**ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ**
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

# İDRAR YOLU ENFEKSİYONU OLAN HASTALARDAN İZOLE EDİLEN β -LACTAM DİRENÇLİ S*TAPHYLOCOCCUS AUREUS* BAKTERİSİ ÜZERİNE C VİTAMİNİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

**Ghufran Younus Khairullah ALQARAGULI**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ÇANKIRI**
**2022**

**Her hakkı saklıdır**

## TEZ ONAYI

Ghufran Younus Khairullah ALQARAGULI tarafından hazırlanan **"İdrar yolu enfeksiyonu olan hastalardan izole edilen β -Lactam dirençli S*taphylococcus aureus* bakterisi üzerine C vitaminin etkilerinin araştırılması"** adlı tez çalışması 07/06/2022 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** : Doç. Dr. Mehmet SEZGİN

**Eş Danışman** : Dr. Öğr. Üyesi Alaa Yacoob RAHEE

**Jüri Üyeleri** :

**Başkan** : Doç. Dr. Mehmet SEZGİN
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

**Üye** : Doç. Dr. Atilla ÇAKIR
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı
Bingöl Üniversitesi

**Üye** : Dr. Öğr. Üyesi Filiz SARIKAYA PEKACAR
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 "**İdrar yolu enfeksiyonu olan hastalardan izole edilen β -Lactam dirençli S*taphylococcus aureus* bakterisi üzerine C vitaminin etkilerinin araştırılması**" 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 (07/06/2022).

**Ghufran Younus Khairullah ALQARAGULI**

# ÖZET


Yüksek Lisans Tezi

İDRAR YOLU ENFEKSİYONU OLAN HASTALARDAN İZOLE EDİLEN β -LACTAM DİRENÇLİ S*TAPHYLOCOCCUS AUREUS* BAKTERİSİ ÜZERİNE C VİTAMİNİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ghufran Younus Khairullah ALQARAGULI

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mehmet SEZGİN
Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Alaa Yacoob RAHEE

Bu çalışmada, Kasım 2020-Haziran 2021 tarihleri arasında Al-Hussein Araştırma ve Al-Rifai Araştırma Hastanelerinde yatan idrar yolu enfeksiyonu olan 100 hastadan, orta akım idrar örneği Araştırma alın arak bu öreneklerde *Staphlococcus aureus* 'un varlığı araştırılmıştır. Alınan 100 örnekten 20'sinde *Staphlococcus.aureus*'a rastlanmıştır. metisilin, penisilin G, ampisilin, sefaleksin ve oksasilin antibiyotikleri için duyarlılık testleri yapılmıştır. *Staphlococcus aureus* bakteri izolatları çeşitli konsantrasyonlarda (5, 10, 20, 30 µg/mL) hazırlanan C vitamini solüsyonu ile muamele edilmiştir. Bu işlem ile belirlenen antibiyotiklere karşı duyarlılık, tedavi ve direnç mekanizmalarında meydana gelen değişiklikler belirlenmiştir. Ayrıca biyofilm oluşturma miktarı da ölçülerek Tn552 geni moleküler olarak tespit edilmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonu sonuçları ile bakterilerin fenotipik sonuçlaı uyumlu olarak belirlenmiştir. Tn552 geni için Polimeraz zincir reaksiyonu sonuçları tüm izolatlarda C vitamini ile tedavi edilmeden önce ve 5 ve 10 µg/mL C vitamini konsantrasyonları ile tedavi edildikten sonra %100 olarak belirlenmiştir. 20 µg/mL C vitamini konsantrasyonunda ise oran %40 olarak bulunmuştur.



**2022, 59 sayfa**

**ANAHTAR KELİMELER:** Antibiyotik, *Staphylococcus aureus*, C vitamini, PCR

## ABSTRACT

Master of Science Thesis

ISOLATED FROM PATIENTS WITH URINARY TRACT INFECTION INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF VITAMIN C ON β-LACTAM-RESISTANT STAPHYLOCOCCUS AUREUS BACTERIA

Ghufran Younus Khairullah ALQARAGULI

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

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Mehmet SEZGİN
Co-Advisor: Asst. Prof. Dr. Alaa Yacoob RAHE

In this study, midstream urine samples were taken from 100 patients with urinary tract infections hospitalized in Al-Hussein Research and Al-Rifai Research Hospitals between November 2020 and June 2021, and the presence of *Staphlococcus aureus* in these samples was investigated. *Staphlococcus aureus* was found in 20 of 100 samples taken. Susceptibility tests were performed for methicillin, penicillin G, ampicillin, cephalexin and oxacillin antibiotics. *Staphlococcus aureus* bacterial isolates were treated with vitamin C solution prepared at various concentrations (5, 10, 20, 30 µg/mL). Changes in susceptibility, treatment and resistance mechanisms to the antibiotics determined by this procedure were determined. In addition, the amount of biofilm formation was measured and the Tn552 gene was determined molecularly. The results of the polymerase chain reaction and the phenotypic results of the bacteria were determined to be compatible. Polymerase chain reaction results for the Tn552 gene were determined as 100% in all isolates before treatment with vitamin C and after treatment with vitamin C concentrations of 5 and 10 µg/mL. The rate was found to be 40% at 20 µg/mL vitamin C concentration.



**2022, 59 pages**

**Keywords:** Antibiotic, *Staphlocoocus aurus*, Vitamin C, PCR

## ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren sayın hocalarım Doç. Dr. Mehmet SEZGİN ve Dr. Öğr. Üyesi Alaa Yacoob RAHEE'ye ve tezimin gerçekleşmesinde bana yardımcı olan Al-Rifai General Hastanesindeki tüm meslektaşlarıma ve dostlarıma çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında manevi desteğini esirgemeyen her zaman yanımda olan başta annem olmak üzere tüm aileme çok teşekkür ederim. Canım babam şu anda yanımda olamasanda bu başarı senin başarın sana sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunuyorum. Son olarak, bu çalışmanın yazılmasında bana yardımcı olan herkese teşekkür ediyorum

**Ghufran Younus Khairullah ALQARAGULI**

**Çankırı, Haziran 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 Stafilokoklar** ..... **3**
**2.2 *Staphylococcus Aureus*** ..... **3**
**2.3 *S. aureus'un* Patojenite ve Virülans Faktörleri** ..... **4**
**2.4 *Staphylococcus aureus* Yoluyla Biyofilm Oluşumu** ..... **4**
**2.5 β-Laktam Antibiyotikler** ..... **5**
**2.6 Kullanılan Antibiyotikler ve Direnç Mekanizmaları** ..... **7**
**2.7 Doğal ya da Sentetik Antibiyotiklerde Askorbik Asidin Sinerjik Etkisi** ..... **10**
**2.8 Kimyasal Bileşim ve Doğal C Vitamini Kaynakları** ..... **11**
**2.9 C Vitamininin Vücuttaki Bağışıklık Fonksiyonları** ..... **12**
**2.10C Vitamininin Antimikrobiyal Özellikleri** ..... **12**
**2.11Stafilokokal β-laktamaz Transpozonu Tn552** ..... **13**
**3. MATERYAL VE YÖNTEM** ..... **15**
**3.1 Materyal** ..... **15**
**3.2 Metot** ..... **15**
**3.2.1 Besiyeri hazırlama** ..... **15**
**3.2.2 Boyamaların, tamponların, reaktiflerin ve solüsyonların hazırlanması** ..... **17**
**3.2.3 İdrar toplama** ..... **18**
**3.2.4 Bakteriyel izolasyon** ..... **18**
**3.2.5 *Staphylococcus aureus'*un teşhisi** ..... **19**
**3.2.6 Vitek 2 ile tanımlama teşhis** ..... **20**

**3.2.7 Antibiyotik duyarlılık testi** ..... **23**
**3.2.8 Dirençli izolatların C vitamini solüsyonu ile tedavisi** ..... **24**
**3.2.9 Biyofilm oluşumu (kantitatif biyofilm üretim testi)** ..... **24**
**3.2.10 DNA ekstraksiyon protokolü** ..... **25**
**3.2.11 Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) aşamaları** ..... **26**
**3.2.12 Reaksiyonların karışımı** ..... **27**
**3.2.13 Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)** ..... **27**
**3.2.14 Agaroz jel elektroforezi** ..... **27**
**3.2.15 Biyogüvenlik ve tehlikeli maddelerin imha edilmesi** ..... **30**
**3.2.16 İstatistiksel analiz** ..... **30**
**4. BULGULAR VE TARTIŞMA** ..... **31**
**4.1 Mikroskobik İnceleme** ..... **31**
**4.2 Klasik ve biyokimyasal tanımlama** ..... **31**
**4.3 *S. aureus* İzolatlarının Yaş ve Cinsiyete Göre Dağılımı** ..... **33**
**4.4 Antibiyotik Duyarlılık Testi** ..... **34**
**4.5 *S. aureus* Fenotipi Üzerinde Askorbik Asidin Etkisi** ..... **36**
**4.6 *S. Aureus* İzolatlarında Biyofilm Oluşumu** ..... **38**
**4.7 *S. aureus* İzolatları Arasında Tn552 Geninin Moleküler Tespiti** ..... **39**
**5. TARTIŞMA ve SONUÇ** ..... **41**
**KAYNAKLAR** ..... **45**
**EKLER** ..... **57**
**ÖZGEÇMİŞ** ..... **59**

## SİMGELER DİZİNİ

| | |
|---|---|
| ' | Dakika |
| " | Saniye |
| % | Yüzde |
| + | Pozitif |
| < | Daha az |
| > | Daha büyük |
| ° | Derece |
| µg | Mikrogram |
| µL | Mikrolitre |
| BP | Çift bazlı |
| gr | Gram |
| Kb | Kilobaz |
| kg | Kilogram |
| L | Litre |
| mL | Mililitre |
| mm | Milimetre |
| mol | Molarite |
| N | Normal |
| Nm | Nanometre |
| ºC | Santigrat Derece |
| ppm | Milyonda bir |
| B | Beta |

## KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|---|---|
| B.P | Kırılma noktası |
| BHI | Beyin kalp infüzyon suyu |
| CA-MRSA | Toplumla ilişkili metisiline dirençli *S. Aureus* |
| CLSI | Klinik ve laboratuvar stveartları enstitüsü |
| CONS | Koagülaz-negatif stafilokoklar |
| COPS | Koagülaz-pozitif stafilokoklar |
| DNA | Deoksiribonükleik asit |
| FC | Fraksiyon kristalleştirilebilir |
| HA-MRSA | Sağlık hizmetleriyle ilişkili metisiline dirençli *S. Aureus* |
| MDRB | Çoklu ilaca dirençli bakteriler |
| mecA | Metisiline dirençli gen |
| MHA | Muller-hinton agar |
| MRSA | Metisiline dirençli *S. Aureus* |
| MSA | Mannitol tuz agar |
| MSSA | Metisiline duyarlı *S. Aureus* |
| PBPS | Penisilin bağlayıcı proteinler |
| PG | Peptidoglikan |
| PZR | Polimeraz zincirleme reaksiyonu |
| SA | *Staphylococcus aureus* |
| Tn552 | Stafilokokal β-laktamaz transpozonu |
| TSS | Toksik şok sendromu |
| TSST-1 | Toksik şok sendromu toksin-1 |
| UTI | İdrar yolu enfeksiyonu |

# ŞEKİLLER DİZİNİ


Şekil 2.1 β-Laktamlar antibiyotiğin kimyasal yapısı (Lee *et al*. 2016) ..... 7
Şekil 2.2 β-Laktam antibiyotiklerin etki ve direnç mekanizması (Shin 2016) ..... 7
Şekil 3.1 Elde edilen özüt DNA..... 26
Şekil 3.2 Agaroz jel elektroforezi ..... 29
Şekil 4.1 A. Mannitol salt agar üzerinde *S. aureus* kolonileri, B. Kanlı agar üzerinde *S. aureus* kolonileri, C. Kanlı agarda β-hemolitik koloniler, D. Kümeler halinde gram pozitif koklar (100x)..... 32
Şekil 4.2 Katalaz testi ..... 32
Şekil 4.3 Koagülaz testi pozitif ve negatif..... 33
Şekil 4.4 Cinsiyete göre İYE oranı ..... 34
Şekil 4.5 C vitamini 20 µg /mL ile tedavi öncesi ve sonrası antibiyotik duyarlılık testi sonuçları yüzdesi ..... 36
Şekil 4.6 C vitamini ile tedavi edilmeden önceki inhibisyon bölgesi..... 37
Şekil 4.7 Kanlı agar besiyerinde antibakteriyel olarak C vitamini uygulaması..... 37
Şekil 4.8 C vitamini 20 µg /mL ile tedavi edildiğinde inhibisyon bölgesi ..... 38
Şekil 4.9 C vitamini ile muamele edilmeden önce %1 agaroz jel elektroforezinde Tn552 geninin (354bp) PCR ürünü ..... 39
Şekil 4.10 C vitamini ile muamele edildikten sonra %1 agaroz jel elektroforezinde Tn552 geninin (354bp) PCR ürünü ..... 40
Şekil 4.11 C vitamini 10 µg / mL ile muamele edildikten sonra %1 agaroz jel elektroforezinde Tn552 geninin pozitif PCR ürünü ..... 40
Şekil 4.12 C vitamini 20 µg/mL ile muamele edildikten sonra %1 agaroz jel elektroforezinde Tn552 geninin negatif PCR ürünü..... 40

# ÇİZELGELER DİZİNİ


Çizelge 3.1 *S. aureus*'in antibiyotik duyarlılık paternleri.....23
Çizelge 3.2 PZR'de kullanılan ileri ve geri primer özellikleri.....26
Çizelge 3.3 Reaksiyon karışımının içeriği .....27
Çizelge 3.4 PZR döngüsü.....27
Çizelge 4.1 *Staphylococcus aureus*'un biyokimyasal özellikleri .....32
Çizelge 4.2 *S. aureus* izolatlarının cinsiyet ve yaşa göre dağılımı .....33
Çizelge 4.3 Antibiyotik duyarlılık testi sonuçları, R (direnç), I(orta), S (duyarlı) .....34
Çizelge 4.4 C vitamini 20 µg /mL ile tedavi sonrası antibiyotik duyarlılık testi sonuçları. R (direnç), I(orta), S (hassas) .....35
Çizelge 4.5 C vitamini 20 µg /mL ile tedavi öncesi ve sonrası biyofilm sonuçları .....39

# GİRİŞ

*Staphylococcus aureus*, patojen olarak konakçıyı etkilemesi ve hastalığa neden olan virülans faktörlere sahip olması nedeniyle en yaygın görülen patojenik bakterilerden biri olarak bilinmektedir (Alfatemi *et al.* 2014). *S. aureus,* belirli hasta gruplarında veya ürolojik cerrahi işlem uygulanan hastalarda en birincil üriner patojendir (Araki *et al.* 2002).

Antimikrobiyal ilaçların β-laktam sınıfının antibiyotik etkinliğinin iyileştirilmesi, çoklu ilaca dirençli bakteri suşlarının ortaya çıkmasına neden olmuştur. Yıllar içinde çok sayıda penisilin türevi ile yeni bir β-laktam dizisi geliştirilmiş ve test edilmiştir. Klinik olarak faydalı bir β-laktam içeren antibiyotikler: a) bakteri hücre duvarının penisilin bağlayıcı proteinlerini (PBP) asiller; b) bakteri hücre duvarına nüfuz eder ve c) bakteriyel β-laktamazın neden olduğu hidrolize karşı direnci sağlar (Sykes *et al.* 2002).

Enfeksiyonları tedavi ederken, bakteriyel biyofilmleri ortadan kaldırmak için sıklıkla antibiyotik kullanılmaktadır. Ancak antibiyotiklerin uzun süreli kullanımı çoklu ilaca karşı direnci ve mikrofloranın ekolojisinin değişimini meydana getirmektedir (Cegelski *et al.* 2008). Bu sebeple biyofilm oluşumunu etkileyerek antibiyotik tedavilerinin süresini ve dozunu kısaltabilen kemo-profilaktik ajanlara karşı artan bir ilgi oluşmuştur (Xavier *et al.* 2005). Bu ajanlardan en çok tercih edileni C vitaminidir. C vitamini ucuz olması, kolay temin edilmesi ve antimikrobiyal özelliklere sahip olamsı nedeniyle tercih edilmektedir (Isela *et al.* 2013). Ayrıca C vitamini, biyofilm yapısını bozan hücre dışı polimerik maddelerin üretimini engellemektedir (Pandit *et al.* 2017).

