ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

IRAK'IN SALAHUDDİN VİLAYETİNDE KOAGULASE-NEGATİF *STAPHYLOCOCCUS SPP*'NİN YARA İZOLATLARINDA BİYOFİLM OLUŞUMU VE HEMOLİZİN ÜRETİMİ

Mustfa Mohsin Hameed AL-KARAWI

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2022

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Mustfa Mohsin Hameed AL-KARAWI tarafından hazırlanan **"Irak'ın Salahuddin Vilayetinde Koagulase-Negatif *Staphylococcus Spp*'nin Yara İzolatlarında Biyofilm Oluşumu ve Hemolizin Üretimi"** adlı tez çalışması 04/03/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi İlkay ÇORAK ÖCAL

Eş Danışman : Dr. Anas Yaseen Mahmood AL-HAYAWI

Jüri Üyeleri :

Başkan : Dr. Öğr. Üyesi Aysel Sarı
Fen Fakültesi, Kimya Anabilim Dalı
Fırat Üniversitesi

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

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Pınar ARSLAN
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 "**Irak'ın Salahuddin Vilayetinde Koagulase-Negatif *Staphylococcus Spp*'nin Yara İzolatlarında Biyofilm Oluşumu ve Hemolizin Üretimi**" 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 (.../.../2022).

Mustfa Mohsin Hameed AL-KARAWI

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

IRAK'IN SALAHUDDİN VİLAYETİNDE KOAGULASE-NEGATİF *STAPHYLOCOCCUS SPP*'NİN YARA İZOLATLARINDA BİYOFİLM OLUŞUMU VE HEMOLİZİN ÜRETİMİ

Mustfa Mohsin Hameed AL-KARAWI

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi İlkay ÇORAK ÖCAL
Eş Danışman: Dr. Anas Yaseen Mahmood AL-HAYAWI

Stafilokok türleri, gıda zehirlenmesinden sorumlu en yaygın bakterilerden biridir. Bu çalışmada kullanılan örnekler Salah El-Din Genel Hastanesinin acil servisinde yaralanan hastalardan temin edilmiştir. Kasım 2020 ile Ocak 2021 tarihleri arasında toplamda 94 örnek alınmıştır. Bu çalışmada, çeşitli cilt lezyonlarından *Staphyloccoccus spp*'yi izole etmek, tanımlamak, biyofilm oluşumu ile beta-laktamaz ve hemolizin üretiminin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca izolatların antibiyotik direnç paternleride incelenmiştir. Elde edilen veriler incelendiğinde, toplumda taşıyıcılar ve hastalar arasında Metisiline dirençli Stafilokokların yüksek prevalansının olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, Metisiline dirençli Stafilokoklarda çoklu ilaç direnci bulunmuştur. Aynı zamanda hem MRSA hem de MR-CoNS izolatları yüksek ve güçlü biyofilm oluşumu gözlemlenmiştir. Bunlara ek olarak, lokal *Staphylococcus spp* izolatlarında mecA geninin saptanması için moleküler yöntemlerin kullanılması önerilmiştir. En son olarak bu genin, diğer antibiyotiklere karşı çoklu ilaç direncini veya enzimler ile toksinler gibi bazı virülans faktörlerinin üretimini yöneten diğer genlerle veya mecA geninin icaADBC operonu ile korelasyonu araştırılmıştır.

2022, 64 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: *Staphylococcus spp*, Hemolizinler, Biyofilm, Yaralar, Koagulase-negatif

ABSTRACT

Master of Science Thesis

BIOFILM FORMATION AND HEMOLYSINS PRODUCTION IN WOUND ISOLATES OF COAGULASE-NEGATIVE *STAPHYLOCOCCUS SPP* IN SALAHUDDIN GOVERNORATE, IRAQ

Mustfa Mohsin Hameed AL-KARAWI

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

Advisor: Asst. Prof. Dr. İlkay ÇORAK ÖCAL
Co-Advisor: Dr. Anas Yaseen Mahmood AL-HAYAWI

Staphylococcus species are known to be among the most common bacteria responsible for food poisoning outbreaks. The samples used in this study were obtained from patients injured in the emergency department of Salah El-Din General Hospital. A total of 94 samples were taken between November 2020 and January 2021. In this study, it was aimed to isolate and identify *Staphyloccoccus spp* from various skin lesions, and to evaluate biofilm formation and beta-lactamase and hemolysin production. In addition, antibiotic resistance patterns of the isolates were also investigated. When the data obtained were analyzed, it was determined that there was a high prevalence of Methicillin-resistant *Staphylococci* among carriers and patients in the community. In addition, multidrug resistance has been found in Methicillin-resistant *Staphylococci*. At the same time, both MRSA and MR-CoNS isolates were high and strong biofilm formation was observed. In addition to these, it has been suggested to use molecular methods for the detection of mecA gene in local *Staphylococcus spp* isolates. Finally, the correlation of this gene with other genes that govern multidrug resistance to other antibiotics or the production of certain virulence factors such as enzymes and toxins, or the icaADBC operon of the mecA gene was investigated.

2022, 64 pages

Keywords: *Staphylococcus spp*, Hemolysins, Biofilm, Wounds, Coagulase-negative

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tez danışmanlarım Dr. Öğr. Üyesi İlkay ÇORAK ÖCAL ve Dr. Anas Yaseen Mahmood AL-HAYAWI'a destekleri için teşekkür ederim.

Mustfa Mohsin Hameed AL-KARAWI

Çankırı, Mart 2022

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **iii**
İÇİNDEKİLER ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **vi**
KISALTMALAR DİZİNİ ..... **vii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **viii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **ix**
1. GİRİŞ **1**
2. LİTERATÜR ÖZETİ **3**
2.1 *Staphylococcaceae* Familyasının Genel Özellikleri **3**
2.2 *Staphylococcus* sp. Sınıflandırması **3**
2.3 Stafilokok spp Genel Özellikleri **3**
2.4 Koagülaz Negatif Stafilokoklar (CoNS) **4**
2.5 Patojenlik **4**
2.5.1 Koagülaz negatif stafilokok patojeni **6**
2.6 Koagülaz Negatif Stafilokok Epidemiyolojisi **6**
2.6.1 Normal yaşam alanı **6**
2.6.2 Hastaneler **6**
2.6.3 Toplum **7**
2.7 *S. aureus* Virülans Faktörleri **7**
2.8 Antibiyotik Direnci **8**
2.8.1 Koagüle negatif stafilokokların genel özellikleri ve tanımlanması **11**
2.8.2 Biyofilm ve balçık tabakası ve patogenezdeki rolleri **12**
2.8.3 Biyofilm oluşum mekanizması **13**
2.9 Biyofilm Oluşumunu Etkileyen Genetik Düzenleme ve Çevresel Faktörler **15**
2.10 Antimikrobiyal Ajanlara Karşı Biyofilm Direnci **17**
2.10.1 Bakteriyel biyofilmlerde antibiyotik direnci mekanizması **17**
2.10.2 Biyofilm tedavisi **18**
3. MATERYAL VE METOT **21**

3.1 Materyal 21
3.1.1 Laboratuvar ekipmanları ve aparatları 21
3.1.2 Kimyasallar 21
3.1.3 Kültür ortamının hazırlanması 23
3.1.4 Bakteri izolatlarının korunması 26
3.1.5 Çözeltinin hazırlanması 26
3.2 Metot 27
3.2.1 Bakteriyel numune toplama 27
3.2.2 İzolatların tanımlanması 27
3.2.3 Biyokimyasal testler 27
3.2.4 Biyofilm oluşturma testi 28
3.2.5 Kongo kırmızı agar yöntemi 29
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 32
4.1 Cinsiyete Göre Hastaların Dağılımı 32
4.2 Numune ile Yaş ve Cinsiyet Arasındaki İlişki 32
4.2.1 Yaş 32
4.2.2 Cinsiyet 33
4.3 Bakteriyel İzolasyon ve Tanımlama 34
4.3.1 Gram pozitif bakteri izolatları 34
4.3.2 Tüp yöntemiyle koagülaz tespiti 35
4.4 Stafilokokların Virülans Faktörlerinin Saptanması 36
4.4.1 Hemolizin 36
4.4.2 Biyofilm oluşumu 37
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 46
KAYNAKLAR 47
ÖZGEÇMİŞ 62

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
±	Artı eksi
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
DNA	Deoksiribonükleik asit
g	Gram
mg	Miligram
mL	Mililitre
ng	Nano gram
nm	Nanometre
O_2	Tekli oksijen

KISALTMALAR DİZİNİ

AKT	Antimikrobiyal kilit tedavisi
CAPD	Sürekli ambulatuvar periton diyalizi
CONS	Koagülaz negatif stafilokoklar
KMD	Küçük multidrug direnci
KNS	Koagülaz negatif stafilokoklar
PNAG	Polimerik N-asetil glukozamin
PVL	Panton valentine lökosidin
SE	Stafilokokal enterotoksinler

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 CoNS'nin virulans faktörleri 8
Şekil 2.2 TRAP-RAP etkileşimi ve agr düzenlemesi yoluyla önerilen *S. aureus* QS mekanizması ve toksin üretimi 17
Şekil 4.1 Klinik örneklerden izole edilen bakteri oluşumu 32
Şekil 4.2 Numunelerin yaş gruplarına göre dağılımı 33
Şekil 4.3 Numunelerin cinsiyete göre dağılımı 33
Şekil 4.4 *S. aureus* için antibiyotik duyarlılık testi 42
Şekil 4.5 *S. epidermidis* için antibiyotik duyarlılık testi 43
Şekil 4.6 *S. sciuri* için antibiyotik duyarlılık testi 43

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Kullanılan alet ve ekipman türleri 21
Çizelge 3.2 Kimyasal ve biyolojik olan bileşikler 22
Çizelge 3.3 Antimikrobiyal diskler tablosu 22
Çizelge 3.4 β-laktam antibiyotik diski 22
Çizelge 3.5 Hazır ortam 23
Çizelge 3.6 Çalışmada kullanılan diğer materyaller 23
Çizelge 4.1 Konvansiyonel biyokimyasal testin sonucunun yöntem okuma şeması 35
Çizelge 4.2 Koagülaz negatif ve pozitif bakteriyel izolatlar 35
Çizelge 4.3 Hemolizin üretme yeteneklerine göre dağılan bakteri izolatlarının sayısı 37
Çizelge 4.4 Biyofilm oluşumlarına göre dağılan bakteri izolatlarının sayısı 38
Çizelge 4.5 Kongo kırmızısı agar ile biyofilm oluşumunun sayısı ve yüzdesi 39
Çizelge 4.6 Kapsül oluşumunun sayısı ve yüzdesi 40
Çizelge 4.7 Yaralardan izole edilen bakterilerin antibiyotiklere direnci 41

1. GİRİŞ

Koagülaz negatif stafilokoklar (KNS), bağışıklığı baskılanmış bireylerde, uzun süreli hastanede yatan hastalarda, prematüre yenidoğanlarda, kalıcı veya çeşitli implant polimer gövdeleri olan hastalarda çok çeşitli enfeksiyonlara neden olan organizmalar olarak tanımlanmaktadır (Soumya *et al.* 2017, Azih and Enabulele 2013, Nanoukon *et al.* 2017).

Staphylococcus epidermidis, *Staphylococcus haemolyticus* ve *Staphylococcus saprophyticus*, hastane enfeksiyonlarının büyük çoğunluğundan sorumlu olduğu doğrulanan KNS türleri olarak bilinmektedir. Birçok hastane izolatı klinik olarak çeşitli antimikrobiyal ilaçlara karşı önemli direnç oranlarına sahiptir. Bu nedenle KNS enfeksiyonlarının tedavisi daha zor hale gelmektedir. (Xu *et al.* 2015).

CoNS'nin icaADBC ile kodlanmış polisakkarit hücreler arası adhezin ve kimyasal olarak çeşitli biyofilmler oluşturabildiği belirtilmiştir (Bowden *et al.* 2005). Biyofilmler, hücreleri konakçının savunma sistemi için daha az erişilebilir hale getirerek ve antibiyotiklerin etkinliğini azaltarak organizmanın hayatta kalmasına yardımcı olmaktadır. Biyofilm oluşturma yeteneği, CoNS'nin en temel virülans özelliği olarak bilinmektedir (França *et al.* 2021).

Biyofilm oluşturmanın adımları; bağlanma, birikim, olgunlaşma ve ayrılma olarak sıralanmaktadır. Bhp, AtlE ve diğer hücre duvarı bağlayıcı proteinler, ilk yapışmaya aracılık eden proteinlerdir. Hücreler arası bir yapıştırıcı olan Fbe'nin yanı sıra icaADBC ile kodlanmış olan polisakkarit hücreler, hücreler arası adezin sentezi ve birikim aşamasını karakterize eden proteinlerdir. KNS'de PIA'dan bağımsız olarak biyofilm gelişiminde hücre yüzeyi ile ilişkili Aap (birikimle ilişkili protein) ve Embp (hücre dışı matris bağlayıcı protein) gibi iki önemli proteinin dahil olduğu yapılan çalışmalar ile ortaya çıkarmıştır. Bu proteinler, fibronektine bakteri bağlanmasını kolaylaştıran ve biyofilm oluşumuna katkıda bulunan Bap protein ailesinin üyeleri olarak bilinmektedir (Bowden *et al.* 2005). Proteinler; DNA, lipidler, organik bileşikler, makromoleküller, biyofilmlerde bulunur ve üç boyutlu, yüksek düzeyde organize bir yapıya sahiptir.

CoNS ayrıca diğer enfeksiyonlara geçebilen direnç genleri kaynağı olarak kabul edilir. Metisiline dirençli koagülaz- negatif CoNS izolatları nozyomasiyal enfeksiyonların %80-90'ını oluşturmaktadır. Antibiyotik direnç genlerinin çoğu plazmidler üzerinde taşınır ve metisiline dirençli bakterilerde daha yaygındır (Shrestha *et al.* 2017).

CoNS, konak hücrelerin istilasından sorumlu olan hemolizinler gibi *Staphylococcus aureus* ile bağlantılı çeşitli toksinler ve enzimler üretebilmektedir (Moraveji *et al.* 2014, Gemmell and Roberts 1974). Staphylococci hemolizinler dört tipe ayrılır: alfa (α), beta (β), gama (γ) ve delta (δ). -toksin, çok çeşitli insan hücrelerine karşı etki eden ve hla geni tarafından ifade edilen gözenek oluşturan bir sitotoksindir (PFT). Bu toksinin hemolitik, dermonekrotik ve nörotoksik özellikleri patojenikliğine katkıda bulunmaktadır (Qiu *et al.* 2012, Berube and Wardenburg 2013, Oliveira *et al.* 2018). Mg^{2+} bağımlı sphingomyelinaz, hlb geni tarafından kodlanan bir toksindir. Toksinin sitolitik etkisi 10°C'nin altındaki sıcaklıklarda inkübe edildiğinde artar ve bu durum 'sıcak-soğuk' hemolizin olarak bilinmektedir (Burnside *et al.* 2010, Zhang *et al.* 2003). Delta (δ) hemolizin, hld geni tarafından kodlanan 26 amino asitli bir peptittir. Bu toksin deterjan görevi görerek eritrositleri yok etmektedir. Delta toksini, akut ishalden şiddetli enterite kadar çeşitli bağırsak bozukluklarına sebep olmaktadır (Marconi *et al.* 2005, Nasaj *et al.* 2020).

Bu tez çalışmasında, *Staphylococcus* spp. bakterilerinin farklı lezyonlarından izolasyonu ve biyofilm oluşturma bileşimleri, beta- laktamaz ve hemolizin desen muayenesi ile izolatların antibiyotik paterninin incelenmesi amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 *Staphylococcaceae* Familyasının Genel Özellikleri

Staphylococcaceae, 0,5-1,5 μm çapında, çiftler halinde, tetradlarda, kısa zincirlerde (3-4 hücre) bulunabilen ve düzensiz üzüm benzeri kümeler üretmek için birden fazla düzlemde bölünen bakteriyel bir ailedir. Peptidoglikan ve teikoik asit, Gram-pozitif, nonmotil, nonflajel ve spor oluşturmayan bakterilerin hücre duvarında bulunmaktadır. Kapsül oluşumu genellikle yoktur veya kısıtlanmıştır. *Staphylococcacea*, %10 NaCl içeren bir ortamda iyi yetişen ancak %15 NaCl içeren bir ortamda zayıf büyüyen aerobik bir familyadır (Wu *et al.* 2018).

2.2 *Staphylococcus* sp. Sınıflandırması

Şube:	Bakteri
Alem:	Öbakteri
Filum:	Firmicutes
Sınıf:	Basil
Takım:	Bacillales
Familya:	Stafilokoksiya
Cins:	*Stafilokok* (Botelho *et al.* 2016)

2.3 Stafilokok spp Genel Özellikleri

Stafilokok bakterileri, hareketli olmayan, anaerobik fakültatif, spor oluşturmayan ve tek başına, çiftler halinde ve kümeler halinde var olan Gram-pozitif toksiklerdir. %10 NaCl ortamında iyi büyür, ancak %15 NaCl ortamında çok iyi büyüme göstermezler (Wu *et al.* 2018). Alkali fosfataz, katalaz (Kesmen *et al.* 2014), koagülaz (Nasaj *et al.* 2020), hyaluronidaz ve hemoliz için olumlu reaksiyonlar gösterirler. Oksidaz, β-glucuronidaz için negatiftirler. Fruktoz, maltoz ve sakkarozdan aerobik halde asit üretirken arabinoz, selobioz, melezitoz, raffinoz, salisin, ksilitol ve ksiloz asit üretmez.

2.4 Koagülaz Negatif Stafilokoklar (CoNS)

Koagülaz Negatif Stafilokoklar (CoNS), nonmotil (hareketsiz), spor oluşturmayan ve çapı 0,5-1,0 μm olan Gram-pozitif toksiklerdir. Tek tek, çiftler halinde veya kümeler halinde bulunabilirler. Koloniler yükseltilmiş, pürüzsüz, pırıl pırıl, yarı saydam ve tam kenarlara sahiptir. Pigmentlerin rengi griden sarıya-turuncuya kadar değişiklik göstermektedir.

Triterpenoid karotenoidler ve türevleri hücre zarında bulunan pigmentlerdir. Koloninin çapı>5 μm'den fazladır. Kapsül üretme potansiyeline sahiptir. Kapsüllenmiş suşlar tarafından üretilen koloniler genellikle daha küçük ve daha dışbükeydir. N-asetil-d-aminogalakturonik asit, N-asetil-d-fukozamin ve taurin N-asetil-d-aminogalakturonik asidin örnek olarak verilebilir. Glikolipidler, mono ve diglukosildigliserit fosfolipidler, lisillfosfatidilgliserol ve kardiyolipin hücre zarlarında bulunmaktadır. Anaerobik fakültatiftir ancak aerobik ortamlar içinde de 30–37 °C ideal büyüme gösterirler.

Hem mikro hem de aerobik ortamda yetişmektedirler. Aerobik bir şekilde glikozdan l-laktat, asetat ve süksinat üretirler. Kanlı agar üzerinde, koloniler beyaz, opak, parıldayan, eksiksiz, pürüzsüz ve dışbükey olarak tespit edilmiştir. Kanlı agar inkübasyonunda iki gün sonra koloni çapı 1-3 mm arasında değişmektedir. Büyüme için ideal sıcaklık aralığı 30–40°C'dir. 20°C veya 45°C'de büyüme gerçekleşmez. Tüm suşlar %10 NaCl konsantrasyonunu tolere eder. Ancak, %15 NaCl konsantrasyonunda yaşama belirtisi göstermezler. Pigment ve topaklanma faktörünün eksikliğinin yanı sıra anaerobik mannitol fermantasyonunun yapılamaması, 45°C'de büyümesi, glikozdan asetoin üretmesi, nitratı azaltması, b- glukozdaz üretmesi ve galaktoz, laktoz ve diğer şekerlerden asit üretmesi bakımından *S. aureus* subsp. *aureus* türünden ayrılır.

