındır, ancak tek bir pandemik suş yoktur. Bunun yerine, MRSA, art arda ortaya çıkan baskın suşlarla enfeksiyon dalgalarında kendini gösterme eğilimindedir. Kuzey Amerika ve Avrupa'da sağlık bakımıyla ilişkili MRSA (HA-MRSA) klonal kompleks 30 (CC30), Kuzey Amerika'da toplumla ilişkili MRSA (CA-MRSA) USA300 ve Avustralya'da hayvancılıkla ilişkili MRSA (ST398 dahil) ve ST93 ortaya çıkan MRSA suşlarının son örnekleridir (David *et al.* 2014).

2.6 Virülans Faktörleri

S. aureus enfeksiyonları, yüzeylere yapışmasına, bağışıklık sistemine nüfuz etmesine veya bağışıklık sistemine kaçmasına ve konak için zararlı toksik sonuçlara neden olmasına izin veren çeşitli virülans faktörleri tarafından üretilmektedir (Holmes *et al.* 2005, Gordon ve Lowy 2008).

S.aureus virülans faktörleri çoğunlukla üç gruba ayrılır:

- Hücre yüzeyine bağlı proteinler (MSCRAMM'ler (yapışkan matris moleküllerini tanıyan mikrobiyal yüzey bileşenleri) ve diğer yüzey elemanları (hücre duvarı peptidoglikan ve polisakarit kapsülü),
- Koagülaz ve stafilokinaz gibi hücre dışı enzimleri,
- Hemolizinler, lökosidinler, Panton Valentine Lökosidin (PVL) ve toksik şok sendromu toksini (TSST) gibi toksinler (Archer 1998).

2.6.1 Hücre yüzeyi ile ilgili faktörler

S. aureus suşlarının çoğu, patojeniteye yardımcı olan bir kapsüler polisakkarit oluşturmaktadır. Kapsül, bakteri hücrelerinin birbirine yapışması, doku ve tıbbi aletleri barındırması için gereklidir. Ayrıca kapsül fagositozu baskılar ve antibiyotiklerin bakteri hücre yüzeyine ulaşmasını engellemektedir (Lowy 1998). Yapışkan matris moleküllerini (MSCRAMM'ler) tanıyan mikrobiyal yüzey bileşenleri adı verilen çok sayıda yüzey proteinine (protein A, kollajen bağlayıcı proteinler, fibronektin bağlayıcı proteinler ve fibrinojen bağlayıcı proteinleri) sahiptir. Bu moleküller, bakterinin konak dokuları istila etme yeteneği için önemlidir (Foster ve Hook 1998; Gordon ve Lowy 2008).

MSCRAMM'ler ayrıca doğuştan gelen bağışıklık sisteminden kaçınmaya ve demir emilimini artırmaya yardımcı olabilir (Foster 2005). MSCRAMM'ler, konakçı ve protez yüzeylerde biyofilmlerin (balçık) üretimine yardımcı olarak, konakçı bağışıklık sisteminden ve antimikrobiyallerden kaçmasına izin vererek kolonizasyonda önemli bir işlevi varmış gibi görünmektedir. Ek olarak, MSCRAMM protein A, Fc reseptör aracılı opsonofagositozu önleyerek Fc bölgeleri aracılığıyla immünoglobulinleri bağlayabilir (Donlan ve Costerton 2002; Gordon ve Lowy 2008).

2.6.2 Hücre dışı enzimler

S. aureus tarafından üretilen hücre dışı enzimler enfeksiyon yoluyla proteazlar, hemolizinler, lipazlar, DNaz, nükleazlar, hiyalüronidaz, koagülazlar ve kolejazlar. Bu proteinlerin birincil rolü, lokal konak dokuları bakteriyel büyüme için gerekli besinlere dönüştürmek olabilir (Dinges *et al.* 2000; Brooks *et al.* 2007). Bazı enzimlerin ise patojenitede çok önemli bir rolü olduğu öne sürülmüştür. Örneğin proteaz, antikor blokajının yanı sıra konakçı bağışıklık sistemi peptitlerinin inaktivasyonunda yer alabilir. Hiyalüronidaz, bağ dokusundaki hyaluronik asidi parçalayarak ve bu şekilde dokuyu yok ederek bakteri üremesini arttırmaktadır. Lipaz, bakterileri inhibe etmek için tasarlanmış yağ asitlerini baskılayarak konakçı bağışıklık tepkisini etkileyebilir (Murray *et al.* 2003). Aynı zamanda, fibrinojeni fibrine dönüştürebilen bir stafilotrombin kompleksi oluşturmak için kandaki protrombin ile birleşen enzim benzeri bir protein olan koagülaz

üretmektedir (Lowy 1998). Koagülaz, *Staphylococci* yüzeyinde potansiyel olarak fagositik hücre alımını veya bu hücrelerin içindeki ölümünü etkileyen fibrin biriktirebilir (Brooks *et al.* 2007). *S. aureus* tarafından üretilen bir diğer temel enzim, β-laktam antibiyotik direnci için çok önemli olan β-laktamazlardır (Lowy 1998).

2.6.3 Toksinler

S.aureus, etki mekanizmalarına göre sınıflandırılan çeşitli sitotoksinler üretmektedir. Hemolizinler (alfa, beta, gama ve delta), kırmızı kan hücreleri ve trombositler dahil olmak üzere çeşitli konakçı hücreleri parçalayan porin benzeri toksinlerdir (Dinges *et al.* 2000).

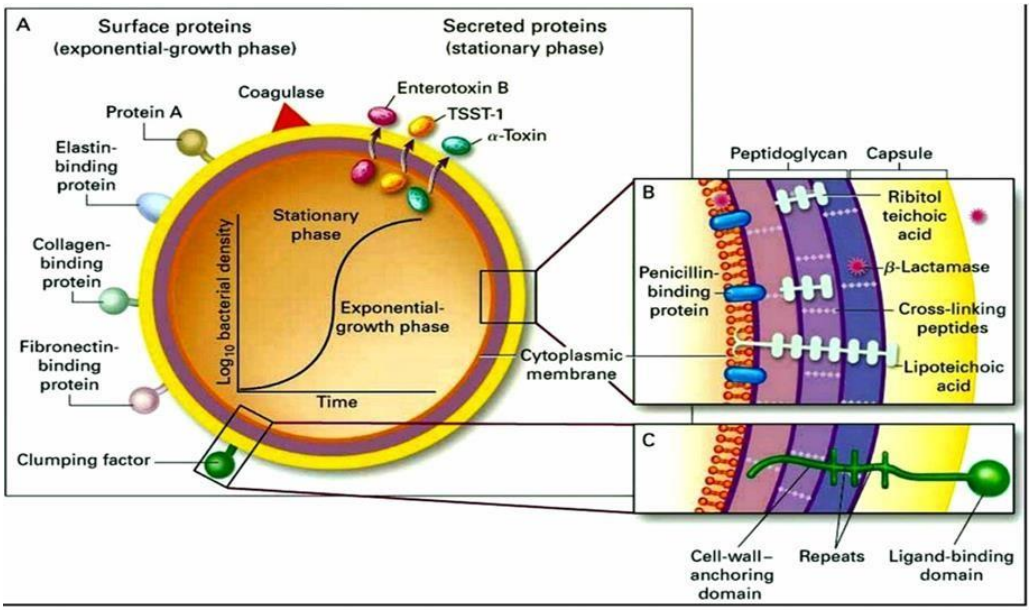
S.aureus'taki diğer bir ana virülans faktörü olan Panton-Valentine lökosidin PVL, bir gözenek oluşturmak üzere konakçının sitoplazmik zarına giren üretilen iki proteine (LukF-PV ve LukS-PV) bağlı olması nedeniyle iki bileşenli bir sitolizin olarak kategorize edilir (Kaneko ve Kamio 2004). Ciddi nekrotizan pnömoni ve enfeksiyöz cilt enfeksiyonlarına yol açan lökositler için yüksek bir afiniteye sahiptir (Foster 2005).

Enterotoksinler (SEA, SEB, SECn, SED, SEE, SEG, SEH ve SEI), toksik şok sendromu toksini-1 (TSST-1) ve eksfolyatif toksin (A,B) de *S. aureus* tarafından salgılanır. Bu toksinler gıda zehirlenmesi, toksik şok sendromu ve eksfolyatif dermatit (haşlanmış cilt sendromu) gibi hastalıklara neden olabilir (Baker ve Acharya 2004).

Yardımcı gen düzenleyiciye (agr) dayalı bir çekirdek algılama sistemi, *Staphylococcal* virülans faktörlerini doğru bir şekilde düzenlemektedir. Bu düzenleyiciler, *S. aureus'*ta virülans genlerinin ekspresyonunu kontrol eden temel bir ağın parçasıdır. Tek bir virülans geni, genin yalnızca ortam uygun olduğunda ifade edilmesini garantilemek için "çapraz konuşma" yapan birçok düzenleyici tarafından etkilenebilir (Projan *et al.* 1997).

MSCRAMM'ler, organizmanın doku konumlarını kolonize etmesine yardımcı olmak için üstel büyüme fazı boyunca ifade edilirken, salgılanan enzimler ve

toksinler, organizmanın yayılmasına yardımcı olmak için durağan faz boyuncadaha sonra üretilmektedir (Şekil 2.1) (Gordon ve Lowy 2008).



Şekil 2.1 *S. aureus'un* virülans faktörlerini gösteren grafik. Panel A, büyüme fazına göre yüzeyi ve üretilen proteinleri göstermektedir. Panel B ve C, hücre zarfının enine kesitlerini göstermektedir (Lowy 1998).

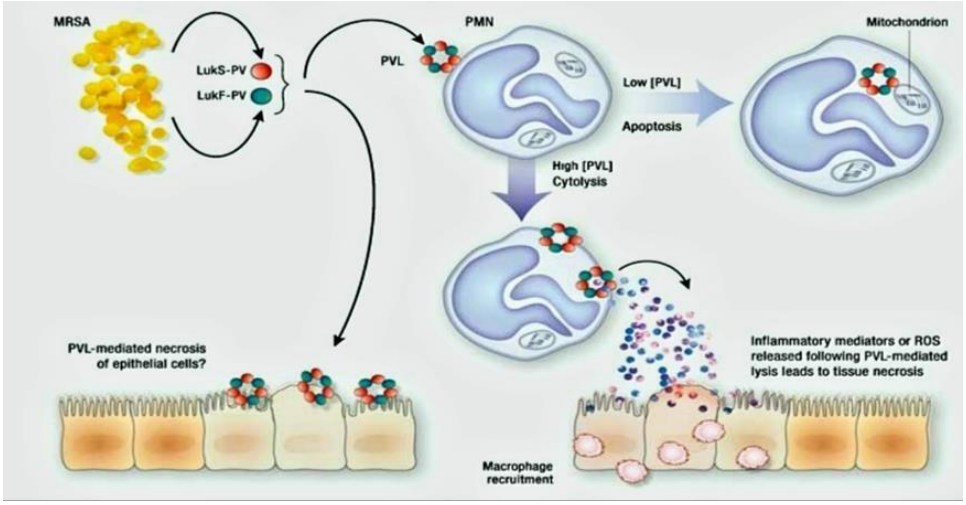
2.7 Panton-Valentine Lökosidin (PVL) Geni

PVL geni, MRSA'nın hızlı yayılmasına ve daha yüksek virülansına katkıda bulunan faktörlerden biridir. PVL'yi ilk keşfeden Van deVelde olmasına rağmen, Sir Phillip (Panton ve Valentine 1932) yılında *S. aureus*'taki PVL genini cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları ile ilişkilendirmiştir.

PVL geni bir sitotoksin üretir (daha önce belirtildiği gibi) insan monositleri, makrofajlar ve polimorfonükleer nötrofil (PMN) için konsantrasyona bağlı nekroz ve ölüme neden olmaktadır. Bu gen ayrıca kalsiyum kanalı aktivasyonuna ve gen transkripsiyon değişikliklerine neden olmaktadır. (O'Hara *et al.* 2008). PVL pozitif mecA taşıyan suşlar giderek yaygınlaşmaktadır ve β-laktam antibiyotiklerin çoğuna dirençlidirler. Bu evrime, SCCmec I-III'den daha kısa olan ve sadece toplumdan edinilmiş enfeksiyonlarla

bağlantılı görünen iki ek (stafilokokal kaset kromozomal mec) SCCmec tip IV ve V'nin oluşumu eşlik etmiştir. (Zhang *et al.* 2005).

PVL, lökosit membranlarına zarar veren heptamerik delikler oluşturmak için birlikte çalışan iki farklı protein bileşeninden (lukF-PV ve lukS-PV) oluşan bir virülans faktörüdür ve özellikle CA-MRSA'da virülans artışına neden olmaktadır (Monecke *et al.* 2006) (Şekil 2.2). PVL pozitif suşlar bu nedenle bağışıklığı yeterli kişilerde tekrarlayan, kronik veya çok akut yumuşak doku ve cilt enfeksiyonlarına neden olabilir. PVL pozitif suşlar da yaşamı tehdit eden pnömoni ile ilişkilendirilmiştir (Schlievert 2009).



Şekil 2.2 Doku nekrozunu başlatmak için PVL modeli (Boyle-Vavra ve Daum, 2007)

Luk SF-PV genleri bir profaj üzerinde iletilir ve faj transferinin genleri bir suştan diğerine ilettiği kanıtlanmıştır. Genlerin bir suştan diğerine faj transferi yoluyla aktarılabileceği de kanıtlanmıştır. Bu, PVL geninin klonlar arasında sadece dikey olarak değil aynı zamanda yatay olarak da aktarılabileceğini göstermektedir (O'Hara *et al.* 2008). Ve bu nedenle luk-pv taşıyan suşların yayılması giderek artmaktadir (Bush *et al.* 1995; Issa 2019).

Araştırmalara göre, toplum kökenli MRSA izolatlarının % 77'sinde luk-pv bulunurken, hastane kökenli MRSA izolatlarının sadece % 4'ünde bulunmaktadır (Yoong ve Torres 2013). PVL, önemli bir *S. aureus* toksini olduğu ve çeşitli araştırmalarda akut *S. aureus* enfeksiyonlarının epidemiyolojik bir biyolojik belirteci olduğu öne sürüldüğü için çok

ilgi görmüştür (Vandenesch *et al.* 2003). PVL-pozitif *S. aureus*, Amerika Birleşik Devletleri'nde *S. aureus* ile ilişkili şiddetli pediatrik hematojen osteomiyelitin üçte ikisine kadar sorumludur (Bocchini *et al.* 2006). Bir çalışmanın sonuçları, *S. aureus* osteomiyelitin yayılmasında, süresinde ve akutluğunda PVL geninin önemini doğrulamaktadır (Jiang *et al.* 2017).

2.8 16S rRNA Geni

16S ribozomal RNA geni, bakteriyel rRNA genlerinin en stabilleri arasındadır ve tüm bakterilerde bulunur (Woese 1987). Yaklaşık 1500 bp uzunluğundadır ve dokuz değişken cins veya türe özgü bölge ile serpiştirilmiş korunmuş nükleotit dizilerinden oluşur. Mikroorganizmaların filogenetik sınıflandırması ise değişken bölgelerin genetik dizilimlerine dayanmaktadır (Doolittle 1999).

Doğru tanımlamaya alternatif olarak, son zamanlarda çok sayıda PCR tabanlı moleküler teknik geliştirilmiştir (Bal *et al.* 2010). PCR primerleri ve çevreleyen değişken alanlar için korunan alanlar seçilerek her bakteri türünden DNA'yı tespit edebilen geniş aralıklı PCR'ler oluşturmak mümkündür. Değişken alanlar içeren amplifiye edilmiş PCR ürününün dizilenmesi ve bunun mikrop veri tabanlarındaki bilinen bakteri dizileriyle karşılaştırılması, bakterilerin tür veya cins düzeyinde tanımlanmasını tamamlar (Clarridge III 2004; Jenkins *et al.* 2012) ve DNA dizileme teknolojisine dayanan bu yöntemler, klinik ortamda daha düşük maliyetli ve daha yaygın hale gelmektedir (Janda ve Abbott 2007; Johnson *et al.* 2016).

16S ribozomal RNA geni, ribozomal kompleksin gelişimini ve stafilokokların taksonomisini incelemek için yaygın bir tekniktir. Büyümenin üstel fazı boyunca, 16S rRNA'ya bağlı transkripsiyonun çoğu genellikle meydana gelmektedir (Janda ve Abbott 2007; Johnson *et al.* 2016).

16S rRNA gen dizilimi son zamanlarda moleküler bir teşhis alternatifi olarak uygulanmaktadır. Aşağıdakileri içeren çeşitli nedenlerle faydalıdır: (1) 16S rRNA geni

tüm bakterilerde bulunduğundan, yüksek oranda korunduğundan ve bilişimde kullanılmak için (daha önce belirtildiği gibi) yeterince büyüktür (Janda ve Abbott 2007; Johnson *et al.* 2016), hemen hemen tüm bakterilerde bir multigen ailesinin veya operonların varlığı, (2) 16S rRNA geninin işlevi zaman içinde değişmemiştir, bu da rastgele dizi değişikliklerinin daha doğru bir zaman ölçüsü (evrim) olduğu anlamına gelmektedir. (Patel 2001; Janda ve Abbott 2007).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Laboratuvar ekipmanları

Bu çalışmada kullanılan laboratuvar cihazları ve araçları Çizelge 3.1'de göstermektedir.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan cihazları ve araçları

Ekipmanlar	**Firma / Menşe**
AURA TM PCR Kabini	EuroClone SpA / İtalya
Otoklav	Ekspres/ Almanya
Bio TDB-100, Kuru blok termostatlı	Bio San / Almanya
Biyolojik tehlike güvenlik kabini sınıf II B	Genex / ABD
Denge	Kernpfb / Almanya
Sütun Camı	Sartotius / İtalya
Bileşik ışık mikroskobu	Olimpos/Japonya
CO_2 kuluçka makinesi	Gallenkamp/İngiltere
Derin dondurucu	Thermo Scirntific / ABD
Damıtıcı	GFL / Almanya
Elektroforez	CBS / ABD
Eppendorf tezgah santrifüjü	Eppendorf / Birleşik Krallık
Manyetik karıştırıcılı sıcak plaka	Gallenkamp / İngiltere
Kuluçka makinesi	Jrad / Çin
laminer flow	Memmert / Almanya
Mini Güç Kaynağı 300V, 2200V	Biolab / Singapur
Mikropipet Hacmi 0,5-10 uL, 2-20 uL, 10-100 uL, 100-1000 uL	Lab / ABD
MultiGeneOptiMax Gradyan Termal Döngüleyici	Lab / ABD
Microspin 12, Yüksek Hızlı Mini Santrifüj	Biosan / Letonya
Mikrodalga	Gosonic / Çin
Milipor filtre ünitesi	Sarotius/İtalya
Buzdolabı	Concord/ Lübnan
Gerçek Zamanlı PCR	Sacace / İtalya
V-1 plus, Tüpler için Kişisel Vorteks	Digsystem / Almanya
96 duvarlı Mikrotitre plakası	Akış Laboratuvarı/ Irvine / İngiltere
UV transillüminatör	Vilber lourmat / Farance
Su banyosu	Gallen Kamp / İngiltere
VITEK-2 sistemi	BioMerieux / France
VITEK Densichek	BioMerieux / France

3.1.2 Kimyasallar ve solüsyonlar

Bu çalışmada kullanılan kimyasalları ve solüsyonları Çizelge 3.2'de göstermektedir.

Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan kimyasallar

Kimyasallar	**Şirket / Menşe**
Metil Kırmızısı	Himedia / Hindistan
Etanol (mutlak)	BDH/ İngiltere
KOH	BDH/ İngiltere
Hidrojen peroksit	BDH/ İngiltere
N,N,N,N-Tetrametil-P-fenilendiaminodihiklorür	BDH/ İngiltere
EDTA	Sigma / ABD
Tris Borik asit TBE tamponu 10 X	Conda / ABD
Marker 1000 bp	Intron / Kore
Kırmızı güvenli boyama	Intron / Kore
Agaroz	Conda / ABD
Normal Tuzlu Su (sodyum klorür)	Öncü / Irak
Gliserol	BDH / İngiltere
Baryum Klorür $BaCl_2.H_2O$, H_2SO_4	BDH / İngiltere

3.1.3 Kitler

Bu çalışmada kullanılan kimyasalları ve solüsyonları Çizelge 3.3'de göstermektedir.

Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan kitler

Kitler	**Şirket / Menşe**
VITEK®2 GP kimlik kartı	BioMérieux / Fransa
AST-GP76 TEST KİTİ	BioMérieux / Fransa
Quick-RNA TM Bakteriyel Miniprep Kiti	Zymo/ABD
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X)	Kapa /ABD
cDNA sentezi için PrimeScript™ RT reaktif Kiti	Takara / Japonya
Quick-DNA™ Bakteriyel Miniprep Kiti	ZYMO A / Almanya
MaximeTM PCR PreMix Kiti (i-TaqTM)	İntron / Kore
Gram boyama kiti	BDH / İngiltere

3.1.4 Kültür ortamları

Bu çalışmada kullanılan Kültür ortamları Çizelge 3.4'te göstermektedir.

Çizelge 3.4 Çalışmada kullanılan kültür besiyerleri

Kültür ortamları	**Şirket adı / Menşei**
Kanlı agar	Himedia / Hindistan
Beyin kalp infüzyon suyu	Himedia / Hindistan
Mannitol Tuz ağarı	Oksoid / İngiltere
MR-VP suyu	Himedia / Hindistan
Besin agarı	Himedia / Hindistan
Besin suyu	Himedia / Hindistan

3.1.5 Primerler

Tüm primerler Entegre DNA teknolojileri (ABD) tarafından üretilmiştir. Bu araştırmada dizileri eşitleme için kullanılan primerler Çizelge 3.5'te göstermektedir.

Çizelge 3.5 Çalışmada kullanılan primerler

Primer	**Sıra (5′→3′ yön)**
16S rRNA	
İleri	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
Tersi	GGTTACCTTGTTACGACTT
PVL	
İleri	ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA
Tersi	GCATCAACTGTATTGGATAGCAAAAGC

Bu çalışmada gen ekspresyonu için kullanılan primerler dizileri Çizelge 3.6'da göstermektedir.

Çizelge 3.6 Gen ekspresyonu için primerler

Primer	**Sıra (5′→3′ yön)**
16S rRNA'sı	
İleri	CGGCAACGAGCGCAACCT
Tersi	CCATTGTAGCACGTGTGTAGCT
PVL	
İleri	GCGTACAACGACGAAATGTCA
Tersi	ACGAGCATGAGCTTTGTGTGT

3.1.6 Çözücüler

1. Gram boyama

Bu testte, üretici firmanın talimatları doğrultusunda iyot, kristal viyole, safranin ve %70 etanol içeren hazır kit (Gram boyama kiti; BDH / İngiltere) kullanıldı.

2. Katalaz reaktifi

Reaktif, (% 3) hidrojen peroksitten oluşacak şekilde hazırlanmıştır (Atlas *et al.* 1995).

3. Oksidaz reaktifi

Oksidaz reaktifi, 1 g N,N,N,N-Tetrametil-P-fenilendiaminodihiklorürün 100 ml distile suda çözülmesiyle hazırlandı, ardından koyu renkli bir şişede tutuldu (Atlas *et al.* 1995).

4. Voges - proskauer reaktifi

Bu reaktifi oluşturan iki çözelti vardır:

- A: 40 g KOH'nin 80 mL DW'de çözülmesiyle hazırlanarak ardından hacim DW ile 100 mL'ye tamamlanmışır.
- B: 5 g α-naftolün 100 mL mutlak etanol içinde çözülmesiyle hazırlanır. Bu iki çözeltiden elde edilen eşit hacimler iyice karıştırılarak kullanıma kadar 4 °C'de saklanır (Collee *et al.* 1996).

5. Metil kırmızı reaktif

0,05 g metil kırmızısı 150 mL saf etanolde çözülerek hazırlanan hacim distile su ile 250 mL'ye kadar tamamlanır (Collee *et al.* 1996).

6. McFarland standartı

McFarland'ın standart solüsyonu 0.5, bulanıklık standart solüsyonunu sunma eder. Bu çözelti şu şekilde hazırlandı:

- 1 g Baryum Klorür ($BaCl_2$) 100 mL distile su içinde çözülür

- 1 mL sülfürik asit (H2SO4) ilave edildikten sonra kapasite distile su ile 100 mL'ye tamamlanır.

Daha sonra 1. Aşamada hazırlanan çözeltiden 0,5 mL ve 2. Aşamada hazırlanan çözeltiden 99,5 mL olacak şekilde hazırlanan McFarland standardı, Kullanılıncaya kadar karanlık bir şişede saklanır. Bu solüsyon, bir antibiyotik duyarlılık testi gerçekleştirmeden ve VITEK 2 Sistemini kullanarak bakterileri tanımlamadan önce bakteri hücrelerinin sayısını değerlendirmek için kullanılan 1,5 *108 CFU/ml içeren bir bakteri süspansiyonu ile karşılaştırıldığında bulanıklık sağlamak için belirli bir optik yoğunluğa sahiptir (Benson 2002).

3.1.7 Kültür ortamları

1. Besin agarı

Üreticinin talimatlarına göre 28 g besin agarı, 1000 mL damıtılmış suda çözülür. Daha sonra kaynama noktasına kadar ısıtılarak hazırlanır ve ardından sterilize edilir.

2. Beyin kalp infüzyon suyu

37 g Beyin Kalp İnfüzyon Suyu, 1000 mL distile suda çözülerek üreticinin talimatlarına göre hazırlanır. Ardından kaynama noktasına kadar ısıtılır ve sterilize edilir.

3. Besin suyu

13 g besin suyu, 1000 mL distile suda çözülerek üreticinin talimatlarına göre hazırlanır. Ardından kaynama noktasına kadar ısıtılır ve sterilize edilir.

4. Kan agarı

Kanlı agar bazı sterilize edilir ve 45-50°C'ye kadar soğutulur. Daha sonra kanlı agar bazına % 5 taze insan kanı eklenir.

5. Mannitol tuzlu agar

Üreticinin talimatlarına göre 111 g mannitol tuzlu agar, 1000 mL distile suda çözülerek üreticinin talimatlarına göre hazırlanır. Ardından kaynama noktasına kadar ısıtılır ve sterilize edilir.

6. MR-VP suyu

17 g MR-VP Suyu, 1000 mL distile suda çözülerek üreticinin talimatlarına göre hazırlanır. Ardından kaynama noktasına kadar ısıtılır ve sterilize edilir.

3.2 Yöntem

3.2.1 Numune toplama

Irak'ta buunan Al Yarmuk hastanesi ve Bağdat Şehri Tıp Hastanelerinden yara ve yanık şikâyeti bulunan toplamda 200 hastadan numune alınmıştır. Toplanan örneklerden sadece 103 izolat *S. aureus*'u içermektedir (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.7 Klinik kaynaklar ve izolat sayısı

Klinik Kaynak	**Sayı**
Yanık	53
Yara sürüntüleri	50
Toplam	103

3.2.2 *S. aureus'un* tanımlaması

1. Morfolojik inceleme

Koloni formu, boyutu, rengi, pigmentleri, kokusu ve marjları dahil olmak üzere mannitol tuzlu agar (MSA), kanlı agar ve besleyici agarda bakteri üremesinin morfolojik özellikleri, birincil teşhis testlerinin temeli olarak araştırıldı.

2. Mikroskobik inceleme

Her izolattan tek bir koloni, şekil, gruplama, boyut ve Gram reaksiyonunu incelemek için Gram boyama ile mikroskobik olarak incelendi (Atlas *et al.* 1995).

3. Biyokimyasal testler

- **Katalaz testi**

Bakteri kolonisi mikroskop lamına aktarılarak bu koloniye bir damla % 3 hidrojen peroksit çözeltisi eklenir. Bu işlem sonucunda gaz kabarcıklarının oluşumu testin pozitif sonuç aldığını belirtmektedir (Atlas *et al.* 1995).

- **Oksidaz testi**

Filtre kağıdı, bu test için birkaç damla N,N, N,N-tetra metil-p-fenilen-diamin dihidroklorür solüsyonu ile ıslatılır. Daha sonra bir hücre kolonisi alınarak filtre kağıdına aktarılır. 10 saniye içinde mor veya koyu mavi bir rengin gelişmesiyle pozitif bir reaksiyon olduğu sonucuna varılır (Collee *et al.* 1996).

- **Koagülaz testi**

Bu test, 0.1 ml insan plazmasına her bir izolattan 0.1 ml gece besiyeri kültürü eklenerek yapıldı. ve 24 saat inkübe edildi. Pıhtının varlığı pozitif sonuç anlamına gelir (Atlas *et al.* 1995).

- **Voges - proskauer testi**

Bakteriyel izolatlar, MRVP suyu içinde aşılandı ve 24 saat 37°C'de inkübe edildi. Ardından iki damla (A) ve dört damla (B) (3.1.6.4'te bahsedildiği gibi) eklendi. 15 dakika sonra pembe-kırmızı rengin görülmesi pozitif sonucu göstermektedir.

- **Metil kırmızı testi**

Bakteriyel izolatlar MRVP broth içinde aşılanarak 37°C'de 24 saat inkübe edilir. Daha sonra 2 ile 3 damla metil kırmızısı reaktifi (3.1.6.5'te bahsedildiği gibi) eklenir. Kırmızı rengin ortaya çıkması pozitif sonucu göstermektedir.

- **VITEK 2 sistemi ile tanımlama ve antimikrobiyal duyarlılık testi**

VITEK 2 sistemi (BioMe´rieux), floresan tabanlı teknolojiyi kullanan bakteri ve seçicilik testinin tanımlanması için yeni bir otomatik sistemdir. Saf bakteri kültürleri elde edildiğinde, sonuçlar tekniğin tanımlama ve duyarlılık için doğru bulgular sağladığını göstermektedir (Ling *et al.* 2003). 1970'lerde bu teknik otomatik bir tanımlama sistemi olarak başladı, ardından bugün antimikrobiyal duyarlılık testi VITEK 2 sisteminde geliştirildi. Bu sistem, birincil inokulumlar hazırlandıktan ve standardize edildikten sonra tanımlama ve antimikrobiyal duyarlılık testi (AST) için gerekli tüm adımları otomatik olarak devam ettirmektedir (Funke *et al.* 1998). Ayrıca VITEK 2 sistemi ile duyarlılık testi, daha hızlı ve daha doğru test sağlayarak hasta tedavisini iyileştirir. Bakteriyel izolatlar, mannitol tuzlu agar plakalarına aşılandıktan sonra gece boyunca 37°C'de inkübe edilir. Daha sonra tek bir koloni alınarak çözelti içinde süspanse edilir. Bakteri süspansiyonunun bulanıklığı VITEK DensiChek (BioMèrieux) ile % 0,45 sodyum klorürde McFarland 0,5 standardına uyacak şekilde ayarlanır. Ardından VITEK 2 ID-GP kartı (Referans numarası 21342), AST-GP 76 Antimikrobiyal duyarlılık kartı (Referans Numarası 418424) ve bakteri süspansiyon tüpleri VITEK-2 sistemine manuel olarak yüklenir ve sonuçlar 4-6 saat sonra alınır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 VITEK 2 sistemi

4. Sterilizasyon yöntemleri

Sterilizasyon yöntemleri 4 aşamadan oluşmaktadır (Quinn *et al.* 2004).

- **Otoklavlama**

Kültür ortamı 121°C'de 15 dakika 15 Ib /In² basınç altında otoklavlanarak sterilize edilir.

- **Fırın**

Cam kaplar 2 saatlik fırında 180°C'de sterilize etmek için kullanılır.

- **UV Işık**

UV ışığı mikropipetleri, uçları ve Eppendorf tüplerini sterilize etmek için kullanılır.

- **Doğrudan Ateşleme**

Gaz brülörünün alevi aşılama halkası sterilize eder, agar veya suyu içinde izolatların kültürlenmesinde kullanılan aşılama halkası.

3.2.3 Moleküler tanı

3.2.3.1 Gen dizileme

3.2.3.1.1 Ticari kit ile DNA ekstraksiyonu ve saflaştırma

Quick-DNA™ Bacterial Miniprep ekstraksiyon kiti kullanılarak genomik bakteri DNA'sı ekstre edildi. DNA ekstraksiyonu için prosedürler aşağıdaki gibidir.

Prosedür:

1. 200 µL'ye kadar su içinde yeniden süspanse edilmiş 100 mg (ıslak ağırlık) bakteri hücreleri ZR BashingBead™ Lysis tüpüne (0,1 mm ve 0,5 mm) ekledim. Ardından tüpe 750 µL BashingBead™ tamponu ekledim.
2. 2 ml tüp için maksimum hızda 5 dakika vorteks yaptım.
3. Bir ZR BashingBead™ Lysis tüpünü (0,1 ve 0,5 mm) bir mikrosantrifüjde 10.000 xg'de (xg merkezkaç kuvveti anlamına gelir) 1 dakika santrifüjledim.
4. 400 µL'ye kadar olan süpernatantı toplama tüpü içindeki Zymo-Spin™ III-F Filtresine aktardım ve 1 dakika boyunca 8000 x g'de santrifüjledim.

5. Adım 4'teki Toplama Tüpündeki filtrataya 1,200 µL Genomik Lizis Tamponu ekledim.
6. Adım 5'teki karışımın 800 µl'sini bir Toplama Tüpü içindeki bir Zymo-Spin™ IICR Kolonu3'e aktardım ve 10.000 x g'de 1 dakika santrifüjledim.
7. Toplama Tüpündeki akışı attım ve 6. Adımı tekrarladım.
8. Yeni bir Toplama Tüpündeki Zymo-Spin™ IICR Kolonuna 200 µl DNA Ön Yıkama Tamponu ekledim ve 10.000 x g'de 1 dakika santrifüjledim.
9. Zymo-Spin™ IICR Kolonuna 500 µl g-DNA Yıkama Tamponu ekledim ve 10.000 x g'de 1 dakika santrifüjledim.
10. Zymo-Spin™ IICR Kolonunu temiz bir 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktardım ve doğrudan kolon matrisine 100 µl DNA Elüsyon Tamponu ekledim. DNA'yı ayrıştırmak için 10.000 x g'de 30 saniye santrifüjledim. Ultra saf DNA artık kullanıma hazırdır.

Primer hazırlama ve optimizasyon:

Üreticinin protokolüne göre (Entegre DNA teknolojileri/ABD), liyofilize primerleri (16S RNA ve PVL primerleri) nükleaz içermeyen suda çözerek her primer için 100 uM konsantrasyonda bir stok solüsyon oluşturdum. Birincil stok solüsyonu -23°C'de sakladım. Daha sonra 10 µL birincil stok solüsyonunu 90 µL nükleaz içermeyen suyla birleştirerek 10 µM konsantrasyonda çalışan bir solüsyon yaptım. Bu solüsyonu daha sonra kullanılana kadar -23 °C'de sakladım.

Konvansiyonel PCR:

Bu teknik, monopleks amplifikasyon olarak 16S RNA ve PVL genleri ile iki *S. aureus* genini saptamak için kullandım. PCR karışımı, 1,5 µL DNA örneğinden , ileri primer için 1 µL (16S RNA ve PVL primerleri), geri primer için 1 µL (16S RNA ve PVL primerleri), 5 µL Maxime PCR PreMix ve 16,5 µL nnükleaz içermeyen su olmak kaydıyla toplam hacim 25 µL 'ye ulaşır. daha sonra Çizelgelerde (Çizelge 3.9 ve Çizelge 3.10) gösterildiği gibi her bir gen için optimum tespit koşuluna dayalı reaksiyonu başlatmak için PCR karışımını bir termal döngüleyiciye aktardım.

PCR için MaximeTM PCR PreMix Kiti (i-TaqTM)

Konvansiyonel PCR'nin yukarıdaki paragrafında açıklandığı gibi, bu prosedür üreticinin talimatına göre 25 µL'lik bir reaksiyon hacminde hazırlanır:

Prosedür

- DNA ve primerleri Maxime PCR PreMix tüplerine (i-Taq) Çizelge 3.8'e ekledim.