Tn552 transpozonu, *Staphylococcus aureus* kaynaklı birkaç beta-laktamazı kodlamaktadır. Aynı zamanda bu transpozon yeni bir dizi transpozisyon fonksiyonuna sahiptir (Sidhu *et al.* 2001)

*Staphylococcus aureus* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan β-laktamlar genellikle etkin değildir. Bunun nedeni, genellikle klinik suşların çoğunluğunda bir veya iki β-

laktamazın alternatif penisilin bağlayıcı proteinlerinin (PBP2′ veya PBP2a) üretiminin düşük afinite meydana getirmesi olarak açıklanabilir (Brown and Reynolds 1980, Hartman and Tomasz 1984). β-laktamaz üretimi çoğu izolatta indüklenebilir (Clarke and Dyke 2001). Aynı zamanda, β-laktamazın düzenlenmesi ve biyosentezi için genlerin birlikte kümelenmesi gerekmektedir. Bu durumun oluşmasında genellikle transpozon Tn552 bulunmaktadır (Rowland and Dyke 1989).

Askorbik asit, bakteri hücrelerinde protein sentezi ile ilişkili bazı metabolik aktiviteler üzerinde etkilidir. Bundan dolayı antibiyotiklerle olan sinerjistik etkisi ile hücre zarı üzerindeki etkisi sayesinde organizmaları antibiyotiklere daha geçirgen hale getirmektedir. Aynı zamanda, antibiyotiklerin daha geniş spektrumlu olması, hücre içine askorbik asidin oto-oksidasyonundan salınan ve antibiyotiklerin güçlü aktivitesine yol açan $H_2O_2$'nin bulunması olarak açıklanabilir (Kramarenko *et al.* 2006).

Bu çalışmanın amacı, βeta -laktam dirençli *Staphylococcus aureus*'un izolasyonudur. Aynı zamanda izole edilen *Staphylococcus aureus* üzerinde, C vitamininin farklı konsantrasyonlarının virülans faktörleri üzerindeki etkilerine yönelik fenotipik çalışmalar ile β-laktam dirençli geni üzerindeki etkilerine yönelik Genotipik çalışmalardır. Bu çalışmaların sonucunda C vitamini gibi daha güvenli alternatiflerin varlığı ile antibiyotik kullanımının azaltılması konusunda kanıtlayıcı bilgilere sahip olunacağı düşünülmektedir.

# LİTERATÜR ÖZETİ

## 1.1 Stafilokoklar

*Staphylococcus* türleri, *Staphylococcaceae* familyasına aittir. Bu familyada bulunan türler gram pozitif, fakültatif olarak anaerobik, fermentatif metabolizma özelliğine sahip olup 37°C'de solunum yapabilen kemoorganotrofikler olarak bilinmektedirler. Stafilokoklar hem insanlarda hem de hayvanlarda patojen olarak bulunur. Bu bakteriler spor üretmez, hareketsizdir ve katalaz için pozitif özelliklere sahiptir (Argudín *et al.* 2010). Stafilokoklar; çiftler, tetradlar, kısa zincirler ve farklı boyutlarda kümeler oluşturmak için üç dikey yönde bölünen küresel hücrelere sahiptir. Genellikle düzensiz üzüm benzeri kümeler halinde bunulurlar (Brooks 2007)

## 1.2 *Staphylococcus Aureus*

*Staphylococcus aureus*, mannitol şeker fermente etme ve mannitol tuz agar (MSA) besiyerinde bakteri kolonisi çevresinde sarı bir alan oluşturma kapasitesiyle diğer *Staphylococcus* türlerinden farklılık göstermektedir. Ayrıca, *S. aureus* laktoz, sakaroz, maltoz ve glikoz gibi karbonhidratları metabolize etme ve geniş bir pH aralığı ile (4,8-9,4) düşük nem koşulları ve yüksek ozmotik basınç altında büyüyebilme yeteneğine sahiptir (Hau *et al.* 2017, Thompson and Jefferson 2009). *S. aureus* kuru ortamlara dayanıklıdır ve bu durumlarda spor üretemez ancak 15 ºC ve 45 ºC sıcaklıkta büyüme gösterebilir. Bu bakteriler yüksek tuz konsantrasyonlarına (%15 NaCl) dayanıklı olup uygun tuz konsantrasyonlarında (%10 NaCl) hızla gelişim göstermektedir. Aynı zamanda oda sıcaklığında hızla çoğalarak toksin üretimi nedeniyle hastalıklara neden olabilmektedir (Hau *et al.* 2017, Wu *et al.* 2018).

*S. aureus*, tanımlanmış önemli bir klinik patojendir. Bu bakteriler, folikülit, derin cilt apseleri, osteomiyelit ve yara enfeksiyonları, impetigo, yüzeysel, pnömoni, septisemi, menenjit, plevral amfizem, süpüratif artrit, toksik şok sendromu (TSS), endokardit, gıda zehirlenmesi ve haşlanmış deri sendromu olarak adlandırılan çeşitli hastalıklara neden

olmaktadır (Thompson and Jefferson 2009). Metisiline karşı dirençli olan *S. aureus* (MRSA), hastane kaynaklı (HA-MRSA) ve toplum kaynaklı (CA-MRSA) olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadır (Costella *et al.* 2010).

## 1.3 *S. aureus'un* Patojenite ve Virülans Faktörleri

*S. aureus,* patojenik bakterilerin en yaygın türlerinden biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Patolojisi bakımından değerlendirildiğinde, insanlarda hastalığa neden olan bir dizi virülans faktöre sahip olduğu bilinmektedir (Alfatemi *et al.* 2014). *S. aureus*, yüzeyle ilişkili polisakarit kapsülleri ve opsonofagositik öldürmeyi engelleyen proteinleri nedeniyle bağışıklık sistemini etkiler (Walton and Rockoff 2013). *S. aureus*, toksin aracılı virülanslara sahip olması, antibiyotik direnci ve hızlı yayılımı nedeniyle insanlarda çeşitli hastalıklara neden olabilen çok yönlü bir patojendir. Stafilokok enfeksiyonları, birçok virülans faktörüne bağlı olarak fronkül ve sivilcelerden sepsis ve toksik şok sendromuna kadar farklılık göstermektedir (Virués-Ortega 2010). *S. aureus* tarafından salgılanan enzimler, konakçıdaki bazı molekülleri parçalayabilir veya konak hücrelerdeki metabolik adımlara müdahale edebilmektedir (Otto 2014). Bu enzimler arasında koagulaz, katalaz, hiyalüronidaz, stafilokinaz, lipazlar, β –laktamaz, kapsül, protein A, ve hemolizin yer almaktadır.

## 1.4 *Staphylococcus aureus* Yoluyla Biyofilm Oluşumu

Biyofilmler, alt tabakaya bağlı ve hücre dışı polimerik maddelerden oluşan bir matrise gömülü hücreler tarafından temsil edilen mikrobiyal topluluktur. Bu topluluklar, protein üretimi ve büyümesi açısından farklı bir fenotipe sahiptirler (Donlan and Costerton 2002). Biyofilmin içine yüksek orvea nüfuslu *S. aureus* yayar ve endokardit, Artrit veya osteomiyelit gibi bakteriyemiye neden olur (Boles and Horswill 2011). *S. aureus'un* farklı seviyelerde biyofilm oluşturma kabiliyetine sahip olması, genetik bileşenlerin biyofilm oluşumunu kontrol etme ve önleme araçları olarak görülmesi gerektiğini göstermektedir (Jotić *et al.* 2016). Bakteriyel biyofilmlerin oluşumunda, antibiyotik taşınması çok katmanlı biyofilmlere doğru sınırlanmıştır. Ayrıca bu durum bakterilerin azaltılmış antibiyotik maruziyeti ile bağlantılıdır (Amorena *et al.* 1999).

C vitamini, vitamin tarafından yok edilmeyen bakteriyel biyofilmleri etkilemektedir. (Pandit *et al.* 2017) yaptıkları çalışmada, C vitamininin, matris EPS'nin sentezini bloke ederek biyofilmlerini dengesizleştirdiğini ortaya koymuştur. Bu süreç, biyofilmlerin karmaşıklığını azaltarak ve hücrelerin antimikrobiyal ajanlara duyarlılığını artırmaktadır (Mai-Prochnow *et al.* 2015). Biyofilmlerin etkilenmesi, vitamin tarafından doğrudan öldürülmeyen bakteriler ile ortak antibiyotik tedavilerini arttırmada C vitamininin kullanılmasını gerektiren durumların ortaya çıkmasında önemli rol oynamaktadır (Khameneh *et al.* 2016). Bu durum, C vitamininin, etkinliği arttırmak veya maruz kalma süresini azaltmak için antibakteriyel tedavide biyofilm istikrarsızlaştırıcı olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Yaygın bakteriyel enfeksiyonlar arasında antibiyotik direnci hızla yayılmaktadır, bu nedenle maruziyetin azaltılması ve verimliliğin arttırılması kritik öneme sahiptir.

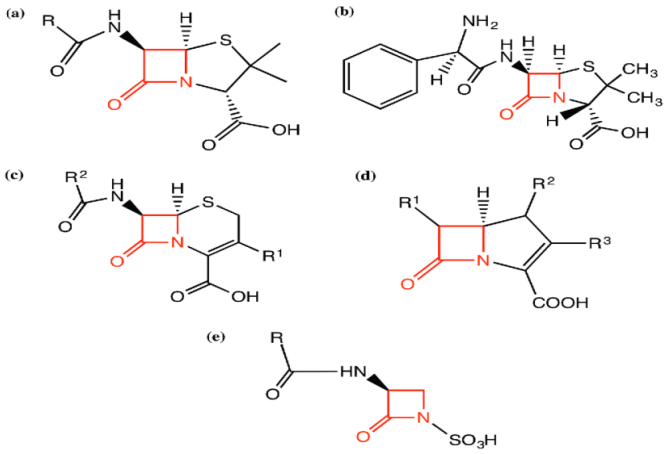
## 1.5 β-Laktam Antibiyotikler

β-Laktamlar olarak bilinen antibiyotikler, geniş bir klinik uygulama yelpazesi ile en sık reçete edilen ilaç gruplarındandır. Antibiyotiklerin moleküler yapısında β-laktam halkasının bulunması β-laktam antibiyotikler olarak adlandırılmasını sağlamaktadır (Şekil 2.1).

Bu antibiyotikler, 1930'larda ortaya çıkmıştır. Günümüze kadar ilerleyen süreçte bakterilerden bulaşan hastalıklara karşı mücadelede önemli bir rol kazanmışlardır (Thakuria and Lahon 2013). β-Laktamlar, sefalosporinler ve penisilinler en önemli antibiyotik ilaçlar olmakla birlikte hem kamu hem de bilim sektöründe önemli bir tartışma ve araştırma konusu olmuştur (Ozcengiz and Demain 2013). β-Laktam antibiyotikleri, genellikle penisilin bağlayıcı proteinler (PBP'ler) olarak bilinmektedir. Bunların antibakteriyel aktiviteleri, bakterilerin hücre duvarını bloke etmesiyle elde edilir. Peptidoglikan ve transpeptidazlar olarak adlandırılan penisilin bağlayıcı proteinler üretimi bozarak tam çalışmayı engellemektedir (Parija 2014). Peptidoglikan, güçlü iç ozmotik basınç nedeniyle hücreye şekil sağlayan bakteri hücre duvarının bir bileşeni olarak tanımlanmaktadır. β-Laktam halkası, N-asetilmuramik asit (NAM) pentapeptitinin

D-alanin-D- ile aynı dizilime sahiptir. Bu nedenle PBP'ler, hücre duvarı oluşumu sırasında bunları β-Laktam olarak algılayarak yanlışlıkla hücre içerisine alırlar ve yapı taşları olarak kullanırlar. Bakteri hücresi, PBP asilasyonuna neden olan bu hata sonucunda, transpeptidasyon reaksiyonlarını inhibe ederek enzimi (transpeptidazları) etkisiz hale getirerek hücre duvarının öncü birimlerinin birikmesine neden olur ve hücre duvarı otokatalitik sistemini aktive ederek hücre lizizi oluşur (Zapun *et al.* 2008)

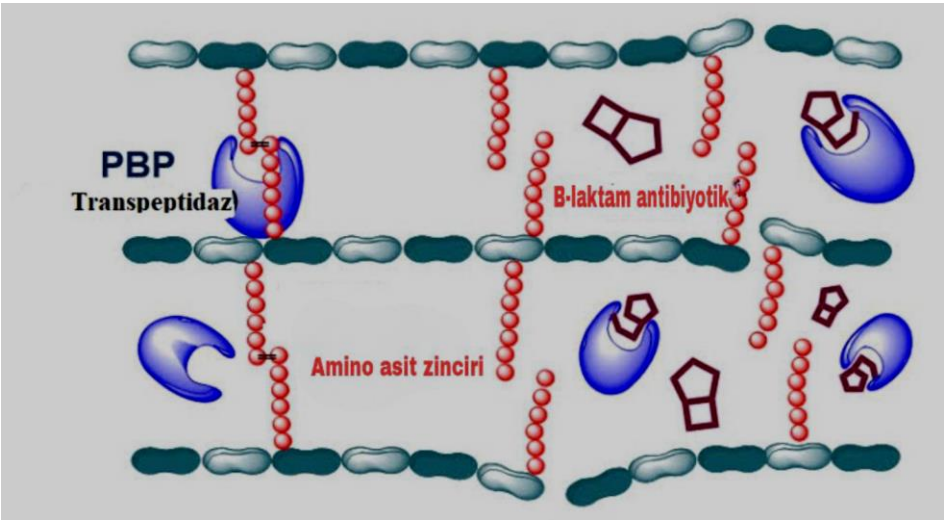
β-Laktamlar çekirdek bileşeni nedeniyle penisilinler gibi Penisilin, stafilokok ve streptokok gibi geniş bir enfeksiyon yelpazesine karşı umut vaat eden antibiyotiklerden biridir. Ayrıca, modern bilimdeki en güçlü ve etkili keşiflerden biri olan β-Laktam antibiyotik sınıfının bir parçasıdır (Khan *et al.* 2013). Sefalosporinler, Sefalosporin çekirdeği, penisilinlerden farklı olarak, C3 pozisyonunda fazladan bir değişim alanına sahiptir ve bu durum yapısal çeşitliliğe neden olur. Birçok antimikrobiyal aktivite özelliğine göre sefalosporinler dört bölümde sınıflandırılır (Page 2012). Antipseudomonal özelliklere sahip veya metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'a (MRSA) karşı etkili olan sefalosporinler yakın zamanda geliştirilmiştir (Bush and Macielag 2010). Karbapenemler, ciddi enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır. Bunlar; Sefalosporinler, Penisilinler ve diğer bazı β-Laktam / β-Laktamaz inhibitörleri kombinasyonlarından farklı olarak, çok daha geniş antibakteriyel spektruma sahiptir (Papp-Wallace *et al.* 2011). Karbapenemlerin çok çeşitli PBP'lere bağlanma ve çeşitli β-Laktamazları bloke etme veya hidrolize direnç gösterme kapasitesi bulunmaktadır (Queenan *et al.* 2010). Monobaktamlar, C2 ve C4 konumlarında farklı organik gruplara sahiptir. Aynı zamanda, monosiklik β-Laktamlara ve N1 nitrojene bağlı bir sülfonik asit bileşenine sahip antibiyotiklerdir




**Şekil 0.1** β-Laktamlar antibiyotiğin kimyasal yapısı (Lee *et al*. 2016)

## 1.6 Kullanılan Antibiyotikler ve Direnç Mekanizmaları

Belirtilen bu maddelerin tarımda ve tıpta yaygın olarak kullanılması mikroorganizmaları fazla seçici hale getirmiştir. Bakteriler, geniş spektrumlu direnç üretmek için çeşitli direnç genlerine sahiptir. β-laktam antibiyotiklerine karşı bakteriyel dirence katkıda bulunan üç ana mekanizma bulunmaktadır. Bunlar; (i) β-Laktam bağlanma başarısızlığına yol açan PBP'lerin hedef modifikasyonu, (ii) β-Laktamlarla enzimatik bozunma ve (iii) β-Laktam girişi ve akışı düzenleme olarak sınıflandırılmaktadır (Şekil 2.2).