2.5 Patojenlik

CoNS çok çeşitli enfeksiyonların nedeni olarak bilinmektedir. 1950'lerin sonunda ve 1960'ların başında hastanede yatan hastaların nozomyal enfeksiyonu olarak, CoNS

önemli morbidite ve mortaliteye neden olmuştur. İnsanlarda görülen, Furunkül (kan çıbanı), karbonkül (şirpençe), impetigo ve toksik epidermal nekroliz bu tür tarafından üretilen hastalıklarından sadece birkaçı olarak bilinmektedir. Akut endokardit, miyokardit, perikardit, enterokolit, mastitis, sistit, prostatit, serviksit, serebrit, menenjit, bakteriyemi, toksik şok sendromu ve kas, deri, ürogenital sistem, merkezi sinir sistemi ve çok sayıda karın içi organın apselerinde de bu baktaerilerle karşılaşılmaktadır (Yeboah-Manu *et al.* 2013, Cheung *et al.* 2021).

Ayrıca, gıda zehirlenmesi stafilokok enterotoksinden kaynaklanmaktadır. 1980'lerde CoNS suşları hastanelerde önemli bir klinik ve epidemiyolojik tehlike haline gelmiştir. Aynı zamanda İnsanlara ek olarak, *Staphylococcus aureus* bir dizi memeli ve kuşları da enfekte etmektedir (AL-Kazaz *et al.* 2014).

2.5.1 Koagülaz negatif stafilokok patojeni

Koagülaz negatif stafilokokların (CoNS) var olan çeşitli grupları, *S. aureus* ile nonpathojenik olarak sınıflandırılan stafilokoklar arasında ayrım yapmak için kullanılmaktadır. CoNS, hasta ve tedavi ile ilgili değişikliklerin bir sonucu olarak en yaygın nozomyal enfeksiyonlardan biri haline gelmiştir. *S. epidermidis* ve *S. hemolitikus* en yaygın türleridir. Prematüre bebeklerde yabancı cisim enfeksiyonlarının ve hastalıklarının önemli bir kısmını oluşturmaktadırlar. *S. saprophyticus* akut üretrit ile bağlantılı iken, *S. lugdunensis, S. aureus*'a benzer şekilde bulaşıcı endokardite neden olur. Diğer birçok CoNS türü, insanların ve hayvanların deri ve mukoza zarlarını kolonlaştırmaktadır. Ancak gıda ile ilişkili saprofitler haricinde klinik olarak belirgin hastalıklara daha az katılım sağlamaktadır. Çeşitli konakçı savunma taktikleri, türlere ve suşlara özgü virülans faktörlerinin evrimi patojenite derecesini yansıtmaktadır. CoNS, *S. aureus*'tan daha az virülans özelliğine sahip olması nedeniyle farklı bir hastalık spektrumu göstermektedir. Bu gibi durumlarda, konağın duyarlılığı çok daha önemlidir. CoNS'lerin, metisiline dirençli suşlarının çok sayıda olması ve glikopeptitlere daha az duyarlı olan izolatları nedeniyle tedavi edilmesi zordur (Becker *et al.* 2020).

2.6 Koagülaz Negatif Stafilokok Epidemiyolojisi

2.6.1 Normal yaşam alanı

CONS, hızlı bir şekilde kendini gösteren bir gastroenterit türü olan stafilokok gıda zehirlenmesine neden olan bakterilerdir. CONS genellikle çevrede (toprak, su ve hava) ve insanların burunlarında ve derilerinde bulunmaktadır. Et ve et ürünleri, kümes hayvanları ve yumurta ürünleri, süt ve süt ürünleri, salatalar, krema dolu pasta ürünleri ve sandviç dolguları stafilokok gıda zehirlenmesi salgınlarıyla bağlantılıdır (Argudín *et al.* 2010).

2.6.2 Hastaneler

CoNS, implante edilmiş cihaz ve cihazlara sahip bireylerde, özellikle yaşlılar, çok küçük çocuklar ve bağışıklık sistemi bozulmuş kişilerde sıklıkla enfeksiyona neden bakterilerdir. İnsan vücudunda iyi huylu olarak tanımlanan ve hastalık oluşturmayan türlerinden ciddi bozukluklara neden olanlara kadar çok çeşitli CoNS vardır (Gautam *et al.* 2017). Kommensal stafilokokların, invaziv patojenlere dönüşmesi genlerin kazanılması nedeniyle meydana gelmektedir (Yu *et al.* 2017).

CoNS enfeksiyonları vakaların büyük çoğunluğunda hastaneye yatışla sonuçlanmaktadır ve nozomyal enfeksiyonlarda ilk beş patojenden biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Stafilokok enfeksiyonlarını tedavi etmek için kullanılan antimikrobiyaller tipik olarak birçok CoNS türüne karşı dirençlidir (Szczuka *et al.* 2016). Hastanelerde antibiyotik kullanımı, antimikrobiyal direnç suşlarının bir rezervuarını sağlayarak ilaca dirençli CoNS suşlarının yayılmasına yardımcı olmaktadır. CoNS türleri arasında metisilin direncinin sıklığı ve CoNS ile *S. aureus* arasındaki genetik değişim önemli bir halk sağlığı sorunu olarak bilinmektedir (Yu *et al.* 2017).

2.6.3 Toplum

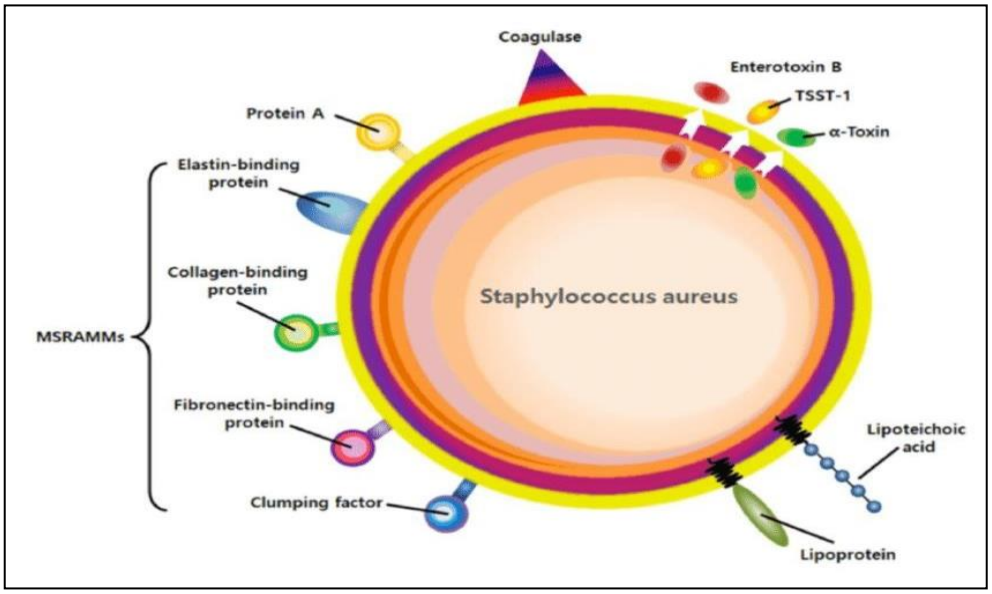
Genellikle koagülaz negatif stafilokok enfeksiyonlar genç ve cinsel olarak aktif olan kadınlarda idrar yolu enfeksiyonlarının önemli bir nedeni olarak karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca bu enfeksiyonlara en yaygın neden olan tür *S. saprophyticus*'tur (Sousa *et al.* 2013). Bununla birlikte halk arasında görülen CNS enfeksiyonları, eklemler, kalp kapakçıkları ve intrakardiyak yamalar gibi protez implantların yerleştirilmesi sırasında veya hastaneden taburcu edilen hastalarda ortaya çıkabilir. Bu enfeksiyon genellikle hastanede edinilmiş enfeksiyonun gecikmiş bir ifadesi olarak bilinmektedir. Bununla birlikte, son zamanlardaki sürekli ambulatuvar periton diyalizindeki (CAPD) artış, hastaların hastaneden daha erken taburcu edilmesi ve ev içi ilaç tedavisine olan ilgi nedeniyle toplum içinde CNS enfeksiyonlarının artacağı düşünülmektedir (Peacock 2006).

Shittu vd. (2004) tarafından yapılan çalışmada, hastanelerde ve halk arasında dirençli bir *S. haemolyticus* türünün yaygın olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, bu bakterinin tıbbi personel veya taburcu edilen hastalar aracılığıyla bulaşan bir hastane klonu olabileceği düşünülmektedir. Halk arasında veya ayakta tedavi gören hastalarda bulunan stafilokok enfeksiyonlar genellikle hastaneden taburcu edilen hastalardan veya tıbbi personelden yayılmaktadır. Bu nedenle, CNS hastalığında insan rezervuarlarının işlevini belirlemek, hastane ve toplum ortamlarında CNS enfeksiyonunun epidemiyolojisini anlamak amacıyla ayrıntılı çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır (Shittu *et al.* 2004).

2.7 *S. aureus* Virülans Faktörleri

CoNS, hem toplum kökenli hem de hastane kaynaklı enfeksiyonlar arasında en sık izole edilen bakteridir (Baba-Moussa *et al.* 2008). CoNS, cilt ve yumuşak doku enfeksiyonların'dan pnömoni ve bakteriyemi gibi toksin aracılı hastalıklara kadar çok çeşitli bulaşıcı hastalıklara sebep olan patojendir (Holtfreter *et al.* 2007).

CoNS'nin klinik önemi, virülans faktörlerine, yüzey proteinlere, toksinlere, enzimlere ve ilaç direncinin hızlı gelişimine bağlıdır (Şekil 2.1) (Arvidson and Tegmark 2001, Sabouni *et al.* 2014). Bu mikroorganizma ile en çok ilişkili; hemolizinler (α, β, γ, δ), lökosidinler (Panton-Valentine lökosidin; PVL, LukE/D) (Sina *et al.* 2013), sporadik gıda zehirlenmesi sendromuna veya gıda kaynaklı salgınlara neden olan ısıya dayanıklı stafilokokal enterotoksinler (SE'ler), eksfolyatif toksinler (ETA ve ETB), gıda zehirlenmesine, enterokolite, haşlanmış cilt sendromuna neden olan toksik şok sendromu-1 (TSST-1) (Kérouanton *et al.* 2007, Pereira *et al.* 2009) ve toksik şok olarak adlandırılan virülans faktörlerdir (Larkin *et al.* 2009).



Şekil 2.1 CoNS'nin virulans faktörleri (Choi *et al*. 2014)

2.8 Antibiyotik Direnci

Bulaşıcı enfeksiyonlar dünyada ikinci ölüm nedenidir. CoNS; cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları, endokardit, osteomiyelit, bakteriyemi ve ölümcül pnömoni gibi çeşitli bulaşıcı hastalıkları tetikleyebilen çok yaygın patojenik mikroorganizmadır (Kong *et al.* 2016).

Son yıllarda, bakterilerin evrimi ve antibiyotiklerin kötüye kullanılması nedeniyle, CoNS'nin ilaç direnci giderek artmıştır. Buna bağlı olarak CoNS'nin enfeksiyon oranı

dünya çapında artmış ve CoNS'nin klinik anti-enfektif tedavisi daha zor hale gelmiştir (McGuinness *et al.* 2017). CoNS'nin direnç mekanizmalarının, özellikle çok çeşitli antibiyotiklere dirençli olan CoNS için oldukça karmaşık olduğunu gösteren kanıtlar tespit edilmiştir (Gnanamani *et al.* 2017).

Sonuç olarak, CoNS ilaç direncini zamanında belirlemek ve ilaç direnç mekanizmasını moleküler düzeyde aydınlatmak CoNS enfeksiyonu tedavisi için kritik öneme sahip olmuştur. Çok sayıda araştırmacı, CoNS'nin moleküler özelliklerinin incelenmesinin, CoNS'nin neden olduğu hastane enfeksiyonları önleme ve tedavi stratejileri geliştirmeye yani virüsün ilerlemesini takip etmeye yardımcı olabileceğine inanmaktadır. CoNS araştırmaları, mevcut durumu, doğuştan gelen ve edinilmiş antibiyotik direncinin varlığı ile CoNS tedavisi için potansiyel terapötik seçenekleri ortaya koymaya çalışmaktadır (Guo *et al.* 2020). Antibiyotiğe dirençli organizmalar 1940'lardan bu yana ortaya çıkıp dünyaya yayılmıştır. Aynı zamanda antimikrobiyal direnç yirmi birinci yüzyılda insan sağlığına yönelik en büyük tehditlerden biri haline gelmiştir. Antibiyotik direncinin altında yatan mekanizmalar karmaşıktır. Bu durum, antibiyotik hedeflerini kodlayan genlerdeki mutasyonları, bakteriyel antibiyotik duyarlılığını etkileyen proteinlerin üretimini kontrol eden faktörleri ve patojenik olmayan bakteriler de dahil olmak üzere suşlar ve türler arasındaki gen transferini içermektedir.

Bakterilerin en yaygın kullanılan antibiyotiklerin bazılarına maruz kalarak hayatta kalabilmelerinin ve moleküler mekanizmalarının daha iyi anlaşılması için çalışmalar yapılmalıdır. Bir ilacın antibakteriyel etki göstermesi için hedefine ulaşması ve bağlanması gerekmektedir. Antibiyotik direnç mekanizmaları bakterilerde çeşitli şekillerde gelişmiştir. Bunlar dört gruba ayrılır;

1. Bakterinin hücre içine girmesini engelleyerek veya yok ederek kullanılacak ilaç miktarını azaltmak.
2. Hedefe ulaşmadan önce ilacı hücre dışı veya hücre içi olarak etkisiz hale getirmek veya değiştirmek.
3. Hedefi, ilaç bağlanamayacak şekilde değiştirmek.
4. İlacın bloke ettiği biyolojik eylemi gerçekleştirmenin başka bir yolunu bulmak.

Antibiyotik direncinin moleküler nedenleriyle mücadele etmek için ilacın hücre içi konsantrasyonunun azaltılması gerekmektedir. Tüm bakteri genomlarında çoklu akış pompaları kodlanmıştır ve bunlar hücreden çeşitli maddeleri dışarı atmaktadır. Akış pompaları, belirsiz işlevleri olan nesiller boyu devam eden proteinlerdir. Bununla birlikte, bazılarının hücreler için tehlikeli olan doğal olarak oluşan kimyasalları ihraç ettiği bilinmektedir (Piddock 2006). Ayrıca, işlevsel akış pompalarının, patojenite ve biyofilm gelişimi dahil olmak üzere diğer hücresel faaliyetler için rol aldığı bilinmektedir (Webber *et al.* 2009, Alvarez-Ortega *et al.* 2013). Dışa akış pompaları, bir bakteri türünün belirli bir ilaca karşı içsel duyarlılık düzeyini belirlemede önemlidir ancak bu durum antibiyotik direncine de yol açabilir. Aynı zamanda yerel düzenleyicilerdeki mutasyonlar da buna neden olabilir (Alekshun *et al.* 2000, Webber *et al.* 2005). Bunun sonucunda alternatif olarak, dışarı akış pompası genlerinin yukarı akışında güçlü promotörler olarak çalışan yerleştirme dizisi (IS) elemanları elde edilebilir (Boutoille *et al.* 2004). Makrolid taşıyıcıları kodlayan Gram pozitif bakterilerdeki mef ve msr genleri gibi mobil genetik elemanlarda da yeni akış genleri bulunabilmektedir (Luna *et al.* 1999, Butaye *et al.* 2003). Yüksek düzeyde tetrasiklin direnci veren Tet pompaları gibi belirli akış pompaları dar bir özgüllüğe sahipken bazıları daha geniş bir özgüllüğe sahip olabilmektedir (Thaker *et al.* 2010). Diğer taraftan, çoklu ilaç akış sistemleri, çoklu antibiyotikler de dahil olmak üzere çok çeşitli substratları ihraç edebilmektedir.

Antibiyotik direnci florokinolonları taşıyan *Streptokok pneumoniae*'den (pnömokok) PatAB ve *E. coli'*den makrolid ihraç eden MacAB gibi birkaç ATP bağlama (ABC) taşıyıcısı tarafından sağlanmaktadır (Marrer *et al.* 2006, Garvey *et al.* 2011). ABC taşıyıcıları, yaşamın üç aşamasında da bulunabilen bir taşıyıcı türüdür. Bunlar iki membrana yayılan etki alanı ile iki ATP bağlama etki alanından oluşur. Substrat ihracatında yer alan ABC transporter ailesi normalde her biri bir membran yayılan etki alanına ve bir nükleotid bağlama alanına sahip olan iki yarım transporterin homodimerlerinden veya heterodimerlerinden oluşmaktadır (Dassa and Bouige 2001, Higgins 2001). ABC pompaları birincil taşıyıcılardır, yani iyon taşımacılığı yerine ATP hidrolizi ile ilaç taşırlar. Taşıyıcı familyalar arasında moleküler taşıma mekanizmaları farklılık gösterir ve bunların çoğu bilinmemektedir. MDR atım sistemleri çok sayıda

substrat bağlar, potansiyel enerjiyi güç taşımacılığına dönüştürür ve alt tabakaları tek yönlü olarak çalışmaktadır.

2.8.1 Koagüle negatif stafilokokların genel özellikleri ve tanımlanması

Koagülaz negatif stafilokoklar, *Micrococcaceae* familyasına ait olan Stafilokok cinsinin 50'den fazla benzersiz spektrometre grubu olarak tanımlanmaktadır (Becker *et al.* 2020). Koagülaz negatif stafilokoklar, hepsi kümeler oluşturan fakültatif anaeroblardır. Aynı zamanda hareketsiz ve spor oluşturmayan gram pozitif koklardır. Katı ortam üzerindeki kolonileri, *S. aureus* 'un kolonilerinden daha küçük ve gri-beyaz renklidir. Ancak bazıları hafif pigmentli, genellikle krem veya sarı olabilen küçük koloniler olarak karşımıza çıkmaktadır (Al-Kobaisi *et al.* 2007, Becker *et al.* 2020, Noshak *et al.* 2020). Genellikle katalaz enzimi üretirler. Hemen hemen tüm stafilokoklar, anaerobik koşullar altında glikozdan asit üretirler. Aynı zamanda yüksek glisin içeriğine sahip interpeptid köprüleri bulunan bir peptidoglikan içerirler ve bu da onları lizostafin bölünmesine duyarlı hale getirir. Bunlara ek olarak Sitokrom-oksidaz negatif olan *S. sciuri* türleri dışında hücre duvarlarında teikoik asitler içerirler (Grüner *et al.* 2007). Koagülaz negatif stafilokok türlerinin tanımlanması oldukça zordur. Ancak bu durum, epidemiyolojik eğilimleri belirlemek, tedavi başarısızlıklarını doğrulamak veya spesifik enfeksiyonların nedenini belirlemek (De Paulis *et al.* 2003, Azih and Enabulele 2013) ve klinisyenlerin klinik örneklerde mevcut CNS çeşitleri hakkında bilgi edinmelerine izin vermek ve bunları enfeksiyon sürecinin etiyolojik ajanları olarak kabul etmek için gereklidir. Her türün potansiyel patojenitesini veya antibiyotik duyarlılığını belirlemek için CNS'nin doğru bir şekilde tanımlanması gerekmektedir (Nasaj *et al.* 2020). Stafilokok türleri başlangıçta koagülaz testi ile ayırt edilir ancak koagülaz üretmeyen stafilokoklar koagülaz negatif stafilokoklar olarak adlandırılır (Abdeen *et al.* 2021).