Çizelge 3.8 Maxime PCR PreMix tüpleri (i-Taq) içindekiler

Malzeme	**Hacim**
Jel yükleme tamponu	1X
Reaksiyon tamponu (10X)	1X
DNTP'ler	2,5mM
i -Taq DNA Polimeraz	5U/µL

- Toplam hacmi 25µl olacak şekilde tüplere distile su ekledim.ve kurutulmuş bileşenler hesaplanmaz.
- Pipetleme yapılarak mavi pelet çözdüm.
- Elde edilen numunelere PCR yaptım.
- Daha sonra numuneleri agaroz jele yükleme boyası tamponu eklemeden yükledim ve elektroforez yaptım.

Çizelgeler 3.9'da Çizelgeler ,3.10'da gösterildiği gibi 16S rRNA geni ve PVL geni için PCR programı.

Çizelge 3.9 16S rRNA'nın PCR aşamaları

	Evre	**Sıcaklık (°C)**	**Zaman**	**Döngü sayısı**
1-	İlk Denatürasyon	94°C	3 dakika.	1 döngü
2-	Denatürasyon 2	94°C	45 saniye	
3-	Tavlama	56°C	45 saniye	35 döngü
4-	Uzantı1	72°C	1 dakika	
5-	Uzantı 2	72°C	7 dk.	1 döngü

Çizelge 3.10 PVL geninin PCR aşamaları

	Evre	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü sayısı
1-	İlk Denatürasyon	94°C	5 dakika.	1 döngü
2-	Denatürasyon 2	94°C	45saniye	
3-	Tavlama	65°C	1 dakika	35 döngü
4-	Uzantı1	72°C	1 dakika	
5-	Uzantı 2	72°C	5 dakika.	1 döngü

Agaroz Jel Elektroforezi

Çıkarılan DNA'nın kalite analizi için, özütlenen DNA parçalarının varlığını ve bütünlüğünü doğrulamak için agaroz jel elektroforezi kullanılır. Ayrıca PCR etkileşiminin amplifikasyonunun varlığını doğrulamak için de standart DNA kullanılır.

(a) % 1 Agaroz jeli için hazırlamak için uygulanacak prosedür

- Bir behere 100 mL 1X TBE aldım..
- Tampona 1 gr agaroz ekledim.
- Çözeltiyi, tüm jel parçacıkları çözülene kadar (Mikrodalga kullanarak) kaynama noktasına kadar ısıttım.
- Agaroz solüsyonuna 5 µl RedSafeTM Nükleik Asit Boyama Solüsyonu (20.000x) ekledim. Daha sonra çözeltiyi karıştırmak ve kabarcık oluşumunu önlemek için şişeyi hafifçe döndürdüm.
- Çözelti 50-60°C'ye kadar soğumaya bıraktım.
- Her iki kenarı da selofan bantlarla kapatıldıktan sonra agaroz solüsyonunu jel tepsisine döktüm ve agaroz oda sıcaklığında 30 dakika katılaşmaya bıraktım. Jel tamamen katılaşmadan tarağı yerleştirdim.
- Tarağı dikkatlice çıkardım ve tepsiyi 1X TBE-elektroforez tamponu ile tampon jel yüzeyinin 3-5 mm üzerine ulaşana kadar doldurdum.

(b) DNA yükleme

- 8µl DNA numuneleri jelin deliklerine yükledim. DNA numunelerine yükleme boyası eklenmesine gerek yoktur çünkü zaten MaximeTM PCR PreMix PCR Kiti içerir, bu yüzden eklemedim.
- DNA'nın negatif taraf olan katottan pozitif taraf olan anoda (anot) gitmesini sağlamak için elektrik gücü 30 dakika boyunca 100 volt ve 70 amperde açtım. sonra 336 nm UV ışığı kullanarak jeldeki bantları inceledim.
- Jelin stein lekeli bantlarını görmek için jel görüntüleme kullandım.

3.2.2.2 Gen ifadesi

Ticari kit ile RNA ekstraksiyonu

Quick-RNA TM Bacterial Miniprep Kit (Zymo, ABD) (Katalog No. R2014) kullanılarak aşağıda belirtilen prosedüre göre genomik RNA'yı ekstrakttım. 16S rRNA ve PVL genlerinin gen ekspresyonunu analiz etmek için RNA ekstraksiyonu yaptım.

Prosedür

Belirtilmediği sürece tüm adımları oda sıcaklığında ve 10.000-16.000 x g'de 30 saniye santrifüjlemede gerçekleştirdim.

- 800 µl RNA Lysis Buffer'da donmuş hücre peletini1 yeniden süspanse ettim ve karışımı bir ZR BashingBead Lysis Tüpüne (0,1 ve 0,5 mm) aktardım.
- Tüpü, 2 ml'lik bir tüp tutucu ile donatıldım bir boncuk çırpıcıya sabitledim ve işlemden geçirdim.
- Kalıntıyı peletlemek için tüpü 1 dakika santrifüjledim.
- 400 µl'ye kadar temizlenmiş süpernatanı bir Toplama Tüpü içindeki bir Zymo-Spin™ IIICG Kolonu2'ye aktardım ve santrifüjledim. sonra akışı tuttum.
- Akışa eşit hacimde etanol (%95-100) (1:1) ekledim ve iyice karıştırdım.

- Karışımı bir Toplama Tüpü içindeki bir Zymo-Spin™ IICR Kolonu2'ye aktardım ve santrifüjledim. Akışı atım.
- Kolona 400 µl RNA Prep Buffer ekledim ve santrifüj yaptım. Akışı atım.
- Kolona 700 µl RNA Yıkama Tamponu ekledim ve santrifüj ettim. Akışı atım.
- 400 µl RNA Yıkama Tamponu ekledim ve yıkama tamponunun tamamen çıkarılmasını sağlamak için kolonu 1 dakika santrifüjledim. Sonra dikkatlice kolonu nükleaz içermeyen bir tüpe aktardım.
- 50 µl DNaz/RNaz İçermeyen Su'yu doğrudan kolon matrisine ekledim ve santrifüjledim.

cDNA Sentezi

RNA'nın ters transkripsiyonu ile PrimeScript™ RT reaktif Kiti (Takara, Japonya) (Katalog No. RR037A) kullanarak cDNA Sentezi yaptim. Üreticinin talimatlarına göre toplam 10µL reaksiyon hacmi hazırladım (Çizelge 3.11). Reaksiyon karışımını aşağıdaki koşullar altında inkübe ettim: 37°C'de 15 dakika (Ters transkripsiyon), 85°C'de 5 saniye (Isıl işlemle ters transkriptazın inaktivasyonu) ve ardından 4°C.

Çizelge 3.11 cDNA Sentezi için reaksiyon bileşenleri ve hacmi

Reaktifler	**Hacim**
5 × PrimeScriptTM karışımı	2 µL
Toplam RNA	500 ng ile 8 µL
RNase dH_2O	10 µL 'ye kadar
Toplam	10 µL

Kantitatif gerçek zamanlı PCR (qRT–PCR)

Real-time PCR Sistemini (Sacace, İtalya) kullanarak QRT-PCR yaptım. Gen ekspresyon seviyeleri ve kat değişimi, KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X) Evrensel Kit bileşenleri (Katalog No: KK4601) kullanılarak ve eşik döngüsü (Ct) ölçülerek belirlenir.

KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix'in (2X) ticari kitini kullanarak *S.aureus* (16S RNA, PVL) genlerinin ekspresyon seviyelerini tahmin etmek için bu tekniği kullandım.

Prosedür

- KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X) kitini oda sıcaklığında (25 °C) çözdüm. Çizelge 3.12'de, gerekli sayıda reaksiyonu hazırlamak için gereken malzemelerin hacmini göstdim.

Çizelge 3.12 Gen ifadesi için reaksiyon bileşenleri ve hacmi

Bileşen	**Hacim**
Şablon DNA Numune Hacmi	3 µL
Ileri primer	0,4 µL
Ters primer	0,4µL
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2X) Evrensel Kit	10 µL
Nükleaz içermeyen su	20 µL'ye kadar
Toplam hacim	20 µL

- qPCR ana karışımı, şablonu ve primerlerinin Çizelge 3.12 "ünde belirtildiği gibi hacimleri bir PCR tüpünün/tüplerinin her birine aktardım.
- Reaksiyon tüp(ler)inin kapağını kapattım ve kısa süre santrifüjledim.
- Tüpü qRT PCR kuyusunun içine yerleştirdim ve programı çalıştırdım.
- Çizelge 3.13'te, qRT-PCR program koşullarını gösterdim.

Çizelge 3.13 qRT-PCR aşamaları ve sıcaklığı

Adım	**Sıcaklık (°C)**	**Zaman**	**Döngü**
Enzim aktivasyonu	95 °C	05:00 dak	Tutmak
Denatürasyon	95,0 °C	00:20 saniye	40
Tavlama	60,0 °C	00:20 saniye	
Uzantı	72,0 °C	00:20 saniye	

16S rRNA'sı Temizlik Gen ifadesi

ΔCT değerini belirlemek için kontrol olarak 16S RNA-Temizlik genini kullandım. Çizelge 3.14'te gösterilen Termal profil ile 16S rRNA-H.K.G geninin amplifikasyonunun bir qRT PCR reaksiyonunu gerçekleştirdim.

Çizelge 3.14 qRT-PCR aşamaları ve sıcaklığı

Adım	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü
Enzim aktivasyonu	95 °C	05:00 dak	Tutmak
Denatürasyon	95,0 °C	00:20 saniye	40
Tavlama	60,0 °C	00:20 saniye	
Uzantı	72,0 °C	00:20 saniye	

PVL Gen ifadesi

ΔCT değerini hesaplamak için PVL genini kullandım. PVL geninin, qRT-PCR aşamaları ve sıcaklığı Çizelge 3.15'te göstermektedir.

Çizelge 3.15 qRT-PCR aşamaları ve sıcaklığı

Adım	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü
Enzim aktivasyonu	95 °C	05:00 dak	Tutmak
Denatürasyon	95,0 °C	00:20 saniye	40
Tavlama	60,0 °C	00:20 saniye	
Uzantı	72,0 °C	00:20 saniye	

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 *S. aureus*'un İzolasyonu ve Tanımlanması

Bu çalışmada, Bağdat şehrinde bulunan Al-Yarmouk Eğitim ve Bağdat Tıp Şehri Hastanelerinden toplamda 200 farklı klinik örnek alınmıştır. Alınan çeşitli klinik örneklerden 103 *S. aureus* izolatı tanımlanmıştır. Bu klinik izolatlar yanık (53 izolat) ve yara (50 izolat) örneklerinden oluşmaktadır.

Tüm izolatlar, yüksek tuz konsantrasyonu ile büyüyebilen ve mannitolü fermente etme özelliğinden dolayı sarı koloniler oluşturabilen *S. aureus* için seçici ve ayırıcı bir besiyeri olan Mannitol Salt agar MSA'da kültürlenmiştir (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2) (Moura *et al.* 2018). Daha sonra tüm izolatlar kanlı agarda kültürlendi (Şekil 4.3). Kültürlen izolatlar beta-hemolitik ve açık altın sarısı pigmentli koloniler oluşturmuştur. Besleyici agar üzerinde kültürlenen izolatlar ise altın sarısı koloniler oluşturmuştur (Thangavel *et al.* 2011). Kültürel testlerin sonuçları Çizelge 4.1'de göstermektedir.

Çizelge 4.1 *S. aureus* izolatları için kültürel testlerin pozitif sonuçları

Örnek türü	Mannitol Tuz agarı	Kanlı agar	Besin agarı	Toplam
Yara	50/50	50/50	50/50	50
Yanık	53/53	53/53	53/53	53



Şekil 4.1 Mannitol tuzlu agarda *S. aureus* üremesi



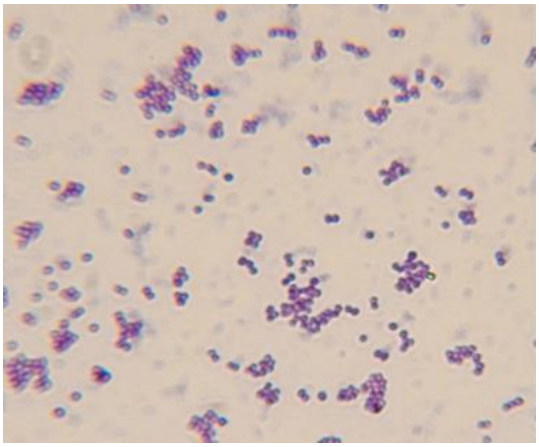
Şekil 4.2 Mannitol tuzlu agarda *S. aureus* üremesi



Şekil 4.3 Kanlı agarda *S. aureus* üremesi

4.2 Mikroskobik İnceleme

Gram boyama ile yapılan mikroskobik testlerde, *S. aureus* izolatlarının üzüm benzeri düzensiz kümeler oluşturduğu tespit edilmiştir. ışık mikroskobu altındaki 40X'de görüntülenen *S. aureus* kümeleri Şekil 4.4'te göstermektedir (Brooks *et al.* 2007).



Şekil 4.4 Gram boyama ile *S. aureus* tanımlaması

4.3 Biyokimyasal Test Sonuçları

S. aureus izolatlarını tanımlamak için 50 izolatta; Katalaz, Oksidaz, Koagülaz, metil-kırmızı- voges- proskauer (MR-VP), kalan 53 izolatta ise VITEK 2 GP biyokimyasal testleri kullanıldı, çünkü VITEK 2 GP daha doğru ve daha az zaman alıyor ancak aynı zamanda pahalı, bu nedenle bu sistem tarafından sadece 53 izolat tanımlanıyor.

Katalaz reaksiyonu yanık ve yaralardan elde edilen 50 izolatın tümü için pozitif sonuç verirken, hidrojen peroksitin oksijen ve suya dönüşümünü katalize ederek gaz baloncuklarının oluşmasıyla oluşan pozitif sonuçlar, bu izolatları Streptococcus spp.'den ayıran katalaz enziminin varlığına işaret etmektedir (Al-Ugaili 2013). Oksidaz testi 50 izolatın tümü için negatifti, yani bu bakterilerde sitokrom c oksidaz enzimi yoktu, sitokrom c oksidaz enzimi enerji üretmek için oksijeni kullanır, *S. aureus* izolatlarını Micrococcus spp bakterilerinden ayıran özellikler (Goldman ve Green, 2008). Koagülaz testi 50 izolatın tamamı için pozitif olarak sonuçlanmıştır. Bu test *S. aureus*'u koagülaz negatif stafilokoklardan ayırt etmek için kullanılmıştır. Pozitif sonuç *S. aureus*'un plazmayı koagülasyon ve bir pıhtıya dönüştürme yeteneği anlamına gelmektedir (Götz *et al.* 2006).

Koagülaz üretimi, normal *S. aureus* tanımlaması için standart olan 4 ile 24 saatlik inkübasyondan sonra pozitif reaksiyon gösteren tavşan plazmalı tüp koagülazı

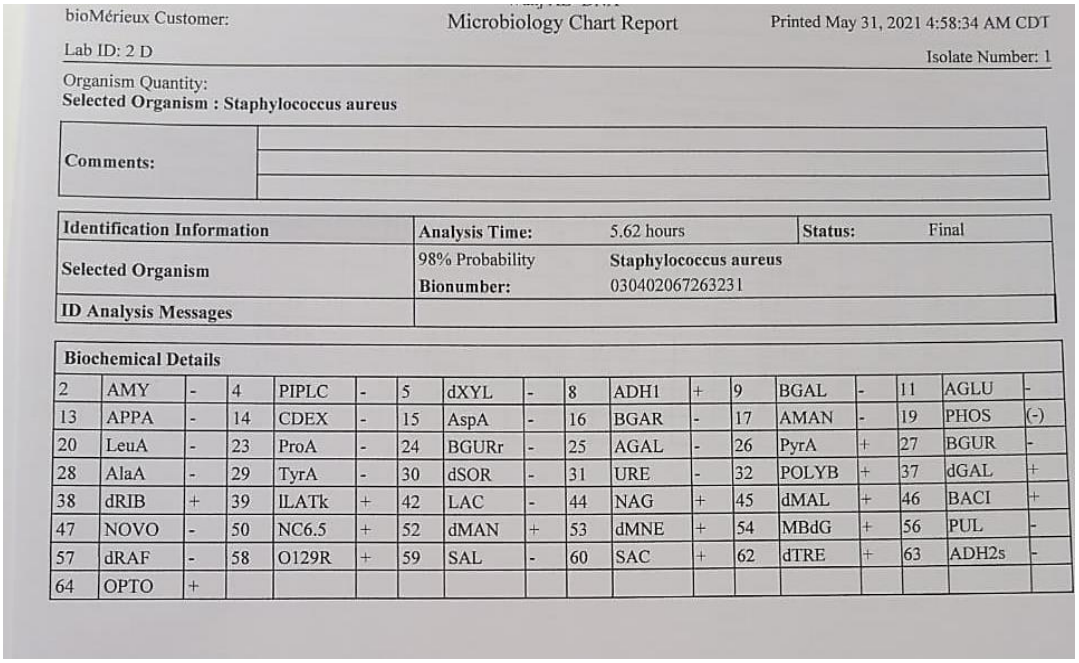
kullanılarak yapılmıştır. Metil kırmızısı ve voges-proskauer (MR-VP) testleri 50 izolatın tümü için pozitif sonuç vermiştir. Metil kırmızısı ve Voges-Proskauer (MR-VP) testleri 50 izolatın tümü için pozitifti, metil kırmızısı MR için pozitif sonuç, kırmızı rengin ortaya çıkmasıyla, karışık asit fermantasyon yolunun glikozu kullanmak için kullanıldığını ve birkaç organik asit ürettiğini göstermektedir.

Voges-Proskauer VP reaksiyonu için pozitif sonuç, kahverengimsi-kırmızıdan pembeye bir renk görünümüyle olurken, 2,3 bütandiol fermantasyon yolunun glikozu kullanmak ve bir 2,3 bütandiol son ürünü üretmek için kullanıldığını göstermektedir (Datsugwai ve Yusuf, 2017). Çizelge 4.2'de biyokimyasal testlerin sonuçları göstermektedir.