**Şekil 0.2** β-Laktam antibiyotiklerin etki ve direnç mekanizması (Shin 2016)

1950'lerden önce *S. aureus* enfeksiyonları β-Laktam antibiyotiği olan benzilpenisilin (penisilin G) ile tedavi edilliyordu, ancak 1950'lerin sonunda benzilpenisiline dirençli *S. aureus* suşlarının gelişmesi bu konuda ciddi endişelerin doğmasına neden oldu (Stapleton and Taylor 2002).

Bakteriler sahip oldukları direnç mekanizmalarından bir veya ikisini kullanmaktadır. Bu mekanizmalar; ilaç absorpsiyonunun sınırlandırılması, ilacın bağlanmasını önlemek için hedefin ayarlanması, ilacın geçirgenliğini azaltarak ilaç birikiminin hafifletilmesi ve ilgili antimikrobiyallere bağlı olarak ilaçların aktif akışının arttırılması olarak sıralanabilir. Antibiyotikler ve sahip oldukları etki mekanizmaları da aşağıda sırasıyla açıklanmıştır.

**a) Penisilin**

*S. aureus*; penisilin direncine ve buna bağlı olarak diğer β-Laktam antibiyotiklerinin halka yapısının bozulmasına neden olan penisilinin hedef enzimlerindeki değişikliklere neden olan bir bakteri türüdür (Walton and Rockoff 2013) .

Dirençli *S. aureus* suşları tipik olarak β-laktamı inaktive eden β-laktamaz adı verilen bir enzim üretir. Bu bağlamda, 1959 yılında metisilin sentezi ile β-laktamaz hidrolizine dirençli penisilin türevlerinin sentezlenmesi gerçekleştirldi (Stapleton and Taylor 2002).

**b) Metisilin**

*S. aureus*, MecA genlerini aralarında transfer ederek metisiline direnç kazanmıştır (Liang *et al.* 2019). *S. aureus*'ta metisilin direnci, değiştirilmiş bir penisilin bağlayıcı protein 2a'yı kodlayan MecA genine dirençlidir (Al-Talib *et al.* 2014). β-Laktam direncine iki farklı ana mekanizma neden olmaktadır. Bunlar:

1 Birinci mekanizma; penisilini parçalayan ve antibiyotiği hidrolize eden bir β-Laktamaz enziminin üretimi (Rocchetti et al. 2018).

2 İkinci mekanizma; antibiyotikler için zayıf bir çekiciliği olan yeni bir penisilin bağlayıcı protein üreterek β-Laktam etki bölgelerinde meydana gelen değişiklik (Rocchetti *et al*. 2018).

Metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) suşları klinik olarak metisilin kullanıldığı zamanda izole edilmiştir (Stapleton and Taylor 2002). Direnç, B-laktamaz üretiminden değil, antibiyotiğin etkisine dirençli olan başka bir türden elde edilen ilave bir penisilin bağlayıcı proteinin (PBP2a) ekspresyonundan kaynaklanmaktadır. Yıllar boyunca farklı tipte antibiyotiklerin kullanılması, çok dirençli MRSA suşlarının ortaya çıkmasına neden olmuştur (Livermore 2000).

**c) Sefaleksin**

İdrar yolu enfeksiyonları da dahil olmak üzere çok çeşitli enfeksiyonları tedavi etmek için sıklıkla kullanılan bir antibiyotiktir. Genellikle, penisiline karşı alerjisi olan hastalarda sefaleksin ve birinci kuşak sefalosporinler rahatça kullanılabilir. Bu antibiyotiklerin kullanımı ile çoğu gram-pozitif bakteri, bakteri hücre duvarında N-asetilglukozamin ve N-asetilmuramik asit arasındaki çapraz bağlanma aktivitesini yok eder ve hücre lizisinin oluşmasına neden olur (Fisher *et al.* 2005).

Çalışmamızda, yarı sentetik sefalosporinlerin en yenisi olan sefaleksinin, içsel "metisilin" direncine sahip 70 *S. aureus* suşunun sadece 6'sına karşı terapötik konsantrasyonlarda aktif olduğu tespit edilmiştir. Sefaleksin *S. aureus*'a karşı diğer B-laktam antibiyotiklere göre daha az aktiftir. Bu sebeple, dirençli *S. aureus* suşlarında, aynı zamanda oksasilin direnci düşük, sefaleksin direnci yüksekti olarak karşımıza çıkmıştır. İncelenen örneklerde 49 suşun direnci sefaleksin için oksasiline göre 16 kat daha yüksek değer almıştır (Kayser *et al.* 1970).

**d) Oksasilin**

Penisilinaz dirençli bir β-Laktam olup, penisilinaz enzimlerine karşı direnç gösterir ve klinik ortamlarda penisiline dirençli *S. aureus'u* tedavi etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Oksasilin β-Laktam halkası, bakteri hücre duvarı üretimi ile bağlantılı enzimler olan penisilin bağlayıcı proteinlere kovalent olarak bağlanır. Bu bağlanma ile transpeptidasyon aktivitesini ve bakteri hücre duvarının önemli bir unsuru olan peptidoglikan üretimini engeller. Aynı zamanda, Oksasilin ve diğer penisilinlerin bakteri hücre duvarının bütünlüğünü tehlikeye atarak aktif olarak büyüyen bakterileri yok ettiği varsayılmaktadır (Katzung and Trevor 2014).

Çoğu ülkede hastanelerde oksasilin dirençli *S. aureus* (MRSA) prevalansı artmıştır. *S. aureus*'un oksasiline karşı içsel direnci, yarı sentetik penisilinler için düşük afinite sunan ve kromozomal gen mecA tarafından kodlanan ek bir penisilin bağlayıcı proteinin (PBP2 veya PBP2a) üretilmesinden kaynaklanmaktadır (Pereira *et al.* 2009).

**e) Ampisilin**

Ampisilin, gram pozitif ve gram negatif bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılan bir antibiyotiktir**.** *S. aureus* karşı geniş kapsamlı etkiye sahip ilk penisilin olarak bilinmektedir (Magdesian 2017).

Güngeçtikçe direncin yayılması, dirençli *S. aureus* suşlarının β-laktam, ampisilin gibi şu anda etkisiz antibiyotiklere karşı yeniden duyarlılaştırılmasından kaynaklanmaktadır. Bu yaklaşım, PBP2a gibi dirence katkıda bulunan proteinlerin ekspresyonunu ve/veya işlevselliğini inhibe etmesiyle açıklanabilir. PBP'ler, bitişik peptidoglikan segmentleri arasında temel çapraz bağlantılar oluşturdukları için hücre büyümesi için vazgeçilmezdir (Moreillon 2008).

## 1.7 Doğal ya da Sentetik Antibiyotiklerde Askorbik Asidin Sinerjik Etkisi

C vitamini, nötr pH koşullarında bile *S. aureus* ve streptokokların büyümesini inhibe edebilir. Ayrıca C vitamini, MRSA gibi çoklu ilaca karşı dirençli (MDR) bakterilere karşı

güçlü büyüme engelleyici etkilere, doğal ya da sentetik antibiyotik bileşikleriyle kanıtlanmış sinerjik etkilere sahiptir. Bunlara ek olarak, ortaya çıkan MDR bakteri türleriyle enfeksiyonlarla mücadele için yeni yolların denenmesine olanak sağlar. Bununla birlikte, antimikrobiyal sinerjilerin moleküler mekanizmasını daha iyi anlamak için hem in vitro hem de in vivo (deneysel ve klinik) çalışmalara ihtiyaç vardır (Mousavi *et al.* 2019). yapılan çalışmalar, bakır (II) iyonlarının C vitamini varlığında *S. aureus*'a karşı antimikrobiyal etkisinin arttığını göstermiştir (Hoshino *et al.* 2000). Eser miktarda (0,3 µM f.c.) bakır (II) iyonu olan C vitamini Gram pozitif türlere karşı etkilidir (Lho *et al.* 1991).

Diğer çalışmalar askorbik asidin R plazmidlerinin kaybına neden olabileceğini ve Stafilokoklarda antibiyotik direnç düzeylerini etkileyebileceğini öne sürmüştür (Amábile-Cuevas and Heinemann 2004). Askorbik asit, ampisiline duyarlılıkla β-laktamaz üretimini inhibe eder (Shoeb *et al.* 1995). Bu durum, β-laktamazların heterojenliği veya üretilen farklı miktarlar, askorbik aside maruz kalmaya bağlı olarak farklı ampisilin direnci mekanizmalarının oluşmasını açıklayabilir (Sanders *et al.* 1988). Yapılan çalışmlarda, askorbik asit konsantrasyonu insan plazmasında gözlenmiştir (Alabi *et al.* 1994). Askorbik asit (25 mg kg-1), ampisillim ve kloxacillin uygulamasının yanı sıra, *Staphylococcus aureus*'un neden olduğu sığır mastitine karşı sadece antibiyotik uygulamasından daha etkilidir (Naresh *et al.* 2002).

## 1.8 Kimyasal Bileşim ve Doğal C Vitamini Kaynakları

C vitamini, glukuronik asitten üretilen bir glukonik asit laktonunun yanı sıra iki iyonize hidroksil grubu içeren ve suda çözünür bir keto lakton olarak bilinmektedir. (Strohle *et al.* 2011, Sorice *et al.* 2014). C vitamininin doğal kaynakları; papaya, çilek, mango, narenciye, kivi, brokoli, yeşil yapraklı sebzeler ve domates olarak sıralanabilir (Block *et al.* 2001, Farris 2014, Sorice *et al.* 2014, Lykkesfeldt and Tveden-Nyborg 2019 ). Şaşırtıcı bir şekilde, hemen tüm omurgalılar glikozdan C vitamini üretebilir fakat insanlar ve fareler gibi birçok memeli, L-glukoz-γ-lakton oksidaz eksikliği nedeniyle C vitamini üretme yeteneğini kaybetmiştir (De Tullio 2010, Hong *et al.* 2016, Hemilä 2017).

İnsanlar temel ihtiyaçlarını karşılamak için günde 100 ile 200 mg C vitamini almalıdır. Çeşitli araştırmalar (Hong *et al.* 2016). Bununla birlikte, uygun olmayan gıda depolama, işleme ve hazırlama tekniklerinin C vitamini bozulmasına neden olmaktadır. C vitamini suda çözünür olduğu için aşırı C vitamini alımından kaynaklanan zehirlenme olasılığı hemen hemen yoktur (Lykkesfeldt and Tveden-Nyborg 2019).

## 1.9 C Vitamininin Vücuttaki Bağışıklık Fonksiyonları

C vitamini, herhangi bir klinik yan etkisi olmayan yaygın, doğal bir gıda takviyesidir (Vilchèze *et al.* 2013). Ayrıca, insanlarda ve diğer deneysel in vivo modellerde, askorbik asidin çeşitli immün hücre popülasyonları üzerindeki etkisi ortaya çıkmıştır (Van Gorkom *et al.* 2019). C vitamini konsantrasyonlarının bağışıklık hücrelerinde, örneğin lökositlerde plazmada ölçülenlere göre 10 ile 100 kat daha yüksek olduğu görülmektedir (Strohle *et al.* 2011).

Ayrıca C vitamini önemli antioksidan özelliklere sahiptir (Strohle *et al.* 2011, Sorice *et al.* 2014). Bu özelliklerin bir sonucu olarak, C vitamini, hormonal ve epigenetik yolların düzenlenmesi, ayrıca enerji metabolizması ve gen transkripsiyonu dahil olmak üzere çeşitli kritik faaliyetlerde rol alır (Carr and Maggini 2017). C vitamininin antibakteriyel özelliklere sahip olduğunu, enfeksiyon riskini azalttığını ve özellikle yüksek dozlarda immünomodülatör etkileri olduğunu göstermiştir (Hong *et al.* 2016)

## 1.10 C Vitamininin Antimikrobiyal Özellikleri

Özellikle kadınlar arasında görülen idrar yolu enfeksiyonları (İYE) tüm dünyada yaygın olarak görülmektedir. Çeşitli bakteri suşları antibiyotik direncine sahiptir ve bu da daha fazla komplikasyona neden olmaktadır (Ahmed *et al.* 2019). tarafından yapılan çalışma, 200 idrar numunesi arasında pozitif bakteri üreme sayısının 137 olduğu ve izole edilen izolatların 46'sında (%33,6) *S. aureus*'a oluştuğu ve 45'inde (%97,8) MDR oranının arttığını bildirilmiştir (Mulu *et al.* 2012). Bu nedenle, idrar yolu enfeksiyonları da dahil olmak üzere çeşitli enfeksiyonları tedavi etmek önem arz etmektedir. Bu tedaviler için

uygulanacak C vitamini, olumsuz etkileri olmayan ve kolayca erişilebilen ucuz alternatiflerden biridir (Verghese *et al.* 2017). (Hong *et al.* 2016) yapmış oldukları çalışmada, özellikle yüksek konsantrasyonlarda C vitamininin immünomodülatör fonksiyonlara ve antimikrobiyal özelliklere sahip olduğunu ve bu nedenle enfeksiyon riskini azalttığını belirtmiştir. C vitamininin, özellikle L-askorbik asidin, *Staphylococcus aureus* dahil olmak üzere çeşitli patojenik organizmalara karşı antibakteriyel etkisi bulunmuştur (Isela *et al.* 2013). Askorbik asidin farmakolojik kullanımının bağışıklık sistemini iyileştirmesi ve C vitamininin işlevsel bir konakçı direnç mekanizması için çok önemli olduğu düşünülmektedir (Van Gorkom *et al.* 2018). C vitamininin antibakteriyel bir madde olarak işlev gördüğünü ortaya koyan çalışmalarda, C vitamini içeren meyve suları antimikrobiyaller olarak kullanılmıştır (Opara *et al.* 2009). Yüksek askorbik asit konsantrasyonları, Gram pozitif bakterilerde özellikle *S. aureus*'ta en büyük inhibisyon bölgelerinin var olduğunu göstermiştir (Al-Talib *et al.* 2013).

Düşük miktarda (0,15 mg/mL) C vitamini uygulaması ile *Staphylococcus aureus*'un büyümesi engellenebilmektedir (Golonka *et al.* 2017). Aynı zamanda düşük seviyelerde C vitamini direnci ile (8-16 μg/mL) metisiline dirençli *S. aureus'*un biyofilmler (MRSA) oluşturması da önlenebilmektedir (Mirani *et al.* 2018). pH bakımından nötralize edilmiş C vitamini, *S. aureus'*un büyümesi üzerinde sadece küçük bir inhibitör aktiviteye sahiptir (Kallio *et al*. 2012). Özellikle, bazı ilaçlarla beraber C vitamininin birlikte uygulanması, MRSA gibi çoklu ilaca dirençli bakterilerde antibakteriyel aktivitenin artmasına neden olmaktadır (Hatano *et al.* 2008). Ayrıca, C vitamini bakteriyel enfeksiyonlarla mücadele ve/veya önlemede antibiyotikten bağımsız uygulanabilir bir tekniktir (Lykkesfeldt and Tveden-Nyborg 2019).

### 1.11 Stafilokokal β-laktamaz Transpozonu Tn552

Bir stafilokokal beta-laktamaz transpozonu olan Tn552, yeni bir yer değiştirebilir elementler sınıfına aittir. Tn552'nin gen organizasyonu, Tn21 alt grubu ve Tn3 transpozon ailesininkine benzemektedir. Tn552, hedef DNA'nın 5 bp yerine 6 bp'de doğrudan tekrarlarını oluşturmaktadır. Transpozaz proteini ise hem Tn552 'nin terminal ters çevrilmiş tekrarlarına hem de Tn3 elemanlarına benzer değildir. Tn552, tıpkı faj Mu ve

retroelementler gibi terminal dinükleotidleri 5' TGCA 3' aracılığıyla belirtmektedir. Doğal olarak oluşan bir stafilokokal plazmitte bulunan Tn552'den türetilen bir çözünürlük sistemi ('resR-binR') olan pI9789, Tn552 transpozisyonu için bir 'sıcak nokta' olarak çalışmaktadır. Bu durum, biri pI9789 'da (resR) ve diğeri Tn552 'de (resL) olmak üzere iki ters tekrarlanan çözünürlük bölgesi ile çevrili bir DNA segmenti oluşturmaktadır. Bu segmentin in vivo olarak etkin bir şekilde ters çevrilmesini indükleme kapasitesi nedeniyle, bilinen çözünürlüklerin homolog DNA invertazlarına en yakından bağlı olan Tn552 çözünürlüğü DNA invertaz ('Bin') olarak tanımlanmıştır (Rowland and Dyke 1989).