CNS'ler, kolonyal morfoloji, fosfataz üretimi gibi çeşitli özelliklere bağlı olarak farklı türlere ayrılmıştır (Pfaller and Herwaldt 1988, Becker *et al.* 2020). *S. warneri*, *S. capitis*, *S. simulans* ve *S. hominis* gibi daha az yaygın suşları belirlemek için daha kapsamlı biyokimyasal testler gerekmektedir (Al Wohoush *et al.* 2011, Lamers *et al.* 2012). Lizostafin izolasyonu (Schindler and Schuhardt 1964), stafilokokların

mikrokoküsten ayrılması için basit ve hızlı bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Ancak lizostafin lizisi, cinsler arasındaki farkları belirlemede anaerobik glukoz fermentasyonundan daha etkili ve uygundur (Geary and Stevens 1986). Birçok çalışma, lizostafinin güçlü bir anti-stafilokokal aktiviteye sahip olduğunu ve stafilokokların neden olduğu enfeksiyonların tedavisi için düşünülebileceğini ortaya koymuştur (Blazanovic *et al.* 2015).

Ayrıca, novobiyosine duyarlılık, koagülaz negatif stafilokokları gruplamak için kullanılan bir özellik olarak bilinmetedir (Collee *et al.* 1996).

CNS çalışmalarında birkaç farklı epidemiyolojik tipleme yöntemi uygulanmıştır ve bunlar aşağıda belirtildiği gibidir.

- Antimikrobiyal duyarlılık profilleri (antibiyogram)
- Biyokimyasal profiller (biyotip)
- Serolojik tipleme
- Bakteriyofaj duyarlılık modelleri (faj tiplemesi)
- DNA tipleme yöntemleri (plazmit profilleme, plazmit ve kromozomal DNA'nın restriksiyon endonükleaz analizi ve DNA hibridizasyonu) (Pfaller and Herwaldt 1988)

2.8.2 Biyofilm ve patogenezdeki rolleri

Mikrobiyal biyofilmler, insanlarda kalıcı hastalıkların gelişmesinde önemli bir faktördür (Joo and Otto 2012). Yabancı cisim enfeksiyonlarına ve tıbbi cihaza bağlı enfeksiyonlara neden olan en yaygın bakteriyel patojenler stafilokoklardır. Bakterilerin onları konakçıdan koruyan biyomalzemeler üzerinde biyofilm oluşturma kapasitesi bu hastalıklarda çok önemli bir unsurdur (Lim *et al.* 2004). CoNS, biyofilm geliştiren klinik olarak en önemli gram-pozitif bakteriyel patojenler arasındadır ve intravenöz kateterle ilişkili enfeksiyonların %50 ile %70'ine neden olmaktadır (Cotter *et al.* 2009, Joo and Otto 2012). Son yirmi yılda *S. aureus* gibi biyofilm oluşturan Stafilokokların *S.*

aureus'a karşı duyarlı olduğu gösterilmiştir. Önde gelen bir tür olarak *S. epidermidis,* "kronik polimerle ilişkili enfeksiyon" olarak bilinen yeni bir enfeksiyon yaratmaktadır. Sonuç olarak enfeksiyonlar, geniş bir yelpazedeki cerrahi ve tıbbi tedavileri karmaşık hale getirirken aynı zamanda sağlık hizmetleri kaynaklarını da zorlaştırmaktadır. Başta CoNS olmak üzere antibiyotiğe dirençli Stafilokokların varlığı sorunun daha da vahim olmasına neden olur (O'Neill *et al.* 2008). Biyofilm, ürettikleri hücre dışı polisakkarit (balçık) matrisine gömülü çok katmanlı hücre kümeleri oluşturmak için canlı veya cansız bir alt tabakaya geri dönüşümsüz olarak bağlanan hücreler tarafından karakterize edilen, bu mikroorganizmaların yüzeylere yapışmasını kolaylaştıran ve onları konakçı patojenlerden koruyan, yüzeyle ilişkili mikroorganizmaların sabit bir topluluğudur (Curtin and Donlan 2006, Jabra-Rizk *et al.* 2006, Mathur *et al.* 2006).

Potansiyel bir patojenite göstergesi olarak balçığın klinik önemini belirlemek için çok çaba harcanmıştır. Birçok çalışma, balçık oluşumunun koagülaz negatif Stafilokokun biyopolimerlere yapışmasına yardımcı olduğunu ve bunun kötü tedavi nedeniyle olabileceğini öne sürmektedir (Mempel *et al.* 1996).

PIA, bakteri hücrelerinin etkileşimini kolaylaştırarak çok katmanlı bir biyofilm oluşumuna neden olur. *S. epidermidis,* yaygın olarak polimerle ilişkili enfeksiyonlara neden olan bakterilerdir. Aynı zamanda *S. aureus* ve bir dizi başka stafilokok türünde de bu enfeksiyonlar tespit edilmiştir. PIA (ica operonu tarafından kodlanır), *S. epidermidis*'in önemli bir virülans faktörü olduğu öne sürülmüştür ve ica operonunun polimerle ilişkili enfeksiyonlara neden olan *S. epidermidis* izolatlarında yaygın olduğu bilinmektedir. Biyofilmler, günümüzün sağlık bakım ortamında tüm bakteriyel hastalıkların %65'inden fazlasında görülmektedir. Bu durum cihazla ilgili ve ilgili olmayan kronik enfeksiyonları kapsamaktadır (Del Pozo *et al.* 2009).

2.8.3 Biyofilm oluşum mekanizması

Son on yılda stafilokoksik biyofilm mekanizmalarına olan ilgi yoğunlaşmıştır. Başlangıçta bu durum fenotipin *S. epidermidis*'de bir virülans belirleyicisi olarak öneminden kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte, diğer CoNS usta bir biyofilm

oluşturucudur ve bu durum karşımıza virülans kapasitesini artıran bir özellik olarak çıkmaktadır.

Aslında hücrelerin fizikokimyasal etkileşimler yoluyla bir yüzeye yapışması (erken yapışma), bakteriyel biyofilm topluluklarının yapılandırılmış yaşam tarzını karakterize etmektedir (Payne and Boles 2016). Bu durumu, hücreler arası yapışma, glikokaliks gelişimi, biyofilm olgunlaşması ve çok katmanlı hücre kümelerinde (hücreler arası yapışma) bakterilerin büyümeye bağlı hücreler arası toplanması izlemektedir (Archer *et al.* 2011). En son olarak, bakteriler biyofilmden ayrılabilmektedir (Dotto *et al.* 2021).

Bakteriyel tutunmayı, yüzey proteinleri, polisakkaritler, fizikokimyasal etkileşimler, hidrofobik etkileşimler, konakçı proteinlerin varlığı ve kapsüler polisakkarit adhezin, otolizin AtlA ve diğer Stafilokok yüzey proteinleri gibi spesifik bakteriyel proteinleri ve polisakaritler etkilemektedir (Flemming and Wingender 2010, Houston *et al.* 2011). Biyofilm oluşumundaki birikim aşaması, ilk bağlanmadan sonra PIA oluşumuna bağlıdır (Speziale *et al.* 2014). PIA, çoğalan hücrelerin hücreden hücreye yapışmasına aracılık ettiği için bakteri hücresi birikimi için gereklidir (Foster *et al.* 2014).

Hücreler arası yapışma (ica operonu), PIA sentezi için gerekli olan enzimleri kodlar. İca operonu iki genden oluşur: icaR (düzenleyici) ve icaADBC (biyosentez) (Archer *et al.* 2011). PIA üretimi her zaman biyofilmlerin oluşturulmasıyla bağlantılı değildir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda *Stapylococcus spp*'de (CoNS) biyofilm gelişiminin en az iki mekanizması olduğu netlik kazanmıştır. İlk olarak polisakkarit hücreler arası adhezin (PIA) olarak bilinen hücre dışı bir polimerin geliştirilmesi gerekmektedir. İca gen kümesi, PIA üretimi ve PIA üreten suşlarda biyofilm oluşumunda en önemli etmendir (O'Neill *et al.* 2008). Yapılan çalışmalarda, çoklu CoNS türlerinde ica lokusundaki mutasyonların biyofilm kapasitesini bozmadığı belirlenmiştir. Ayrıca, icadan bağımsız biyofilm oluşum mekanizmasının var olduğu ortaya çıkarılmıştır (O'Neill *et al.* 2008, Archer *et al.* 2011).

Teikoik asitler, *Staphylococcus spp*'nin önemli bir parçası olan yüzeye maruz kalan yüklü polimerlerdir. Hücre duvarı, ilk yapışmada işlev görür ve biyofilm matrisinin

bileşenidir (Speziale *et al.* 2014). Biyofilmle ilişkili protein Bap ve *S. epidermidis*'den elde edilen agregasyonla ilişkili protein Aap gibi yüzey yapışkanları, ica'dan bağımsız mekanizmalar için gereklidir (Archer *et al.* 2011). Biyofilm kalınlığı arttıkça, çeşitli boyutlarda tek hücreler ve/veya bakteri kümeleri dağılır ve bunlar, bulaşıcı sürecin ana destekleyicileri olarak kabul edilebilir. Bakteriler kan dolaşımına yayıldığında metastatik enfeksiyonlar ve sepsis oluşmaktadır (Donelli *et al.* 2007).

Biyofilm gelişiminin temel genetik unsurlarını ve düzenleyici süreçlerini tanımlamaya yönelik çalışmalar yapılmasına rağmen, bakterinin olgun biyofilmden dağılması hakkında çok az şey bilinmektedir. IS256 ekleme dizisinin icaADBC operonuna eklenmesi/çıkarılmasının, çok sayıda araştırmada biyofilm oluşturma kapasitesinin "açma-kapama" geçişinde doğrudan bir rol oynadığı tespit edilmiştir (Tormo *et al.* 2005, Valle *et al.* 2007).

2.9 Biyofilm Oluşumunu Etkileyen Genetik Düzenleme ve Çevresel Faktörler

Yapılan çalışmalar, Stafilokokal biyofilm oluşumunun hem düzenleyici süreçlerden hem de faz varyasyonları, mutasyonlar ve kromozomal yeniden düzenlemeler gibi genetik mekanizmalardan etkilenen oldukça değişken bir faktör olduğunu göstermiştir (Kozitskaya *et al.* 2004, Penesyan *et al.* 2019).

Biyofilm oluşumunun düzenlenmesi karmaşıktır ve çeşitli düzenleyici sistemlerden etkilenmektedir. Alternatif stres sigma faktörü σB, *S. epidermidis*'de biyofilm oluşumunda önemli bir etkendir. Ancak *S. aureus*'da küçük bir rol oynamaktadır (Jäger *et al.* 2009). Stafilokokal yardımcı düzenleyici SarA, çeşitli CoNS türlerinde biyofilm oluşumu için esastır (Jäger *et al.* 2009). PIA sentezi ayrıca, *S. epidermidis* 'in faz varyantlarında bir açma-kapama modu düzenlemesine tabidir, bu kısmen, bir IS öğesinin ica lokusuna alternatif olarak yerleştirilmesinden kaynaklanmaktadır (Tormo *et al.* 2005, Valle *et al.* 2007).

İca operonuna bitişik bulunan icaR geni, ica lokusunun bir transkripsiyonel baskılayıcısını kodlamaktadır. İcaR'nin ifadesi sırayla alternatif strese duyarlı sigma faktörü σB tarafından dolaylı olarak bastırılır. Böylece, σB'yi aktive eden çevresel koşullar, icaR geninin baskılanması ve icaADBC operonunun deregülasyonu ile sonuçlanmaktadır (Tormo *et al.* 2005, Cotter *et al.* 2009).

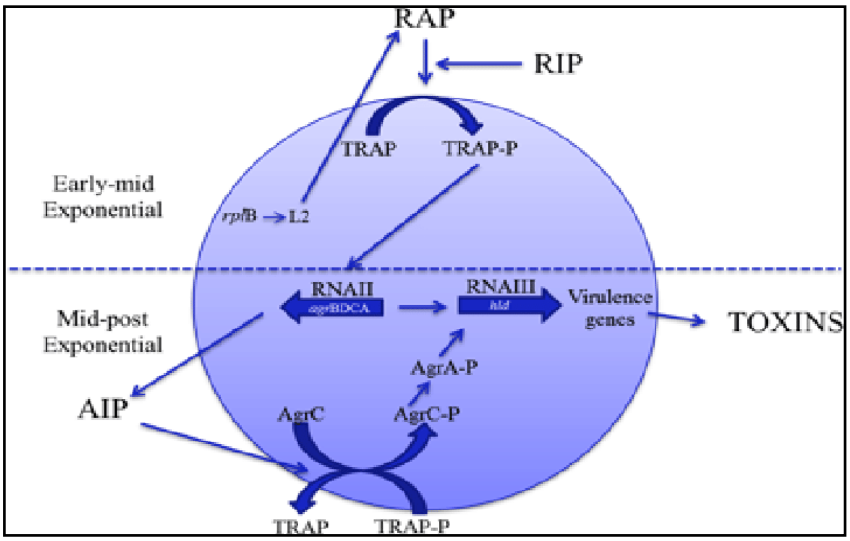
S. epidermidis'de PIA/PNAG üretimi ve biyofilm oluşumu, NaCl'ye yüksek ozmolarite, etanol, glukoz, anaerobik koşullarda büyüme, yüksek sıcaklık ve bazı antibiyotiklerin alt inhibitör konsantrasyonları da dahil olmak üzere çeşitli çevresel faktörler tarafından düzenlenmektedir (Cue *et al.* 2012). Bu alt-inhibitör koşullar altında ica operonunun transkripsiyonunun yukarı doğru düzenlendiği ve biyofilm gelişiminde önemli bir artışa neden olduğu tespit edilmiştir (Cue *et al.* 2012). Biyofilm oluşumunda şekerlerin (rafinoz) var olması önemli bir rol oynamaktadır. Anoksik koşullar (Anaerobiosis) altında, *S. epidermidis*'de ica operonunun ve PIA üretimi artan transkripsiyona neden olmaktadır (Dobinsky *et al.* 2003).

Ayrıca demir, biyofilm gelişiminin düzenlenmesinde önemlidir. Biyofilm oluşumunda, düşük demirli bir ortamda indüklenir ve demir ilavesiyle baskılama yapılır. Ayrıca düşük sitrat konsantrasyonları biyofilm oluşumunu güçlü bir şekilde uyarmaktadır. Bunlara ek olarak Alfa-hemolizin ve salgılanan diğer toksinler, biyofilm oluşumunda rol oynayabilir (Trentin *et al.* 2013).

Çekirdek algılama olarak bilinen hücreler arasındaki kimyasal sinyal alışverişi, biyofilmin karmaşık yapılara dönüşmesini düzenlemektedir. Nisap algılama, bulaşıcı süreç için çok önemli sonuçları olan aşırı kalabalıklaşmayı ve besin rekabetini azaltarak biyofilm topluluğuna fayda sağlayan bir hücreden hücreye iletişim stratejisi olarak bilinmektedir.

CoNS çekirdek algılama (QS) sistemi, bu proteini kodlayan yardımcı gen düzenleyicisidir (Cosgriff *et al.* 2019). Bir QS, RAP (TRAP) hedefinin fosforilasyonunu indükleyen 33-kDa otoindükleyici RNAIII aktive edici proteini (AEP) kullanılmaktadır (Şekil 2.2). Diğer QS, AgrC'yi fosforile eden ve RNAIII ve toksin

üretimi ile sonuçlanan otoindükleyici peptit AIP'yi kullanmaktadır (Balaban *et al.* 2007).



Şekil 2.2 TRAP-RAP etkileşimi ve agr düzenlemesi yoluyla önerilen *S. aureus* QS mekanizması ve toksin üretimi (Ciulla *et al.* 2018)

2.10 Antimikrobiyal Ajanlara Karşı Biyofilm Direnci

Olgun bir biyofilmde bulunan bakteriler, planktonik benzerlerinden oldukça farklı davranırlar; özellikle biyofilm organizmaları, antimikrobiyal maddelere karşı süspansiyon halindeki organizmalardan çok daha dirençlidir. Bazı durumlarda, yapışık organizmalara karşı bakteri aktivitesi elde etmek için gereken antibiyotik konsantrasyonu, tür-ilaç kombinasyonuna bağlı olarak planktonik bakterilerden üç ile dört kat daha yüksek olabilmektedir (Roy *et al*. 2018).

2.10.1 Bakteriyel biyofilmlerde antibiyotik direnci mekanizması

Biyofilm bakterilerinin antimikrobiyal ajanlara karşı var olan direnç mekanizmalarının kapsamı hala belirsizliğini korumaktadır. Ancak bu durumun difüzyon sınırlamasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Bakteriler, düşük büyüme oranları ve bu hücrelerdeki tipik fenotiplerle ilişkili olarak fizyolojilerini değiştirmiştir. Antimikrobiyal moleküller, kaplanmış hücreleri etkisiz hale getirmek için biyofilm matrisi boyunca yayılmak

zorundadır. Bu matrisi oluşturan hücre dışı polimerik madde, moleküllerin biyofilm iç kısmına taşınma hızını etkileyerek bu moleküller için bir bariyer oluşturmaktadır (Park *et al.* 2011).

Bakteri hücrelerinin, besin ve oksijen eksikliği nedeniyle yavaş geliştiği veya durağan faz durumuna geçtiği düşünülmektedir. Yavaş büyüyen bakteriler, önemli ölçüde daha düşük metabolik aktiviteye sahiptir ve bu da antibiyotik direncinde bir azalmaya neden olur. Diğer bir olasılık da biyofilmin yüzey tabakasındaki bakterilerin, etkilerini kaybettikten çok sonra ilaçları parçalayıp değiştirmeleri, daha derinlere yerleşmiş komşu hücrelerini tehlikeli antimikrobiyal bileşiklerden korumaları olarak düşünülmektedir.

2.10.2 Biyofilm tedavisi

İmplante edilmiş tıbbi cihazlara veya hasarlı dokuya yapışan bakteriler, kalıcı enfeksiyonların odağı haline gelebilmektedir. Bu bakteriler, içinde korundukları biyofilmlerde büyüyerek konakçı savunmaları ve antimikrobiyal kemoterapi tarafından temizlenmeden kaçmaktadır (Vestby *et al.* 2020). Tıbbi cihazla ilişkili enfeksiyonları yok etmeye yönelik antibiyotik tedavileri, ekzopolisakkarit matrislerinde bulunan sesil bakterilerin planktonik organizmalardan daha ilaca dirençli olma yetenekleri nedeniyle genellikle başarısız olmaktadır (Khatoon *et al.* 2018). Biyofilm bakterilerindeki antimikrobiyal direnç, biyofilm olmayan bakterileri öldürmek için gerekenden 500 ile 5.000 kat daha yüksektir (Del Pozo *et al.* 2009).

Biyofilm, çok hücreli bir organizmanın toplu olarak tek bir hücreyi öldürecek antimikrobiyal tedavilere direndiğini ve antimikrobiyal direnç kazandığını belirtmektedir. Buna rağmen, bazı antimikrobiyal ajanlar, alt inhibitör konsantrasyonlarda biyofilm tabakasını önemli ölçüde azaltabilir. Farklı antibiyotiklerin, alt inhibitör konsantrasyonlarda CoNS biyofilmlerinin üretimini hem uyardığı hem de önlediği gösterilmiştir. Bu etkilerin, çalışılmakta olan suş ve antimikrobiyal ajan kombinasyonuna bağlı olduğu görülmektedir. Örneğin, düşük dozlarda eritromisin, klindamisin ve siprofloksasinin KNS'de biyofilm oluşumunu

teşvik ettiği gösterilmiştir (Tahaei *et al.* 2021). Diğer taraftan β-laktam antibiyotik Dikloxacillin'in alt inhibitör konsantrasyonları, *S. haemolyticus* ve *S. epidermidis* tarafından üretilen biyofilm miktarını azaltmıştır. Ayrıca Rifampin, diğer antibiyotiklerle kombinasyon halinde, hastane cihazıyla ilişkili enfeksiyonları tedavi etmek için sıklıkla kullanılmaktadır.