Çizelge 4.2 *S. aureus* izolatlarının biyokimyasal test sonuçları

İzolat Türleri	**İzolat Sayısı**	**Katalaz Testi Pozitif/Toplam**	**Oksidaz Testi Pozitif/Toplam**	**Koagülaz Testi**	**MR-VP Testleri**
Yaralar	22	22/22(% 100)	0/22(% 0)	22/22(% 100)	22/22(% 100)
Yanıklar	28	28/28(% 100)	0/28(% 0)	28/28(% 100)	28/28(% 100)
Toplam	50	50/50(% 100)	0/50(% 0)	50/50(% 100)	50/50(% 100)

Kalan 53 *S. aureus* izolatı için VITEK 2 gram pozitif GP tanımlama yöntemi kullanılmıştır. Bu sistem türler arasında yüksek farklılaşma, doğru mikrobiyal tanımlama ve mikrobiyal tanımlama süresini (yaklaşık 6 saat sürmektedir) azaltmaktadır. VITEK 2 GP kartı, 43 biyokimyasal ölçüm testi karbon kaynağı kullanımı, inhibisyon ve direnç ve enzimatik aktiviteleri temel alır (şekil 4.5) (Crowley ve ark. 2012). Bu sistem, tek bir koloni için 43 standart biyokimyasal test gerçekleştirecek şekilde tasarlanmıştır. Sonuçlar tüm izolatlarda (53/53 (% 100)) pozitif sonuç vermiştir.



bioMérieux Customer: Microbiology Chart Report Printed May 31, 2021 4:58:34 AM CDT

Lab ID: 2 D Isolate Number: 1

Organism Quantity:
Selected Organism : Staphylococcus aureus

Comments:	

Identification Information	**Analysis Time:**	5.62 hours	**Status:**	Final
Selected Organism	98% Probability	**Staphylococcus aureus**		
	Bionumber:	030402067263231		
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	+															

Şekil 4.5 VITEK 2 GP sisteminde *S. aureus* izolatlarının tanımlanması

4.4 *S. aureus* İzolatları için Antimikrobiyal Duyarlılık Testi

S. aureus 53 izolatları (53 örnek) için antimikrobiyal duyarlılığı test etmek için VITEK Sistemi tarafından dört tip antibiyotik kullanılmıştır. *S. aureus* için dört tip antibiyotiğe karşı duyarlılık ve direnç sonuçları Çizelge 4.3'te göstermektedir. Sonuçlara göre bu izolatlar; Sefoksitin (% 100), Benzilpenisilin (% 96,2), Oksasilin'e (% 94,3) dirençlidir, ve Gentamisin'e (% 96,2) duyarlıdır. Metisiline Dirençli *S. aureus* (MRSA) izolatlarını belirlemek için sefoksitin direnç testi kullanılmıştır. Sefoksitin direnci sadece mecA aracılı direnç mekanizmasına sahip MRSA'da saptanmıştır (Swenson *et al.* 2007). Bu çalışmadaki 53 *S. aureus* izolatının tamamı Metisiline Dirençli (MRSA) olarak tespit edilmiştir. (Anand *et al.* 2009) tarafından yapılan çalışmada *S. aureus* izolatlarının % 64'ünün sefoksitin ve MRSA'ya dirençli olduğu bulunmuştur. Başka bir çalışmada da *S. aureus* izolatlarının % 54'ünün sefoksitin ve MRSA'ya dirençli olduğu tespit edilmiştir (Lakshmi Priya, 2009).

Al-Talib *et al.* (2015) tarafından yapılan bir araştırma. Oksasilin'e (%100) direnç göstermiş, bu çalışma ile uyumlu ancak çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlardan farklı olarak tüm S. aureus izolatları Gentamisin'e (%100) dirençli bulunmuştur. Al-Dahbi ve

Al-Mathkhury (2013) tarafından yapılan başka bir çalışmada Benzilpenisiline direnç (%100) ve Gentamisin'e düşük direnç (%29,3) gösterilmiş olup bu çalışma ile uyumludur.

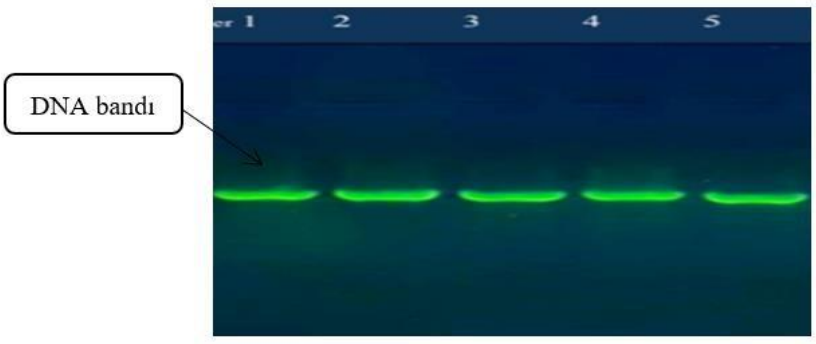
Çizelge 4.3 VITEK Sistemi sonuçlarına göre antimikrobiyal duyarlılık testi

Antibiyotikler	**Bakteri İzolatlarının Sayısı ve Yüzdeleri**	
	Direnç	**Duyarlılık**
Sefoksitin	53(% 100)	0(% 0)
Benzilpenisilin	51(% 96,2)	2(% 3,7)
Oksasilin	50(% 94,3)	3(% 5,6)
Gentamisin	2(% 3,7)	51(% 96,2)

4.5 *S. aureus*'un Moleküler Tanısı

4.5.1 *S. aureus* izolatlarından DNA ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu hazır kit kullanılarak yapılmıştır (53 numuneler için). Bunun sonucunda ekstrakte edilen DNA saf ve hasarsız şekilde elde edilmiştir (Şekil 4.6).



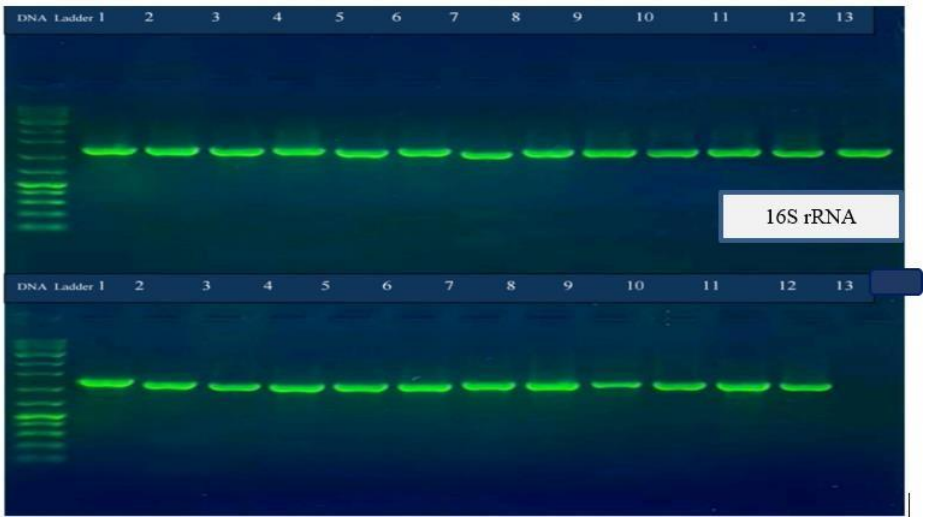
Şekil 4.6 % 1 agaroz jel elektroforezi kullanan PCR ürünü (genomik DNA)

4.5.2 PCR ile *S. aureus* izolatlarından 16S rRNA ve PVL genlerinin tespiti

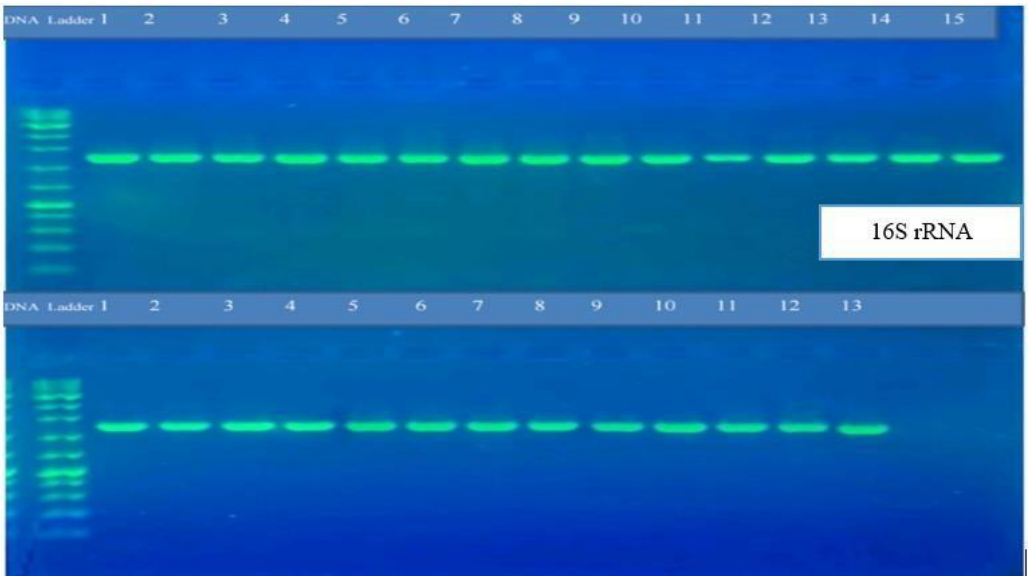
S. aureus genomu için 53 MRSA izolatının identifikasyonu ve spesifik primerler (Materyal bölümünde belirtilen 16S rRNA ve PVL primerleri) kullanılarak gen varlığının tespiti için konvansiyonel PCR uygulanmıştır. hepsi MRSA izolatı olduğundan ve bu moleküler analiz için uygun sayı olduğundan ve ayrıca moleküler test çok maliyetli olduğundan yalnızca 53 izolat uygulanmıştır. Jel elektroforezi kullanılarak elde edilen PCR ürünleri Şekil 4.7, Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da göstermektedir.

S. aureus izolatlarının tanımlanması için 16S rRNA geni kullanılmıştır. Bu gen, bakteriler arasında evrensel olarak mevcut olduğundan, yüksek oranda korunduğundan ve primerler kullanılarak hızla büyütülebildiğinden bakteri izolatlarını tanımlamak için sıklıkla kullanılmaktadır (Nguyen *et al.* 2016).

Moleküler boyutu 750 bp olan 16S rRNA primeri kullanan 16S rRNA geni için 53 (% 100) izolatın tamamı pozitif sonuç vermiştir. Bizim PCR sonucumuz, Ali *et al.* (2014) tarafından yapılan çalışma ile uyumluydu, Ali *et al.* (2014), 16S rRNA geninin test edilen tüm izolatların %100'ünde olduğunu buldu. Çalışmamızda genin hedef izolatlardaki varlığı Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de gösterildiği gibidir. PCR yöntemi, *S. aureus* izolatlarının sınıflandırılması ve tanımlanması için spesifik ve başarılı bir yöntemdir.

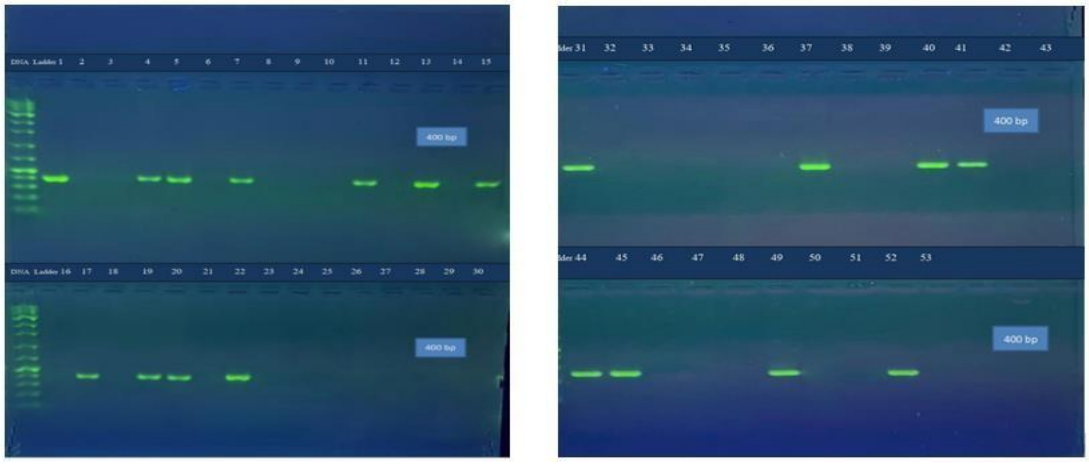


Şekil 4.7 *S. aureus* 16S rRNA geninin geleneksel PCR amplifikasyon ürünleri 1-25



Şekil 4.8 *S. aureus* 16S rRNA geninin geleneksel PCR amplifikasyon ürünleri 26-53

PVL geni, 400 bp moleküler büyüklüğe sahip PVL primeri kullanıldığında yalnızca 19 izolatta saptandı. Bu çalışmada, hedef izolatlarda (53 izolatlarda) bu genin varlığı, Şekil 4.9'de gösterildiği gibi %35.8 idi. Bir çalışmada, PVL geni üreten izolatların test edilen tüm nozokomiyal izolatların %17,9'unu (78 izolattan sadece 14'ü) oluşturduğu bulundu (Elgendy *et al.* 2016), bu çalışmadaki yüzde oranın yarısıdır.



Şekil 4.9 *S. aureus* PVL geninin geleneksel PCR amplifikasyon ürünleri

4.5.3 Gen dizileme

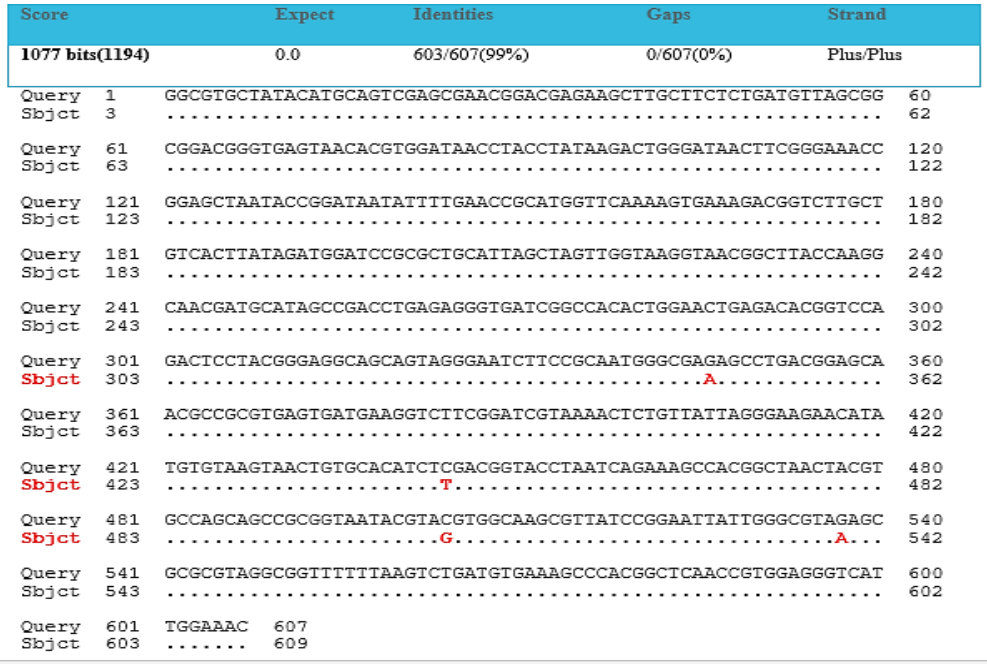
4.5.3.1 16S rRNA geni

16S rRNA geni için 12 izolatta dizileme yapılmıştır. NCBI'deki hizalama, Çizelge 4.4 ile Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15, Şekil 4.16, Şekil 4.17, Şekil 4.18 Şekil 4.19, Şekil 4.20, ve Şekil 4.21'de göstermektedir. Elde edilen sonuçlar *S. aureus* izolatlarının % 99 benzerlik gösterdiğini ortaya koymuştur.