# MATERYAL VE YÖNTEM

## 1.12 Materyal

Al Hussein Eğitim Hastanesi ve Al Refaee Eğitim Hastanesi'nde kayıt altına alınan idrar yolu enfeksiyonu (İYE) şikayeti olan toplam 100 hastadan Kasım 2020-Haziran 2021 tarihleri arasında orta akım idrar örneği toplanmıştır. Ayrıca hastaların klinik öykülerinin belirlenmesi amacıyla anket hazırlanmış ve tüm hasta bilgileri alınarak ve kaydedilmiştir.

Öncelikle çalışmanın amacı ve araştırılmak istenen konu için etik onay belgesi alınmıştır (Ek 1). Daha sonra bu durum tüm katılımcılara açıklanarak kişisel onay vermesi ile ilerlemiştir. Elde edilen numuneler uzman gözetiminde toplanmıştır. Etik hususlar dokümanı ekte yer almaktadır.

## 1.13 Metot

### 1.13.1 Besiyeri hazırlama

Bu çalışmada üreticinin talimatlarına göre hazırlanan besiyerleri kullanılmıştır ve bunlar aşağıda sırasıyla açıklanmıştır, Bunlara *S.aureus*larekilecek.

### A. Mannitol tuzlu agar:

Hazırlanan bu besiyeri, Stafilokokların klinik örneklerden izole edilmesi, numaralandırılması ve farklılaştırılması için kullanılmıştır. Besiyeri, yüksek konsantrasyonda tuz (sodyum klorür) bulunan bölgelerde yaşayabilen organizmaları seçecek ve pH göstergesinin (fenol kırmızısı) sarı dönüşüyle gösterilen mannitol fermantasyonu, tanıya rehberlik etmeyi mümkün kılacaktır. Mannitol tuzlu agar (110 g), 1 litre steril distile suda eritilmiştir. Daha sonra, otoklavda 121°C'de 15 dk. sterilize edilerek 50°C'ye kadar soğutulmuştur. Soğuduktan sonra plakalara dökülmüştür (Amelia *et al.* 2020).

**B. Kanlı agar:**

Bu besiyeri, kolayca büyümeyen bakteri veya mikropları kültürlemek için kullanılan zenginleştirilmiş bir ortamdır. Hemolitik bakterileri, özellikle Streptokok türlerini tespit etmek ve ayırt etmek de kullanılır. Aynı zamanda, Stafilokok gibi bazı bakteriler tarafından salgılanan sitolitik toksinler tarafından hemolizin (RBC'yi yok eden) saptanmasına sağlar.

1 litre steril distile su içinde 40 g kanlı agar bazı süspanse edilmiştir. Ardından, otoklavda 121°C'de 15 dk. kaynatılıp sterilize edilerek 50°C'ye kadar soğutulmuştur ve aseptik olarak %5 koyun kanına ilave edilmiştir (MacFaddin 1999).

**C. Muller-Hinton agar (MHA):**

Bu besiyeri titiz olmayan mikroorganizmaların rutin duyarlılık testleri için kullanılır. 1 litre steril distile suda 38 g çözülerek hazırlanmıştır. 121°C'de 15 dakika sterilize edildikten sonra 50°C'ye soğutulmuş ve plakalara dağıtılmıştır (Mueller 1941).

**D. Beyin kalp infüzyon suyu (BHI):**

Klinik örneklerden aerobik ve anaerobik bakteriler de dahil olmak üzere titiz ve titiz olmayan mikroorganizmaların yetiştirilmesinde kullanılan sıvı bir ortamdır. Bu ortam özellikle plazma koagülaz testi için koagülaz pozitif stafilokokların belirlenmesi için uygundur

Beyin kalp infüzyon suyu 37 g tartılarak besi yerine ilave edilmiştir, 1 litre steril distile suda eritilerek tüplere dağıtılmıştır. Ardından otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir (Fugelsang and Edwards 2007).

**E. Agaroz**

Hazırlanan bu besiyeri agaroz jel elektroforezi tekniğinde kullanılır, Bir şişeye (500 mL), 100 mL TBE tamponunu (1X) ve 0,8 g agarozu eklenmiştir. Daha sonra, çözelti sıcak bir plaka üzerinde yaklaşık 10 dakika mikrodalga ile ısıtılmıştır. Agarozun tamamen çözülmesini sağlamak için agaroz solüsyonunu hafifçe döndürülmüştür. Agaroz ısıtıldıktan sonra 45-50°C'lik bir sıcaklığa kadar soğumaya bırakılmıştır. Hazırlanan jel, dökme sırasında hava kabarcıkları oluşturmadan plakaya dökülmüştür. Daha sonra, numunelerin eklendiği delikleri oluşturmak için özel tarak kullanılmıştır. Jelin sertleşmesi (katılaşmak) için 30 dakika beklenmiş ve daha sonra tarak sertleştirilmiş agarozdan dikkatlice çıkarılmıştır. Plaka, jelin yüzeyini kaplayan bir TBE tamponu ile önceden doldurulmuş olan elektroforez ünitesinin tankı ile temsil edilen elektroforez yatay ünitesine sabitlenmiştir (Sambrook *et al.* 1989).

### 1.13.2 Boyamaların, tamponların, reaktiflerin ve solüsyonların hazırlanması

İzolatların boyamaya tepkilerini, şekillerini ve dizilişlerini belirlemek için gram boyama kullanılmıştır (Gillet *et al.* 2002). Gram boyama içeriğini; kristal menekşe metanol çözeltisi, lugol iyot çözeltisi, alkol aseton çözeltisi ve temel fuchsin çözeltisi oluşturmaktadır.

Büyüyen bakteri kolonileri bir sterilizatör halkası kullanarak cam slayta aktarılır ve kurumaya bırakılır. Daha sonra gram boyama ile boyanarak mikroskobik olarak incelenir (Wanger *et al.* 2017).

Etidyum bromür boyası (0,05 g), 10 mL steril distile suya ilave edilmiştir. Daha sonra, tamamen eriyene kadar vortex ile karıştırılarak muhafazası için steril koyu renkli şişede saklanmıştır. Böylece %0,5 'lik bir etidyum bromür stok çözeltisi hazırlanmış olur. Bu stok, elektroforezde DNA boyaması için kullanılır (Sambrook *et al*. 1989) .

DNA ve RNA poliakrilamid jel elektroforezi için en yaygın olarak kullanılan tampondur.10 mL TBE-10X tamponu 90 mL steril distile suda çözülmüştür. Elde edilen ortam kullanılıncaya kadar 4°C'de saklanmıştır (Sambrook *et al.* 1989) .

Katalaz testi, stafilokoklar gibi katalaz pozitif organizmaların streptokoklar gibi katalaz negatif türlerden ayırt edilmesini sağlar. Katalaz reaktif testi için %3 'lük hidrojen peroksit sulu çözeltisi kullanılıncaya kadar 4°C'de koyu renkli bir şişede tutulmuştur (Prescott *et al.* 2007) .

Oksidaz testi, bir organizmanın sitokrom oksidaz enzimine sahip olup olmadığını belirlemek için kullanılır. 10 mL hazırlanmak için: 0,1 g Tetrametil -p-fenilendiamin dihidroklorür, 10 mL steril distile suda çözülerek hazırlanır.

Elde edilen çözeltinin konsantrasyonu 100 µg/mL olacak şekilde**,** 100 mL steril distile su içinde 0,01 gr C vitamini tozu ile stok çözelti hazırlanır. Daha sonra stok çözeltiden bir dizi seyreltme (5, 10, 20, 30 µg/mL) hazırlanır (Mirani *et al.* 2018)

### 1.13.3 İdrar toplama

İdrar örnekleri steril koşullarda alınarak gerekli testler için hastane laboratuvarına götürülmüştür. Ayrıca, hastalardan isim, tarih, yaş, cinsiyet ve ikamet yeri gibi ayrıntılı bilgiler alınarak not edilmiştir. Bakteriyel enfeksiyonun varlığını gösteren iltihaplanma ve irin hücrelerinin varlığını belirlemek üzere alınan idrar örnekleri mikroskopta incelenmiştir.

### 1.13.4 Bakteriyel izolasyon

Tüm örnekler mannitol tuzlu agar ve kanlı agar besiyerinde kültüre alınmıştır. Daha sonra plakalar gece boyunca 35–37°C'de aerobik olarak inkübe edilmiştir. Kanlı agarda *S. aureus* olduğundan şüphelenilen gri pigmentli, dışbükey, pürüzsüz ve hemolitik koloniler oluşturan izolatlar tespit edilmiştir. Ardından, bu izolatlar Gram boyama ile boyandıktan sonra ışık mikroskobunda incelenmiştir. Gram pozitif koklar olarak ortaya çıkan hücreler (Üzüm benzeri düzensiz kümeler halinde) biyokimyasal testlerle saflaştırılmıştır.

### 1.13.5 *Staphylococcus aureus'*un teşhisi

*Staphylococcus aureus*'u tanımlamak için kültür ortamındaki morfolojik Bir koloni şekli, boyutu ve rengiyle belirlenir özellikler, Ayrıca mikroskopla teşhis edilir Gram boyama ile boyadıktan sonra, ve biyokimyasal testler kullanılmıştır gibi koagülaz testi ve katalaz testi ve oksidaz testi ve son aşama vitek tarafından teşhis edildi.

**A. Mikroskobik inceleme**

Tüm bakteri izolatları morfolojik olarak (hücrelerin şekli ve rengi) ışık mikroskobunda gözlemlenmiştir. Daha sonra lamlara taşınarak Gram boyası ile boyanmıştır. Gram boyanmış slaytlar daha sonra hücre morfolojisi, düzenlemesi için 100x büyütmeli bir ışık mikroskobu altında incelenmiştir (Al-Kobaisi 2007)

**B. Besiyeri ve özellikler**

Toplanan örnekler kanlı agar üzerinde steril sürüntü ile inoküle edilerek 24 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra 37°C'de 24 saat inkübe edilen mannitol tuzlu agar (MSA) üzerinde kültüre alınmıştır (Suzuki *et al.* 2012). Bu besyeri, bakterileri seçici olarak izole etmek ve yetiştirmek için kullanılmaktadır. Test edilen bakterilerin saf bir kolonisi plakaların üzerine ekilerek tekrar 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir (Gillet *et al.* 2002)

**C. Biyokimyasal testler**

**- Koagülaz testi**

1:5 oranında seyreltilmiş sitratlı tavşan plazması, eşit hacimde BHI et suyu kültürü ile karıştırılarak 37°C'de inkübe edilmiştir. Kontrol olarak, steril et suyu ile karıştırılmış bir plazma tüpü bulunmaktadır. 1-4 saat içinde pıhtıların oluşması testin pozitif olduğunu göstermektedir. Negatif sonucun oluştuğu durumlarda örnekler 24 saat boyunca tekrar incelenmektedir (Karmakar *et al.* 2016).

**- Katalaz testi**

Bir lam üzerine bir damla katalaz reaktifi (%3 $H_2O_2$) uygulanır ve test edilen bakteri kolonisi reaktif ile birleştikten sonra oluşan hava kabarcıkları testin pozitif olduğunu göstermektedir (Prescott *et al.* 2007)

**- Oksidaz Testi**

Birkaç damla oksidaz reaktifi (%1N, N, N, N-tetrametil-p-fenilendiamin dihidroklorür) bir filtre kağıdına yerleştirilir ve ardından tahta bir çubukla kağıda izole edilmiş bir bakteri kolonisi eklenir. Sonuç pozitif olduğunda koloninin rengi 10-15 saniye içinde koyu mor renge dönüşür (Prescott *et al.* 2007)

**- Hemoliz testi**

Ortam, test edilecek saf bakteri kolonisinin bir kısmı ile aşılanır ve plate'ler 37°C'de 18-24 saat inkübe edilir. Koloni çevresinde hemoliz meydana gelmesi testin pozitif sonuç aldığını göstermektedir (Levinson and Jawetz 2000)

### 1.13.6 Vitek 2 ile tanımlama teşhis

Vitek sistemi, Vitek 2 GN Kiti (Biomérieux/ Fransa) (Pincus 2006) tarafından gram pozitif bakterileri tanımlamak için kullanılan otomatik bir aparattır.

**A. Vitek 2 sistemi prensibi**

Vitek 2, süreci otomatikleştirmek için büyümeye dayalı teknolojileri kullanan bir mikrobiyolojik sistemdir. Bu sistem esas olarak klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarına yöneliktir ve daha yüksek hacimli laboratuvarlar için daha yüksek derecede otomasyon sunmaktadır. Ayrıca bu sistem sayesinde seyreltme ve otomatik pipetleme sağlanmaktadır. Antimikrobiyal duyarlılık testi için, 64 kuyunun her biri reaktif

kartlarında benzersiz bir test substratı taşıyabilir. Substratlar, örneğin enzim hidrolizi, alkalinizasyon, anti-büyüme ajanları mevcut olduğunda büyüme gibi sayısız metabolik aktiviteyi ölçer. Kartın her iki tarafında, optik olarak şeffaf bir film bulunur. Bu film, organizma-substrat karışımları ile teması engelleyen kapalı bir kabı korurken uygun miktarda oksijen transferini sağlar. Her karta aşılama için önceden yerleştirilmiş bir transfer tüpü dahildir. Kartlar, ürün çeşidi, son kullanma tarihi, lot numarası ve numune sisteme yüklenmeden önce veya yüklendikten sonra tanımlayıcı barkodları içermektedir.

**B. Numune hazırlama**

• Numunelerin makinede test edilmeden 18 ile 24 saat öncesinde hazırlanması gerekmektedir.

• Daha sonra, kaset numarasını tanımlayan etiketli bir barkoda sahip Vitek 2 kompakt kaseti seçilir.

• Polistiren tüplere steril Vitek Saline'den 3 mL alınır.

• Seçilen plakadan izole edilmiş kolonileri seçilir ve steril Vitek salin içinde süspanse edilir.

• Düzgün bir süspansiyon yapılır ve ardından karıştırılır.

• İnokulumun yoğunluğunu Densichecker ile kontrol edilir ve 0,5 Mc Farlve Stveardı yapılır.

• Seçilen kartlar aşı için hazırlanmış olur.

• Tekrar seçilen kartlar polistiren tüplerdeki inokulumlara yerleştirilir.

• Kasetteki inokulumların tamamı makineye yerleştirilmek üzere hazırlanır. Kartları aşılandıktan sonra yerleştirme süresi 30 dakikayı geçmemelidir.

**C. Örnek yükleme**

• Kaset, doldurma kapağına yüklenir.

• Kullanıcı arayüzü ekranında "Doldur"a basılır.

• Doldurma 70 saniye kadar sürer.

• Doldurma tamamlandıktan sonra cihaz üzerindeki mavi gösterge ışığı yanıp söner.

• Kaset yükleme kapağına girilir.

• Barkodlar taranır ve Ana Sanal Kaset elektronik çalışma listesine göre kontrol edilir.

• Kartlar karusele yüklenir ve işlem bittikten sonra kaset atılır.

• Cihaz üzerinde yanıp sönen mavi ok, yüklemenin tamamlandığını gösterir.

**D. Kartlar çalışma bilgilerinin girilmesi**

Kart çalışma verileri sistem yazılımına girilmiş ve Biomerieux tarafından verilen kullanım kılavuzuna göre sisteme kaydedilmiştir. Buna göre, 18 saat sonra, test edilen organizmanın tanımlama ve antimikrobiyal duyarlılık sonuçları alınır.

### 1.13.7 Antibiyotik duyarlılık testi

Bu çalışmada kullanılan antibiyotik diskleri (Türkiye, Bioanalyse), açıklamaları ve içerikleri ile Çizelge 3.1'de verilmiştir.