Antimikrobiyal kilit tedavisi (AKT), biyofilmlerin çok yüksek konsantrasyonlarda antimikrobiyallere uzun süre maruz bırakılmasının, biyofilm bakterilerinin göreceli antimikrobiyal direncinin üstesinden gelebileceği beklentisine dayanmaktadır. Bunu belirlemek için Glikopeptitler ve Aminoglikozitler dahil olmak üzere çeşitli ajanlar kullanılmıştır. Bu yöntem son zamanlarda biyofilme yerleştiren KNS'nin önlenmesi ve tedavisinde kullanılmaktadır (Curtin *et al.* 2003). Oritavancin, ayrıca CoNS biyofilmlerini sterilize etmek için de kullanılabilmektedir (Belley *et al.* 2009).

Biyofilme gömülü CoNS'nin antimikrobiyal temizliğe dayanma kapasitesi, bu büyüme modunda bakterilere karşı etkili olan yeni antimikrobiyal ilaçları aramaya devam etme ihtiyacını vurgular veya mevcut antimikrobiyal varlığı ile çalışır (Jabra-Rizk *et al.* 2006). Örneğin sodyum salisilatın Vankomisin gibi antibiyotiklerin aktivitesini iyileştirdiği bulunmuştur. *S. epidermidis*'in biyofilm gelişimi bu ilaçla inhibe edilmektedir. Ayrıca Feng vd. (2018) yaptıkları çalışmada, Nacetylsistein-Tigesiklin'in biyofilm ile ilişkili tüm canlı bakterileri önemli ölçüde azalttığını ve CoNS için sinerjik olduğunu göstermiştir (Feng *et al.* 2018). Çekirdek algılama inhibitörü RNAIII inhibe edici peptit (RIP) olan TRAP, hedef proteininin fosforilasyonunu azaltarak Stafilokok biyofilmlerinin üretimini azaltır, bu da *Staphylococci* tarafından üretilen virülans faktörlerinin inhibisyonu ile sonuçlanmaktadır. RIP'nin, CoNS türleri gibi ilaca dirençli suşların neden olduğu enfeksiyonlar da dahil olmak üzere Stafilokok enfeksiyonlarını önlemede güçlü aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Antibiyotiklerin varlığında, RIP %100 inhibisyon elde etmiştir (Balaban *et al.* 2007).

Del Pozo vd. (2009) tarafından yapılan bir çalışmada, elektrik akımının (EC) aminoglikozitlerin, kinolonların ve oksitetrasiklin'in bakteri biyofilmlerine karşı aktivitesini iyileştirmekte olduğu ortaya konmuştur. Bulgular, EC'nin biyofilm

organizmalarına (MRSA gibi) karşı antimikrobiyal ilaçların etkinliğini geliştirdiğini göstermektedir.

Bunun yanı sıra, kateterlerde antiseptik ve antibiyotik kaplamaların kullanılması gibi *Staphylococci* tarafından üretilen biyofilmi önlemek ve yok etmek için farklı tedaviler bulunmaktadır (Jaśkiewicz *et al.* 2019). Hücre zarı ile ilişkili makromoleküllere karşı üretilen antikorlar, litik fajların kullanımı (Curtin and Donlan 2006), ayrıca dispersin B (bir N-asetilglukozaminidaz olan) gibi enzimlerin kullanımı (Dobrynina *et al.* 2015 biyofilmin hücre dışı matrisleri olarak kabul edilmektedir (Kokai-Kun *et al.* 2009).

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Laboratuvar ekipmanları ve aparatları

Bu çalışmada kullanılan tüm araç ve gereçler Çizelge 3.1'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.1 Kullanılan alet ve ekipman türleri

Alet veya ekipman	**Üretim şirketi**
Otoklav	Certoclave/ CV-EL 18L/ Avusturya
Santrifüj	Jouan / Fransa
Damıtıcı	Aquatron / Bibby
İnkübatör	Nave/ Türkiye
Fırın	Memmert/ Almanya
pH metre	Hanna/ Romanya
Plastik doku kültürü plakası (96 oyuklu düz dipli)	BioTek/ ABD
Buzdolabı	Philips/ Hollanda
Hassas terazi	Sartorius/ Almanya
Vitek2 kompakt sistem	Biomeriux/ABD
Laminer hava akışı (davlumbaz)	Labtech (Kore)
Mikro pipetler	Brand-W(Almanya)

3.1.2 Kimyasallar

3.1.2.1 Kimyasal ve biyolojik bileşikler

Bu çalışmada kullanılan kimyasallar Çizelge 3.2'de gösterilmiştir. Ayrıca çalışmada kullanılan antimikrobiyal diskler Çizelge 3.3'te ve β-laktam antibiyotik diskleri ise Çizelge 3.4'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.2 Kimyasal ve biyolojik olan bileşikler

Kimyasal	**Üretim şirketi**
NaH_2PO_4	Çin
Na_2HPO_4	Çin
Kristal viyole	İngiltere
Glikoz	İngiltere
Tavşan plazması	Tikrit Üniversitesindeki hayvan evi LAP

Çizelge 3.3 Antimikrobiyal diskler tablosu

Antimikrobiyal disk	**Sembol**	**Disk Konsantrasyonu µg/disk**	**Üretim şirketi**
Vankomisin	VA	30	Bioanalyse/Türkiye
Azitromisin	AZM	15	Bioanalyse/Türkiye
Tobramisin	TOB	10	Bioanalyse/Türkiye
Metisilin	ME	10	Bioanalyse/Türkiye
Sefotaksim	CTX	30	Bioanalyse/Türkiye
Novobiyosin	NV	10	Al-Razi center
Gentamisin	CN	10	Bioanalyse/Türkiye
Metronidsol	MET	30	Bioanalyse/Türkiye

Çizelge 3.4 β-laktam antibiyotik diski

Antimikrobiyal disk	**Sembol**	**Disk Konsantrasyonu µg/disk**	**Üretim şirketi**
Seftazidim	CAZ	30	Bioanalyse/ Türkiye
Sefotaksim	CFM	30	Bioanalyse/ Türkiye
Augmentin	AUG	30	Bioanalyse/ Türkiye

3.1.2.2 Kültür ortamı

Hazır ortam Çizelge 3.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.5 Hazır ortam

Kültür ortamı	Üretim şirketi
Manitol Tuz Agar	Himedia/ Hindistan
Mueller-Hinton ağarı	Himedia/ Hindistan
Besin Agarı	Oxoid/ İngiltere
Besin Sıvı Besiyeri	Himedia/ Hindistan
Tripton soya besiyeri	Himedia/ Hindistan
Beyin-Kalp İnfüzyon besiyeri	Himedia/ Hindistan
Beyin-Kalp İnfüzyon Agarı	Himedia/ Hindistan

Çizelge 3.6'da çalışmada kullanılan diğer bazı materyaller gösterilmektedir.

Çizelge 3.6 Çalışmada kullanılan diğer materyaller

Araçlar	Üretim şirketi
Petri kapları	Biozek(İsviçre)
Tüpler, beherler, şişeler	-
Pamuklu çubuklar	AFCO (Ürdün)
Halka	Himedia (Hindistan)

3.1.3 Kültür ortamının hazırlanması

Bu çalışmadaki kullanıma hazır ortamların tümü, üreticinin talimatlarına göre hazırlanmıştır. Diğer yandan hazırlanan tüm ortamlar, 121°C'de 15 dk boyunca 15 lb/g^2 basınçta otoklavlanır.

3.1.3.1 Besin agarı

Bu ortam 28 g toz besin ortamını 1 L distile suda erittikten sonra pH 7,2'ye ayarlanarak 121 °C'de otoklavda sterilize edilmesi ve son olarak 15 dk' lık bir süre için 15 lb/g^2 basınç uygulanarak hazırlanmaktadır. Bu ortam, saf numunelerin izolasyonunda ve muhafazasında kullanılmaktadır.

3.1.3.2 Besin sıvı besiyeri

Bu ortam 13 g toz besin besiyerini 1 L distile suda eritilip pH 7,2'ye ayarlanarak hazırlanarak, steril tüplerle boşaltılmış ve otoklavda sterilize edilmiştir. İzolatları büyütmek ve berrak bakterileri biyokimyasal testler için hazırlamak için 121°C ve 15 lbs/g2 basınç 15 dk boyunca kullanılmıştır.

3.1.3.3 Kan agarı

35 g kanlı agar ortamı 1 L distile suda çözülerek hazırlanmış ve 121°C'de 15 dk buhar sterilizasyonu ile sterilize edilmiştir. Daha sonra kompozit 45°C'ye kadar soğutulmuş ve %7'lik steril insan kanı eklenmiştir. Bu yöntem, hemolitik aktiviteyi ve hemoliz tipini tespit etmek için bakteriyel izolasyon ve enkültürasyon için uygun kabul edilmektedir (Collee *et al.* 1996).

3.1.3.4 Manitol tuz agar

111g/ 1L distile suda çözülerek hazırlanmıştır. Elde edilen kompozitin pH'sı 7,2'ye ayarlanarak otoklavda sterilize edilmiştir. Daha sonra, kompozit 121°C sıcaklıkta ve 15 dk boyunca 15 lbs/g2 basınçta otoklavlanmıştır. Bu ortam, stafilokokları izole etmek ve teşhis etmek için kullanılmaktadır (Collee *et al.* 1996).

3.1.3.5 Muller hinton agarı

23g/1L besiyeri distile suda çözülerek pH'sı 7,2'ye ayarlanarak hazırlanmıştır. Besiyeri 121°C'de 15 dk otoklavda sterilize edilerek 45°C'ye kadar soğutulmuştur. Bu ortam bakteri izolatlarının antibiyotiklere duyarlılığını test etmek için kullanmıştır.

3.1.3.6 Beyin-kalp infüzyon besiyeri

Bu ortam, tedarik eden şirketin talimatlarına dayanılarak hazırlanmıştır. Kompozit, sıvı ortamda besiyerinin 37 gramının çözülmesi daha sonra tüplere dağıtılması ve otoklavda sterilize edilmesi ile hazırlanmaktadır. Bu ortam, bakterileri geliştirmek ve uyarmak amacıyla kullanılmıştır.

3.1.3.7 Beyin-kalp infüzyon agarı

Bu ortam, tedarik eden şirketin talimatlarına göre hazırlanmıştır. Buna göre, 1L distile su içerisinde bulunan 52 g orta sıvı besleyicinin çözündürülmesini ve otoklavda 121°C'de 15 dk sterilize edilmesini içermektedir. Hazırlanan ortam, bakterileri geliştirmek ve uyarmak amacıyla kullanılmıştır.

3.1.3.8 Üre agar ortamı

Üre bazlı agar 95 mL Üre +solüsyon ve 5 mL Christensen ortamı ile üretici firmanın talimatına göre hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyerinin pH'sı 6,8 – 6,9'a ayarlanarak 121ºC'de 15 dk otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Daha sonra 50ºC'ye kadar soğutulmuştur. Ardından her 95 mL'ye aseptik olarak 5 mL steril su ve %40 üre solüsyonu eklenerek iyice karıştırılmıştır. En son steril tüplere (eğik) olarak dağıtılmıştır. Bu ortam, bakterilerin üreaz enzimi üretme kabiliyetini saptamak için kullanılmıştır (Collee *et al.* 1996).

3.1.4 Bakteri izolatlarının korunması

Kısa sreli koruma; bakteri izolatlarını içeren besin agar besiyerini içeren tüpler 37 °C'de 22 saat inkübe edilmiştir. İzolatlar aylık olarak yenilenmektedir. *Uzun süreli koruma*; bu işlemde 5 mL önceden hazırlanmış beyin ve kalp infüzyon broth içeren tüplere aktarılmıştır. Daha sonra bu tüp grupları 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir ve tüpler kullanılana kadar -21 derecede tutulmuştur. Katalaz reaktifi %3 hidrojen peroksit (H_2O_2) olarak hazırlanmıştır. Oksidaz reaktifi ise 1 g N, N, N, N, -tetra metil-Pfenilen-diamin dihidroklorürün 100 mL damıtılmış su içinde çözülmesiyle hazırlanmıştır. Hazırlanan ortamlar koyu renkli şişede saklanarak kullanılmaktadır.

3.1.5 Çözeltinin hazırlanması

Kristal ihlal çözümü

Çözelti, 100 mL damıtılmış suda 1 g ihlal eden Kristal tozunun çözülmesiyle hazırlanmıştır. Bu işlemi tamamlamak için çözelti, 0,22 µL geçirgen çaplı mikrofiltrasyon üniteleri kullanılarak filtrelenmiş ve kullanılana kadar buzdolabında saklanmıştır. Hazırlanan ihlal çözümü, bakteri izolatlarının biyofilm oluşumunu tespit etmek için kullanılmıştır.

Fosfat tamponlu tuzlu su (PBS)

Bu çözelti, 8 g NaCl, 0,2 KCl, 1,4 g Na_2HP0_4 ve 0,25 KH_2PO_4'ün küçük bir hacimde bir litre damıtılmış suyu içeren distile su içinde çözülmesiyle hazırlanmıştır. pH 2,7'ye ayarlanarak otoklavda sterilize edilmiştir. Bu çözelti, incelenecek olan izolatlar tarafından biyofilm oluşumunu tespit etmek için kullanılmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Bakteriyel numune toplama

Bu çalışmada kullanılan örnekler Salah El-Din Genel Hastanesinin acil servisinde yaralanan hastalardan temin edilmiştir. Toplamda 94 örnek alınmıştır. İşlem, acil serviste görev yapan doktor ve uzmanların gözetiminde gerçekleştirilmiştir. Örnekler steril bir ortamda toplanmıştır. Eküvyon çubukları 1 ile 80 yaş arasındaki farklı yaşlardaki yaralı hastalardan ve her iki cinsiyetten alınmıştır. Eküvyon çubuklarının alınma süreci Kasım 2020'den Ocak 2021'e kadar sürmüştür. Steril eküvyon çubukları besiyeri içeren steril test tüplerine aktarılmıştır. Alınan tüpler 24 saat 37°C sıcaklıkta tutularak Salah El-Din Genel Hastanesi'ndeki mikrobiyoloji laboratuvarına aktarılmıştır.

3.2.2 İzolatların tanımlanması

Koagülaz negatif stafilokoklar, API-Staph kullanılarak yapılan biyokimyasal testler ve kültür ortamındaki morfolojik özelliklerine bakılarak aşağıda belirtilen iki başlıkla tanımlanmıştır (Nasaj *et al.* 2020).

Mikroskobik incelemeler, İzolatların lekeye tepkilerini, formlarını ve dizilişlerini belirlemek için gram boyama kullanılmıştır. Koloni morfolojisi**,** Koloniler kanlı agar üzerinde büyütülmüş ve daha sonra şekilleri, boyutları, renkleri ve kan hemolizleri de test edilmiştir.

3.2.3 Biyokimyasal testler

Katalaz testi

Tahta bir aplikatör çubuğu ile kültür plakasından tek bir izole bakteri kolonisi çıkarılarak 1-2 damla %3'lük H_2O_2 ile karıştırılmıştır. Daha sonra cam slayt üzerine yerleştirilmiştir. Gaz kabarcıklarının oluşumu tesitin pozitif olduğunun bir göstergesidir.

Oksidaz testi

Tek izole bakteri kolonisi tahta aplikatör çubuğu ile bir parça filtre kağıdına aktarılmıştır. Ardından filtre kağıdına hazırlanan 2-3 damla oksidaz reaktifi eklenmiştir. Renkteki mora dönüşüm pozitif bir sonuç olduğunu göstermektedir. Oksidaz negatif olan bakterilerde renk değişikliği meydana gelmemektedir.

Tüp koagülaz testi

Serbest plazma pıhtılaşmış enzim (pıhtılaşmadan bağımsız), beyin ve kalp infüzyon suyundan 0,2 mL kan plazmasına 0,8 mL kan plazması eklenerek hazırlanmaktadır. Gelişmekte olan bakteri izolatları küçük tüplerde inoküle edilir ve daha sonra 4 saat sıcaklıkta 37°C inkübe edilmiştir. Bu süre zarfında, muayenenin olumlu olduğunu gösteren pıhtılaşma ortaya çıkacaktır. Oda sıcaklığında pıhtılaşma göstermeyen tüpler ertesi güne kadar bırakılmıştır.

3.2.4 Biyofilm oluşturma testi

Bu test bakterilerin biyofilm oluşturma yeteneğini belirlemek amacıyla yapılmaktadır. Bu test tüp yöntemi kullanılarak yapılmış olup, tüplerin iç duvarlarında ve altlarında mor bir tabaka şeklinde biyofilmler oluştuğunda olumlu bir sonuç ortaya çıkmaktadır. Gelişmekte olan bakteri kolonilerine %1 konsantrasyonda Glikoz şekeri eklenerek (Triptik soya suyu) besiyeri içeren cam test tüplerine aktarılmıştır. Elde edilen tüpler kuluçka süresinin bitiminden sonra 37°C sıcaklıkta ve 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra tüpler fosfat tamponlu tuzlu su ile yıkanarak kurutulmalıdır. Daha sonra üç dk boyunca %1'lik konsantrasyonda kristal viyole boya ile boyanmıştır. Biyofilmler tüplerin alt kısmında ve iç duvarlarında menekşe tabakası şeklinde oluştuğundan, kuruması için baş aşağı biçimde konumlandırılmıştır.

3.2.5 Kongo kırmızı agar yöntemi

Kongo kırmızı agar (CRA) ortamını kullanarak (Freeman *et al.* 1989) biyofilm oluşumu belirlenmiştir. Beyin kalp infüzyon suyu (Oxoid, UK) 37 g/L, sakaroz 50 g/L, agar No. 1 (Oxoid, UK) 10 g/L ve Kongo Kırmızı indikatör (Oxoid, UK) 8 g/L CRA ortamını yapmak için kullanılmıştır. İlk olarak Kongo kırmızısı boyası konsantre sulu çözelti hazırlanmıştır ve diğer ortam elementlerinden ayrı olarak 15 dk boyunca 121ºC otoklavlanmıştır. Daha sonra 55°C'de otoklavlanmış ve beyin kalp infüzyonlu sukroz agarına konulmuştur. 5 CRA plakası, test organizmaları ile enfekte edilerek aerobik olarak 37ºC'de 24 saat inkübe edilmiştir. Biyofilm oluşumu kuru kristal kıvamlı siyah koloniler ile tanımlanmıştır (Reid 1999).

Kapsül boyama yöntemi

- Kuru ve temiz bir slaytta, bir öze dolusu bakteri kültürü aktarılmıştır. Ardından nigrosin lekesi ile hafifçe karıştırılarak suyla durulanmadan önce havada kurumaya bırakılmıştır.
- Slayt metilen mavisi ile boyanarak suyla durulanmadan önce havada kurumaya bırakılmıştır.
- Daha sonra, mikroskop altında inceleme yapılmıştır. Nigrosin lekesi, leke bırakmayan kapsüle koyu bir arka plan verirken, metilen mavisi lekesi hücrelere mavi bir renk vermektedir.

İzole bakteri testinin antibiyotiklere duyarlılığı

Bakterilerin antibiyotik duyarlılığını belirlemek için difüzyon disk testi kullanılmaktadır.