Çizelge 4.4 16S rRNA geni için hizalama ve konum varyasyonları analizi

	İkame türü	**Konum**	**Nükleotid**	**Karşılaştırmalı sıra kimliği**	**Kaynak**	**Oran**
1	Geçiş	348	A\G	ID: MK000713.1	*S. aureus*	% 99
	Geçiş	447	T\C			
	Dönüşüm	506	G\C			
	Geçiş	539	A\G			
2	Dönüşüm	248	T\G	ID: MW453043.1	*S. aureus*	% 99
	Geçiş	460	T\C			
	Dönüşüm	479	A\T			
	Geçiş	504	G\A			
	Dönüşüm	545	T\G			
	Dönüşüm	567	G\C			
	Dönüşüm	608	G\C			
3	Geçiş	446	T\C	ID: MK000713.1	*S. aureus*	% 99
4	Geçiş	244	A\G	ID: MK000713.1	*S. aureus*	% 99
	Geçiş	280	C\T			
	Dönüşüm	325	AC			
	Dönüşüm	326	G\T			
	Dönüşüm	397	AC			
	Dönüşüm	409	T\G			
	Geçiş	446	T\C			
	Dönüşüm	452	T\G			
	Dönüşüm	539	AC			
	Dönüşüm	551	G\T			
	Geçiş	579	C\T			
	Dönüşüm	588	A\T			
	Dönüşüm	594	G\C			
	Dönüşüm	602	T\A			
5	Geçiş	446	T\C	ID: MK000713.1	*S. aureus*	% 99
	Dönüşüm	553	G\C			
	Geçiş	592	T\C			
6	Geçiş	254	A\G	ID: KP728240.1	*S. aureus*	% 99

	Geçiş	456	T\C			
7	Geçiş	452	T\C	ID: KY971290.1	*S. aureus*	% 99
	Dönüşüm	787	AC			
8	Dönüşüm	140	CA	ID: KY971290.1	*S. aureus*	% 99
	Dönüşüm	264	G\C			
9	Dönüşüm	152	A\T	ID: KY971290.1	*S. aureus*	% 99
	Geçiş	205	C\T			
	Geçiş	214	T\C			
10	Dönüşüm	152	A\T	ID: KY971290.1	*S. aureus*	% 99
	Geçiş	214	T\C			
	Geçiş	256	A\G			
	Dönüşüm	654	T\G			
11	Dönüşüm	264	G\C	ID: KY971290.1	*S. aureus*	% 99
	Dönüşüm	427	AC			
	Dönüşüm	438	AC			
	Geçiş	452	T\C			
	Dönüşüm	561	T\G			
12	Dönüşüm	264	G\C	ID: KY971290.1	*S. aureus*	% 99
	Dönüşüm	298	G\C			
	Dönüşüm	374	G\T			
	Dönüşüm	428	AC			



Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1077 bits(1194)	0.0	603/607(99%)	0/607(0%)	Plus/Plus

```
Query  1    GGCGTGCTATACATGCAGTCGAGCGAACGGACGAGAAGCTTGCTTCTCTGATGTTAGCGG  60
Sbjct  3    ............................................................  62

Query  61   CGGACGGGTGAGTAACACGTGGATAACCTACCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACC  120
Sbjct  63   ............................................................  122

Query  121  GGAGCTAATACCGGATAATATTTTGAACCGCATGGTTCAAAAGTGAAAGACGGTCTTGCT  180
Sbjct  123  ............................................................  182

Query  181  GTCACTTATAGATGGATCCGCGCTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGG  240
Sbjct  183  ............................................................  242

Query  241  CAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCA  300
Sbjct  243  ............................................................  302

Query  301  GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAGAGCCTGACGGAGCA  360
Sbjct  303  ..........................................A.................  362

Query  361  ACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCGGATCGTAAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACATA  420
Sbjct  363  ............................................................  422

Query  421  TGTGTAAGTAACTGTGCACATCTCGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGT  480
Sbjct  423  ......................T.....................................  482

Query  481  GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTACGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAGAGC  540
Sbjct  483  ......................G.............................A...  542

Query  541  GCGCGTAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAT  600
Sbjct  543  ............................................................  602

Query  601  TGGAAAC  607
Sbjct  603  .......  609
```

Şekil 4.10 16S rRNA geninin 1 numaralı izolat için hizalama sonuçları ID: MK000713.1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1051 bits(1165)	0.0	593/600(99%)	0/600(0%)	Plus/Plus

```
Query  1    ATACATGCAAGTCGAGCGAACGGACGAGAAGCTTGCTTCTCTGATGTTAGCGGCGGACGG  60
Sbjct  24   ............................................................  83

Query  61   GTGAGTAACACGTGGATAACCTACCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTA  120
Sbjct  84   ............................................................  143

Query  121  ATACCGGATAATATTTTGAACCGCATGGTTCAAAAGTGAAAGACGGTCTTGCTGTCACTT  180
Sbjct  144  ............................................................  203

Query  181  ATAGATGGATCCGCGCTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCGTACCAAGGCAACGAT  240
Sbjct  204  ............................................T...............  263

Query  241  GCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCT  300
Sbjct  264  ............................................................  323

Query  301  ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGC  360
Sbjct  324  ............................................................  383

Query  361  GTGAGTGATGAAGGTCTTCGGATCGTAAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACATATGTGTAA  420
Sbjct  384  ............................................................  443

Query  421  GTAACTGTGCACATCTCGACGGTACCTAATCAGAATGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCA  480
Sbjct  444  ..............T...................A.........................  503

Query  481  ACCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATGGGGCGTAAAGCGCGCGTA  540
Sbjct  504  G.........................................T..................  563

Query  541  GGCCGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGCAGGGTCATTGGAAAC  600
Sbjct  564  ...G.........................................G...............  623
```

Şekil 4.11 16S rRNA geninin 2 numaralı izolatının hizalama sonuçları ID: MW453043.1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1067 bits(1183)	0.0	593/594(99%)	0/594(0%)	Plus/Plus

```
Query  1    TGCAGTCGAGCGAACGGACGAGAAGCTTGCTTCTCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGT  60
Sbjct  16   ............................................................  75

Query  61   AACACGTGGATAACCTACCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCG  120
Sbjct  76   ............................................................  135

Query  121  GATAATATTTTGAACCGCATGGTTCAAAAGTGAAAGACGGTCTTGCTGTCACTTATAGAT  180
Sbjct  136  ............................................................  195

Query  181  GGATCCGCGCTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATGCATAG  240
Sbjct  196  ............................................................  255

Query  241  CCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGA  300
Sbjct  256  ............................................................  315

Query  301  GGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGT  360
Sbjct  316  ............................................................  375

Query  361  GATGAAGGTCTTCGGATCGTAAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACATATGTGTAAGTAACT  420
Sbjct  376  ............................................................  435

Query  421  GTGCACATCTCGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG  480
Sbjct  436  ..........T.................................................  495

Query  481  GTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGT  540
Sbjct  496  ............................................................  555

Query  541  TTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAAC  594
Sbjct  556  ......................................................  609
```

Şekil 4.12 16S rRNA geninin 3 numaralı izolatının hizalama sonuçları ID: MK000713.1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1009 bits(1118)	0.0	580/594(98%)	0/594(0%)	Plus/Plus

```
Query  1    TGCAGTCGAGCGAACGGACGAGAAGCTTGCTTCTCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGT  60
Sbjct  16   ............................................................  75

Query  61   AACACGTGGATAACCTACCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCG  120
Sbjct  76   ............................................................  135

Query  121  GATAATATTTTGAACCGCATGGTTCAAAAGTGAAAGACGGTCTTGCTGTCACTTATAGAT  180
Sbjct  136  ............................................................  195

Query  181  GGATCCGCGCTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATGCATAG  240
Sbjct  196  ...........................................A................  255

Query  241  CCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCATACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGA  300
Sbjct  256  ......................C.....................................  315

Query  301  GGCAGCAGTCTGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGT  360
Sbjct  316  .........AG..............................................  375

Query  361  GATGAAGGTCTTCGGATCGTACAACTCTGTTATGAGGGAAGAACATATGTGTAAGTAACT  420
Sbjct  376  ......................A...........T.........................  435

Query  421  GTGCACATCTCGACGGGACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG  480
Sbjct  436  ..........T.....T.....................................------  495

Query  481  GTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTCAAGCGCGCGTAGTCGGT  540
Sbjct  496  ...........................................A............G....  555

Query  541  TTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTACGGCTCATCCGTGCAGGGTCAATGGAAAC  594
Sbjct  556  ......................C........A.....G.......T.......  609
```

Şekil 4.13 16S rRNA geninin 4 numaralı izolatının hizalama sonuçları ID:MK000713.1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1058 bits(1173)	0.0	591/594(99%)	0/594(0%)	Plus/Plus

```
Query  1    TGCAGTCGAGCGAACGGACGAGAAGCTTGCTTCTCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGT  60
Sbjct  16   ............................................................  75

Query  61   AACACGTGGATAACCTACCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCG  120
Sbjct  76   ............................................................  135

Query  121  GATAATATTTTGAACCGCATGGTTCAAAAGTGAAAGACGGTCTTGCTGTCACTTATAGAT  180
Sbjct  136  ............................................................  195

Query  181  GGATCCGCGCTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATGCATAG  240
Sbjct  196  ............................................................  255

Query  241  CCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGA  300
Sbjct  256  ............................................................  315

Query  301  GGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGT  360
Sbjct  316  ............................................................  375

Query  361  GATGAAGGTCTTCGGATCGTAAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACATATGTGTAAGTAACT  420
Sbjct  376  ............................................................  435

Query  421  GTGCACATCTCGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG  480
Sbjct  436  ..........T.................................................  495

Query  481  GTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCCGT  540
Sbjct  496  ............................................................G..  555

Query  541  TTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGCGGAGGGTCATTGGAAAC  594
Sbjct  556  ..................................T.................  609
```

Şekil 4.14 16S rRNA geninin 5 numaralı izolat için hizalama sonuçları ID: MK000713.1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1092 bits(1210)	0.0	608/610(99%)	0/610(0%)	Plus/Plus

```
Query  1    CGGCGCGCCTATACATGCAAGTCGAGCGAACGGACGAGAAGCTTGCTTCTCTGATGTTAG  60
Sbjct  10   ............................................................  69

Query  61   CGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGATAACCTACCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAA  120
Sbjct  70   ............................................................  129

Query  121  ACCGGAGCTAATACCGGATAATATTTTGAACCGCATGGTTCAAAAGTGAAAGACGGTCTT  180
Sbjct  130  ............................................................  189

Query  181  GCTGTCACTTATAGATGGATCCGCGCTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCA  240
Sbjct  190  ............................................................  249

Query  241  AGGCGACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAACTGAGACACGGT  300
Sbjct  250  ....A.......................................................  309

Query  301  CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGA  360
Sbjct  310  ............................................................  369

Query  361  GCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCGGATCGTAAAACTCTGTTATTAGGGAAGAAC  420
Sbjct  370  ............................................................  429

Query  421  ATATGTGTAAGTAACTGTGCACATCTCGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTA  480
Sbjct  430  ........................T...................................  489

Query  481  CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAA  540
Sbjct  490  ............................................................  549

Query  541  AGCGCGCGTAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGT  600
Sbjct  550  ............................................................  609

Query  601  CATTGGAAAC  610
Sbjct  610  ..........  619
```

Şekil 4.15 16S rRNA geninin 6 numaralı izolat için hizalama sonuçları ID: KP728240.1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1478 bits(1638)	0.0	822/824(99%)	0/824(0%)	Plus/Plus

```
Query  1    TCGAGCGAACAGATAAGGAGCTTGCTCCTTTGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACAC  60
Sbjct  27   ............................................................  86

Query  61   GTGGGTAACCTACCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAA  120
Sbjct  87   ............................................................  146

Query  121  CATTTAGAACCGCATGGTTCTAAAGTGAAAGATGGTTTTGCTATCACTTATAGATGGACC  180
Sbjct  147  ............................................................  206

Query  181  CGCGCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATACGTAGCCGAC  240
Sbjct  207  ............................................................  266

Query  241  CTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAG  300
Sbjct  267  ............................................................  326

Query  301  CAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGA  360
Sbjct  327  ............................................................  386

Query  361  AGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACAAATGTGTAAGTAACTGTGCA  420
Sbjct  387  ............................................................  446

Query  421  CATCTCGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT  480
Sbjct  447  .....T......................................................  506

Query  481  ACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGTTTCTT  540
Sbjct  507  ............................................................  566

Query  541  AAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAAACTTG  600
Sbjct  567  ............................................................  626

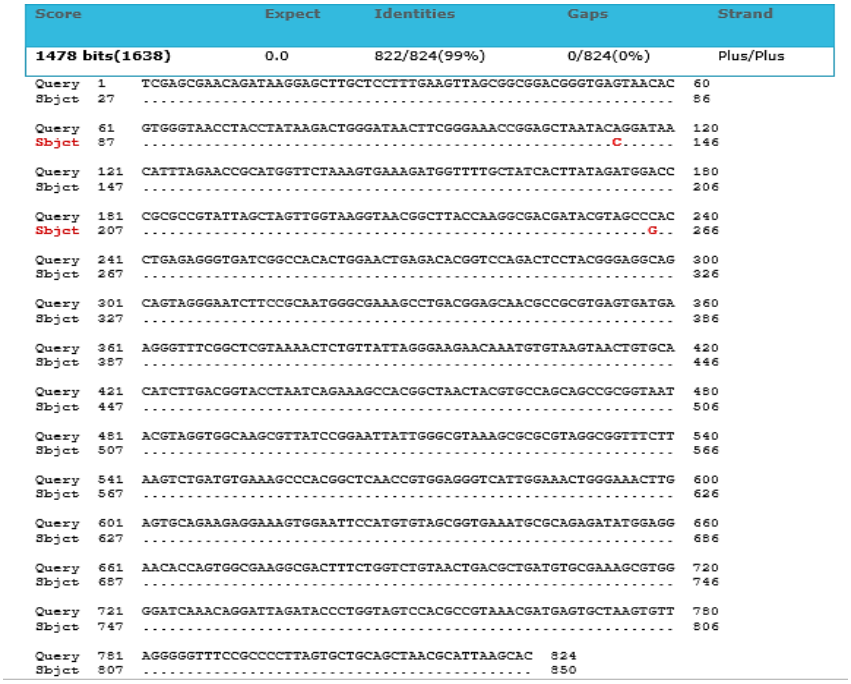
Query  601  AGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGG  660
Sbjct  627  ............................................................  686

Query  661  AACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACTGACGCTGATGTGCGAAAGCGTGG  720
Sbjct  687  ............................................................  746

Query  721  GGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTACACGATGAGTGCTAAGTGTT  780
Sbjct  747  ..........................................A.................  806

Query  781  AGGGGGTTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCAC  824
Sbjct  807  ..........................................  850
```

Şekil 4.16 16S rRNA geninin 7 numaralı izolat için hizalama sonuçları ID: KY971290.1



Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1478 bits(1638)	0.0	822/824(99%)	0/824(0%)	Plus/Plus

```
Query  1    TCGAGCGAACAGATAAGGAGCTTGCTCCTTTGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACAC  60
Sbjct  27   ............................................................  86

Query  61   GTGGGTAACCTACCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACAGGATAA  120
Sbjct  87   ...........................................................C..  146

Query  121  CATTTAGAACCGCATGGTTCTAAAGTGAAAGATGGTTTTGCTATCACTTATAGATGGACC  180
Sbjct  147  ............................................................  206

Query  181  CGCGCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATACGTAGCCCAC  240
Sbjct  207  ...........................................................G..  266

Query  241  CTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAG  300
Sbjct  267  ............................................................  326

Query  301  CAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGA  360
Sbjct  327  ............................................................  386

Query  361  AGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACAAATGTGTAAGTAACTGTGCA  420
Sbjct  387  ............................................................  446

Query  421  CATCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT  480
Sbjct  447  ............................................................  506

Query  481  ACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGTTTCTT  540
Sbjct  507  ............................................................  566

Query  541  AAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAAACTTG  600
Sbjct  567  ............................................................  626

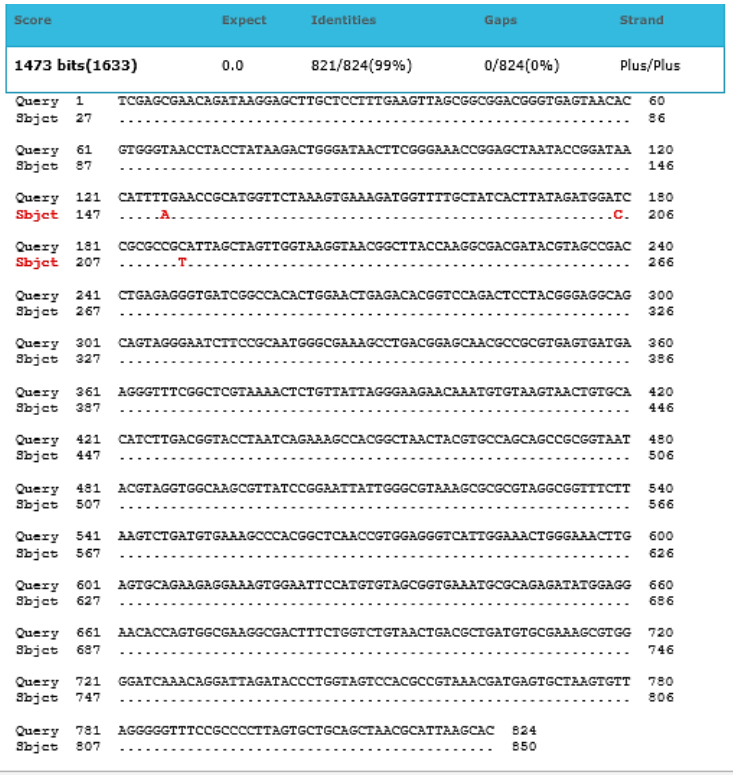
Query  601  AGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGG  660
Sbjct  627  ............................................................  686

Query  661  AACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACTGACGCTGATGTGCGAAAGCGTGG  720
Sbjct  687  ............................................................  746

Query  721  GGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTT  780
Sbjct  747  ............................................................  806

Query  781  AGGGGGTTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCAC  824
Sbjct  807  ..........................................  850
```

Şekil 4.17 16S rRNA geninin 7 numaralı izolat için hizalama sonuçları ID: KY971290.1



Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1473 bits(1633)	0.0	821/824(99%)	0/824(0%)	Plus/Plus

```
Query  1    TCGAGCGAACAGATAAGGAGCTTGCTCCTTTGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACAC  60
Sbjct  27   ............................................................  86

Query  61   GTGGGTAACCTACCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAA  120
Sbjct  87   ............................................................  146

Query  121  CATTTTGAACCGCATGGTTCTAAAGTGAAAGATGGTTTTGCTATCACTTATAGATGGATC  180
Sbjct  147  .....A.......................................................C.  206

Query  181  CGCGCCGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATACGTAGCCGAC  240
Sbjct  207  .......T....................................................  266

Query  241  CTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAG  300
Sbjct  267  ............................................................  326

Query  301  CAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGA  360
Sbjct  327  ............................................................  386

Query  361  AGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACAAATGTGTAAGTAACTGTGCA  420
Sbjct  387  ............................................................  446

Query  421  CATCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT  480
Sbjct  447  ............................................................  506

Query  481  ACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGTTTCTT  540
Sbjct  507  ............................................................  566

Query  541  AAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAAACTTG  600
Sbjct  567  ............................................................  626

Query  601  AGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGG  660
Sbjct  627  ............................................................  686

Query  661  AACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACTGACGCTGATGTGCGAAAGCGTGG  720
Sbjct  687  ............................................................  746

Query  721  GGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTT  780
Sbjct  747  ............................................................  806

Query  781  AGGGGGTTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCAC  824
Sbjct  807  ..........................................  850
```

Şekil 4.18 16S rRNA geninin 9 numaralı izolat için hizalama sonuçları ID:

KY971290.1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1469 bits(1628)	0.0	820/824(99%)	0/824(0%)	Plus/Plus

```
Query  1    TCGAGCGAACAGATAAGGAGCTTGCTCCTTTGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACAC  60
Sbjct  27   ............................................................  86

Query  61   GTGGGTAACCTACCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAA  120
Sbjct  87   ............................................................  146

Query  121  CATTTTGAACCGCATGGTTCTAAAGTGAAAGATGGTTTTGCTATCACTTATAGATGGACC  180
Sbjct  147  .....A.......................................................  206

Query  181  CGCGCCGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGAC  240
Sbjct  207  .......T.....................................................  266

Query  241  CTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAG  300
Sbjct  267  ............................................................  326

Query  301  CAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGA  360
Sbjct  327  ............................................................  386

Query  361  AGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACAAATGTGTAAGTAACTGTGCA  420
Sbjct  387  ............................................................  446

Query  421  CATCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT  480
Sbjct  447  ............................................................  506

Query  481  ACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGTTTCTT  540
Sbjct  507  ............................................................  566

Query  541  AAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAAACTTG  600
Sbjct  567  ............................................................  626

Query  601  AGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGG  660
Sbjct  627  ...........................T................................  686

Query  661  AACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACTGACGCTGATGTGCGAAAGCGTGG  720
Sbjct  687  ............................................................  746

Query  721  GGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTT  780
Sbjct  747  ............................................................  806

Query  781  AGGGGGTTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCAC  824
Sbjct  807  ..........................................  850
```

Şekil 4.19 16S rRNA geninin 10 numaralı izolat için hizalama sonuçları:ID KY971290.1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1464 bits(1623)	0.0	819/824(99%)	0/824(0%)	Plus/Plus

```
Query  1    TCGAGCGAACAGATAAGGAGCTTGCTCCTTTGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACAC  60
Sbjct  27   ............................................................  86

Query  61   GTGGGTAACCTACCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAA  120
Sbjct  87   ............................................................  146

Query  121  CATTTAGAACCGCATGGTTCTAAAGTGAAAGATGGTTTTGCTATCACTTATAGATGGACC  180
Sbjct  147  ............................................................  206

Query  181  CGCGCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATACGTAGCCCAC  240
Sbjct  207  ..........................................................G..  266

Query  241  CTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAG  300
Sbjct  267  ............................................................  326

Query  301  CAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGA  360
Sbjct  327  ............................................................  386

Query  361  AGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACACATGTGTAAGTCACTGTGCA  420
Sbjct  387  ..........................................A.........A........  446

Query  421  CATCTCGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT  480
Sbjct  447  .....T......................................................  506

Query  481  ACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGTGTCTT  540
Sbjct  507  ..........................................................T....  566

Query  541  AAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAAACTTG  600
Sbjct  567  ............................................................  626

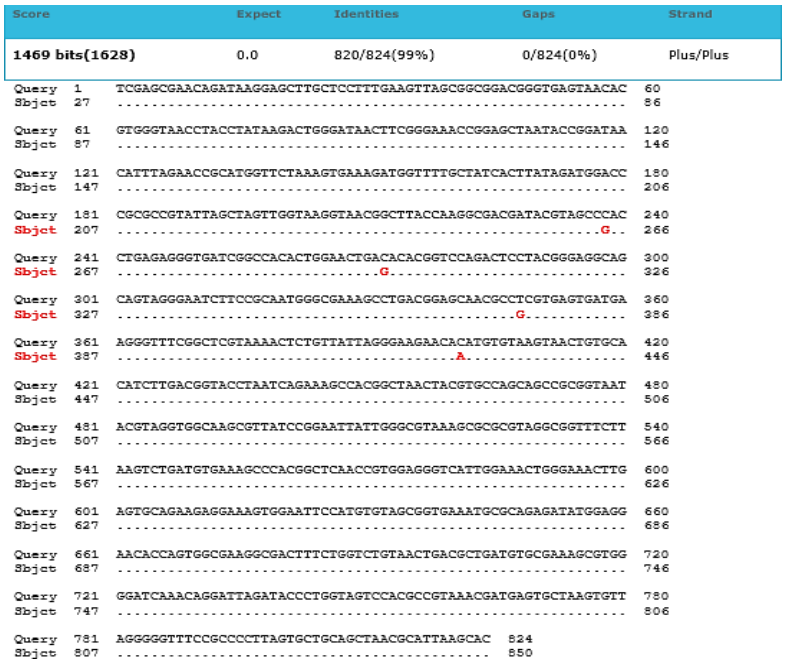
Query  601  AGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGG  660
Sbjct  627  ............................................................  686

Query  661  AACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACTGACGCTGATGTGCGAAAGCGTGG  720
Sbjct  687  ............................................................  746

Query  721  GGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTT  780
Sbjct  747  ............................................................  806

Query  781  AGGGGGTTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCAC  824
Sbjct  807  ..........................................  850
```

Şekil 4.20 16S rRNA geninin 11 numaralı izolatı için hizalama sonuçları ID: KY971290.1



Şekil 4.21 16S rRNA geninin 12 numaralı izolat için hizalama sonuçları ID: KY971290.1

4.5.3.2 PVL geni

PVL geni için 5 izolatta dizileme yapılmıştır. NCBI'deki hizalama, Çizelge 4.5 ve Şekil 4.22, Şekil 4.23, Şekil 4.24, Şekil 4.25 ve Şekil 4.26'da göstermektedir. Elde edilen sonuçlar *S. aureus* izolatlarının % 99 benzerlik gösterdiğini ortaya koymuştur.

Çizelge 4.5 PVL geni için hizalama ve varyasyon analizi

No	İkame türü	Konum	Nükleotid	Karşılaştırmalı sıra kimliği	Kaynak	Oran
1	Geçiş	1924352	T\C	ID: AP023034.1	*S. aureus*	% 99
2	Geçiş	1886031	T\C	ID: CP038229.1	*S. aureus*	% 99
3	Geçiş	1924151	T\C	ID:	*S. aureus*	% 99
	Geçiş	1924352	T\C	AP023034.1		
4	Geçiş	1924254	T\C	ID:	*S. aureus*	% 99
	Dönüşüm	1924321	T\A	AP023034.1		
	Geçiş	1924352	T\C			
5	Dönüşüm	1885788	C\G	ID:	*S. aureus*	% 99
	Dönüşüm	1885999	A\T	CP038229.1		
	Geçiş	1886031	T\C			

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
523 bits(579)	4e-146	291/292(99%)	0/292(0%)	Plus/Plus

```
Query  1        ATTATGTCCTTTCACTTTAATTTCGTGTGTTTTCCAATTAACTTCATATCTAACTACAAA  60
Sbjct  1924065  ............................................................  1924124

Query  61       GTTTCTATTTACAAATGCATTATGCTTTCTTTCTGCGTAAATACCAGTTCTAGGGAATAA  120
Sbjct  1924125  ............................................................  1924184

Query  121      AGTCGCATATGTAATATCTAAGTTTCTACCATATGAAATTTCAAATTCACTCGTATCACT  180
Sbjct  1924185  ............................................................  1924244

Query  181      TGAACCTTTTTCATGTGATAGTGTAGTGATAAACGATGGATTAAAGCCACTTTGAACTAA  240
Sbjct  1924245  ............................................................  1924304

Query  241      AGGTGGCAATTGATTATCAGGAGCAAAATATTCTCTTGCTGAACCTGCTGGA  292
Sbjct  1924305  ..............................................T.....  1924356
```

Şekil 4.22 PVL geninin 1 numaralı izolatı için hizalama sonuçları ID: AP023034.1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
523 bits(579)	4e-146	291/292(99%)	0/292(0%)	Plus/Plus

```
Query  1        ATTATGTCCTTTCACTTTAATTTCGTGTGTTTTCCAATTAACTTCATATCTAACTACAAA  60
Sbjct  1885744  ............................................................  1885803

Query  61       GTTTCTATTTACAAATGCATTATGCTTTCTTTCTGCGTAAATACCAGTTCTAGGGAATAA  120
Sbjct  1885804  ............................................................  1885863

Query  121      AGTCGCATATGTAATATCTAAGTTTCTACCATATGAAATTTCAAATTCACTCGTATCACT  180
Sbjct  1885864  ............................................................  1885923

Query  181      TGAACCTTTTTCATGTGATAGTGTAGTGATAAATGATGGATTAAAGCCACTTTGAACTAA  240
Sbjct  1885924  ............................................................  1885983

Query  241      AGGTGGTAATTGATTATCAGGAGCAAAATATTCTCTTGCTGAACCTGCTGGA  292
Sbjct  1885984  ..............................................T.....  1886035
```

Şekil 4.23 PVL geninin 2 numaralı izolatı için hizalama sonuçları ID: CP038229.1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
518 bits(574)	5e-145	290/292(99%)	0/292(0%)	Plus/Plus

```
Query  1        ATTATGTCCTTTCACTTTAATTTCGTGTGTTTTCCAATTAACTTCATATCTAACTACAAA  60
Sbjct  1924065  ............................................................  1924124

Query  61       GTTTCTATTTACAAATGCATTATGCTCTCTTTCTGCGTAAATACCAGTTCTAGGGAATAA  120
Sbjct  1924125  ..........................T.................................  1924184

Query  121      AGTCGCATATGTAATATCTAAGTTTCTACCATATGAAATTTCAAATTCACTCGTATCACT  180
Sbjct  1924185  ............................................................  1924244

Query  181      TGAACCTTTTTCATGTGATAGTGTAGTGATAAACGATGGATTAAAGCCACTTTGAACTAA  240
Sbjct  1924245  ............................................................  1924304

Query  241      AGGTGGCAATTGATTATCAGGAGCAAAATATTCTCTTGCTGAACCTGCTGGA  292
Sbjct  1924305  ..............................................T.....  1924356
```

Şekil 4.24 PVL geninin 3 numaralı izolat için hizalama sonuçları ID: AP023034.1



Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
514 bits(569)	2e-143	289/292(99%)	0/292(0%)	Plus/Plus

```
Query  1        ATTATGTCCTTTCACTTTAATTTCGTGTGTTTTCCAATTAACTTCATATCTAACTACAAA  60
Sbjct  1924065  ............................................................  1924124

Query  61       GTTTCTATTTACAAATGCATTATGCTTTCTTTCTGCGTAAATACCAGTTCTAGGGAATAA  120
Sbjct  1924125  ............................................................  1924184

Query  121      AGTCGCATATGTAATATCTAAGTTTCTACCATATGAAATTTCAAATTCACTCGTATCACT  180
Sbjct  1924185  ............................................................  1924244

Query  181      TGAACCTTTCTCATGTGATAGTGTAGTGATAAACGATGGATTAAAGCCACTTTGAACTAA  240
Sbjct  1924245  .........T..................................................  1924304

Query  241      AGGTGGCAATTGATTAACAGGAGCAAAATATTCTCTTGCTGAACCTGCTGGA  292
Sbjct  1924305  ..............T..............................T....  1924356
```

Şekil 4.25 PVL geninin 4 numaralı izolatı için hizalama sonuçları ID: AP023034.1



Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
514 bits(569)	2e-143	289/292(99%)	0/292(0%)	Plus/Plus

```
Query  1        ATTATGTCCTTTCACTTTAATTTCGTGTGTTTTCCAATTAACTTGATATCTAACTACAAA  60
Sbjct  1885744  ..............................................C.............  1885803

Query  61       GTTTCTATTTACAAATGCATTATGCTTTCTTTCTGCGTAAATACCAGTTCTAGGGAATAA  120
Sbjct  1885804  ............................................................  1885863

Query  121      AGTCGCATATGTAATATCTAAGTTTCTACCATATGAAATTTCAAATTCACTCGTATCACT  180
Sbjct  1885864  ............................................................  1885923

Query  181      TGAACCTTTTTCATGTGATAGTGTAGTGATAAATGATGGATTAAAGCCACTTTGAACTAA  240
Sbjct  1885924  ............................................................  1885983

Query  241      AGGTGGTAATTGATTTTCAGGAGCAAAATATTCTCTTGCTGAACCTGCTGGA  292
Sbjct  1885984  ..............A..............................T....  1886035
```

Şekil 4.26 PVL geninin 5 numaralı izolatı için hizalama sonuçları ID: CP038229.1

4.5.4 PVL gen ifadesinin tahmini

PVL geninin gen ekspresyonu 53 izolatta yapılmıştır ancak bu izolatlardan sadece 22 izolatta gen ekspresyonu pozitif sonuçlar vermiştir, çünkü sadece 22 izolat bu gene sahipti. PVL gen ekspresyonunun ortalaması ve Ct değerleri Çizelge 4.6'da gösterilmektedir.

Çizelge 4.6 *Staphylococcus aureus* klinik izolatları için 16SrRNA ve PVL genlerinin Ct değerleri ve katı gen ekspresyonu

Genin adı	Ortalama CT ±SD	Ortalama ΔCT	Ortalama ΔΔCT	Kat gen ifadesi =2ˆ-ΔΔCT	Kat gen ifadesi =2ˆ-CT
HKG 16SrRNA	22,39 ±3,11	----------	----------	----------	0,817
PVL geni	28,17 ± 1,88	5,82	-1,076	2,108	
*P değeri	< 0,05				

(*P≤0,05) = oldukça anlamlı iken P> 0,05 anlamsız

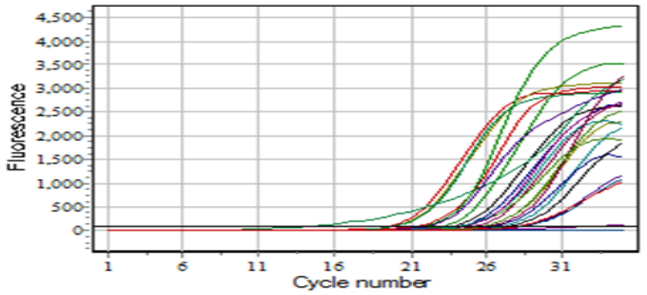
cDNA da dahil olmak üzere herhangi bir çift sarmallı DNA'yı tespit edebilen bir flüoresan boya olan syber green kullanılarak amplifikasyon bir Ct değeri (döngü eşiği) olarak değerlendirildi. Düşük Ct değeri, daha fazla hedef kopyanın varlığını gösterirken yüksek Ct değerleri, düşük gen ifadesi anlamına gelmektedir (Schmittgen ve Livak 2008).

S. aureus'ta 16S rRNA (Temizlik geni) için Ct değerinin ortalama ±SD değeri 22 izolat için 22,39 ± 3,11 olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada verileri normalleştirmek için gen 16S rRNA kullanıldı. Bunu başarmak için, Çizelge 4.6'de gösterildiği gibi kontrol ve örneklerde 2ˆ-Ct oranı kullanıldı (Schmittgen ve Livak 2008).

Gen ekspresyonunun incelenmesinin temel amacı, 53 izolattan PVL virülans genine sahip izolatların sayısını bulmak ve bu izolatlarda PVL geninin ekspresyonunu referans gen 16S rRNA ekspresyonu ile karşılaştırmak ve PVL gen ekspresyonunun antibiyotik direncindeki önemini bilmektir.

PVL gen ifadesini ölçmek için 16S rRNA gen ifadesi ile karşılaştırılmıştır. Test 53 izolat için yapılırken, sortalama sonuçlar her numune için verilen gen ekspresyonunun miktarını hesaplamak için kullanılmıştır. ΔΔCt, gen ekspresyonunu ölçmek için kullanılmıştır. ΔΔ Ct, numunenin ΔCt'si kalibratörün ΔCt'sinden standart numune çıkarılarak elde hesaplanmıştır. Göreceli gen ekspresyonu verilerine bağlı olarak, karşılaştırmalı Ct yöntemi (Schmittgen ve Livak 2008) kat değişimi (= 2-ΔΔ Ct) yöntemine de atıfta bulunur, farklı numunelerde gen ekspresyonunu kıyaslamak için altın denklem yöntemi kullanılmıştır. Gözlemlenen varyasyonların mRNA kalitesi veya miktarından ziyade hedef gen ekspresyonundaki değişikliklerden kaynaklandığından emin olmak için her numune bir dahili kontrol geni (Temizlik geni) ile karşılaştırılmıştır.

Staphylococcus aureus'ta PVL virülans genini saptamak için RT-qPCR kullanma olasılığı ölçülmüştür. Sadece 22 izolatta (% 41,5) PVL geni tespit edilmiştir. Bunun haricinde farklı izolatlarda farklı ifadeler de tespit edilmiştir (Şekil 4.27).



Şekil 4.27 RT-qPCR ile PVL amplifikasyonu

Şekil 4.28'de elde edilen sonuçların ortalama değerleri gösterilmektedir. ct ±SD 28,17 ± 1,88 ve kat gen ekspresyonu PVL geni için 2,1 iken, referans genin ortalaması: ct 22,39 ±3,11 ve kat gen ekspresyonu 0,81 olarak bulunmuştur. Bu, PVL gen ekspresyonunun arttığını ve elde edilen değerin (P <0,05) oldukça anlamlı olduğunu göstermektedir.

16S rRNA geni, diğer gen ekspresyonunu analiz etmek için nicel araştırmalarda dahili bir standart olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (Vaudaux *et al.* 2002, Yarwood *et al.* 2002). Temizlik genlerin moleküler araştırmalarda kullanılmasının ardındaki öncül, ekspresyonlarının analiz edilen hücrelerde veya dokularda sabit olmaktadır (Rebouças, 2013). Örnekten örneğe varyasyonu azaltmak için referans genler veya temizlik genler kullanılır. Bu nedenle, stabil olarak ifade edilen temizlik genlerinin seçilmesi çok önemlidir, çünkü temizlik gen ekspresyonundaki değişiklikler değerler için yanlış pozitif sonuçlara neden olabilir (Dheda *et al.* 2005).

Çok çeşitli bakteri hücreleri, numuneler ve deneysel durumlar arasındaki ifade seviyelerinde minimum farkla 16S rRNA referansını veya temizlik genini ifade etti. Real-time PCR kullanılarak numunelerin karşılaştırılması için ilgili genlerin mRNA seviyeleri önce 16S rRNA geni kullanılarak normalize edildi. Uygun seçimi yapmak, qRT-PCR sonuçlarını doğru bir şekilde değerlendirmek için çok mühimdir (Radonic *et al.* 2004). Bu referans geni, RNA kalitesi ve ekstraksiyon, numune değişkenliğini, cDNA sentezinin etkinliği, dahili kontrolleri ve çeşitli deneysel numuneleri analiz etti ve azalttı (Peters *et al.* 2004).

Çalışmamız, *S. aureus* gen ekspresyonu çalışmalarında referans gen olarak 16S rRNA'nın kullanımını desteklemiştir. Gen ekspresyonu kat değişimi, ΔΔCT değerinden nispi niceleme (RQ) kullanılarak hesaplanmıştır.

Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) izolatları ciddi enfeksiyonlara neden olabilen patojen ajanlar arasında önemli bir sorun teşkil etmekte ve PVL geni üretildiğinde daha virülans haline gelip ciddi nekrotik pnömoniye neden olabilmektedir (Motamedi *et al.* 2015). Bunları takiben oluşan salgınlarda yenidoğanlar ve yoğun bakım üniteleri gibi hassas grupları etkilenmektedir (Amin *et al.* 2020). Hastadan alınan izolatlarda virülans özelliklerinin incelenmesi çoklu ilaca dirençli bireylerin hızlı tespiti açısından kritik öneme sahiptir (Amin *et al.* 2020).

PVL geninin varlığı, MRSA toplulukları için genetik bir belirteçtir (Motamedi *et al.* 2015). Ayrıca Nijeryada yapılan bir çalışmada PVL üreten tüm izolatlar, çoklu ilaca dirençli MDR olarak tespit edilmiştir (Adebola *et al.* 2021).

Çalışmamızda, gerçek zamanlı PCR ile PVL geninin prevalansı % 41,5 (53 MRSA izolatından 22'si pozitif) olarak tespit edilmiştir. Bu sonuç, hastane izolatlarından PVL geni için test edilen otuz iki MRSA izolatından on üçünde (% 40.62) pozitif bulunan çalışmaya benzer. Diğer çalışmalar MRSA izolatlarında farklı PVL prevalansı gösterirken, 25 izolattan sadece 4'ünde %16 (Galia *et al.* 2019), 47 izolattan 13'ünde %27,7 (Amin *et al.* 2020). Türkiye'de hastanelerden alınan MRSA suşlarında PVL prevalansının % 1,7 ile % 20 arasında değiştiği gözlemlenmiştir (Akoğlu *et al.* 2010, Oksuz *et al.* 2013, Kılıç *et al.* 2015, Duman ve Sevimli 2018).

İngiltere ve Galler'de 2010 yılında yapılan bir araştırma, gelişmiş bir sürveyans programının bir parçası olarak PVL-MRSA'nın klinik örneklerinde artan bir eğilim (Ellington *et al.* 2010) olduğunu belirtmiştir. Ayrıca 2012 yılında Birleşik Krallık'taki bölgesel bir yenidoğan ünitesinde PVL-pozitif MRSA salgını meydana gelmiştir (Ali *et al.* 2012). 7 Avrupa ülkesindeki 13 hastaneden elde edilen invaziv *S. aureus* enfeksiyonlu pediatrik hastaların geniş ölçekli bir incelemesine göre, 2016 yılında MRSA izolatlarındaki toplam PVL pozitif oranı % 7,8'dir (Gijón *et al.* 2016).

2019 yılında bir Japon hastanesindeki MRSA izolatlarında PVL prevalansı % 13,5'e ulaşırken (Funaki *et al.* 2019), aynı yıl Çin'de pediatrik hastalardan elde edilen MRSA izolatlarında PVL pozitifliği % 39 olarak tespit edilmiştir (Wang *et al.* 2019). 2012 ve 2017 yılları arasında Avustralya'da elde edilen MRSA suşlarının epidemiyolojik sürveyansı, izolatların % 28'inin PVL için pozitif değer aldığını ortaya koymuştur (Dotel *et al.* 2019). (Shrestha *et al.* 2014) gelişmekte olan ülkelerdeki MRSA izolatlarını incelemek amacıyla Nepal'deki bir hastanede MRSA izolatlarını test etmiş ve hastane izolatlarında PVL gen pozitif oranını % 26,1 bulmuştur (Shrestha *et al.* 2014). 2013'ten 2016'ya kadar Güney Afrika'daki kan kültürlerinden MRSA izolatlarını inceleyen diğer bir çalışmada PVL pozitif oranı % 25 olarak karşımıza çıkmaktadır (Singh-Moodley *et al.* 2019). PVL-MRSA, Amerika Birleşik Devletleri'nde toplumdan edinilmiş -MRSA'nın hastanede bulaşması meydana geldiğinde nozokomiyal enfeksiyonlarla da ilişkilendirilmiştir (Saiman *et al.* 2003), bu da hastanelerin bir halk sağlığı tehlikesi olarak toplumdan edinilmiş MRSA'nın başlıca kaynağı olduğunun altını çizmektedir. Ayrıca, birçok çalışma, düşük MRSA varlığı ortamlarında, sağlık çalışanlarının MRSA rezervuarı ve hastalara önemli bir potansiyel bulaşma kaynağı görevi yapabileceğini göstermiştir (Lari *et al.* 2011, Papastergiou ve Tsiouli 2018).

Bu çalışmadaki gen ekspresyonunun sonucu, gözlemlenen topluluğun yetersiz sağlık eğitimi aldığı ve sıklıkla beta-laktam antibiyotikler kullandığı Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarında PVL geninin yüksek ekspresyonunu bulan önceki çalışmalarla tutarlıydı. Bu, artan PVL gen ekspresyonunun (Karmakar *et al.* 2018) ve ayrıca *S. aureus*'un hastane suşlarında başka bir çalışmada bulunan PVL geninin yüksek ekspresyonunun altında yatan neden olabilir (Darboe *et al.* 2019). Düşük PVL ekspresyonu gösteren başka bir çalışma ile tutarsız olsa da (Wirtz *et al.* 2009). Brezilya hastanelerinde bulunan Brezilya'daki bir çalışmada, diğer virülans faktörleriyle birlikte yüksek PVL ekspresyonu bu soyun uygunluğunu artırabilir, patojenitesini etkileyebilir ve hastanelere giriş ve kuruluşa izin verilmesi (Chamon *et al.* 2020).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) enfeksiyonları tehlikesi hastanelerde büyük bir endişe haline geldi ve PVL genini ürettiğinde daha öldürücü hale geliyor ve ölüme yol açabiliyor, bu nedenle patojenin virülansını en aza indirmek için enfeksiyon yönetim stratejileri uygulanmalıdır ve *S.aureus*'ta çoklu ilaç direnci.

VITEK2 sisteminde antimikrobiyal duyarlılık testi için dört antibiyotik kullanılmıştır. İncelenen izolatların, Sefoksitin (% 100), Benzilpenisilin (% 96,2), Oksasilin (% 94,3) dirençli ve Gentamisin'e (% 96,2) duyarlı olduğunu ve tüm izolatların Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* olduğu tespit edilmiştir.

Staphylococcus aureus izolatlarının moleküler tanımlaması için 16S rRNA geninin saptanması, test edilen tüm izolatlarda 16S rRNA geninin varlığının yanı sıra bir virülans geni olan PVL'nin Konvansiyonel PCR ile sadece 19 izolatta varlığını göstermiştir.

Referans gene16S rRNA ile karşılaştırıldığında, test edilen izolatlarda PVL gen ekspresyonunun yüksek olduğu bulunmuştur. Virülans faktörü olarak PVL geninin gen ekspresyonunu belirlemek için gerçek zamanlı PCR'nin kullanılmıştır. PCR yöntemi PVL geni ile *S. aureus*'un antibiyotik direnci arasındaki ilişkiyi incelemek için güçlü bir moleküler araçtır.

Gerçek zamanlı PCR sonuçları, konvansiyonel PCR sonuçlarından daha doğrulayıcı olarak bilinmektedir. Bu bağlamda PVL geni, 22 *S. aureus* izolatında tespit edilmiştir.

Elde ettiğimiz tüm bu sonuçların değerlendirilmesi neticesinde *S. aureus* izolatlarındaki diğer virülans genlerinin ve bu genler için gen ekspresyonunu belirlenmesi ve onları antibiyotik Metisilin direnci ile karşılaştırın önerilmektedir.

KAYNAKLAR

Abdulgader, S. M., Shittu, A. O., Nicol, M. P. and Kaba, M. 2015. Molecular epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in africa: a systematic review. Frontiers in Microbiology, 6: 348.

Adebola, O., Ocholi, J. A., Babatunde, O., and Jabir, A. H. 2021. Nasal carriage of multi-drug resistant Panton Valentine Leukocidin positive Staphylococcus aureus in healthy individuals of Tudun-Wada, Gombe State, Nigeria. African Journal of Infectious Diseases, 15(1): 24-33.

Akoğlu, H., Zarakolu, P., Altun, B., and Ünal, S. 2010. Epidemiological and molecular characteristics of hospital-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains isolated in Hacettepe University adult hospital in 2004-2005. Mikrobiyoloji Bulteni, 44(3): 343-355.

Al-Dahbi, A. M., and Al-Mathkhury, H. J. 2013. Distribution of methicillin resistant Staphylococcus aureus in Iraqi patients and healthcare workers. Iraqi Journal of Science, 54(2): 293-300.

Ali, H., Nash, J. Q., Kearns, A. M., Pichon, B., Vasu, V., Nixon, Z., and Mühlschlegel, F. A. 2012. Outbreak of a south west pacific clone Panton–Valentine Leucocidin-positive meticillin-resistant Staphylococcus aureus infection in a UK neonatal intensive care unit. Journal of Hospital Infection, 80(4): 293-298.

Ali, R., Al-Achkar, K., Al-Mariri, A., and Safi, M. 2014. Role of polymerase chain reaction (PCR) in the detection of antibiotic-resistant Staphylococcus aureus. Egyptian Journal of Medical Human Genetics, 15(3): 293-298.

Al-Talib, H., Al-Khateeb, A., & Hassan, H. 2015. Antimicrobial resistance of Staphylococcus aureus isolates in Malaysian Tertiary Hospital. International Medical Journal, 22: 1- 3.

Al-Ugaili, D. 2013. Bacteriological and genetic studies on oxacillin resistant staphylococcus aureus ısolated from some hospital in Baghdad City. Philosophy Doctorate Thesis, Al-Nahrain University,118 page, Baghdad.

Amin, D. H. M., Guler, E., and Baddal, B. 2020. Prevalence of Panton-Valentine Leukocidin in methicillin-resistant Staphylococcus aureus clinical isolates at a

university hospital in Northern Cyprus: a pilot study. BMC Research Notes, 13(1): 1-7.

Anand, K. B., Agrawal, P., Kumar, S., and Kapila, K. 2009. Comparison of cefoxitin disc diffusion test, oxacillin screen agar, and PCR for mecA gene for detection of MRSA. Indian Journal of Medical Microbiology, 27(1): 27-29.

Anonymous, 2009. The Bacterial Challenge: Time to React. A call to narrow the Gap between multidrug-resistant bacteria in the EU and development of new antibacterial agent. ECDC, 42 pages, Solan.

Archer, G. L. 1998. Staphylococcus aureus: a well-armed pathogen. Reviews of Infectious Diseases, 26(5): 1179-1181.

Atlas, R. M., Williams, J. F., & Huntington, M. K. 1995. Legionella contamination of dental-unit waters. Applied and Environmental Microbiology, 61(4): 1208-1213.

Baker, M. D. and Acharya, K. R. 2004. Superantigens: structure-function relationships. International Journal of Medical Microbiology, 293(7-8): 529-537.

Bal, E. B. B., Bal, M. A., Isevi, T., & Yula, E. 2010. Application of PCR-RFLP of gap gene method as a molecular typing tool for coagulase negative Staphylococci from bovine and human origin identified with VITEK 2. African Journal of Microbiology Research, 4(9): 775-782.

Benson, H. J. 2002. Microbiological applications: laboratory manual in general microbiology (8th ed), McGraw Hill Companies, pp. 455, New York.

Bocchini, C. E., Hulten, K. G., Mason, E. O., Gonzalez, B. E., Hammerman, W. A., and Kaplan, S. L. 2006. Panton-Valentine Leukocidin genes are associated with enhanced inflammatory response and local disease in acute hematogenous Staphylococcus aureus osteomyelitis in children. Pediatrics, 117(2): 433-440.

Boswihi, S. S., & Udo, E. E. 2018. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: An update on the epidemiology, treatment options and infection control. Current Medicine Research and Practice, 8(1): 18-24.

Boyle-Vavra, S. and Daum, R. S. 2007 Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus: the role of Panton–Valentine Leukocidin. Laboratory Investigation, 87:3-9.

Brooks, G. F., Butel, J. S., and Morse, S. A. 2007. The staphylococci. Jawetz, Melnick and Adelberg's medical microbiology (24th ed), McGraw-Hill, pp. 224-232. New York.

Budiarso, T. Y., Prihatmo, G., Restiani, R., Pakpahan, S., and Sari, L. 2019. Detection Staphylococcus aureus producing enterotoxin a on the skewers meatballs productin Yogyakarta City Indonesia. Journal of Physics: Conference Series, 1397 (1) 012044.

Bush, K., Jacoby, G. A., and Medeiros, A. A. 1995. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 39(6), 1211-1233.

Chamon, R. C., Marques, L. M., Timenetsky, J., da Costa Rachid, C. T., Ferreira, R. B., de Oliveira, T. L., and dos Santos, K. 2020. Genome sequence of a highly virulent PVL-positive vancomycin-intermediate-resistant Staphylococcus aureus sequence type 30. Current Genomics, 21(2), 128-137.

Chan, R. V., Sherman, P. M., & Bourke, B. 2006. Bacterial genomes and infectious diseases. Springer Science & Business Media, pp. 200-212 United States of America.

Cheng, A. G., Kim, H. K., Burts, M. L., Krausz, T., Schneewind, O., & Missiakas, D. M. 2009. Genetic requirements for Staphylococcus aureus abscess formation and persistence in host tissues. The FASEB Journal, 23(10): 3393-3404.

Chongtrakool, P., Ito, T., Ma, X. X., Kondo, Y., Trakulsomboon, S., Tiensasitorn, C., and Hiramatsu, K. 2006. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCC mec) typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains isolated in 11 Asian countries: a proposal for a new nomenclature for SCC mec elements. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 50(3): 1001-1012.

Clarridge III, J. E. 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. Clinical Microbiologyreviews, 17(4): 840-862.

Cogen, A. L., Nizet, V., & Gallo, R. L. 2007. Staphylococcus epidermidis functions as a component of the skin innate immune system by inhibiting the pathogen Group A Streptococcus. Journal of Investigative Dermatology Vol. 127, pp. S131-S131, New York

Collee, J., Miles, R. and Watt, B. 1996. Tests for the identification of bacteria. In: Practical Medical Microbiology. Collee, J., Fraser, A., Marmion, B. and Simmons, A. 4th edition. Churchill Livingstone, 14, 131-49 U.K.

Collins, M. D. 1981. Distribution of menaquinones within members of the genus Staphylococcus. FEMS Microbiology Letters, 12: 83-85.

Corne, P., Marchandin, H., Jonquet, O., Campos, J., & Banuls, A. L. 2005. Molecular evidence that nasal carriage of Staphylococcus aureus plays a role in respiratory tract infections of critically ill patients. Journal of Clinical Microbiology, 43(7): 3491-3493.

Cosgrove, S. E., Sakoulas, G., Perencevich, E. N., Schwaber, M. J., Karchmer, A. W., and Carmeli, Y. 2003. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible Staphylococcus aureus bacteremia: a meta-analysis. Clinical Infectious Diseases, 36(1): 53-59.

Crowley, E., Bird, P., Fisher, K., Goetz, K., Boyle, M., Benzinger, Jr, M. J., & Johnson, R. L. 2012. Evaluation of the VITEK 2 gram positive (GP) microbial identification test card: collaborative study. Journal of AOAC International, 95(5): 1425-1432.

Darboe, S., Dobreniecki, S., Jarju, S., Jallow, M., Mohammed, N. I., Wathuo, M., and Secka, O. 2019. Prevalence of Panton-Valentine leukocidin (PVL) and antimicrobial resistance in community-acquired clinical Staphylococcus aureus in an urban Gambian hospital: a 11-year period retrospective pilot study. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 9, 170.

Datsugwai, M. S. S. and Yusuf, A. S. 2017. Phytochemical analysis and antimicrobial activity of baobab (Adansonia digitata) leaves and stem bark extracts on Staphylococcus aureus and Escherichia coli. Journal of BioScience and Biotechnology, 6(1): 9-16.

David, M. Z., Daum, R. S., Bayer, A. S., Chambers, H. F., Fowler Jr, V. G., Miller, L. G. and Spellberg, B. 2014. Staphylococcus aureus bacteremia at 5 US academic medical centers, 2008–2011: significant geographic variation in community-onset infections. Clinical Infectious Diseases, 59(6): 798-807.

Dhawan, B., Rao, C., Udo, E. E., Gadepalli, R., Vishnubhatla, S., & Kapil, A. 2015. Dissemination of methicillin-resistant Staphylococcus aureus SCCmec type IV and

SCCmec type V epidemic clones in a tertiary hospital: challenge to infection control. Epidemiology & Infection, 143(2): 343-353.

Dheda, K., Huggett, J. F., Chang, J. S., Kim, L. U., Bustin, S. A., Johnson, M. A., and Zumla, A. 2005. The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization. Analytical Biochemistry, 344(1): 141-143.

Dinges, M. M., Orwin, P. M., & Schlievert, P. M. 2000. Exotoxins of Staphylococcus aureus. Clinical Microbiology Reviews, 13(1): 16-34.

Donker, J.M.W., Vander -Laan, L., Hendriks, Y.J.A.M. and Kluytmans, J.A.J.W. 2012. evaluation of Staphylococcus aureus nasal carriage screening before vascular surgery. PLoS. One. 7(6) : e38127.

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

Doolittle, W. F. 1999. Phylogenetic classification and the universal tree. Science, 284(5423): 2124-2128.

Dotel, R., O'Sullivan, M. V., Davis, J. S., Newton, P. J., and Gilbert, G. L. 2019. Molecular epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates in New South Wales, Australia, 2012–2017. Infection, Disease & Health, 24(3): 134-140.

Dubrac, S., Bisicchia, P., Devine, K. M., & Msadek, T. 2008. A matter of life and death: cell wall homeostasis and the WalKR (YycGF) essential signal transduction pathway. Molecular Microbiology, 70(6): 1307-1322.

Duman, Y. and Sevimli, R. 2018. Investigation of the presence of Pantone-Valentine Leukocidin in Staphylococcus aureus strainsısolated from orthopedic surgical site infections. Bulletin of Microbiology, 52(4): 340-347.