**Çizelge 0.1** *S. aureus*'in antibiyotik duyarlılık paternleri

| Antibiyotik | Simge | Doz (µg) |
|---|---|---|
| Metisilin | ME | 5 |
| Penisilin G | P | 10 |
| Ampisilin | AM | 10 |
| Sefaleksin | CL | 30 |
| Oksasilin | OX | 1 |

McFarlve'ın standart tüpü 0,5 baryum sülfat çökeltisi elde etmek için, 0,5 mL %1,175 baryum klorür [$BaCl_2.2H_2O$: $H_2O$ (W/V, 1,175 g: 98,825 mL)]'e %1 sülfürik asit [$H_2SO_4$: $H_2O$ (V/V, 1 mL: 99 mL)] eklenir. Çözelti, bir bakteri süspansiyonunun bulanıklığını belirlemek için 0,5 McFarlve standardı ile görsel olarak karşılaştırılır. Buharlaşmayı önlemek için McFarlve'ın standart tüpleri parafilm ile kapatılarak karanlıkta oda sıcaklığında 6 aya kadar saklanır. Hazırlanmış olan 0,5 McFarlve standardının doğruluğunu değerlendirmek için spektrofotometre kullanılır. 0,08 ile 0,1 arasında olması gereken optik yoğunluk 625 nm'de ölçülür (Humphries *et al.* 2018).

**Antibiyotik duyarlılık testi yöntemi**

Bu test, Kirby-Bauer yönteminden değiştirlerek aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir:

• Steril bir aşılama öznesi kullanılarak bir gecelik kültür plakasından toplam 4-5 bakteri izolatı kolonisi toplanır ve 0,5 McFarlve tüpü standardına eşdeğer olana kadar 5 mL steril normal salin içinde emülsifiye edilir.

• Tüpün yan tarafında biriken fazla sıvıyı almak için bakteri süspansiyonuna batırılmış steril bir bez kullanılır.

• Mueller-Hinton agar plakasının yüzeyine bir bakteri izolatı aşılanır

• Plakalar 37°C'de 18-24 saat süreyle inkübe edilir.

•Plakalar, inkübasyondan sonra antimikrobiyal diskleri çevreleyen bir bakteri üremesinin (berrak halkalar) olup olmadığını görmek için incelenir; İnhibisyon zonu yoksa organizma o diskteki antimikrobiyal ajana karşı dirençli olarak kabul edilir.

Eğer, disk bir inhibisyon bölgesi ile çevriliyse, inhibisyon bölgesinin çapı mm olarak ölçülür.

### 1.13.8 Dirençli izolatların C vitamini solüsyonu ile tedavisi

Beta-laktam antibiyotiklere dirençli izolatların farklı konsantrasyonlarda (5; 10; 20; 30 µg/mL) C vitamini solüsyonu ile tedavisinde, 1 mL kültürlü beyin kalp infüzyon suyuna 1 mL C vitamini solüsyonu eklenir.

### 1.13.9 Biyofilm oluşumu (kantitatif biyofilm üretim testi)

Bu yöntemde, menekşe kristali kullanılır. Biyofilmlerin 630 nm dalga boyundaki kütlesi ile menekşe kristali arasındaki optik yoğunluk değerleri ELISA ile okunarak belirlenir. Biyofilmlerin üretiminde, (Ghellai *et al.* 2014) tarafından açıklanan yöntem kullanılmıştır. Buna göre;

• Düz tabanlı kuyucukları aşılamak için 20 µL gece boyunca bekletilen bakteri kültürü kullanılır. (Ghellai *et al.* 2014). Kontrol kuyularında, %2 sakarozlu (her 25 mL beyin-kalp suyu için 0,5 gm sakaroz) 200 µL beyin kalp infüzyon suyu bulunur.

• Daha sonra, 37ºC'de 24 saat inkübasyon yapılır ve bu işlem sırasında mikrotitre plakasının üstü parafilm ile kapatılır.

• Yapışmayan bakteri hücrelerini temizlemek için fosfat tamponlu tuzlu su (pH=7,2) ile üç defa yıkanır. Ardından 15 dakika oda sıcaklığında kurumaya bırakılır. Kuruduktan sonra 200 µL menekşe kristali solüsyonu (%0,1) eklenir.

• Menekşe kristali solüsyonu kullanıldıktan sonra bağlanmamış boyayı uzaklaştırmak için tüm kuyucuklar fosfat tamponlu tuzlu su (pH=7,2) ile üç kez yıkanır ve oda sıcaklığında kuruması için bekletilir.

• En son olarak ELISA okuyucusu kullanılarak, her bir kuyunun absorbansı 630 nm'de ölçülür.

İzolatlar %20 gliserol içeren beyin kalp infüzyon suyundan oluşan besiyerinde -20ºC'deki derin dondurucuda uzun süre saklanabilir (Sharma *et al*. 2011)

### 1.13.10DNA ekstraksiyon protokolü

DNA ekstraksiyonu (Dashti *et al.* 2009) belirtilen aşamalara göre yapılmıştır (Şekil 3.1) Bu aşamalar aşağıdaki şekilde sıralanmıştır.

• Bakteriyel izolatlar, 37°C'de Nutrient agar ortamında 18 ile 24 saat kültüre alınır.

• Kolonilerin 2-3 'ünü 50 mL deiyonize su içeren 1,5 mL'lik eppendorf tüpüne aktarılır.

• Daha sonra 90-100 °C derece sıcaklık ve 5 dakika süre boyunca su banyosunda tutulur.

• Ardından ile 10 saniye Vortex ile karıştırılır ve 10,000 rpm hızda 10 dakika santrifüj edilir

• Elde edilen özüt 1 mL hacmindeki yeni bir tüpe aktarılır ve 4°C'de buzdolabında kullanılıncaya kadar saklanır.



**Şekil 0.1** Elde edilen özüt DNA

### 1.13.11Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) aşamaları

**Primer çiftlerinin hazırlanması**

Bu çalışmada, 10 mM Tris-HCl ve 1mM EDTA-$Na^{2}$'den oluşan primer çiftleri TE Tamponu (pH 8,0) içinde çözülmüştür. Böylece ilk önce astar stok tüpü hazırlanmış ve daha sonra çalışma solüsyonu yapılmıştır**.** 100 pikomol/mikrolitre primer stok çözeltisi konsantrasyonu elde etmek için prosedüre uygun olarak TE tamponu ilave edilmiştir. Çalışma solüsyonu, 10 pikomole/mikrolitre elde etmek için stok TE tamponu ile seyreltilerek elde edilmiştir (Green *et al.* 2012). PZR'de kullanılan primerler (Çizelge 3.2), NCBI Gen Bankası'ndaki diziler kullanılarak BLAST programı aracılığı ile belirlendi.

**Çizelge 0.2** PZR'de kullanılan ileri ve geri primer özellikleri

| Gen | Primer dizilemes (5' to 3') | Ürün Boyutu bp |
|---|---|---|
| Tn552 | F:CAAGCAAAGTGACAAGCGACA | 354 |
| | R:ACAACTCATACGCTGAGTCCA | |

### 1.13.12Reaksiyonların karışımı

DNA amplifikasyonu, Çizelge 3.3'de gösterildiği şekilde toplam hacmi 25 µL olacak şekilde hazırlanmıştır

**Çizelge 0.3** Reaksiyon karışımının içeriği

| Reaktif | Hacim |
|---|---|
| Yeşil Master Karışımı | 5 µL |
| DNA kalıbı | 10 µL |
| İleri primer | 2 µL |
| Ters primer | 2 µL |
| Steril distile su | 6 µL |
| Toplam | 25 µL |

### 1.13.13Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

Spesifik primer eşleşmeleri kullanılarak (Çizelge 3.4), hedef DNA'yı amplifiye etmek için geleneksel PZR kullanılmıştır. PZR belirli sayıda döngü için tekrarlanan üç adımdan oluşur. Çizelge 3.4 amplikon üretmek için kullanılan PZR'nin termal döngü koşullarını göstermektedir.

**Çizelge 0.4** PZR döngüsü

| Aşama | | Adımlar | Sıcaklık (ºC) | Süre (dk) | Döngü sayısı |
|---|---|---|---|---|---|
| İlk adım | | Ön denatüryason | 95ºC | 5:00 | 35 x Step2 |
| İkinci adım | I | Denatürasyon | 95ºC | 0:30 | |
| | II | Yapışma | 55ºC | 0:30 | |
| | III | Uzama | 72ºC | 0:40 | |
| Üçüncü adım | | Final Uzama | 72ºC | 5:00 | |

### 1.13.14Agaroz jel elektroforezi

En etkili yöntem, agaroz jel elektroforezi üzerinde DNA parçalarını ayırmaktır. Bir jeldeki agaroz miktarı, ayrılacak DNA parçalarının boyutuna bağlı olarak % 0,5 ile %2 arasında değişmektedir (Lee *et al.* 2012). Ekstraksiyondan sonra, genomik DNA'nın (5-

10 kb) iyi bir şekilde ayrılmasını sağlamak için %0,7 'lik bir jel kullanılırken, küçük PZR ürün fragmanlarında (0,2-1 kb) için yüksek bir çözünürlük elde etmek için ise %1,5-%2'lik jeller kullanılmaktadır. Bunun için, agaroz jelin belirtilen ağırlığına 100 mL 1TBE tamponu ilave edilir ve mikrodalgaya konularak çözelti berraklaşıncaya kadar eritilir. Daha sonra, agaroz jel 50-55°C'ye soğutulur. 0,5 µL/mL'lik konsantrasyon elde etmek için 100 mL eriyen agaroz jeline 5 µL boya ilave edilir (Sambrook and Russell 2006). En son olarak agaroz jel tepsiye dökülür, uçları kapatılarak tarak uygun şekilde yerleştirilir ve sonra kurumaya bırakılır.

Markör bir kuyuya numuneler ise jel üzerindeki diğer kuyulara yüklenir. Ardından, elektrotlar uygun şekilde bağlanarak, jel boyutuna uygun olarak çalıştırılır. Ortalama olarak genomik DNA için agaroz jel elektroforezi 45 dakika, PZR ürünleri için ise 1 saat 30 dakika sürer. (Şekil 3.2) Jel elektroforez aşamaları aşağıda belirtildiği şekilde ilerlemektedir.

• Jel döküm tepsisi tarağın dişleri jelin altından yaklaşık 0,5 mm yukarıda kalacak şekilde plastik tepsiye yerleştirilir

• 500 mL deiyonize suya 50 mL TBE (10X) stok solüsyonu eklenir

• 500 mL'lik bir şişeye 100 mL tampon TBE(1X) ve 0,8 g agaroz dökülür. Çözelti yaklaşık 10 dakika mikrodalga ile sıcak bir plaka üzerinde ısıtılarak agarozun erimesi sağlanır. Agarozun görünür agaroz partikülleri olmadan tamamen çözülmesini sağlamak için agaroz solüsyonunu hafifçe döndürülür.

•Agaroz solüsyonunu yaklaşık 50°C'ye kadar soğutulurak üzerine 2-3 µL etidyum bromür stok solüsyonu eklenir. Daha sonra agaroz yavaş, sabit bir akışla jel döküm tepsisine dökülür ve hava kabarcıklarını giderilir.

• Tarak jelin kenarından yaklaşık 1,5 cm uzağa yerleştirilir. Agarozun katılaşması için 20-30 dakika beklenir ve agaroz sertleştiğinde jele zarar vermeden tarak ileri geri hafifçe hareketlerle çıkarılır.

• Jel döküm tepsisini çıkarılır ve jel kutusu merkezi destek platformuna yerleştirilir.

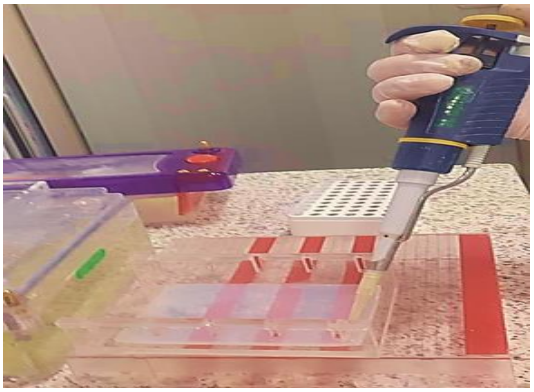
• Jel yüzeyinden 0,5–1 cm yüksekliğe ulaşana kadar tampon haznesini elektroforez tamponu ile doldurulur.

• Numuneler kuyucuklara yerleştirilir. Numuneler yavaşça dışarı atılarak kuyunun dibine batması sağlanır. Numuneler, kuyulara düzgün bir sırayla yerleştirilmelidir. Kuyu sayısından daha az numune yüklenecekse jelin kenarına en yakın kuyucuklar boş bırakılmalıdır.

• Jelin her iki tarafındaki kuyucuklara (numune hattının yanında) 5 µL markör diğer kuyuya 20 µL DNA numunesinin yüklenir.

• Jel kutusunun kapağını kapatılır ve elektrotlar bağlanırç Güç kaynağını açılır. DNA'nın kuyudan pozitif (kırmızı) elektrota doğru ilerlemesi beklenir. Bu işlem jel boyunca minimum 10 cm hareket edene kadar devam eder.

• En son olarak, DNA bir UV transillüminatör altında gözlenir ve görüntülenir.



**Şekil 0.2** Agaroz jel elektroforezi

### 1.13.15Biyogüvenlik ve tehlikeli maddelerin imha edilmesi

Çalışma sırasında, tüm swabların, Petri kaplarının ve kontamine materyallerin otoklavlama ve ardından otoklavlanması işlemleri sırasında tüm biyogüvenlik prosedürlerine uyulmuştur. Çalışma öncesi ve sonrası tüm ekipmanlar %70 alkol ile temizlenmiştir. Ayrıca, biyolojik tehlikeyi azaltmak için etidyum bromür yerine Simply Safe kullanılmıştır (Bergen and Shelhamer 1996)

### 1.13.16İstatistiksel analiz

Örnekteki kadın ve erkek sayısını karşılaştırmak ve örneklerin bir antibiyotik veya c vitamini içeren bir antibiyotik kullanımına duyarlılığını karşılaştırmak için (spss) ve ki kare kullanılarak istatistiksel analiz yapıldı.

# BULGULAR VE TARTIŞMA

## 1.14 Mikroskobik İnceleme

İdrar yolu enfeksiyonu hastalarından (50 erkek ve 50 kadın), Kasım 2020 ile Haziran 2021 arasında, Al Hussein Eğitim Hastanesi ve Al Refaee Eğitim Hastanesinde olmak üzere toplam 100 orta akım idrar örneği alınmıştır. İdrar örnekleri karıştırıldıktan sonra alikuotlar 5000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Klinik izolatlardan ≥10 beyaz kan hücresi/$mm^3$ olan numuneler piyüri (irin hücresi) olarak kabul edilmiştir

## 1.15 Klasik ve biyokimyasal tanımlama

Sodyum klorürün bileşenleri stafilokoklar için seçici ve ayırıcı bir besiyeri olarak kabul edildiğinden *Staphylococcus spp*. örnekleri kanlı agar ve mannitol tuzu agar besiyerinde kültüre alınır.

• Bazı izolatlar mannitolü fermente ederek geniş sarı bölgelerle çevrili büyük altın koloniler oluşturur. Bu arada besiyerinin rengini pembeden sarıya değişir (Şekil 4.1 A).

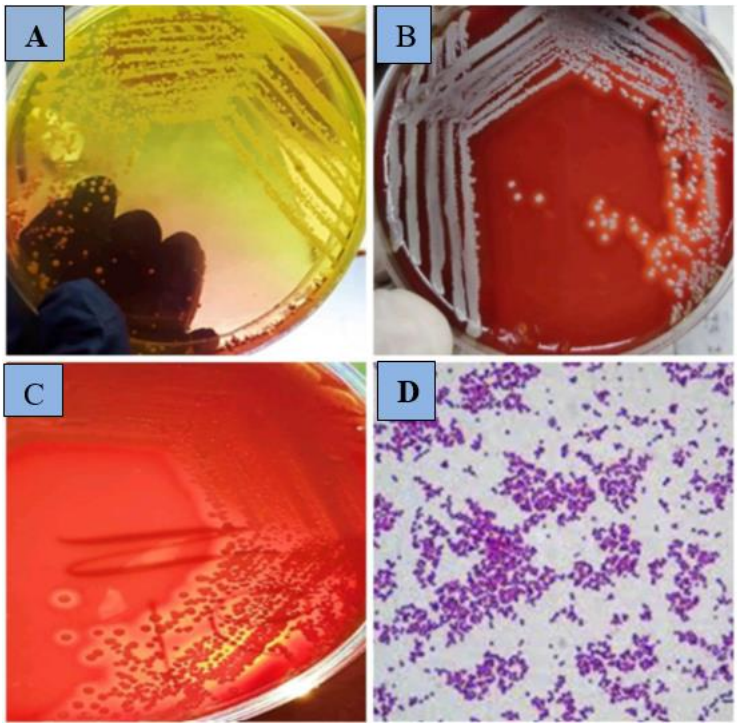
• *S. aureus* izolatları, kanlı agar üzerinde gri pigmentli, pürüzsüz, dışbükey ve hemolitik (Şekil 4.1 B) ve β-hemolitik koloniler oluşturmaktadır (Şekil 4.1 C).