1- Sıvı bakteri kültürü içeren tüpler 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir.
2- Sıvı kültürün bir kısmı (0,1 mL) fizyolojik salin içeren tüplere aktarılmıştır. Daha sonra tüplere 0,5 mL McFarland standart karşılaştırılmıştır.

3- 100 µL bakteri süspansiyonu mikropipet kullanılarak cam difüzör ile Muller-Hinton agar merkezinin çatısına eşit olarak yayılmıştır ve kaplar 10-15 dk oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.
4- Antibiyotik hapları steril forseps kullanılarak plaklara yerleştirilerek plaklar 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir.
5- Antibiyotik haplarının etrafındaki inhibisyon bölgelerinin çapı milimetre olarak ölçülürek not alınmıştır.

Novobocin duyarlılık testi (5 µg/disk)

Bu test Stafilokokus türlerini ayırt etmek için kullanılmıştır. Mueller-Hinton agar üzerine bir gece bekleyen bakteri kültürü besiyerini yaymak için steril bir sürüntü kullanılmıştır. Daha sonra agar ortamı üzerine 5 µg Novobiocin diski konularak plakalar daha sonra 24 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Diski çevreleyen tüm Stafilokok türlerinin inhibisyon bölgesi ölçülmüştür ve çapı 15 mm'nin üzerinde olanlar geniş bir engelleyici bölgeye sahip olarak not edilmiştir (Collee *et al.* 1996).

Beta-laktam direnç testi

İki veya üç taze ve genç koloni izolasyonu bir gün boyunca 37 ^{o}C'de besleyici besiyerine enjekte edilmiştir. Daha sonra, MacFarland'ın standart tüpü kullanılarak kültüre alınan besin suyunun bulanıklığı ayarlanmıştır.

Mueller-Hinton agar plakaları, sterilize edilmiş bir eküvyon çubuğu kullanılarak bakteri süspansiyonu ile kaplanmıştır. Tabletler, bir (30 µg) büyütme diski, bir (30 µg) seftazidim diski ve bir (30 µg) sefotaksim diski ile, merkezden Augmentin diskinin merkezine 15 mm mesafeyle yerleştirilmiştir. Plaka daha sonra bir gün 37°C'de inkübe edilmiştir. İnhibisyon bölgesi Augmentin diskine doğru hareket ederse, bu genişletilmiş spektrumlu beta-laktamaz üretiminin iyi gittiğinin göstergesi olarak değerlendirilmiştir.

Hemolizin üretim testi

Bakteriyel izolatlar hazırlanan kanlı agar içeren plaklara yerleştirilmiştir. Kaplar kullanımdan önce 24 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. Sonuçlar dissosiyasyon tipi (alfa, beta, gama) gözlemlerine dayanarak belirlenmiştir.

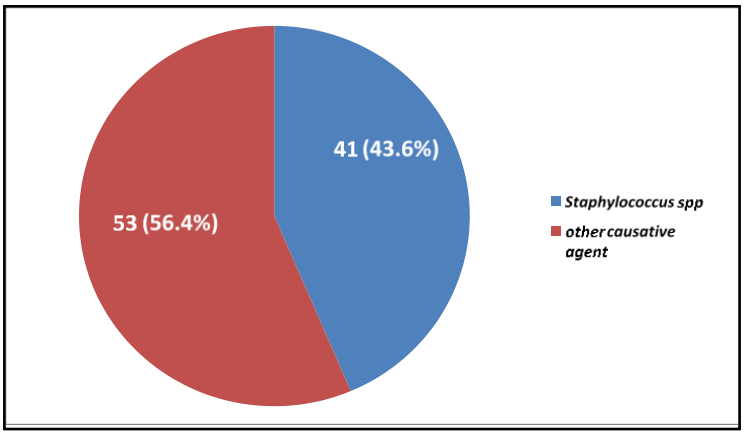
Üreaz üretimi

Bakteri izolatı hazırlanan üre agar besiyerinin tüm eğim yüzeyi üzerine gelecek şekilde yoğun biçimde aşılanmış ve 37 ºC'de inkübe edilmiştir. Tüpler inkübasyondan 4 saat sonra ve tüm gece boyunca incelenmiştir. Üreaz pozitif kültürler besiyerinin rengini mor-pembeye değiştirmiştir (Collee *et al.* 1996).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Cinsiyete Göre Hastaların Dağılımı

Çalışma, Salah El-Din Genel Hastanesi acil servisinde bulunan yaralılardan toplanan 94 örneği kapsamaktadır. *Staphylococcus* cinsi için seçici ve ayırıcı bir besiyeri olan manitol tuzlu agarda sadece 41 (%43,6) örnek üreme kabiliyetine sahip olmuştur ve diğer 53 (%56,4) örnek manitol tuzlu agarda kültürleme için negatif bulunmuştur (Şekil 4.1).

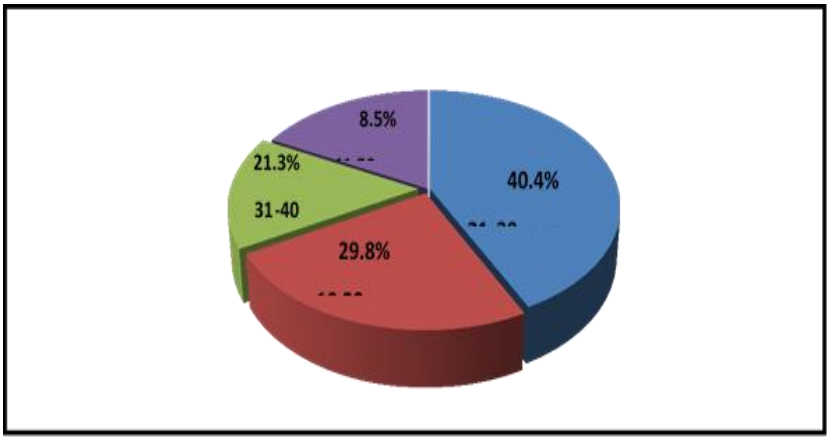


Şekil 4.1 Klinik örneklerden izole edilen bakteri oluşumu

4.2 Numune ile Yaş ve Cinsiyet Arasındaki İlişki

4.2.1 Yaş

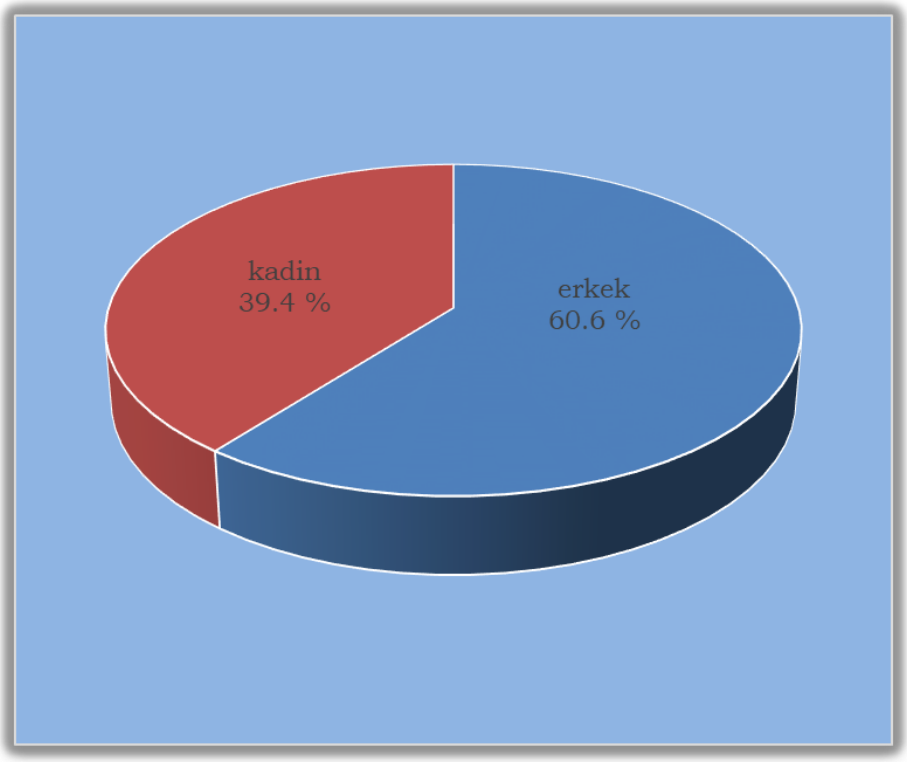
Hastaların yaşına göre 21- 30 yaş grubunun toplam 38/94 (%40,4) hasta ile en yüksek sıklığa sahiptir. 10- 20 yaş arası grubun 28/94 (%29,8) ile toplam hasta grubunda ikinci sırada olduğu görülmektedir. 31 – 40 ve 41/50 yaş grupları sırasıyla 20/94 (%21,3) ve 8/94 (%8,5) hasta ile en düşük sıklığa sahip gruplardır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 Numunelerin yaş gruplarına göre dağılımı

4.2.2 Cinsiyet

Hastaların cinsiyet özellikleri Şekil 4.3'te görüldüğü gibi kadınlarda en yüksek sıklığın 57 (%60,6), erkeklerde ise 55 (%39,4) olduğunu ortaya çıkarmıştır.



Şekil 4.3 Numunelerin cinsiyete göre dağılımı

4.2.3 Gram pozitif bakteri izolatları

Staphylococcus izolatlarında, üzüm salkımlarına benzer küresel kümeler oluşturan Gram pozitif bakteri oranı 41/94 (%43,6) olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.1). Pozitif bakteri türleri 25°C sıcaklıkta hareket edemezken, 37°C sıcaklıkta üreme yeteneği göstermiştir.

*Staphylococcus aureus'*un tüm izolatları, oksidaz testi için negatif bir sonuç gösterirken katalaz testi için pozitif sonuç göstermiştir. Ayrıca plazma koagülaz testinde tüm izolatlar için sonuç pozitiftir. Sonuçlar ayrıca tüm izolatların ortamın rengini pembeden sarıya değiştirerek mentol şekerini fermente edebildiğini göstermiştir.

Staphylococcus epidermidis, Gram pozitif, oksidaz testi için negatif, katalaz ve hemolitik olmayan üreaz testi için pozitif sonuçlar vermiştir. Koagülaz testi için negatif olarak karakterize edilen tek veya çift kok veya zincirler halinde ortaya çıkmıştır.

Sonuçlar, *Staphylococcus sciuri'*nin tüm izolatlarının katalaz testi için pozitif ve oksidaz A ve plazma koagülaz enzimi için yapılan test için negatif olduğunu göstermiştir. Bu durum, Kwok and Chow (2003) tarafından belirlenen sonuçlar ile uyumludur. Sonuçlar ayrıca bakterilerin üreaz enzimini üretemediklerini, katalaz testi için pozitif olma eğiliminde olduklarını göstermiştir. Buna ek olarak, hemolitik bir ortamda büyütüldüğünde hemoliz yeteneği açısından değişken olma eğiliminin olduğu tespit edilmiştir.

S. aureus tipindeki büyük koloniler, %7-10 arasında değişen sofra tuzu konsantrasyonlarında büyüme göstermişlerdir. Özellikle manitol tuzlu agar üzerinde büyümüşlerdir. Buna bağlı olarak *S. aureus* suşları için manitol tuzlu agar seçici besiyeri olarak tanımlanmıştır. *Staphylococcus* grubunun diğer türleri katalaz tahlili için olumlu bir sonuç göstermiştir. Ayrıca, manitol şekerini fermente edici olması ve ortamın rengini kırmızıdan sarıya çeviren asit üretmesi ve oksidaz enzimini üretmemesi

ile karakterize edilmiştir. Bunun sonucunda, ortamın renginin koyu kırmızıya çevrilmesi, pozitif test göstergesi olarak değerlendirilmiştir.

Bakteri kolonilerinin şekli ve şekerleri fermente etme yetenekleri bakımından meydana gelen farklılıklar Çizelge 4.1'de gösterilmiştir. Hemoliz yeteneği, 37°C sıcaklıkta üreme, duyarlılık ve antibiyotik Novobiocin'e direnç, tip *S. aureus* koagülaz testi negatif dışında tüm tipler gram pozitif olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.1 Konvansiyonel biyokimyasal testin sonucunun yöntem okuma şeması

Bakteri türü	Numara	37°C	Oksidaz	Katalaz	Üreaz	No	MSA	Pıhtılaştırıcı Tüp
S. aureus	11	+	_	+	+	R	F	+
S. epidermidis	14	+	_	+	+	R	NF	_
S. sciuri	16	+	_	+	+	R	NF	_

MSA: manitol tuzlu agar ortamını; +: pozitif, -:negatif, R: direnç, F: fermentör, NF: fermentör olmayan

4.2.4 Tüp yöntemiyle koagülaz tespiti

Morfolojik özelliklere, biyokimyasal testlere ve koagülaz testi sonuçlarına göre; 41 stafilokok izolattan 11 (%26,8) koagülaz pozitif stafilokok (CoPS) ve 30 (%73,1) koagülaz negatif stafilokok (ConS) izolat olarak tespit edilmiştir. *Staphylococcus aureus* izolatlarının tümü koagülaz pozitif olarak tanımlanmıştır. Biyokimyasal testler ve Vitek 2, sistemi ve CoNS izolatlarını tanımlamamıza yardımcı olmuştur. Buna ek olarak kullanılan *S. sciuri* 16 (%39,2), *S. epidermidis* 14 (%34,14) olmak üzere Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2 Koagülaz negatif ve pozitif bakteriyel izolatlar

NO.	Bakteriyel İzolatlar	Negatif	NO.	Yüzde %	Pozitif	NO.	Yüzde %
		S. epidermidis	14	34,14%	*S. aureus*	11	26,8%
		S. sciuri	16	39,2			
Toplam			30			11	

4.3 Stafilokokların Virülans Faktörlerinin Saptanması

4.3.1 Hemolizin

Toksin üretimleri koagülaz pozitif (*S. aureus*) ve negatif stafilokoklar ile incelenmiştir. Bu toksinler üç tip hemolizin içerir: alfa (α) ve beta (β) gama (y). Hemolizinler kanlı agar üzerinde test edilmiştir. Her bir hemolizin, kanlı agar plakaları üzerinde alfa-hemolizine bağlı olarak kabul edildiğini belirten Haque vd. (2011) tarafından yapılan çalışmanın sınıflandırmasıyla tanımlanmıştır.

Öte yandan, β-hemolizine bağlı olarak, kan agar plakaları üzerindeki kolonileri çevreleyen ve daha sonra koyulaşan alanlar değerlendirilmiştir. Kan agar plakaları üzerinde keskin bir şekilde tanımlanmış kenarlara sahip tüm lizis bölgeleri, δ-hemolizin üretimine işaret etmektedir.

Staphylococci tarafından üretilen hemolizinler, bu bakterilerin patogenezinde rol oynayan virülans faktörlerinden biri olarak kabul edilir. Gözenek oluşturan α-toksin, *S. aureus*'un başlıca virülans faktörü olarak belirlenmiştir. Patogenezdeki rolü çeşitli hayvan modellerinde gösterilmiştir. α-toksin sitolitik, hemolitik, dermonekrotik ve öldürücü aktiviteler göstermiştir. Eritrositler, monositler, lenfositler, makrofajlar, epitel hücreleri, fibroblastlar ve keratinositler dahil olmak üzere birçok hücre tipi, bu toksinin etkisine karşı hassasiyet gödtermiştir (Ohlsen *et al.* 1998). *S. aureus*'un endotel hücrelerinde apoptozu indüklemesi için çoklu virülans faktörlerine ihtiyaç duyulmasına rağmen, bu faktörler arasında alfa-toksin önemli bir rol oynamıştır. Spesifik olarak, α -toksin, konakçı hücrelerin yüzey reseptörleri ile etkileşime girebilmektedir. Bunlar, küçük heptamerik gözenekler oluşturarak iyonları seçici olarak salabilir ve hücre sinyal iletim yollarını tetikleyebilmektedir. Bu durum, böylece çeşitli hücre tiplerinde apoptozu ve/veya ölümü indükleyebilmektedir (Liang *et al.* 2009, Ragle and Bubeck Wardenburg 2009).

Hemolizin biyolojik zarlarda gözenek oluşturabilen enzimlerdir ve gram pozitif ve negatif bakterilerde bulunmaktadır (Focareta 1991). Bakterilerin hemolizin üretme invazyon aktivitesi ve konak bağışıklık sistemine direnme kabiliyetlerinde artış meydana gelmiştir (Al-Deen Fathi 2007). Kırmızı kan hücreleri, demir içeren hemoliz açısından zengindir, bu hücreler çevreye salınarak bakterilerin serbest demiri almasına izin vermektedir (Valvano *et al.* 1986).

Streptococcus spp kolonilerinin etrafındaki hemolitik alanlar, 4 izolat (%36,3) *S. aureus*, 4 izolat (%36,3) *S. epidermidis* ve 1izolat (%6,25) *S. sciuri* olarak tespit edilmiştir. Bunlar hemolitik aktiviteyi yansıtır ve ayrışma (β) tipindedir.

Bu çalışmada merkezi sinir sisteminden alınan 9 izolatta hemolitik aktivite özelliğini gösteren hemolizin üretimi belirlenmiştir. Hemolizin, *S. aureus*, *S. sciuri* ve S. *epidermidis* izolatları tarafından üretilmektedir (Çizelge 4.3) (Nasaj *et al.* 2020). Elde edilen sonuçlar Türkyilmaz ve Kaya (2006) tarafından bulunan sonuçlara göre daha düşüktür.

Çizelge 4.3 Hemolizin üretme yeteneklerine göre dağılan bakteri izolatlarının sayısı

	Bakteriyel İzolatlar	**Hemolizin**	
		β-hemoliz	γ-hemoliz
	S. aureus	4	7
	S. epidermidis	4	10
	S. sciuri	1	15
Toplam		9	32

4.3.2 Biyofilm oluşumu

4.3.2.1 Tüp yöntemi (christensen yöntemi)

Bu yöntem, bakteriler tarafından balçık tabakası üretimini (tüpün iç yüzeyini kaplayan bir film olarak yapışkan lekeli tabaka malzemesinin varlığı) tespit etmek için gerçekleştirilmiştir. *S. aureus, S. sciuri, S. epidermidis* izolatlarından elde edilen biyofilm sonuçları, zayıftan, orta ve kuvvetli arasında değişen değerler almıştır.