Eggimann, P., & Pittet, D. 2002. Overview of catheter-related infections with special emphasis on prevention based on educational programs. Clinical Microbiology and Infection, 8(5): 295-309.

Elasri, M. O., Thomas, J. R., Skinner, R. A., Blevins, J. S., Beenken, K. E., Nelson, C. L., and Smelter, M. S. 2002. Staphylococcus aureus collagen adhesin contributes to the pathogenesis of osteomyelitis. Bone, 30(1): 275-280.

Elgendy, S. G., Hameed, W. A., Hameed, M. R. A., and Hassan, A. T. 2016. Detection of Panton-Valentine Leukocidin Gene in Clinical Isolates of Staphylococci at Assiut University Hospitals. The Egyptian Journal of Medical Microbiology, 25(2).

Ellington, M. J., Ganner, M., Smith, I. M., Perry, C., Cookson, B. D., and Kearns, A. M. 2010. Panton–Valentine Leucocidin-related disease in England and Wales. Clinical Microbiology and Infection, 16(1): 86-88.

Fernández Guerrero, M. L., González López, J. J., Goyenechea, A. and Fraile, J. 2009. Endocarditis Caused by Staphylococcus aureus. Medicine, 88(1): 1–22.

Fluit, A. C., and Schmitz, F. J. (Eds.). 2003. MRSA: Current perspectives. Caister Academic Press, pp. 1-9, Norfolk.

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

Foster, T.J. and Hook, M. 1998. Surface protein adhesins of Staphylococcus aureus. Trends Microbiol, 6 (12): 484-488.

Fowler Jr, V. G., Boucher, H. W., Corey, G. R., Abrutyn, E., Karchmer, A. W., Rupp, M. E., & Cosgrove, S. E. 2006. Daptomycin versus standard therapy for bacteremia and endocarditis caused by Staphylococcus aureus. New England Journal of Medicine, 355(7): 653-665.

Funaki, T., Yasuhara, T., Kugawa, S., Yamazaki, Y., Sugano, E., Nagakura, Y., ... & Fukuchi, K. 2019. SCCmec typing of PVL-positive community-acquired Staphylococcus aureus (CA-MRSA) at a Japanese hospital. Heliyon, 5(3), e01415.

Funke, G., Monnet, C., Graevenitz B. A. and Freney, J. 1998. Evaluation of the VITEK 2 system for rapid identification of medically relevant gram negative rods. Journal Clinical Microbiol. 36:1948–1952.

Galia, L., Ligozzi, M., Bertoncelli, A., and Mazzariol, A. 2019. Real-time PCR assay for detection of Staphylococcus aureus, Panton-Valentine Leucocidin and Methicillin Resistance directly from clinical samples. AIMS Microbiology, 5(2): 138.

Gijón, M., Bellusci, M., Petraitiene, B., Noguera-Julian, A., Zilinskaite, V., Moreno, P. S., and Conejo, P. R. 2016. Factors associated with severity in invasive community-acquired Staphylococcus aureus infections in children: a prospective European multicentre study. Clinical Microbiology and Infection, 22(7): 643-e1.

Gillet, Y., Issartel, B., Vanhems, P., Fournet, J. C., Lina, G., Bes, M., and Etienne, J. 2002. Association between Staphylococcus aureus strains carrying gene for Panton-Valentine Leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. The Lancet, 359(9308): 753-759.

Goldman, E., and Green, L.H. (Eds.). 2008. Practical Handbook of Microbiology (2nd ed), CRC Press, pp 53-66, Boca Raton.

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

Götz, F., Bannerman, T., and Schleifer, K. H. 2006. The genera staphylococcus and macrococcus. Prokaryotes, Springer, pp. 5-75, New York.

Harkins, C. P., Pichon, B., Doumith, M., Parkhill, J., Westh, H., Tomasz, A., and Holden, M. T. 2017. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus emerged long before the introduction of methicillin into clinical practice. Genome Biology, 18(1): 1-11.

Hartman, B. J. and Tomasz, A. 1984. Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in Staphylococcus aureus. Journal of Bacteriology, 158(2): 513-516.

Holmes, A., Ganner, M., McGuane, S., Pitt, T. L., Cookson, B. D., and Kearns, A. M. 2005. Staphylococcus aureus isolates carrying Panton-Valentine leucocidin genes in England and Wales: frequency, characterization, and association with clinical disease. Journal of Clinical Microbiology, 43(5): 2384-2390.

Holt, J. G., Krieg, N. R., and Sneath, P. H. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology (9th ed), Williams and Wilkins, pp. 532-551, Baltimore.

Janda, J. M., and Abbott, S. L. 2007. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. Journal of clinical microbiology, 45(9): 2761-2764.

Jenkins, C., Ling, C. L., Ciesielczuk, H. L., Lockwood, J., Hopkins, S., McHugh, T. D., and Kibbler, C. C. 2012. Detection and identification of bacteria in clinical samples by 16S rRNA gene sequencing: comparison of two different approaches in clinical practice. Journal of Medical Microbiology, 61(4): 483-488.

Jiang, B., Wang, Y., Feng, Z., Xu, L., Tan, L., Zhao, S., and Hu, X. 2017. Panton-Valentine Leukocidin (PVL) as a potential indicator for prevalence, duration, and severity of Staphylococcus aureus osteomyelitis. Frontiers in Microbiology, 8, 2355.

Johnson, M., Olaleye, O. N., & Kolawole, O. S. 2016. Antimicrobial and antioxidant properties of aqueous garlic (Allium sativum) extract against Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa. British Microbiology Research Journal, 14(1).

Kaneko, J., and Kamio, Y. 2004. Bacterial two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: structures, pore-forming mechanism, and organization of the genes. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 68(5): 981-1003.

Karmakar, A., Jana, D., Dutta, K., Dua, P., and Ghosh, C. 2018. Prevalence of Panton-Valentine Leukocidin gene among community acquired Staphylococcus aureus: a real-time PCR study. Journal of Pathogens, 2018, 4518541.

Katayama, Y., Ito, T. and Hiramatsu, K. 2000. A new class of genetic element, Staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in Staphylococcus aureus. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 44(6): 1549-1555.

Kılıç, A., Doğan, E., Kaya, S., and Baysallar, M. 2015. Investigation of the presence of mecC and Panton-Valentine leukocidin genes in Staphylococcus aureus strains isolated from clinical specimens during seven years period. Mikrobiyoloji Bulteni, 49(4): 594-599.

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.

Knox, K.W and Wicken, A.J. 1973. Immunological properties of teichoicacids. Bacteriology Reviews, 37(2): 215-257.

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

Lakshmi Priya, N. 2009. Detection of Methicillin Resistant Strains of Staphylococcus aureus using Phenotypic and Genotypic Methods in a Tertiary Care Hospital Philosophy Doctorate Thesis, Madras Medical College, 111 page, Chennai.

Lari, A. R., Pourmand, M. R., Ohadian Moghadam, S., Abdossamadi, Z., Namvar, A. E., and Asghari, B. 2011. Prevalence of PVL-containing MRSA isolates among hospital staff nasal carriers. Laboratory Medicine, 42(5): 283-286.

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

Ling, T. K., Liu, Z. K., & Cheng, A. F. 2003. Evaluation of the VITEK 2 system for rapid direct identification and susceptibility testing of gram-negative bacilli from positive blood cultures. Journal of Clinical Microbiology, 41(10): 4705-4707.

Lowy, F. D. 1998. Staphylococcus aureus infections. New England Journal of Medicine,339(8): 520-532.

Monecke, S., Berger-Bachi, B., Coombs, G., Holmes, A., Kay, I., Kearns, A., Linde, HJ., O'Brien, F., Slickers, P., Ehricht, R. 2006, Comparative genomics and DNA array-based genotyping of pandemic Staphylococcus aureus strains encoding Panton-Valentine leukocidin, Clinical Microbiology Infection,13: 236-249.

Morello, J. A., Granato, P. A., and Mizer, H. E. 2004. Laboratory manual and workbook in microbiology. McGraw-Hill Science Companies, pp. 95-99, New York.

Motamedi, H., Abadi, S. S. R., Moosavian, S. M., and Torabi, M. 2015. The association of Panton-Valentine Leukocidin and mecA genes in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus isolates from patients referred to Educational Hospitals in Ahvaz, Iran. Jundishapur Journal of Microbiology, 8(8).

Moura, G. S., Gebreyes, W. A., Marques, M. F. S., Stipp, D. T., Souza, F. N., Da Costa, L. B., & Oliveira, C. J. B. 2018. Occurrence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus and coagulase-negative Staphylococci in dairy goat herds in Ohio, United States. Journal of Dairy Science, 101(9): 7804-7807.

Murray, P. R., Rosenthal, K. S., and Pfaller, M. A. 2020. Medical microbiology E-book. Elsevier Health Sciences, pp. 121, Dublin.

Murray, P., Baron, E., Jorgensen, J., Pfaller, M. and Yole, R. 2003. Manual of clinical Microbiology (8th ed), American Society for Clinical Microbiology, pp. 1: 57-6, Washington.

Nguyen, N. P., Warnow, T., Pop, M., & White, B. 2016. A perspective on 16S rRNA operational taxonomic unit clustering using sequence similarity. NPJ Biofilms and Microbiomes, 2(1): 1-8.

O'Hara, F., Guex, N., Word, J., Miller, L., Becker, J., Walsh, S., Scangarella, N., West, J., Shawar, R., Amrine-Madsen, H. 2008, A Geographic Variant of the Staphyloccus aureus Panton-Valentine Leukocidin Toxin and the Origin of Community-Associated Methicillin-Resistant S. aureus USA300. Journal Infection Diseases 197: 187-94

Oksuz, L., Dupieux, C., Tristan, A., Bes, M., Etienne, J., and Gurler, N. 2013. The high diversity of MRSA clones detected in a university hospital in Istanbul. International Journal of Medical Sciences, 10(12): 1740.

Panton, P. and Valentine, F. 1932, Staphylococcal Toxin, Lancet. 219: 506-508.

Papastergiou, P. and Tsiouli, E. 2018. Healthcare-associated transmission of Panton-Valentine leucocidin positive methicillin-resistant Staphylococcus aureus: the value of screening asymptomatic healthcare workers. BMC Infectious Diseases, 18(1): 1-5.

Patel, J. B. 2001. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. Molecular Diagnosis, 6:313-321.

Peters, I. R., Helps, C. R., Hall, E. J. and Day, M. J. 2004. Real-time RT-PCR: considerations for efficient and sensitive assay design. Journal of Immunological Methods, 286: 203-217.

Prescott, C. E. 2002. The influence of the forest canopy on nutrient cycling. Tree Physiology, 22(15-16): 1193-1200.

Projan, S. J., Novick, R. P., Archer, G., and Crossley, K. 1997. The staphylococci in human disease. The Molecular Basis of Pathogenicity, 55-81.

Quinn, P. J., Carter, M. E., Markey, B. and Carter, G. R. 2004. Clinical Veterinary Microbiology. Mosby, pp. 21-63, London.

Radonic, A., Thulke, S., Mackay, I. M., Landt, O., Siegert, W. and Nitsche, A. 2004. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. Biochemical and Biophysical Research Communications, 313: 856-862.

Rebouças, E. D. L., Costa, J. J. D. N., Passos, M. J., Passos, J. R. D. S., Hurk, R. V. D., and Silva, J. R. V. 2013. Real time PCR and importance of housekeepings genes

for normalization and quantification of mRNA expression in different tissues. Brazilian Archives of Biology and Technology, 56(1): 143-154.

Riedel, S., Morse, S. A., Mietzner, T. A., and Miller, S. 2019. Jawetz Melnick & Adelbergs Medical Microbiology 28 E. McGraw Hill Professional, pp. 205, New York.

Rostamzad, A. & Rostamneia, N. 2016. Prevalence of the panton-valentine leukocidin gene in clinical isolates of Staphylococcus aureus isolated from hospitals the ilam province of Iran. Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection, 3(1): 32691-32691.

Saiman, L., Keefe, M. O., Graham III, P. L., Wu, F., Salim, B. S., Kreiswirth, B., and Latta, P. D. 2003. Hospital transmission of community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus among postpartum women. Clinical Infectious Diseases, 37(10): 1313-1319.

Schlievert, P. M. 2009, Cytolysins, Superantigens, and Pneumonia Due to Community-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus, Journal Infection Diseases, 200: 676- 678.

Schmittgen, T. D. and Livak, K. J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. Nature Protocols, 3: 1101-1108.

Shittu, A. O., Udo, E. E. and Lin, J. 2007. Insights on Virulence and Antibiotic Resistance: A Review of the Accessory Genome of Staphylococcus aureus. Wounds: A Compendium of Clinical Research & Practice 19: 237- 244.

Shockman, G.D and Barrett, J.F. 1983. Stracture, Function, and assembly of cell walls of gram –positive bacteria. Annual Review fo Microbiology, 37: 501-527.

Shrestha, B., Singh, W., Raj, V. S., Pokhrel, B. M., and Mohapatra, T. M. 2014. High prevalence of Panton-Valentine leukocidin (PVL) genes in nosocomial-acquired Staphylococcus aureus isolated from tertiary care hospitals in Nepal. BioMed Research International, 2014,790350.

Sibbald, M. J. J. B., Ziebandt, A. K., Engelmann, S., Hecker, M., Jon, A., Harmsen, H. J. M., Raangs, G.C., Stokroos, I., Arends, J. P., Dubois, J. Y. F. and van Dijl, J.M. 2006. mapping the pathways to Staphylococcal pathogenesis by comparative secretomics. Microbiol. Molecular Biology Reviews, 70(3): 755-788.

Singh-Moodley, A., Strasheim, W., Mogokotleng, R., Ismail, H., and Perovic, O. 2019. Unconventional SCC mec types and low prevalence of the Panton-Valentine Leukocidin exotoxin in South African blood culture Staphylococcus aureus surveillance isolates, 2013-2016. PLoS One, 14(11): e0225726.

Šiširak, M., Zvizdić, A., and Hukić, M. 2010. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) as a cause of nosocomial wound infections. Bosnian Journal of Basic Medical Sciences, 10(1), 32.

Snowden, J. 2016. Bacterial biofilm formation and immune evasion mechanisms. Human Microbiota and Chronic Disease: Dysbiosis as a Cause of Human Pathology, pp. 139-154. wiley.

Styers, D., Sheehan, D., Hogan, P. and Sahm, D. 2006. Laboratory-based surveillance of current antimicrobial resistance patterns and trends among Staphylococcus aureus: status in the United States. Annual Clinical Microbiology Antimicrobial, 5: 1-9.

Swenson, J. M., Lonsway, D., McAllister, S., Thompson, A., Jevitt, L., Zhu, W., and Patel, J. B. 2007. Detection of mecA-mediated resistance using reference and commercial testing methods in a collection of Staphylococcus aureus expressing borderline oxacillin MICs. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 58(1): 33-39.

Tenover, F. C., McDougal, L. K., Goering, R. V., Killgore, G., Projan, S. J., Patel, J. B., and Dunman, P. M. 2006. Characterization of a strain of community- associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus widely disseminated in theunitedstates. Journal of Clinical Microbiology, 44(1): 108-118.

Thakur, P., Nayyar, C., Tak, V., and Saigal, K. 2017. Mannitol-fermenting and tube coagulase-negative Staphylococcal isolates: unraveling the diagnostic dilemma. Journal of Laboratory Physicians, 9(01), 065-066.

Thangavel, A., Natarajanand, M., and Moses, R. P. 2011. Comparative Identification of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) based on amplification of mecA gene and Growth on MeReSa Agar and HiChrome MeReSa Agar. International Journal of Genetic Engineering Biotechnology, 2: 163-72.

Uebele, J., Habenicht, K., Ticha, O., and Bekeredjian-Ding, I. 2020. Staphylococcus aureus Protein A Induces Human Regulatory T Cells Through Interaction With Antigen-Presenting Cells. Frontiers in Immunology, 2553.

Valaperta, R., Tejada, M. R., Frigerio, M., Moroni, A., Ciulla, E., Cioffi, S., and Costa, E. 2010. Staphylococcus aureus nosocomial infections: the role of a rapid and low-cost characterization for the establishment of a surveillance system. New Microbiologica, 33(3): 223-232.

Vandenesch, F., Naimi, T., Enright, M. C., Lina, G., Nimmo, G. R., Heffernan, H., and Etienne, J. 2003. Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus carrying Panton-Valentine Leukocidin genes: worldwide emergence. Emerging Infectious Diseases, 9(8): 978.

Vaudaux, P., Francois, P., Bisognano, C., Kelley, W. L., Lew, D. P., Schrenzel, J., and Von Eiff, C. 2002. Increased expression of clumping factor and fibronectin-binding proteins by hemB mutants of Staphylococcus aureus expressing small colony variant phenotypes. Infection and Immunity, 70(10): 5428-5437.

Wang, X., Shen, Y., Huang, W., and Zhou, Y. 2019. Characterisation of community-acquired Staphylococcus aureus causing skin and soft tissue infections in a children's hospital in Shanghai, China. Epidemiology & Infection, 147.

Wirtz, C., Witte, W., Wolz, C., and Goerke, C. 2009. Transcription of the phage-encoded Panton–Valentine leukocidin of Staphylococcus aureus is dependent on the phage life-cycle and on the host background. Microbiology, 155(11), 3491-3499.

Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. Microbiological Reviews, 51(2), 221-271.

Yarwood, J. M., McCormick, J. K., Paustian, M. L., Kapur, V., and Schlievert, P. M. 2002. Repression of the Staphylococcus aureus accessory gene regulator in serum and in vivo. Journal of Bacteriology, 184(4): 1095-1101.

Yoong, P., and Torres, V. J. 2013. The effects of Staphylococcus aureus leukotoxins on the host: cell lysis and beyond. Current Opinion in Microbiology, 16(1): 63-69.

Zhang, K., McClure, J., Elsayed, S., Louie, T., Conly, JM. 2005, Novel Mulitplex PCR assay for characteriszation and concomitant subtyping of the Staphylococcal Cassette Chromosome mec Types I to V in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. Journal Clinical Microbiology 43: 5026-5033.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Dhuha Yahya Raheem RAHEEM

Eğitim

Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2019-Halen
Lisans	Al-Farabi University College Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2013-2017