• Gram boyama ile boyandıktan sonra bu izolatlar ışık mikroskobu altında Üzüm benzeri düzensiz kümeler halinde gram pozitif koklar oluşturur (Şekil 4.1 D).

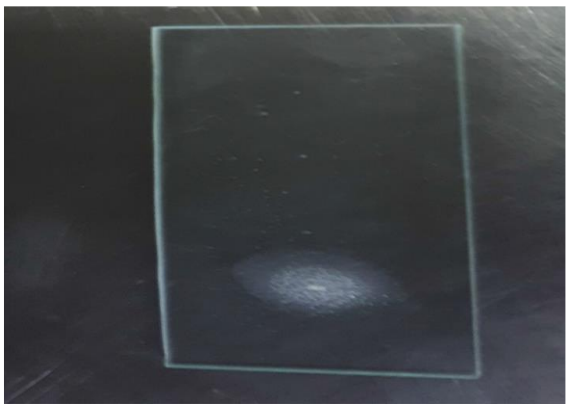
• Uygulalan biyokimyasal testler Çizelge 4.1'de gösterilmiştir. Buna göre; mannitol tuzu agar, katalaz, (Şekil 4.2) ve koagülaz testi pozitif sonuç (Şekil 4.3) alırken oksidaz testi negatif olarak tespit edilmiştir.

**Çizelge 0.1** *Staphylococcus aureus*'un biyokimyasal özellikleri

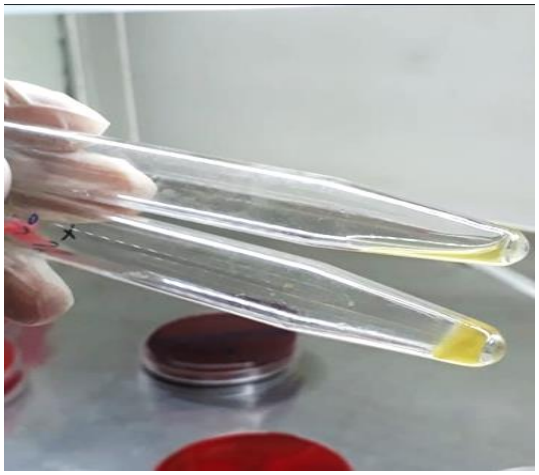
| Test | Sonuçlar |
|---|---|
| Katalaz | + |
| Koagülaz | + |
| Oksidaz | - |
| Mannitol fermentörü | + |




**Şekil 0.1** A**.** Mannitol salt agar üzerinde *S. aureus* kolonileri, B**.** Kanlı agar üzerinde *S. aureus* kolonileri, C**.** Kanlı agarda β-hemolitik koloniler, D**.** Kümeler halinde gram pozitif koklar (100x)



**Şekil 0.2** Katalaz testi



**Şekil 0.3** Koagülaz testi pozitif ve negatif

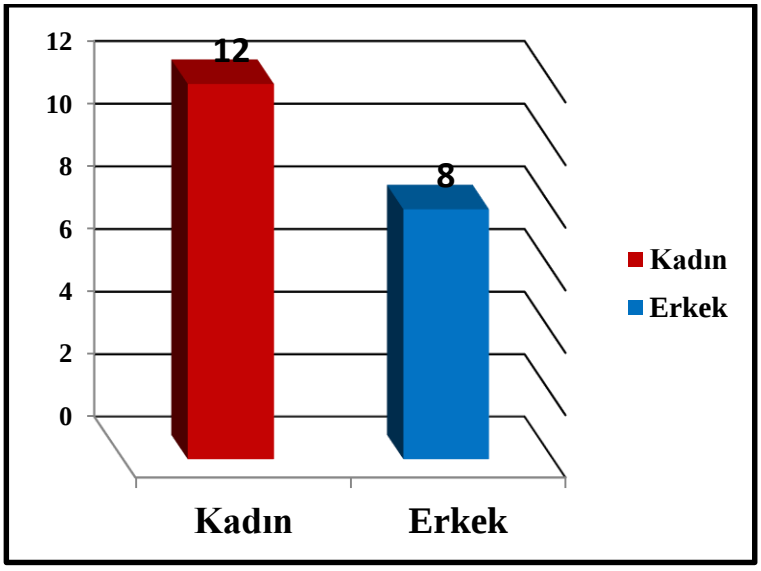
Vitek-2 sistemi kullanılarak, elde edilen toplam 100 orta akım idrar örneğinden, 20 (%20) izolatta *S. aureus* tanımlanmıştır

### 1.16 *S. aureus* İzolatlarının Yaş ve Cinsiyete Göre Dağılımı

Bu çalışmada belirlenen 20 izolattan 12'si (%60) kadınlarda 8'i (%40) erkeklerde tespit edilmiştir (Çizelge 4.2). Böylece kadınlarda (%60) erkeklere göre (%40) daha fazla oranda *S. aureus* olduğu bulunmuştur. Bunun nedeni olarak, kadınlarda yüksek oranda meydana gelen İYE sıklığı, üretranın daralması ve üretral meatusun perianal bölgesinin vajina ve anüse yakınlığı ve vücuttaki mikroflora değişiklikleri gibi çeşitli sebepler sayılabilir.

**Çizelge 0.2** *S. aureus* izolatlarının cinsiyet ve yaşa göre dağılımı

| Yaş grubu | Cinsiyet | | Toplam |
|---|---|---|---|
| | Erkek | Kadın | |
| 11-30 | 2(10%) | 35% | 5(25%) |
| 31-50 | 3(15%) | 35% | 4(20%) |
| 51-70 | 3(15%) | 30% | 3(15%) |
| Toplam | 8(40%) | 100% | 12(60%) |




**Şekil 0.4** Cinsiyete göre İYE oranı

Kadınların oranı %60, erkeklerin oranı ise %40'tı ve oranlar mağnasal imaj, %5 olasılık düzeyinde farklıydı ve ki-kare kullanıyordu.

### 1.17 Antibiyotik Duyarlılık Testi

Antimikrobiyal duyarlılık testi Metisilin, Penisilin G, Ampisilin, Cephaleksin ve Oksasilin olmak üzere beş antibiyotiğe karşı kerby dökme yayma disk yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Klinik Laboratuvar Stveartları Enstitüsü (CLSI) Kılavuzları (2018). Burada amaç, MRSA ile yaygın olarak ilişkilendirilen çoklu ilaç direnci modelini ve bu tip bakteriler için en etkili tedavi yöntemini belirlemektir. Çizelge 4.3'de idrardan izole edilen *S. aureus* için antibiyotik duyarlılık dağılımını gösterilmiştir. Antibiyotikler arasındaki direnç oranları; Metisilin %95 (19), penisilin G, sırasıyla %90 (18), Ampisilin %85 (17) ve Sefaleksin %85 (17) ve Oksasilin %80 (16) olarak sıralanmaktadır.

**Çizelge 0.3** Antibiyotik duyarlılık testi sonuçları, R (direnç), I(orta), S (duyarlı)

| İzole Sayısı | Enfeksiyon kaynağı | Antibiyotik Direnç Modelleri | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | ME | P | AM | CL | OX |
| 1 | İdrar | R | R | R | R | R |
| 2 | İdrar | R | R | R | R | R |
| 3 | İdrar | R | R | R | R | R |
| 4 | İdrar | R | R | R | R | R |

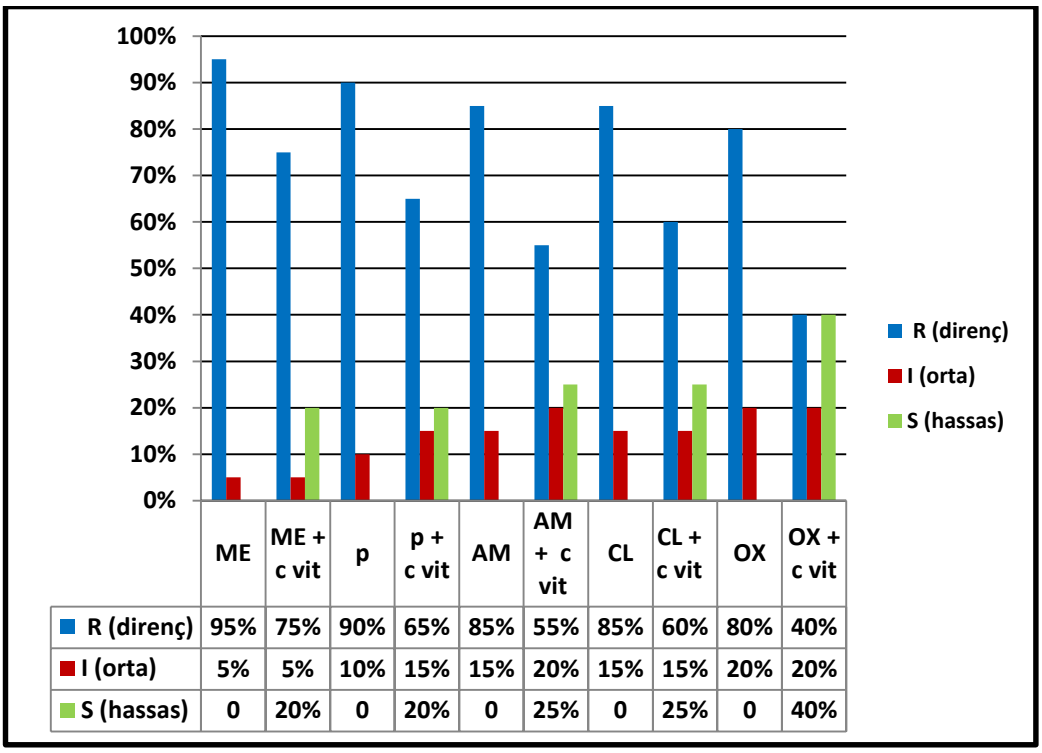
| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 5 | İdrar | I | R | I | I | I |
| 6 | İdrar | R | R | R | R | R |
| 7 | İdrar | R | R | R | R | R |
| 8 | İdrar | R | R | R | I | R |
| 9 | İdrar | R | R | R | R | R |
| 10 | İdrar | R | R | R | R | R |
| 11 | İdrar | R | R | I | R | R |
| 12 | İdrar | R | I | R | R | R |
| 13 | İdrar | R | I | R | I | I |
| 14 | İdrar | R | R | R | R | R |
| 15 | İdrar | R | R | R | R | R |
| 16 | İdrar | R | R | R | R | R |
| 17 | İdrar | R | R | R | R | I |
| 18 | İdrar | R | R | I | R | I |
| 19 | İdrar | R | R | R | R | R |
| 20 | İdrar | R | R | R | R | R |

Daha sonra izolatlar farklı konsantrasyonlarda (5; 10; 20; 30 µg/mL'lik) hazırlanan C vitamini solüsyonu ile muamele edildikten sonra beyin kalp infüzyon suyuna eklenmiştir. Beş antibiyotiğe (Metisilin, penisilin G, Ampisilin, Sefaleksin, Oksasilin) karşı antimikrobiyal duyarlılık testi oranları, tedavi öncesi ve C vitamini tedavisinden sonra olmak üzere kayıt altına alınmıştır. Elde edilen sonuçlara göre farklı konsantrasyonlarda uygulanan C vitamini tedavisi ile antibiyotik direnç yüzdesi azalmıştır. Uygulanan 5, 10 ve 20 µg/mL izolatların antibiyotiğe karşı direncini azaltırken Metisilin %75 penisilin G %65 Ampisilin %55 Sefaleksin %60 ve Oksasilin %40, 30 µg/mL C vitamini konsantrasyonu tüm izolatların büyümesini inhibe etmiştir (Çizelge 4.4).

**Çizelge 0.4** C vitamini 20 µg /mL ile tedavi sonrası antibiyotik duyarlılık testi sonuçları. R (direnç), I(orta), S (hassas)

| **İzole Sayısı** | **Enfeksiyon kaynağı** | **Antibiyotik Direnç Modelleri** | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | **ME** | **P** | **AM** | **CL** | **OX** |
| 1 | İdrar | R | R | I | R | I |
| 2 | İdrar | R | R | R | R | R |
| 3 | İdrar | R | R | R | R | R |
| 4 | İdrar | R | I | I | S | S |
| 5 | İdrar | S | S | S | S | S |
| 6 | İdrar | R | R | R | R | R |
| 7 | İdrar | R | R | R | R | R |
| 8 | İdrar | R | I | I | I | S |
| 9 | İdrar | R | R | R | R | R |
| 10 | İdrar | R | R | R | R | I |
| 11 | İdrar | I | I | S | S | S |
| 12 | İdrar | S | S | S | I | S |
| 13 | İdrar | S | S | S | S | S |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 14 | İdrar | R | R | R | R | R |
| 15 | İdrar | R | R | R | R | I |
| 16 | İdrar | R | R | R | R | I |
| 17 | İdrar | R | R | I | I | S |
| 18 | İdrar | S | S | S | S | S |
| 19 | İdrar | R | R | R | R | R |
| 20 | İdrar | R | R | R | R | R |




| | ME | ME + c vit | p | p + c vit | AM | AM + c vit | CL | CL + c vit | OX | OX + c vit |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| R (direnç) | 95% | 75% | 90% | 65% | 85% | 55% | 85% | 60% | 80% | 40% |
| I (orta) | 5% | 5% | 10% | 15% | 15% | 20% | 15% | 15% | 20% | 20% |
| S (hassas) | 0 | 20% | 0 | 20% | 0 | 25% | 0 | 25% | 0 | 40% |

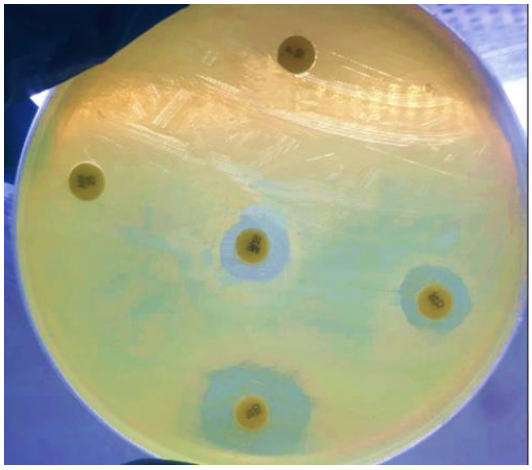
**Şekil 0.5** C vitamini 20 µg /mL ile tedavi öncesi ve sonrası antibiyotik duyarlılık testi sonuçları yüzdesi

Duyarlılık mağnasal farklıydı, vitamin antibiyotikle birlikte kullanıldığında, kontrol grubu ve sadece antibiyotik grubu ile karşılaştırıldığında P değeri <0,05 idi.