Diğer birçok çalışma, şeker varlığının *Staphylococcus spp*'de biyofilm oluşumunun uyarılmasında önemli bir rol oynadığını belirtmiştir. *S. aureus* ve *S. epidermidis*'te glikozun etkisi ile biyofilm oluşumu indüklenmiştir. (Dobinsky *et al.* 2003, Seidl *et al.* 2008). Elde edilen sonuçlar biyofilm oluşturma kabiliyetlerini %29,2 zayıf, %9,75 orta ve %19,51 güçlü katman olarak sınıflandırmıştır. Sonuçlar ayrıca CoNS izolatlarının %18,18'inin olumlu sonuçlar verdiğini bulan Jameel vd. (2018) çalışmasıyla uyumludur. Tüp yöntemi, güçlü biyofilm üreten izolatlar için iyi bir yöntemdir. Ancak, zayıf biyofilm üretenler için ayrım yapmadaki zorluk nedeniyle pek tercih edilmemektedir. Sonuç olarak, biyofilm oluşumunda yüksek değişkenlik gözlemlenmiştir ve Çizelge 4.4'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.4 Biyofilm oluşumlarına göre dağılan bakteri izolatlarının sayısı

NO.	**Bakteriyel İzolatlar**		**Pozitif**		**Negatif**
		Güçlü	Orta	Zayıf	
	S. aureus	6	2	0	3
	S. epidermidis	1	0	6	7
	S. sciuri	1	2	6	7
Toplam		8	4	12	17

4.3.2.2 Kongo kırmızısı agar ile biyofilm oluşumunun tespiti

Toplam 41 izolattan, 31(%75,6) izolat kongo kırmızı agar tarafından biyofilm üretmiştir ve bunlar *S. aureus* 8/11(72,73), *S. epidermidis* 10/14 (%71,43) ve *S. sciuri* 13 (81,25) olarak sınıflandırılmıştır (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5 Kongo kırmızısı agar ile biyofilm oluşumunun sayısı ve yüzdesi

Bakteri	Biyofilm oluşturan (%)	Bioflim oluşturmayan (%)
S. aureus	8 (72,73%)	3 (27,27%)
S. epidermidis	10 (71,43%)	4 (28,57%)
S. sciuri	13 (81,25%)	3 (18,75%)

Růžička vd. (2004), *S. epidermidis*'in 147 izolatından 79'unda (%53,7) TM biyofilm oluşumu ve 64'ünde (%43,5) CRA tespit ettiğini kaydetmiştir. Bu sonuçlara göre TM'nin biyofilm tespiti CRA'dan daha iyi olarak belirlenmiştir (Baqai *et al.* 2008). Üropatojenler arasında biyofilm oluşumunu saptamak için TM'yi test edilmiştir. Elde ettikleri sonuçlara göre izolatların %75'i biyofilm oluşumu sergilemiştir. CRA yöntemi ile 11 tanesinin biyofilm üreten bakteri ve 99 tanesinin de biyofilm üretmeyen bakteri olduğu tespit edilmiştir. CRA yaklaşımının diğer yöntemlerle çok az ilişkisi bulunmuştur ve duyarlılığı (%11), özgüllüğü (%92) ve doğruluğu (%41) olarak tespit edilmiştir. Bu yaklaşım kullanılarak üç izolatın pozitif ve 62 izolatın negatif olduğu bulunmuştur. Knobloch vd. (2002), *S. aureus*'un 128 izolattan CRA'nın biyofilm üretmesini %3,8 TCP'nin biyofilm üretmesini ise %57,1 olarak tespit etmiştir. Biyofilmler, bakterilerin çevrede tercih ettikleri büyüme modelidir ve sucul ekosistemlerdeki araştırmalar, bu biyofilm topluluklarındaki büyümenin avantajlı olduğunu ortaya çıkarmıştır. Biyofilmler, bir alt tabakaya veya arayüze veya birbirine geri dönüşümsüz olarak bağlanan ve ürettikleri hücre dışı polimerik maddelerden (EPS) oluşan bir matrikse ve aynı zamanda büyüme hızı ve gen transkripsiyonu açısından değiştirilmiş bir fenotipe gömülü hücrelerle karakterize edilen mikrobiyal olarak türetilmiş sesil topluluklar olarak bilinmektedir (Donlan and Costerton 2002). Biyofilmler, sağlık hizmetlerinde protez ve implante edilmiş cihaz yüzeylerinde kolayca oluşmaktadır. Biyofilm oluşturan bakterilerin üriner kateterleri, kontakt lensleri, kalça replasmanlarını, mekanik kalp kapakçıklarını ve çeşitli diğer cihazları kolonize ettiği gözlemlenmiştir (Coenye and Nelis 2010). Biyofilmlerin rutin olarak kullanılan antimikrobiyal ilaçlara karşı direnci artırmış olması, cihazla ilişkili birçok hastalığın tedavisini zorlaştırmaktadır (Stickler and Feneley 2010). Balçık ve kapsül, biyokimyasal ve immünolojik özelliklerinde farklılık gösteren iki farklı polisakkarittir. Caputy ve Costerton (1984) tarafından yapılan açıklamaya göre, immünolojik ve antijenik olarak özdeş olan balçık, iki stafilokok suşu tarafından üretilmiştir.

4.3.2.3 Kapsül oluşumu

Çizelge 4.6'da, 94 farklı bakteri türlerinden 19 (%46,34) izolatın kapsül oluşturabildiği gösterilmiştir. Ayrıca bakteri türlerine göre almış oldukları değerler *S. aureus* 5/11 (%45,45) ve *S. epidermidis* 6/14 (%42,85) ve *S. sciuri* 8/16 (%50) olarak sırasıyla verilmiştir.

Çizelge 4.6 Kapsül oluşumunun sayısı ve yüzdesi

Bakteri	Kapsül oluşturan (%)	Kapsül oluşturmayan (%)
S. aureus	5 (45,45%)	6 (54,55%)
S. epidermidis	6 (42,85%)	8 (57,15%)
S. sciuri	8 (50%)	8 (50%)

Kapsül, *Staphylococcus spp*'nin en etkili virülans faktörlerinden biri olarak kabul edilmektedir. *Staphylococcus spp* patojen rolü oynar ve bu patojen konakçıyı immünite sürveyansından (makrofaj ve serum kompleman) korumaktadır (Silver and Vimr 1990). Elde ettiğimiz sonuçlar, *Staphylococcus spp* izolatının %50'sinin kapsül içerdiğini bulan Al-Maliki (2007) ile yakın ilişki içindedir. Bakteri yüzeyini kaplayan fibrilli yapılar oluşturan kapsüler materyal, bir yandan bakterileri fagositozdan korurken, diğer yandan bakterisidal serum faktörleri tarafından bakterilerin öldürülmesini engellemektedir (Vuotto *et al.* 2014).

Kapsül, tüm hücre yüzeyini ve bağlı hücre duvarını kapsayan hücre dışı bir polisakkarittir. Gram pozitif bakterilerin çoğu kapsül üretebilmektedir (Whitfield and Roberts 1999). Kapsüller, bakterinin hayatta kalmasında, bakterilerin fogositozdan korunması sırasında patojenitede önemli roller oynamaktadır (Klemm *et al.* 2004). Bu sonuç, tüm *S. epidermidis* izolatlarının bakteri hücresini çevreleyen polisakkarit kapsülüne de sahip olduğunu bulan Al-Saad (2012) çalışmasında bulunan sonuçlar ile uyumluluk göstermiştir. *S. aureus*, ağır polisakkarit üretimi nedeniyle aljinatı üretebilmektedir. Bu materyal, bakterilerin opsonizasyondan korunmasında önemli bir rol oynamaktadır (Franklin and Ohman 1996). Bu bağlamda elde edilen sonuçlar tüm *S.*

aureus izolatlarının kapsüllenmiş olduğunu bulan Gunaratnam vd. (2011) tarafından elde edilen sonuçlarla benzerdir.

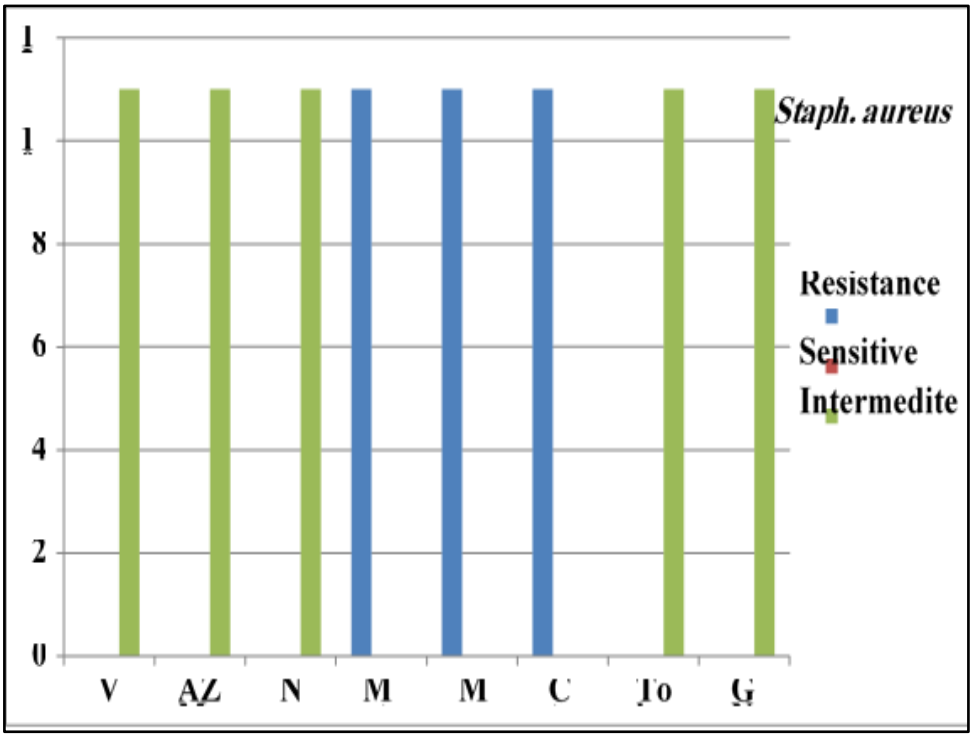
4.3.2.4 Bakteriyel izolatların antibiyotiklere direnci

41 *Staphyloccus spp.* izolatı için yaygın olarak kullanılan 8 antibiyotik ile duyarlılık testi yapılmıştır. Bu yöntemde duyarlılık ve dirençler, antibiyotiklere karşı duyarlılıklarında veya dirençlerinde inhibisyon alanının çapına bağlı olan Tabletler kullanılarak tespit edilmiştir. Ortam üzerinde büyümenin varlığı veya yokluğu gözlemlenerek sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlar Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6 ve Çizelge 4.7'de gösterilmiştir.

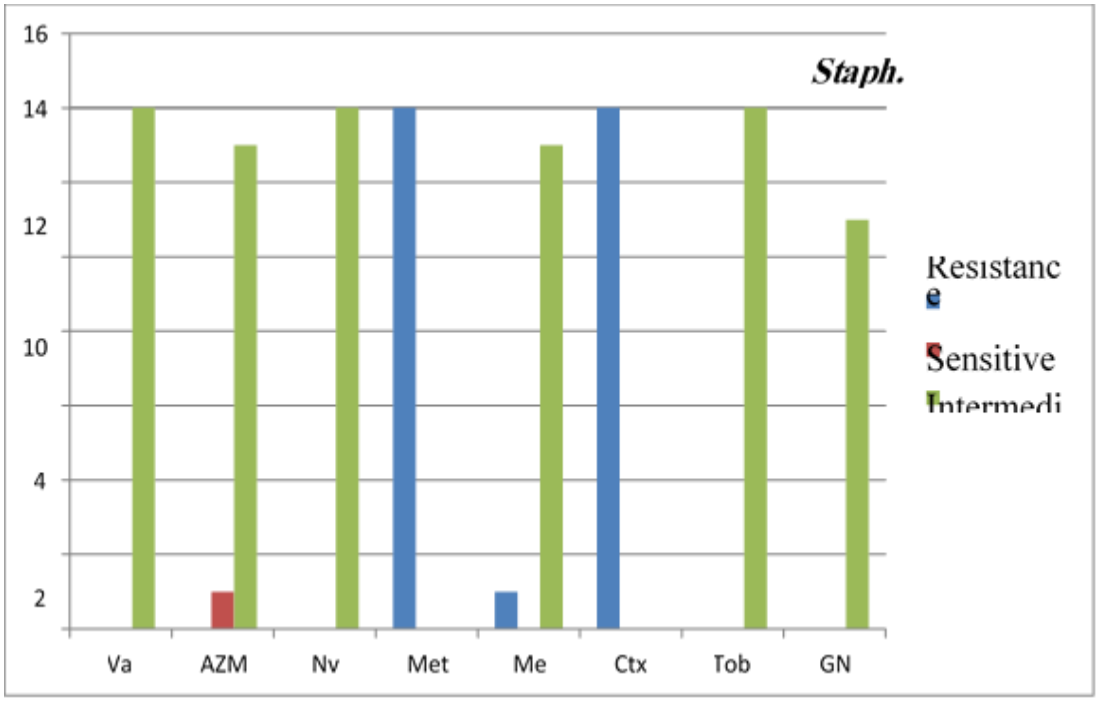
Çizelge 4.7 Yaralardan izole edilen bakterilerin antibiyotiklere direnci

İzolat	Örnek numarası	VA 30	AZM 15	NV 0	MET 30	ME 10	CTX 30	TOB 10	GN 10
	1	I	I	I	R	R	R	I	I
	5	I	I	I	R	R	R	I	I
	8	I	I	I	R	R	R	I	I
S.	11	I	I	I	R	R	R	I	I
aureus	15	I	I	I	R	R	R	I	I
	17	I	I	I	R	R	R	I	I
	22	I	I	I	R	R	R	I	I
	30	I	I	I	R	R	R	I	I
	34	I	I	I	R	R	R	I	I
	42	I	I	I	R	R	R	I	I
	48	I	I	I	R	R	R	I	I
	2	I	I	I	R	I	R	I	I
	4	I	I	I	R	I	R	I	I
	9	I	I	I	R	I	R	I	I
	12	I	S	I	R	I	R	I	I
	16	I	I	I	R	I	R	I	I
	20	I	I	I	R	I	R	I	I
	23	I	I	I	R	I	R	I	I
	28	I	I	I	R	I	R	I	I
	31	I	I	I	R	I	R	I	I
	36	I	I	I	R	I	R	I	I
	40	I	I	I	R	I	R	I	I
	45	I	I	I	R	I	R	I	I

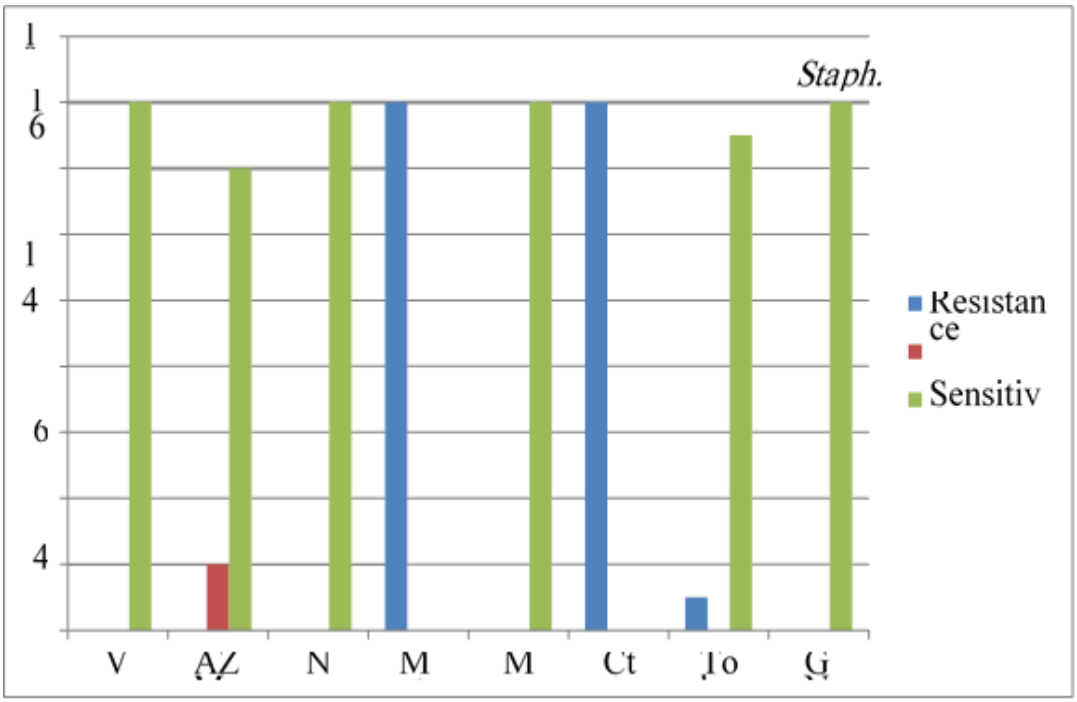
	54	I	I	I	R	I	R	I	I
	60	I	I	I	R	I	R	I	I
	3	I	I	I	R	I	R	I	I
	4	I	I	I	R	I	R	I	I
	6	I	I	I	R	I	R	I	I
S.	13	I	S	I	R	I	R	I	I
	19	I	I	I	R	I	R	I	I
	25	I	I	I	R	I	R	R	I
	29	I	I	I	R	I	R	I	I
	38	I	I	I	R	I	R	I	I
	44	I	I	I	R	I	R	I	I
	51	I	I	I	R	I	R	I	I
	55	I	I	I	R	I	R	I	I
	67	I	I	I	R	I	R	I	I
sciuri	71	I	I	I	R	I	R	I	I
	77	I	I	I	R	I	R	I	I
	81	I	S	I	R	I	R	I	I
	89	I	I	I	R	I	R	I	I



Şekil 4.4 *S. aureus* için antibiyotik duyarlılık testi



Şekil 4.5 *S. epidermidis* için antibiyotik duyarlılık testi



Şekil 4.6 *S. sciuri* için antibiyotik duyarlılık testi

Çizelgelerdeki sonuçlar, *Staphylococcus aureus* bakterilerinin tüm (11) izolatları için antijenlere (MET, ME, CTX) karşı yüksek oranda dirençli (R) olduğunu

göstermektedir. Diğer taraftan 1 izolat (VA, AZM, NV, TOB, GN) antijenlerine karşı direnç göstermemiştir. *S. epidermidis*'in (14) izolatında (MET, ME, CTX) antijenlerine karşı her biri %100 olan direnç (R) belirlenmiştir. Bir izolat, anti-azitromisine duyarlılık göstermiştir ve diğer izolatlar da (VA, AZM, NV, TOB, GN) antijenlerine direnç (I) göstermemektedir.

S. sciuri izolatlarından 16 izolat antibiyotiklere (MET, ME, CTX) karşı %100 direnç (R) gösterirken, bir izolat antibiyotik Tobramisine %6,25 direnç göstermiştir. Aynı zamanda iki izolat *S. sciuri*'nin, Azitromisin antikoruna duyarlı olduğunu ve izolatların geri kalanının (VA, AZM, NV, TOB, GN) antijenlerine krşı dirençli (I) olmadığını göstermiştir. Yürütülen bazı çalışmaların sonuçları ile mevcut çalışmaların sonuçları karşılaştırıldığında, direnç oranları ile uyum veya uyumsuzlukların olduğu tespit edilmiştir. Deyno vd. (2017)'nin *Staphylococcus aureus* bakterileri üzerinde yaptığı çalışmada, Metisilin antikoruna direnç oranı (%71,5) olarak belirlenmiştir.

Kim vd. (2004), *Staphylococcus aureus* bakterisinin anti-sefotaksime direnç oranının (%99,5) olduğu belirtmiştir. Bu sonuç direnç açısından çalışmamızda elde edilen sonuçlar ile örtüşmektedir. Ayrıca idrar enfeksiyonlarından izole edilen *Staphylococcus aureus* bakterilerinin anti-Metronidazole karşı %50 direnç gösterdiği tespit edilmiştir bu sonuç bizim çalışmamızın sonuçları ile örtüşmemektedir.

Staphylococcus epidermidis bakteri türü hakkında, anti-Sefotaksim'e karşı %88,2 direnç oranı kaydedilmiştir. *S. epidermidis* ayrıca yüksek (%100) derecede Metronidazol'e direnç göstermektedir. *S. sciuri* türünde Metronidazol, Sefotaksim antibiyotiklerine karşı direnç oranını %50'dir. Bu sonuçlar mevcut çalışmanın sonuçlarıyla uyuşmamaktadır. β-laktam antibiyotiklere direnç insidansı Amoksisilin (%36,5), Sefotaksim (%100) ve Seftazidimde (%100) olarak tespit edilmiştir. Bu direnç, CNS'nin beta-laktamaz enzimini üretme yeteneğinden kaynaklanmaktadır (Archer and Scott 1991).

Antibiyotik direnci, dünya çapında bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde önemli bir klinik problemdir. Çalışmamızdaki tüm izolatlar, seçilmiş antimikrobiyal ajanlara karşı

antibiyotik dirençleri açısından taranmıştır. Bir izolat, üç veya daha fazla antibiyotik sınıfına karşı dirençli ise, çoklu ilaca dirençli (MDR) olarak kabul edilmiştir (Jassim *et al.* 2018).

Yanlış antibiyotik kullanımı izolatların antibiyotiğe karşı direnç geliştirmesinden sorumludur. Bu nedenle, mevcut antimikrobiyallerin yanlış kullanımını azaltmak için antimikrobiyallerin rasyonel kullanımının vurgulanmasına ihtiyaç vardır. Bunlara ek olarak, direnç modellerinin akıllıca izlenmesi için düzenli antimikrobiyal duyarlılık gözlemi gerekmektedir. Antibiyotiklerin etkinliğini korumak ve daha iyi hasta yönetimi için etkili bir ulusal antibiyotik stratejisi belirlenmeli ve taslak eylem planı uygulamaya konmalıdır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmadan elde ettiğimiz verileri değerlendirdiğimizde, toplumda taşıyıcılar ve hastalar arasında Metisiline dirençli Stafilokokların (hem CoPS hem de CoNS izolatları) yüksek prevalansı ile artan dağılımının olduğu ve direnç oranının %100 olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda Metisiline dirençli Stafilokoklar (hem CoPS hem de CoNS izolatları) çoklu ilaca karşı direnç modeli göstermiştir. MR-CnNS izolatları, MR-CoPS izolatlarına göre antimikrobiyal ajanlara karşı oldukça dirençli olarak tespit edilmiştir. Bu Stafilokoklar, birçok virülans faktörü (enzimler ve toksinler) üretme yeteneğine sahiptir ve MRSA izolatları, MR-CoNS izolatlarından daha fazla virülans faktörü üretmiştir. *Streptococcus spp* kolonilerinin etrafındaki hemolitik alan, %36,3 *S. aureus,* %36,3 *S. epidermidis* ve %6,25 *S. sciuri* olarak belirlenmiştir. Bu durum hemolitik aktiviteyi ve ayrıştırmanın (β) tipinde olduğunu belirtmektedir. Hem MRSA hem de MR-CoNS izolatları farklı üretim miktarlarında balçık tabakası oluşturma yeteneğine sahiptir ve bu iki izolat grubu yüksek ve güçlü biyofilm oluşumu göstermiştir.

Tüm bu sonuçların yorumlanması ile *Staphylococcus spp*'nin lokal izolatlarında mecA geninin saptanması için PCR gibi moleküler yöntemlerin kullanılması ve bu genin diğer antibiyotiklere karşı çoklu ilaç direncini veya enzimler ve toksinler gibi bazı virülans faktörlerinin üretimini yöneten diğer genlerle veya mecA geninin icaADBC operonu ile korelasyonunun araştırlması önerilmektedir. Aynı zamanda Metisiline dirençli *Staphylococcus* spp ile diğer antimikrobiyal ajanların, kimyasal maddelerin, bitki özlerinin, antiseptiklerin veya diğer bakteri türlerinin bazı ürünlerinin biyofilm oluşumu üzerindeki etkilerininde ele alınması önemli bir konu olarak karşımıza çıkmaktadır. Biyofilm üretiminde metisiline duyarlı ve dirençli stafilokok izolatlarının kıyaslanması ile Metisilin dirençli *Staphylococcus spp'*de biyofilm oluşum mekanizmasının moleküler yöntemler kullanılarak belirlenmesi ve Özellikle ica'dan bağımsız biyofilm ve diğer bakteri türlerinde bu mekanizmanın oluşumunun belirlenmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

Abdeen, E. E., Mousa, W. S., Abdelsalam, S. Y., Heikal, H. S., Shawish, R. R., Nooruzzaman, M. and Abdeen, A. 2021. Prevalence and characterization of coagulase positive staphylococci from food products and human specimens in Egypt. Antibiotics, 10: 75-82.

Al Wohoush, I., Rivera, J., Cairo, J., Hachem, R. and Raad, I. 2011. Comparing clinical and microbiological methods for the diagnosis of true bacteraemia among patients with multiple blood cultures positive for coagulase-negative staphylococci. Clinical Microbiology and Infection, 17: 569-571.

Alekshun, M. N., Kim, Y. S. and Levy, S. B. 2000. Mutational analysis of MarR, the negative regulator of marRAB expression in Escherichia coli, suggests the presence of two regions required for DNA binding. Molecular Microbiology, 35: 1394-1404.

AL-Kazaz, E. J., Melconian, A. K. and Kandela, N. J. 2014. Extraction of staphyloxanthin from staphylococcus aureus ısolated from clinical sources to determine its antibacterial activity against other bacteria. Iraqi Journal of Science, 55: 1823-1832.

Al-Saad, N. F. 2012. Study of biofilm formation and the effects of some topical antimicrobial agents on bacteria ısolated from burn wound ınfections. M.Sc. Thesis. Babylon University. 115 pages, Babylon.

Alvarez-Ortega, C., Olivares, J. and Martínez, J. L. 2013. RND multidrug efflux pumps. Frontiers in Microbiology, 4: 7-15.

Archer, G. L. and Scott, J. 1991. Conjugative transfer genes in staphylococcal isolates from the United States. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 35: 2500-2504.

Archer, N. K., Mazaitis, M. J., Costerton, J. W., Leid, J. G., Powers, M. E. and Shirtliff, M. E. 2011. Staphylococcus aureus biofilms. Virulence, 2: 445-459.

Argudín, M. Á., Mendoza, M. C. and Rodicio, M. R. 2010. Food poisoning and Staphylococcus aureus enterotoxins. Toxins, 2: 1751-1773.

Arvidson, S. and Tegmark, K. 2001. Regulation of virulence determinants in Staphylococcus aureus. International Journal of Medical Microbiology, 291: 159-170.

Azih, A. and Enabulele, I. 2013. Species distribution and virulence factors of coagulase negative Staphylococci isolated from clinical samples from the university of Benin teaching hospital, edo state, Nigeria. J. Nat. Sci. Res., 3: 38-43.

Baba-Moussa, L., Anani, L., Scheftel, J. M., Couturier, M., Riegel, P., Haikou, N. and Prevost, G. 2008. Virulence factors produced by strains of staphylococcus aureus isolated from urinary tract infections. Journal of Hospital Infection, 68: 32-38.

Balaban, N., Cirioni, O., Giacometti, A., Ghiselli, R., Braunstein, J. B., Silvestri, C. and Scalise, G. 2007. Treatment of staphylococcus aureus biofilm infection by the quorum-sensing inhibitor RIP. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 51: 2226-2229.

Baqai, R., Aziz, M. and Rasool, G. 2008. Urinary tract infections in diabetic patients and biofilm formation of uropathogens. Infect. Dis. J. Pak., 17: 21-24.

Becker, K., Both, A., Weißelberg, S., Heilmann, C. and Rohde, H. 2020. Emergence of coagulase-negative staphylococci. Expert Review of Anti-Infective Therapy, 18: 349-366.

Belley, A., Neesham-Grenon, E., McKay, G., Arhin, F. F., Harris, R., Beveridge, T. and Moeck, G. 2009. Oritavancin kills stationary-phase and biofilm Staphylococcus aureus cells in vitro. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 53: 918-925.

Berube, B. J. and Wardenburg, J. B. 2013. Staphylococcus aureus α-toxin. Toxins, 5: 1140-1166.

Blazanovic, K., Zhao, H., Choi, Y., Li, W., Salvat, R. S., Osipovitch, D. C. and Griswold, K. E. 2015. Structure-based redesign of lysostaphin yields potent antistaphylococcal enzymes that evade immune cell surveillance. Molecular Therapy-Methods & Clinical Development, 2: 15021-8.

Botelho, A. M., Costa, M. O., Beltrame, C. O., Ferreira, F. A., Côrtes, M. F., Bandeira, P. T. and Figueiredo, A. M. 2016. Complete genome sequence of an agr-dysfunctional variant of the ST239 lineage of the methicillin-resistant Staphylococcus aureus strain GV69 from Brazil. Standards in Genomic Sciences, 11: 1-7.

Boutoille, D., Corvec, S., Caroff, N., Giraudeau, C., Espaze, E., Caillon, J. and Reynaud, A. 2004. Detection of an IS21 insertion sequence in the mexR gene of

pseudomonas aeruginosa increasing β-lactam resistance. FEMS Microbiology Letters, 230: 143-146.

Bowden, M. G., Chen, W., Singvall, J., Xu, Y., Peacock, S. J., Valtulina, V. and Höök, M. 2005. Identification and preliminary characterization of cell-wall-anchored proteins of staphylococcus epidermidis. Microbiology, 151: 1453-1464.

Brooks, G. F., Butel, J. S., Morse, S. A. and Jawetz, M. 2007. Adelberg's medical microbiology. Sultan Qaboos Univ. Med. J., 7: 273-9.

Brown, M. H. and Skurray, R. A. 2001. Staphylococcal multidrug efflux protein QacA. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 32: 163-170.

Burnside, K., Lembo, A., de Los Reyes, M., Iliuk, A., BinhTran, N. T., Connelly, J. E. and Rajagopal, L. 2010. Regulation of hemolysin expression and virulence of Staphylococcus aureus by a serine/ threonine kinase and phosphatase. PloS One, 5: e11071.

Butaye, P., Cloeckaert, A. and Schwarz, S. 2003. Mobile genes coding for efflux-mediated antimicrobial resistance in gram-positive and gram-negative bacteria. International Journal of Antimicrobial Agents, 22: 205-210.

Caputy, G. G. and Costerton, J. W. 1984. Immunological examination of the glycocalyces of Staphylococcus aureus strains Wiley and Smith. Current Microbiology, 11: 297-302.

Cheung, G. Y., Bae, J. S. and Otto, M. 2021. Pathogenicity and virulence of Staphylococcus aureus. Virulence, 12: 547-569.

Choi, J. H., Seo, H. S., Lim, S. Y. and Park, K. 2014. Cutaneous immune defenses against Staphylococcus aureus infections. Journal of Lifestyle Medicine, 4: 39-46.

Ciulla, M., Di Stefano, A., Marinelli, L., Cacciatore, I. and Di Biase, G. 2018. RNAIII inhibiting peptide (RIP) and derivatives as potential tools for the treatment of S. aureus biofilm infections. Current Topics in Medicinal Chemistry, 18: 2068-2079.

Coenye, T. and Nelis, H. J. 2010. In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. Journal of Microbiological Methods, 83: 89-105.

Collee, J. G., Miles, R. S. and Watt, B. 1996. Tests for identification of bacteria. Mackie and McCartney Practical Medical Microbiology, 14: 131-49.

Cosgriff, C. J., White, C. R., Teoh, W. P., Grayczyk, J. P. and Alonzo, F. 2019. Control of staphylococcus aureus quorum sensing by a membrane-embedded peptidase. Infection and Immunity, 87: e00019-19.

Cotter, J. J., O'Gara, J. P., Mack, D. and Casey, E. 2009. Oxygen-mediated regulation of biofilm development is controlled by the alternative sigma factor σB in Staphylococcus epidermidis. Applied and Environmental Microbiology, 75: 261-264.

Cue, D. R., Lei, M. G. and Lee, C. 2012. Genetic regulation of the intercellular adhesion locus in staphylococci. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2: 38-45.

Curtin, J. J. and Donlan, R. M. 2006. Using bacteriophages to reduce formation of catheter-associated biofilms by Staphylococcus epidermidis. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 50: 1268-1275.

Curtin, J., Cormican, M., Fleming, G., Keelehan, J. and Colleran, E. 2003. Linezolid compared with eperezolid, vancomycin, and gentamicin in an in vitro model of antimicrobial lock therapy for Staphylococcus epidermidis central venous catheter-related biofilm infections. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 47: 3145-3148.

Dassa, E. and Bouige, P. 2001. A phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. Research in Microbiology, 152: 211-229.

De Paulis, A. N., Predari, S. C., Chazarreta, C. D. and Santoianni, J. E. 2003. Five-test simple scheme for species-level identification of clinically significant coagulase-negative staphylococci. Journal of Clinical Microbiology, 41: 1219-1224.

Del Pozo, J. L., Rouse, M. S., Mandrekar, J. N., Sampedro, M. F., Steckelberg, J. M. and Patel, R. 2009. Effect of electrical current on the activities of antimicrobial agents against pseudomonas aeruginosa, staphylococcus aureus, and staphylococcus epidermidis biofilms. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 53: 35-40.

Deyno, S., Fekadu, S. and Astatkie, A. 2017. Resistance of Staphylococcus aureus to antimicrobial agents in Ethiopia. Antimicrobial Resistance & Infection Control, 6: 1-15.

Dobinsky, S., Kiel, K., Rohde, H., Bartscht, K., Knobloch, J. K. M., Horstkotte, M. A. and Mack, D. 2003. Glucose-related dissociation between icaADBC transcription

and biofilm expression by Staphylococcus epidermidis. Journal of Bacteriology, 185: 2879-2886.

Dobrynina, O. Y., Bolshakova, T. N., Umyarov, A. M., Boksha, I. S., Lavrova, N. V., Grishin, A. V. and Karyagina, A. S. 2015. Disruption of bacterial biofilms using recombinant dispersin B. Microbiology, 84: 498-501.

Donelli, G., Francolini, I., Romoli, D., Guaglianone, E., Piozzi, A., Ragunath, C. and Kaplan, J. B. 2007. Synergistic activity of dispersin B and cefamandole nafate in inhibition of staphylococcal biofilm growth on polyurethanes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 51: 2733-2740.

Donlan, R. M. and Costerton, J. W. 2002. Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clinical Microbiology Reviews, 15: 167-193.

Dotto, C., Serrat, A. L., Ledesma, M., Vay, C., Ehling-Schulz, M., Sordelli, D. O. and Buzzola, F. 2021. Salicylic acid stabilizes Staphylococcus aureus biofilm by impairing the agr quorum-sensing system. Scientific Reports, 11: 1-14.

Feng, J., Liu, B., Xu, J., Wang, Q., Huang, L., Ou, W. and Zhou, Y. 2018. In vitro effects of N-acetylcysteine alone and combined with tigecycline on planktonic cells and biofilms of Acinetobacter baumannii. Journal of Thoracic Disease, 10: 212-9.

Flemming, H. C. and Wingender, J. 2010. The biofilm matrix. Nature Reviews Microbiology, 8: 623-633.

Focareta, T. 1991. Pore formation bacterial protein hemolysin (cytolysin). Rev. Microbiol., 18: 115-158.

Foster, T. J., Geoghegan, J. A., Ganesh, V. K. and Höök, M. 2014. Adhesion, invasion and evasion. Nature Reviews Microbiology, 12: 49-62.

França, A., Gaio, V., Lopes, N. and Melo, L. D. 2021. Virulence factors in coagulase-negative Staphylococci. Pathogens, 10: 170-8.

Franklin, M. J. and Ohman, D. E. 1996. Identification of algI and algJ in the Pseudomonas aeruginosa alginate biosynthetic gene cluster which are required for alginate O acetylation. Journal of Bacteriology, 178: 2186-2195.

Freeman, D. J., Falkiner, F. R. and Keane, C. T. 1989. New method for detecting slime production by coagulase-negative staphylococci. Journal of Clinical Pathology, 42: 872-874.

Garvey, M. I., Baylay, A. J., Wong, R. L. and Piddock, L. J. 2011. Overexpression of patA and patB, which encode ABC transporters, is associated with fluoroquinolone resistance in clinical isolates of Streptococcus pneumoniae. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 55: 190-196.

Gautam, V., Sethuraman, N., Kaur, R., Sachdev, S., Marwaha, N. and Ray, P. 2017. Changing epidemiology of coagulase-negative staphylococci in normal flora of skin. Indian Journal of Medical Microbiology, 35: 277-278.

Geary, C. O. and Stevens, M. I. 1986. Rapid lysostaphin test to differentiate Staphylococcus and Micrococcus species. Journal of Clinical Microbiology, 23: 1044-1045.

Gemmell, C. G. and Roberts, E. 1974. Toxins and enzymes of coagulase-negative staphylococci isolated from human infections. Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology, 18: 276-80.

Gnanamani, A., Hariharan, P. and Paul-Satyaseela, M. 2017. Staphylococcus aureus. Frontiers in Staphylococcus Aureus, 4: 28-35.

Gruner, B. M., Han, S. R., Meyer, H. G., Wulf, U., Bhakdi, S. and Siegel, E. K. 2007. Characterization of a catalase-negative methicillin-resistant Staphylococcus aureus strain. Journal of Clinical Microbiology, 45: 2684-2685.

Gunaratnam, C., Robertson, L., So, C. and Tong, M. 2011. Physical disruption and antibiotic treatment of Pseudomonas aeruginosa with gentamicin and ciprofloxacin biofilms has no effect on the proportion of rough small colony variants. Journal of Experimental Microbiology and Immunology, 15: 64-70.

Guo, Y., Song, G., Sun, M., Wang, J. and Wang, Y. 2020. Prevalence and therapies of antibiotic-resistance in Staphylococcus aureus. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 10: 107-115.

Haque, N., Bari, M. S., Khan, R. A., Haque, S., Kabir, M. R. and Yasmin, T. 2011. Methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis. Mymensingh Medical Journal, 20: 326-331.

He, G. X., Kuroda, T., Mima, T., Morita, Y., Mizushima, T. and Tsuchiya, T. 2004. An H+-coupled multidrug efflux pump, PmpM, a member of the MATE family of transporters, from Pseudomonas aeruginosa. Journal of Bacteriology, 186: 262-265.

Higgins, C. F. 2001. ABC transporters. Research in Microbiology, 152: 205-210.

Holtfreter, S., Grumann, D., Schmudde, M., Nguyen, H. T. T., Eichler, P., Strommenger, B. and Broker, B. M. 2007. Clonal distribution of superantigen genes in clinical Staphylococcus aureus isolates. Journal of Clinical Microbiology, 45: 2669-2680.

Houston, P., Rowe, S. E., Pozzi, C., Waters, E. M. and O'Gara, J. P. 2011. Essential role for the major autolysin in the fibronectin-binding protein-mediated Staphylococcus aureus biofilm phenotype. Infection and Immunity, 79: 1153-1165.

Jabra-Rizk, M. A., Meiller, T. F., James, C. E. and Shirtliff, M. E. 2006. Effect of farnesol on Staphylococcus aureus biofilm formation and antimicrobial susceptibility. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 50: 1463-1469.

JÄger, S., Jonas, B., Pfanzelt, D., Horstkotte, M. A., Rohde, H., Mack, D. and Knobloch, J. K. M. 2009. Regulation of biofilm formation by σB is a common mechanism in Staphylococcus epidermidis and is not mediated by transcriptional regulation of sarA. The International Journal of Artificial Organs, 32: 584-591.

Jameel, Z. J., Nayef, S. H. and Al-Mahdawi, M. A. 2018. Study some virulence factors of CO-agulase positive Staphylococci and CO-agulase negative Staphylococci ısolated from different parts of human body. Tikrit Journal of Pure Science, 20: 47-54.

Jaśkiewicz, M., Janczura, A., Nowicka, J. and Kamysz, W. 2019. Methods used for the eradication of staphylococcal biofilms. Antibiotics, 8: 174-185.

Jassim, Z. M. and Ali, Z. M. 2018. Molecular study of antibiotic resistance gene in pseudomonas aerugınosa from different source. Plant Archives, 18: 2617-2623.

Joo, H. S. and Otto, M. 2012. Molecular basis of in vivo biofilm formation by bacterial pathogens. Chemistry and Biology, 19: 1503-1513.

Kaatz, G. W., McAleese, F. and Seo, S. M. 2005. Multidrug resistance in Staphylococcus aureus due to overexpression of a novel multidrug and toxin extrusion (MATE) transport protein. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 49: 1857-1864.