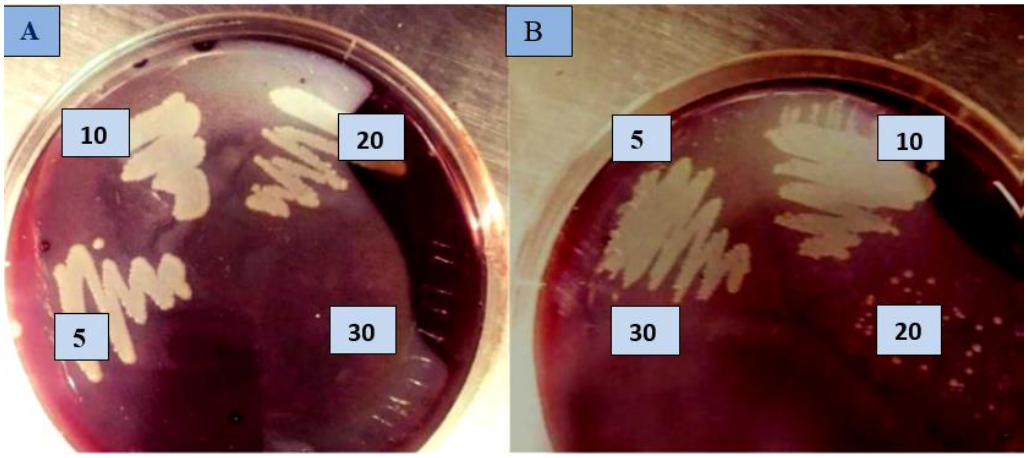
### 1.18 *S. aureus* Fenotipi Üzerinde Askorbik Asidin Etkisi

Şekil 4.6'da C vitamini ile tedavi edilmeden önceki bakteriyel direnç oranlarında artış gösterilmiştir. Ancak, C vitamininin belirli konsantrasyonlarda kullanılması ile bakteri üremesini engellenmiştir (Şekil 4.7, Şekil 4.8). Bu durum C vitamininin antibakteriyel olarak önemini ortaya koymuştur. Yüksek dozlarda askorbik asidin, akut bakteriyel

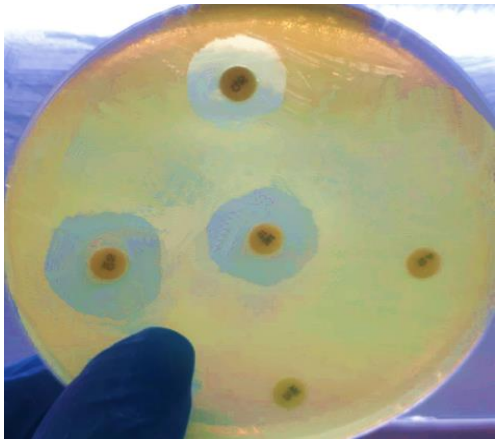
hastalıklara karşı kullanılması uygun antibiyotiklerle sinerjistik olarak çalıştığını ve antibiyotiklerin aktivite spektrumunu önemli ölçüde genişlettiğini öne çıkarmıştır.



**Şekil 0.6** C vitamini ile tedavi edilmeden önceki inhibisyon bölgesi




**Şekil 0.7** Kanlı agar besiyerinde antibakteriyel olarak C vitamini uygulaması



**Şekil 0.8** C vitamini 20 µg /mL ile tedavi edildiğinde inhibisyon bölgesi

Bu çalışmada, 5, 10 µg/mL C vitamini konsantrasyonu bakteriler üzerinde herhangi bir etki yapmazken, 20 µg/mL C vitamini konsantrasyonu bakteri üremesini etkili bir şekilde kontrol ederek bakterilerin antibiyotiklere karşı direncinde bir azalmaya neden olmuştur. 30 µg/mL konsantrasyonuna gelince, bakteriler için tamamen öldürücü bir konsantrasyondur ve fenotip sonuçlarının ile genotip sonuçlarıyla birbiriyle uyumludur.

### 1.19 *S. Aureus* İzolatlarında Biyofilm Oluşumu

*S. aureus* izolatlarının kapasitesi, biyofilm oluşturmak için mikrotiter plakalar (MTP) yöntemi ile test edilmiştir. MTP yöntemi, birçok araştırmacıya göre biyofilm üretimini incelemek ve belirlemek için doğru bir yöntemdir. Bu nedenle bu çalışmada da bu yöntem kullanılmıştır. Yöntem 20 *S. aureus* izolatına uygulanmıştır. Biyofilmlerin miktarı, 630 nm'de lekeli biyofilmlerin absorbansını ölçmek için bir mikrotitre plaka okuyucusu kullanılarak belirlenmiştir. *S. aureus* izolatlarının %70'inde (14) yüksek biyofilm oluşumu (güçlü pozitif yapışma), %25 'inde (5) orta düzeyde biyofilm oluşumu gözlemlenmiştir. İzolatlarının %5 'inde (1) ise biyofilm oluşmamıştır.

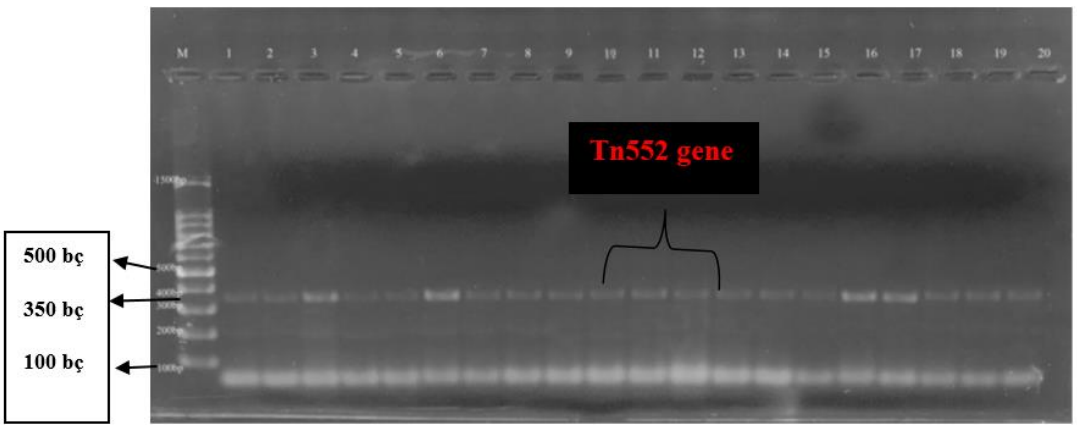
Ayrıca C vitamininin farklı konsantrasyonlarında biyofilm oluşum yüzdeleri arasında fark bulunmuştur C vitamininin, 5 ve 10 µg/mL konsantrasyonunda izolatların biyofilm oluşumuna hiçbir etkisi yokken, 20 µg/mL konsantrasyonda en yüksek etki görülmüştür. 30 µg/mL konsantrasyon tüm izolatların büyümesini inhibe etmiştir (Çizelge 4.5).

**Çizelge 0.5** C vitamini 20 µg /mL ile tedavi öncesi ve sonrası biyofilm sonuçları

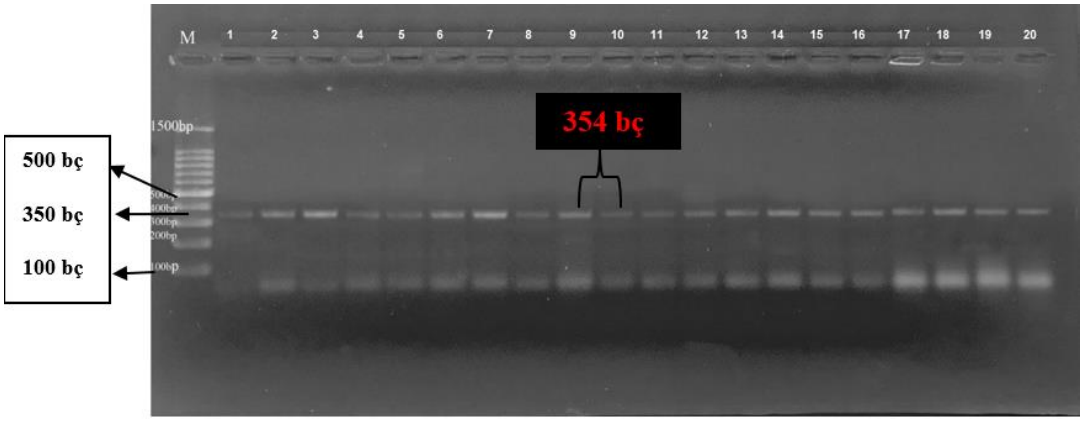
| Biyofilm Standtart OD aralığı | biyofilm | C vitamini ile tedavi edilmeden önceki *S. aureus* sayısı | C vitamini 20 µg/mL konsantrasyonda ile tedavi edildikten sonra *S. aureus* sayısı |
|---|---|---|---|
| <0,120 | Olmayan | 1 (%5) | 6 (%30) |
| 0,120-0,240 | Orta | 5 (%25) | 8 (%40) |
| >0,240 | Yüksek | 14 (%)70 | 6 (%30) |

## 1.20 *S. aureus* İzolatları Arasında Tn552 Geninin Moleküler Tespiti

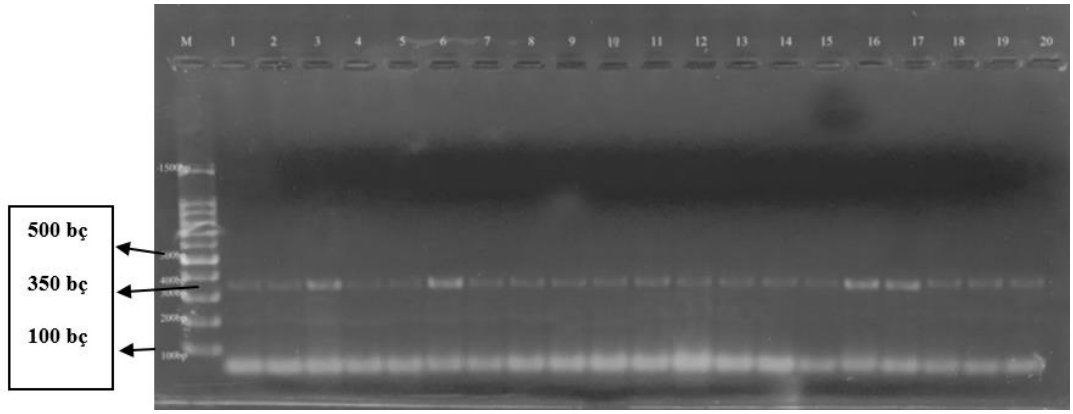
Bu çalışma ülkede yaygın olarak kullanılan ilaç grubunun *S. aureus* izolatlarına karşı direncinden sorumlu olan Tn552 geninin moleküler tespitini içermekte olup, PZR sonuçları ile bakterilerin fenotipik sonuçları arasında uyumluluk tespit edilmişitir. C vitamini ile tedavi edilmeden önceki Tn552 geninin PZR sonuçları Şekil 4.9'da 5 ve 10 µg/mL C vitamini konsantrasyonu ile tedavi edildikten sonraki sonuçları ise Şekil 4.11'de gösterilmiştir. Şekil 4.10'da sırasıyla 20 µg/mL konsantrasyonla tedavi edildikten sonra bu gene PCR sonuçları Şekil 4.12'deki gibi %40'a düşürülmüştür.



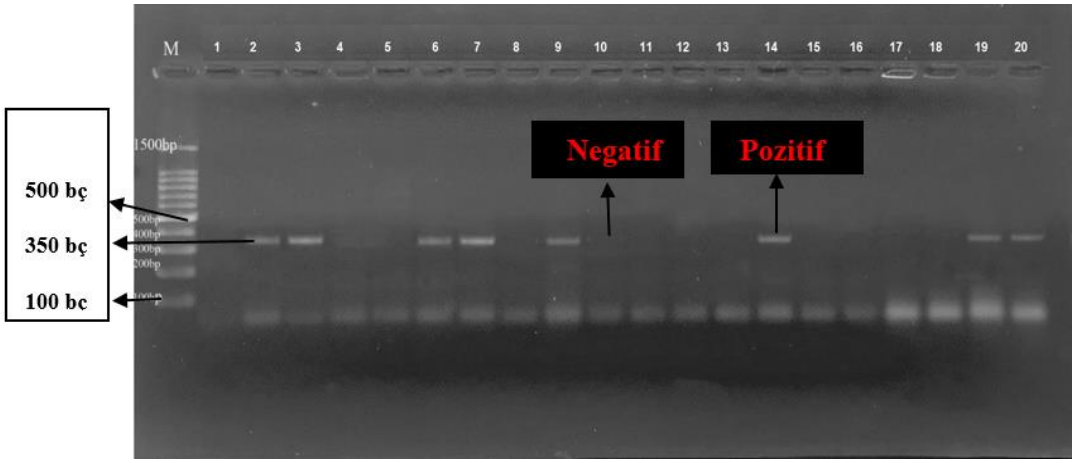

**Şekil 0.9** C vitamini ile muamele edilmeden önce %1 agaroz jel elektroforezinde Tn552 geninin (354bp) PCR ürünü




**Şekil 0.10** C vitamini ile muamele edildikten sonra %1 agaroz jel elektroforezinde Tn552 geninin (354bp) PCR ürünü




**Şekil 0.11** C vitamini 10 µg / mL ile muamele edildikten sonra %1 agaroz jel elektroforezinde Tn552 geninin pozitif PCR ürünü




**Şekil 0.12** C vitamini 20 µg/mL ile muamele edildikten sonra %1 agaroz jel elektroforezinde Tn552 geninin negatif PCR ürünü

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Elde edilen kültür sonuçları, 100 idrar örneğinden sadece 20'sinde *Staphylococcus aureus* espit edilmiştir. Bu sonuçlar, tüm bakteri izolatlarının mikroskobik inceleme, morfoloji karakteristiği, biyokimyasal testler ve vitiK2 sistemi gibi birçok karaktere göre tanımlandığını göstermiştir.

(Mulu *et al.* 2012) tarafından yapılan çalışma, 200 idrar numunesi arasında pozitif bakteri üreme sayısının 137 olduğu ve izole edilen izolatların 46'sında (%33,6) *S. aureus'*a oluştuğu ve 45'inde (%97,8) MDR oranının arttığını bildirilmiştir Ayrıca çalışmamızda izole edilen *S. aureus* oranının 11-50 yaş aralığındaki yaş gruplarında daha fazla görüldüğü fark edilmiştir. Bunun nedeni, bu yaş grubunun diğer yaş grupları arasında hem fiziksel hem de sosyal olarak aktif ve enfeksiyona karşı daha savunmasız olması olarak açıklanabilir.

Bazı izolatlar mannitolü fermente edebilmiş ve geniş sarı bölgelerle çevrili büyük altın koloniler oluşturabilmiştir, besiyerinin rengini pembeden sarıya çevirmiştir. Diğerleri besiyerinde renksiz az sayıda beyaz koloni gösteren mannitol olmayan fermenterlerdir. (De Visscher *et al.* 2013).

Bu çalışmada kullanılan *Staphylococcus aureus* izolatları yaş ve cinsiyet bakımından incelendiğinde, 12 (%60) kadın ve 8 (%40) erkek birey olarak ayrılmaktadır. Kadın bireylerde sayınnın fazla olması genellikle vajina ve idrar yolu arasındaki anatomik yakınlık ile vajinanın idrar mikrobiyal topluluğunun ana kaynağı olmasından dolayı kaynaklandığı düşünülmektedir (Perez-Cruz *et al.* 2003).

*S. aureus* enfeksiyon hastalıkları, başta MRSA olmak üzere çoklu ilaca karşı dirençli suşların gelişmesi nedeniyle dünya çapında sağlık çalışanları için önemli bir sorun olarak bilinmektedir (Gurung *et al.* 2020). Aynı zamanda MRSA izolatları yoluyla meydana gelen yüksek *S. aureus* enfeksiyonu insidansı, halk sağlığı için önemli bir endişe kaynağıdır. MRSA enfeksiyonunun tedavisi zordur ve bu enfeksiyon *S. aureus'*un hassas

metisilin izolatlarına kıyasla yüksek mortalite ve morbidite ile ilişkilendirilir (Gajdács 2019). Bunun nedenleri antibiyotiklerin yanlış kullanımı ve kişilerin kendi kendine tedavi etmesi amacıyla ilaç kullanması olarak açıklanabilir. Bu ilaçların düşük maliyetli ve kullanım için hazır bulunmaları bu sorunun giderek artmasına neden olmaktadır. Özellikle üçüncü dünya ülkelerinde, antibiyotiklerin genel nüfus tarafından sıklıkla ve bilinçsizce kullanılması ile bakterilerin yaygın, ucuz ve geniş spektrumlu antibiyotiklere karşı hızla direnç kazandığını görülmektedir (Levy and Marshall 2004). Antibiyotiğe karşı dirençli olan bakteri alt gruplarında veya MIC'deki küçük bir artış bile, daha yüksek düzeyde direncin başladığını gösterebilir (Dell'Acqua *et al.* 2004). Kısaca antibiyotik direncinin artmasına katkıda bulunan her unsur kritik öneme sahiptir. Bakterilerin antibiyotik direncindeki artış, modern tıbbın birçok ilerlemesini geçersiz kılmaktadır. Yüksek direnci önlemek ve antibiyotik aktivitesini sürdürmek için, dirençli suşların evrimsel gelişimini etkisiz hale getirmenin, değiştirmenin ve hatta tersine çevirmenin yollarını bulmalıyız**.** Bu direncin üstesinden gelmek için; öncelikle farmakolojik stratejiler geliştirilmelidir. Daha sonra kimyasal özelliklerin araştırılması ve bakterileri çevreleyen ve çeşitli ilaçların art arda veya eşzamanlı kullanımı yoluyla dirence duyarlılığını geliştirmeye yardımcı olan koşulların iyi bilinmesini gerekmektedir.