Kérouanton, A., Hennekinne, J. A., Letertre, C., Petit, L., Chesneau, O., Brisabois, A. and De Buyser, M. L. 2007. Characterization of Staphylococcus aureus strains

associated with food poisoning outbreaks in France. International Journal of Food Microbiology, 115: 369-375.

Kesmen, Z., Yarimcam, B., Aslan, H., Ozbekar, E. and Yetim, H. 2014. Application of different molecular techniques for characterization of catalase-positive cocci isolated from Sucuk. Journal of Food Science, 79: 222-229.

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

Kim, H. B., Jang, H. C., Nam, H. J., Lee, Y. S., Kim, B. S., Park, W. B. and Choe, K. W. 2004. In vitro activities of 28 antimicrobial agents against Staphylococcus aureus isolates from tertiary-care hospitals in Korea: a nationwide survey. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 48: 1124-1127.

Klemm, P., Hjerrild, L., Gjermansen, M. and Schembri, M. A. 2004. Structure-function analysis of the self-recognizing antigen 43 autotransporter protein from Escherichia coli. Molecular Microbiology, 51: 283-296.

Knobloch, J. K. M., Horstkotte, M. A., Rohde, H. and Mack, D. 2002. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in Staphylococcus aureus. Medical Microbiology and Immunology, 191: 101-106.

Kokai-Kun, J. F., Chanturiya, T. and Mond, J. J. 2009. Lysostaphin eradicates established Staphylococcus aureus biofilms in jugular vein catheterized mice. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 64: 94-100.

Kong, C., Neoh, H. M. and Nathan, S. 2016. Targeting Staphylococcus aureus toxins. Toxins, 8: 72-81.

Kozitskaya, S., Cho, S. H., Dietrich, K., Marre, R., Naber, K. and Ziebuhr, W. 2004. The bacterial insertion sequence element IS 256 occurs preferentially in nosocomial Staphylococcus epidermidis isolates: association with biofilm formation and resistance to aminoglycosides. Infection and Immunity, 72: 1210-1215.

Kwok, A. Y. and Chow, A. W. 2003. Phylogenetic study of Staphylococcus and Micrococcus species based on partial hsp60 gene sequences. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53: 87-92.

Lamers, R. P., Muthukrishnan, G., Castoe, T. A., Tafur, S., Cole, A. M. and Parkinson, C. L. 2012. Phylogenetic relationships among Staphylococcus species and refinement of cluster groups based on multilocus data. BMC Evolutionary Biology, 12: 1-15.

Larkin, E. A., Carman, R. J., Krakauer, T. and Stiles, B. G. 2009. Staphylococcus aureus. Current Medicinal Chemistry, 16: 4003-4019.

Liang, X., Yan, M. and Ji, Y. 2009. The H35A mutated alpha-toxin interferes with cytotoxicity of staphylococcal alpha-toxin. Infection and Immunity, 77: 977-983.

Lim, Y., Jana, M., Luong, T. T. and Lee, C. Y. 2004. Control of glucose-and NaCl-induced biofilm formation by rbf in Staphylococcus aureus. Journal of Bacteriology, 186: 722-729.

Luna, V. A., Coates, P., Eady, E. A., Cove, J. H., Nguyen, T. T. and Roberts, M. C. 1999. A variety of gram-positive bacteria carry mobile mef genes. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 44: 19-25.

Marconi, C., Cunha, M. L. R. S., Araújo Jr, J. P. and Rugolo, L. M. 2005. Standardization of the PCR technique for the detection of delta toxin in Staphylococcus spp. Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases, 11: 117-128.

Marrer, E., Schad, K., Satoh, A. T., Page, M. G., Johnson, M. M. and Piddock, L. J. 2006. Involvement of the putative ATP-dependent efflux proteins PatA and PatB in fluoroquinolone resistance of a multidrug-resistant mutant of Streptococcus pneumoniae. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 50: 685-693.

Mathur, T., Singhal, S., Khan, S., Upadhyay, D. J., Fatma, T. and Rattan, A. 2006. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci. Indian Journal of Medical Microbiology, 24: 25-29.

McGuinness, W. A., Malachowa, N. and DeLeo, F. R. 2017. Vancomycin resistance in Staphylococcus aureus. The Yale Journal of Biology and Medicine, 90: 269-75.

Mempel, M., Günther, B., Müller, E. and Grüter, L. 1996. Detection and measurement of Staphylococcus epidermidis slime using an ELISA technique. Microbiology and Immunology, 40: 115-119.

Moraveji, Z., Tabatabaei, M., Aski, H. S. and Khoshbakht, R. 2014. Characterization of hemolysins of Staphylococcus strains isolated from human and bovine, southern Iran. Iranian Journal of Veterinary Research, 15: 326-31.

Nanoukon, C., Argemi, X., Sogbo, F., Orekan, J., Keller, D., Affolabi, D. and Prévost, G. 2017. Pathogenic features of clinically significant coagulase-negative staphylococci in hospital and community infections in Benin. International Journal of Medical Microbiology, 307: 75-82.

Nasaj, M., Saeidi, Z., Asghari, B., Roshanaei, G. and Arabestani, M. R. 2020. Identification of hemolysin encoding genes and their association with antimicrobial resistance pattern among clinical isolates of coagulase-negative Staphylococci. BMC Research Notes, 13: 1-6.

Noshak, M. A., Rezaee, M. A., Hasani, A. and Mirzaii, M. 2020. The role of the coagulase-negative staphylococci (CoNS) in infective endocarditis. Current Pharmaceutical Biotechnology, 21: 1140-1153.

Ohlsen, K., Ziebuhr, W., Koller, K. P., Hell, W., Wichelhaus, T. A. and Hacker, J. 1998. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on alpha-toxin (hla) gene expression of methicillin-sensitive and methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 42: 2817-2823.

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

O'Neill, E., Pozzi, C., Houston, P., Humphreys, H., Robinson, D. A., Loughman, A. and O'Gara, J. P. 2008. A novel Staphylococcus aureus biofilm phenotype mediated by the fibronectin-binding proteins, FnBPA and FnBPB. Journal of Bacteriology, 190: 3835-3850.

Park, S. C., Park, Y. and Hahm, K. S. 2011. The role of antimicrobial peptides in preventing multidrug-resistant bacterial infections and biofilm formation. International Journal of Molecular Sciences, 12: 5971-5992.

Paulsen, I. T., Brown, M. H. and Skurray, R. A. 1996. Proton-dependent multidrug efflux systems. Microbiological Reviews, 60: 575-608.

Paulsen, I. T., Brown, M. H., Dunstan, S. J. and Skurray, R. A. 1995. Molecular characterization of the staphylococcal multidrug resistance export protein QacC. Journal of Bacteriology, 177: 2827-2833.

Payne, D. E. and Boles, B. R. 2016. Emerging interactions between matrix components during biofilm development. Current Genetics, 62: 137-141.

Peacock, S. 2006. Staphylococcus aureus. Principles and Practice of Clinical Bacteriology, 2: 73-98.

Penesyan, A., Nagy, S. S., Kjelleberg, S., Gillings, M. R. and Paulsen, I. T. 2019. Rapid microevolution of biofilm cells in response to antibiotics. NPJ Biofilms and Microbiomes, 5: 1-14.

Pereira, V., Lopes, C., Castro, A., Silva, J., Gibbs, P. and Teixeira, P. 2009. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of Staphylococcus aureus isolates from various foods in Portugal. Food Microbiology, 26: 278-282.

Pfaller, M. A. and Herwaldt, L. A. 1988. Laboratory, clinical, and epidemiological aspects of coagulase-negative staphylococci. Clinical Microbiology Reviews, 1: 281-299.

Piddock, L. J. 2006. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. Clinical Microbiology Reviews, 19: 382-402.

Poole, K. 2005. Efflux-mediated antimicrobial resistance. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 56: 20-51.

Qiu, J., Niu, X., Dong, J., Wang, D., Wang, J., Li, H. and Deng, X. 2012. Baicalin protects mice from Staphylococcus aureus pneumonia via inhibition of the cytolytic activity of α-hemolysin. The Journal of Infectious Diseases, 206: 292-301.

Ragle, B. E. and Bubeck Wardenburg, J. 2009. Anti-alpha-hemolysin monoclonal antibodies mediate protection against Staphylococcus aureus pneumonia. Infection and Immunity, 77: 2712-2718.

Reid, G. 1999. Biofilms in infectious disease and on medical devices. International Journal of Antimicrobial Agents, 11: 223-226.

Roy, R., Tiwari, M., Donelli, G. and Tiwari, V. 2018. Strategies for combating bacterial biofilms. Virulence, 9: 522-554.

Růžička, F., Holá, V., Votava, M., Tejkalová, R., Horvát, R., Heroldová, M. and Woznicová, V. 2004. Biofilm detection and the clinical significance of Staphylococcus epidermidis isolates. Folia Microbiologica, 49: 596-600.

Sabouni, F., Mahmoudi, S., Bahador, A., Pourakbari, B., Sadeghi, R. H., Ashtiani, M. T. H. and Mamishi, S. 2014. Virulence factors of Staphylococcus aureus isolates in an Iranian referral children's hospital. Osong Public Health and Research Perspectives, 5: 96-100.

Saidijam, M., Benedetti, G., Ren, Q., Xu, Z., Hoyle, C. J., Palmer, S. L. and Henderson, P. J. 2006. Microbial drug efflux proteins of the major facilitator superfamily. Current Drug Targets, 7: 793-811.

Schindler, C. A. and Schuhardt, V. 1964. Lysostaphin: a new bacteriolytic agent for the Staphylococcus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 51: 414-420.

Seidl, K., Goerke, C., Wolz, C., Mack, D., Berger-Bächi, B. and Bischoff, M. 2008. Staphylococcus aureus CcpA affects biofilm formation. Infection and Immunity, 76: 2044-2050.

Shittu, A., Lin, J., Morrison, D. and Kolawole, D. 2004. Isolation and molecular characterization of multiresistant Staphylococcus sciuri and Staphylococcus haemolyticus associated with skin and soft-tissue infections. Journal of Medical Microbiology, 53: 51-55.

Shrestha, L. B., Bhattarai, N. R. and Khanal, B. 2017. Antibiotic resistance and biofilm formation among coagulase-negative staphylococci isolated from clinical samples at a tertiary care hospital of eastern Nepal. Antimicrobial Resistance and Infection Control, 6: 1-7.

Silver, R. P. and Vimr, E. R. 1990. Polysialic acid capsule of Escherichia coli K1. The Bacteria, 11: 39-60.

Sina, H., Ahoyo, T. A., Moussaoui, W., Keller, D., Bankolé, H. S., Barogui, Y. and Baba-Moussa, L. 2013. Variability of antibiotic susceptibility and toxin production of Staphylococcus aureus strains isolated from skin, soft tissue, and bone related infections. BMC Microbiology, 13: 1-9.

Soumya, K. R., Philip, S., Sugathan, S., Mathew, J. and Radhakrishnan, E. K. 2017. Virulence factors associated with coagulase negative Staphylococci isolated from human infections. 3 Biotech, 7: 1-10.

Sousa, V. S., Rabello, R. F., Dias, R. C., Martins, I. S., Santos, L. B., Alves, E. M. and Moreira, B. M. 2013. Time-based distribution of Staphylococcus saprophyticus

pulsed field gel-electrophoresis clusters in community-acquired urinary tract infections. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, 108: 73-76.

Speziale, P., Pietrocola, G., Foster, T. J. and Geoghegan, J. A. 2014. Protein-based biofilm matrices in Staphylococci. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 4: 171-5.

Stickler, D. J. and Feneley, R. C. 2010. The encrustation and blockage of long-term indwelling bladder catheters. Spinal Cord, 48: 784-790.

Szczuka, E., Jabłońska, L. and Kaznowski, A. 2016. Coagulase-negative staphylococci. Journal of Medical Microbiology, 65: 1405-1413.

Tahaei, S. A. S., Stájer, A., Barrak, I., Ostorházi, E., Szabó, D. and Gajdács, M. 2021. Correlation between biofilm-formation and the antibiotic resistant phenotype in staphylococcus aureus isolates. Infection and Drug Resistance, 14: 1155-1161.

Thaker, M., Spanogiannopoulos, P. and Wright, G. D. 2010. The tetracycline resistome. Cellular and Molecular Life Sciences, 67: 419-431.

Tikhonova, E. B. and Zgurskaya, H. I. 2004. AcrA, AcrB, and TolC of Escherichia coli form a stable intermembrane multidrug efflux complex. Journal of Biological Chemistry, 279: 32116-32124.

Tormo, M. Á., Martí, M., Valle, J., Manna, A. C., Cheung, A. L., Lasa, I. and Penadés, J. R. 2005. SarA is an essential positive regulator of Staphylococcus epidermidis biofilm development. Journal of Bacteriology, 187: 2348-2356.

Trentin, D. S., Silva, D. B., Amaral, M. W., Zimmer, K. R., Silva, M. V., Lopes, N. P. and Macedo, A. J. 2013. Tannins possessing bacteriostatic effect impair Pseudomonas aeruginosa adhesion and biofilm formation. PloS One, 8: e66257.

Türkyilmaz, S. and Kaya, O. 2006. Determination of some virulence factors in Staphylococcus spp. isolated from various clinical samples. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 30: 127-132.

Valle, J., Vergara-Irigaray, M., Merino, N., Penadés, J. R. and Lasa, I. 2007. σB regulates IS 256-mediated Staphylococcus aureus biofilm phenotypic variation. Journal of Bacteriology, 189: 2886-2896.

Valvano, M. A., Silver, R. P. and Crosa, J. H. 1986. Occurrence of chromosome-or plasmid-mediated aerobactin iron transport systems and hemolysin production

among clonal groups of human invasive strains of Escherichia coli K1. Infection and Immunity, 52: 192-199.

Vestby, L. K., Grønseth, T., Simm, R. and Nesse, L. L. 2020. Bacterial biofilm and its role in the pathogenesis of disease. Antibiotics, 9: 59-62.

Votava, M., Skalka, B. and Sedivá, J. 1990. Slime production, hemolysis and proteolysis in coagulase-negative staphylococci isolated in hemoculture from humans. Ceskoslovenska Epidemiologie, Mikrobiologie, Imunologie, 39: 288-293.

Vuotto, C., Longo, F., Balice, M. P., Donelli, G. and Varaldo, P. E. 2014. Antibiotic resistance related to biofilm formation in Klebsiella pneumoniae. Pathogens, 3: 743-758.

Webber, M. A., Bailey, A. M., Blair, J. M., Morgan, E., Stevens, M. P., Hinton, J. C. and Piddock, L. J. 2009. The global consequence of disruption of the AcrAB-TolC efflux pump in Salmonella enterica includes reduced expression of SPI-1 and other attributes required to infect the host. Journal of Bacteriology, 191: 4276-4285.

Webber, M. A., Talukder, A. and Piddock, L. J. 2005. Contribution of mutation at amino acid 45 of AcrR to acrB expression and ciprofloxacin resistance in clinical and veterinary Escherichia coli isolates. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 49: 4390-4392.

Whitfield, C. and Roberts, I. S. 1999. Structure, assembly and regulation of expression of capsules in Escherichia coli. Molecular Microbiology, 31: 1307-1319.

Wu, S., Huang, J., Wu, Q., Zhang, J., Zhang, F., Yang, X. and Xue, L. 2018. Staphylococcus aureus isolated from retail meat and meat products in China. Frontiers in Microbiology, 9: 2767-2769.

Xu, Z., Mkrtchyan, H. V. and Cutler, R. R. 2015. Antibiotic resistance and mecA characterization of coagulase-negative staphylococci isolated from three hotels in London, UK. Frontiers in Microbiology, 6: 947-953.

Yeboah-Manu, D., Kpeli, G. S., Ruf, M. T., Asan-Ampah, K., Quenin-Fosu, K., Owusu-Mireku, E. and Pluschke, G. 2013. Secondary bacterial infections of buruli ulcer lesions before and after chemotherapy with streptomycin and rifampicin. PLoS Neglected Tropical Diseases, 7: e2191.

Yerushalmi, H., Lebendiker, M. and Schuldiner, S. 1995. EmrE, an Escherichia coli 12-kDa multidrug transporter, exchanges toxic cations and H+ and is soluble in organic solvents. Journal of Biological Chemistry, 270: 6856-6863.

Yerushalmi, H., Lebendiker, M. and Schuldiner, S. 1996. Negative dominance studies demonstrate the oligomeric structure of EmrE, a multidrug antiporter from Escherichia coli. Journal of Biological Chemistry, 271: 31044-31048.

Yu, W., Kim, H. K., Rauch, S., Schneewind, O. and Missiakas, D. 2017. Pathogenic conversion of coagulase-negative staphylococci. Microbes and Infection, 19, 101-109.

Zhang, Y. Q., Ren, S. X., Li, H. L., Wang, Y. X., Fu, G., Yang, J. and Wen, Y. M. 2003. Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming Staphylococcus epidermidis strain (ATCC 12228). Molecular Microbiology, 49: 1577-1593.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Mustfa Mohsin Hameed AL-KARAWI

Eğitim

Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı	2019-Halen
Lisans	Bağdat Üniversitesi Bilim Koleji Biyoloji Bölümü	2014-2018

T.C.
ANKARA 34. NOTERLİĞİ
Kızılay/ANKARA
Tel: 0312 426 46 40 - 419 59 30
№ 06181

18 Mayıs 2022

IRAK CUMHURİYETİ
YÜKSEK ÖĞRETİM VE BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR BAKANLIĞI
TİKRİT ÜNİVERSİTESİ
SALT BİLİMLER EĞİTİM FAKÜLTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM BÖLÜMÜ

Sayı : 3/7/1955 Tarih: 15.05.2022

İLGİLİ MAKAMA

KONU / ONAYLAMA

Yüksek Lisans Öğrencisi MUSTAFA MOHSIN MOHAMMED Tarafından gelen ve Türkiye Cumhuriyeti Çankırı Üniversitesine yazılı olan talebi tarafınıza havale eder zira adı geçen bu öğrenci, Biyoloji Bölümü Öğretim Üyelerinden (Doç. Dr. Enes Yasin Mahmood) İsimli Danışman Hoca Gözetiminde Biyoloji Bölümü Laboratuvarlarında araştırma çalışmalarını 05.01 / 01.06.2021 Tarihleri arasında tamamlamış olduğunu bildirmek isteriz.

Bize göstermiş olduğunuz işbirliğinden ötürü teşekkür ederiz.

Eki : Talep Yazısı Aslı

Dr. Ahmet Hamid Mehdi
Bilim İşleri ve Yüksek Eğitimden
Sorumlu Dekan Yardımcısı
15.05.2022
(Resmi Mühür ve İmza)

Dağıtım :
- Dekanlık Makamına – Bilgi için
- Dekan Yardımcılığı Ofisine – Bilgi
- Yüksek Eğitim Bölümüne
- Giden Evrak Şubesine

İŞBU ÇEVİRİNİN KİMLİĞİ DAİREMİZDE SAKLI YEMİNLİ TERCÜMANIMIZ ABBAS TÜRMEN TARAFINDAN ARAPÇA DİLİNDEN TÜRKÇE'YE ÇEVRİLMİŞ OLDUĞUNU ONAYLARIM.

ABBAS TÜRKMEN
HAYEL TUR. DAN. İTH.İHR. VE TİC. LTD.ŞTİ.
Meşrutiyet Mah. Meşrutiyet Cad.
No: 12/28 Çankaya - ANKARA
Tel: 0 532 251 55 24 - 0506 146 68 63
Çankaya V.D. 460 105 8130

ANKARA 34. NOTERLİĞİ
İmza Memur