Bakteriyel direnç oranlarındaki sürekli artıştan sonra, antibiyotiklerin yerini alan veya bakteri direncini azaltmak için çalışan alternatif ve güvenli prosedürlerin araştırılması gerekli hale gelmiştir. Bunlardan C vitamini ve askorbik asit uygulamaları en sık kullanılan alternatif yöntemlerdir. C vitamini önemli bir antibakteriyel olarak bilinmektedir. Çalışmamızda uygulanan C vitamini konsantrasyonları farklı sonuçların doğmasına neden olmuştur. En etkili konsantrasyon 20 µg/mL olarak karşımıza çıkarken 30 µg/mL ve 5,10 µg/mL konsantrasyonunda tüm izolatların büyümesinin inhibe edildiği gözlemlenmiştir. Konsantrasyonlarının izolatların büyümesi ve antibiyotiğe dirençli olması üzerinde küçük bir etkisi vardır. Askorbik asit ise; antibakteriyel, antiviral aktiviteye sahiptir ve bağışıklık fonksiyonunu uyarmak (fagositik lökositleri aktive etmek) (Pauling 1974), enfeksiyonun şiddetini ve süresini azaltmak (Hemilä 1992) ve bakteriyel bir enfeksiyonun neden olduğu iltihabı azaltmak için kullanılmaktadır (Arwa Hammodi Karim 2005).

Askorbik asidin antibiyotiklerle sinerjistik etkisi, askorbik asidin bakteri hücreleri içindeki protein sentezi ile ilişkili bazı metabolik aktiviteler üzerindeki etkisi ve hücre zarı üzerindeki etkisiyle organizmaları antibiyotiklere daha geçirgen hale getirmesi ve daha kolay ve daha büyük penetrasyon sağlamasıyla açıklanabilir (Kramarenko *et al.* 2006). Bazı antibiyotikler farklı bakteri türlerinde reaktif oksijen türlerinin (serbest radikal) indüklenmesini uyarmaktadır (Becerra and Albesa 2002, Albesa *et al.* 2004). Bu nedenle askorbik asit bu serbest radikal için temizleyici görevi görebilir. Öte yandan, Stafilokoklarda antibiyotik direncinin kaybı, plazmit kaybına yol açan askorbik asidin (kür ajanı olarak işlev görür) olası plazmit kürleme etkisinden kaynaklanmaktadır (Cuevas 1988).

*S. aureus* izolatlarının biyofilm oluşturma kapasitesi mikrotiter plakalar (MTP) yöntemi ile test edilmiştir (Mathur *et al.* 2006). Bu yöntem, biyofilm üretimini incelemek ve belirlemek için doğru bir yöntemdir. Bu nedenle bu çalışmada bu yöntem kullanılmıştır. Bu çalışmada bu yöntem 20 *S. aureus* izolatına uygulanmıştır ve biyofilmlerin miktarı 630 nm'de lekeli biyofilmlerin absorbansını ölçmek için bir mikrotitre plaka okuyucusu kullanılarak belirlenmiştir. Buna göre, 20 µg/mL C vitamini konsantrasyonu biyofilm oluşum yüzdesini azaltarak biyofilm oluşumuna etki etmiştir. Ancak, 5 ve 10 µg/mL C vitamini konsantrasyonunun izolatların biyofilm oluşumuna hiçbir etkisi yoktur. 30 µg/mL C vitamini konsantrasyonu tüm bakteri izolatlarını inhibe etmesi nedeniyle biyofilm oluşumunda etkili olmamıştır (Seif-El-Din *et al.* 2011). Küresel olarak, son yıllarda biyofilm ile ilişkili mikroplara bağlı enfeksiyon insidansı artmıştır. Biyofilm üreten mikroorganizmalar, bağışıklık tepkisi ve antimikrobiyal ilaçlarda önemli ölçüde artan direnç gösterir çünkü Biyofilmler halk sağlığı için önemli bir tehdittir. Özellikle**,** MDR mantar ve bakteri türlerinin yaygınlığındaki büyüme, halk arasında salgınlara yol açmıştır (Ghaly *et al.* 2020).

*S. aureus'*ta biyofilm üretimi antibiyotik penetrasyonunu azaltmaktadır. Bu durum, bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisini çok zorlaştırmaktadır (Bissong *et al.* 2020). Geleneksel antibiyotikler bu patojenleri ortadan kaldırmada etkisizdir. Bu çalışmada, biyofilm üreten her izolatın antibiyotiğe dirençli olduğu gösterilmiştir (Neopane *et al.* 2018). Sonuç olarak, C vitamini metisiline dirençli *S. aureus*'un

biyofilmler (MRSA) oluşturmasını önleyebilir ve C vitaminine düşük düzeyde direnç (8 ila 16 /mL) gösterebilir (Mirani *et al*. 2018). pH'sı nötrleştirilmiş C vitamini, *S. aureus* büyümesini küçük bir oranda etkilemiştir (Kallio *et al.* 2012).

PZR sonuçları bakterilerin fenotipik sonuçları ile uyumluluk göstermiştir. Tn552 geninin PZR sonuçları, C vitamini ile tedavi edilmeden önce ve 5 ve 10 µg/mL C vitamini ile tedavi edildikten sonra tüm izolatlarda %100 olarak belirlenmiştir. 20 µg/mL konsantrasyonla tedavi edildikten sonra sonuç %40 olarak bulunmuştur. Bu durum, antibiyotiğe dirençli bakterilerin virülans faktörlerinden biri üzerinde C vitamininin antibakteriyel etkisini doğrulamıştır. Öte yandan, Stafilokoklarda antibiyotik direncinin kaybı, askorbik asidin olası plazmit kürleme etkisinden kaynaklanıyor olabilir. Bu da plazmit kaybına yol açar (Cuevas 1988). C vitamini, insanlar için çeşitli sağlık yararları ile bağlantılı önemli bir besindir. C vitamini ile ilgili kardiyovasküler hastalıklara olan etkisinden, kronik hastalıkların önlenmesine ve bağışıklığı artırmaya kadar son zamanlarda yapılan çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Bunlar C vitamininin antioksidan özellikleriyle bağlantılı olarak sürdürülen çalışmalardır (Aune *et al.* 2018, Lundqvist *et al.* 2014). Bu durum, Antibiyotiklerin yerini alacak veya bakteri direncini azaltmak için alternatif ve güvenli prosedürlerin araştırılması gerekli hale getirmiştir.

Tüm elde edilen veriler değerlendirildiğnde sonuç olarak *S. aureus'un* neden olduğu İYE, kadınlarda erkeklere göre daha yüksek oranda olduğu tespit edişmiştir. *S. aureus* izolatları bu çalışmada kullanılan antibiyotiklere karşı çoklu ilaç dirençliliği ve farklı biyofilm oluşumları göstermiştir. C vitamininin uygulanan 5 ve 10 µg/L l konsantrasyonlarında antibakteriyel etki gözlemlenmemiştir. Ancak, uygulanan 20 µg/mL C vitamini konsantrasyonu, antibiyotiğe dirençli yüzdeyi ve biyofilm oluşumunu azaltarak net bir antibakteriyel etki göstermiştir. Bu nedenle Enfeksiyöz nedenlerin patogenezini azaltmak için ilaçla birlikte antibakteriyel ajan olarak C vitamini kullanılması önerilmektedir.

## KAYNAKLAR


Ahmed, S. S., Shariq, A., Alsalloom, A. A., Babikir, I. H. & Alhomoud, B. N. 2019. Uropathogens and their antimicrobial resistance patterns: Relationship with urinary tract infections. International Journal of Health Sciences, 13(2): 48

Al-Kobaisi, M. F. 2007. Jawetz, melnick & adelberg's medical microbiology. Sultan Qaboos University Medical Journal, 7(3): 273.

Al-Talib, H., Yean, C. Y., Al-Khateeb, A., Hasan, H. & Ravichandran, M. 2014. Rapid detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus by a newly developed dry reagent-based polymerase chain reaction assay. Journal of Microbiology, Immunology and Infection, 47(6): 484–490.

Al-Talib, H., Yean, C. Y., Al-Khateeb, A. & Ravichandran, M. 2013. Comparative evaluation of three different methods of genomic DNA extraction for Staphylococcus aureus. World Appl Sci J, 21(3): 424–427.

Alabi, Z. O., Thomas, K. D., Ogunbona, O. & Elegbe, I. A. 1994. The effect of antibacterial agents on plasma vitamin C levels. African Journal of Medicine and Medical Sciences, 23(2): 143–146.

Albesa, I., Becerra, M. C., Battán, P. C. & Páez, P. L. 2004. Oxidative stress involved in the antibacterial action of different antibiotics. Biochemical and Biophysical Research Communications, 317(2): 605–609.

Alfatemi, S. M. H., Motamedifar, M., Hadi, N. & Saraie, H. S. E. 2014. Analysis of virulence genes among methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) strains. Jundishapur Journal of Microbiology, 7(6).

Amábile-Cuevas, C. F. & Heinemann, J. A. 2004. Shooting the messenger of antibiotic resistance: plasmid elimination as a potential counter-evolutionary tactic. Drug Discovery Today, 9(11): 465–467.

Amelia, S., Wahyuni, D. D., Yunita, R. & Rozi, M. F. 2020. Comparison of Performance between Mannitol Salt Agar-supplemented Cefoxitin Disc and Chromogenic Media for Methicillin-resistance Staphylococcus Aureus Screening.

Amorena, B., Gracia, E., Monzón, M., Leiva, J., Oteiza, C., Pérez, M., Alabart, J.-L. & Hernández-Yago, J. 1999. Antibiotic susceptibility assay for Staphylococcus

aureus in biofilms developed in vitro. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 44(1): 43–55.

Araki, M., Kariyama, R., Monden, K., Tsugawa, M. & Kumon, H. 2002. Molecular epidemiological studies of Staphylococcus aureus in urinary tract infection. Journal of infection and chemotherapy, 8(2): 168-174.

Argudín, M. Á., Mendoza, M. C. & Rodicio, M. R. 2010. Food poisoning and Staphylococcus aureus enterotoxins. Toxins, 2(7): 1751–1773.

Arwa, H. K. 2005. Effect of Tris-EDTA and ascorbate in increasing antibiotic activity against bacteria isolated from Otitis Media. 1–95.

Aune, D., Keum, N., Giovannucci, E., Fadnes, L. T., Boffetta, P., Greenwood, D. C., Tonstad, S., Vatten, L. J., Riboli, E. & Norat, T. 2018. Dietary intake and blood concentrations of antioxidants and the risk of cardiovascular disease, total cancer, and all-cause mortality: a systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. The American Journal of Clinical Nutrition, 108(5): 1069–1091.

Becerra, M. C. & Albesa, I. 2002. Oxidative stress induced by ciprofloxacin in Staphylococcus aureus. Biochemical and Biophysical Research Communications, 297(4): 1003–1007.

Bergen, G. A. & Shelhamer, J. H. 1996. Pulmonary infiltrates in the cancer patient: New approaches to an old problem. Infectious Disease Clinics, 10(2): 297–325.

Bissong, M. E. A., Tahnteng, B. F., Ateba, C. N. & Akoachere, J.-F. T. K. 2020. Pathogenic Potential and Antimicrobial Resistance Profile of Staphylococcus aureus in Milk and Beef from the Northwest and Southwest Regions of Cameroon. BioMed Research International, 2020.

Block, G., Norkus, E., Hudes, M., Mandel, S. & Helzlsouer, K. 2001. Which plasma antioxidants are most related to fruit and vegetable consumption? American Journal of Epidemiology, 154(12): 1113–1118.

Boles, B. R. & Horswill, A. R. 2011. Staphylococcal biofilm disassembly. Trends in Microbiology, 19(9): 449–455.

Brooks, G. 2007. What works for pupils with literacy difficulties. The Effectiveness of Intervention Schemes, 3(12): 13–111.

Brown, D. F. & Reynolds, P. E. 1980. Intrinsic resistance to β-lactam antibiotics in staphylococcus aureus. FEBS letters, 122(2): 275-278.

Bush, K. & Macielag, M. J. 2010. New β-lactam antibiotics and β-lactamase inhibitors. Expert Opinion on Therapeutic Patents, 20(10): 1277–1293.

Carr, A. C. & Maggini, S. 2017. Vitamin C and immune function. Nutrients, 9(11): 1211.

Cegelski, L., Marshall, G. R., Eldridge, G. R. & Hultgren, S. J. 2008. The biology and future prospects of antivirulence therapies. Nature Reviews Microbiology, 6(1): 17–27.

Clarke, S. R. & Dyke, K. G. 2001. The signal transducer (BlaRI) and the repressor (BlaI) of the Staphylococcus aureus β-lactamase operon are inducible. Microbiology, 147(4): 803-810.

Costella, A. M., Trochmann, J. L. & Oliveira, W. S. 2010. Water sorption and diffusion coefficient through an experimental dental resin. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 21(1): 67–72.

Cuevas, C. F. A. 1988. Loss of penicillinase plasmids of Staphylococcus aureus after treatment with L-ascorbic acid. Mutation Research Letters, 207(3–4): 107–109.

Dashti, A. A., Jadaon, M. M., Abdulsamad, A. M. & Dashti, H. M. 2009. Heat treatment of bacteria: a simple method of DNA extraction for molecular techniques. Kuwait Med J, 41(2): 117–122.

De Tullio, M. C. 2010. The mystery of vitamin C. Nat. Educ, 3(9): 48.

De Visscher, A., Haesebrouck, F., Piepers, S., Vanderhaeghen, W., Supré, K., Leroy, F., Van Coillie, E., & De Vliegher, S. 2013. Assessment of the suitability of mannitol salt agar for growing bovine-associated coagulase-negative staphylococci and its use under field conditions. Research in Veterinary Science, 95(2): 347–351.

Dell'Acqua, G., Giacometti, A., Cirioni, O., Ghiselli, R., Saba, V., Scalise, G., Gov, Y., & Balaban, N. 2004. Suppression of Drug-Resistant Staphylococcal Infections by the Quorum-Sensing Inhibitor RNAIII-Inhibiting Peptide. The Journal of Infectious Diseases, 190(2): 318–320. https://doi.org/10.1086/386546

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

Farris, P. K. 2014. Cosmeceutical vitamins: vitamin C. Cosmeceuticals E-Book: Procedures in Cosmetic Dermatology Series, 37: 11-31.

Fisher, J. F., Meroueh, S. O. & Mobashery, S. 2005. Bacterial resistance to β-lactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity. Chemical Reviews, 105(2): 395–424.

Fugelsang, K. C., & Edwards, C. G. (2007). Wine microbiology: practical applications and procedures. Springer.

Gajdács, M. 2019. The concept of an ideal antibiotic: implications for drug design. Molecules, 24(5): 892.

Ghaly, T. M., Geoghegan, J. L., Tetu, S. G. & Gillings, M. R. 2020. The peril and promise of integrons: beyond antibiotic resistance. Trends in Microbiology, 28(6): 455–464.

Ghellai, L., Hassaine, H., Khelil, N. K., Nas, F., Aissaoui, N., Hoceini, A., Ziouane, S. & Zing, W. 2014. Antibacterial efficacy of essential oils of three aromatic plants in combination with povidone-iodine against Staphylococcus aureus grown in biofilm cultures. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 4(7): 88.

Gillet, Y., Issartel, B., Vanhems, P., Fournet, J.-C., Lina, G., Bes, M., Vandenesch, F., Piémont, Y., Brousse, N. & Floret, D. 2002. Association between Staphylococcus aureus strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. The Lancet, 359(9308): 753–759.

Golonka, I., Oleksy, M., Junka, A., Matera-Witkiewicz, A., Bartoszewicz, M. & Musiał, W. 2017. Selected physicochemical and biological properties of ethyl ascorbic acid compared to ascorbic acid. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 40(8): 1199–1206.

Green, M. R., Hughes, H., Sambrook, J. & MacCallum, P. 2012. Molecular cloning: a laboratory manual. In Molecular cloning: a laboratory manual (p. 1890).

Gurung, R. R., Maharjan, P. & Chhetri, G. G. 2020. Antibiotic resistance pattern of Staphylococcus aureus with reference to MRSA isolates from pediatric patients. Future Science OA, 6(4): FSO464–FSO464. https://doi.org/10.2144/fsoa-2019-0122

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

Hatano, T., Tsugawa, M., Kusuda, M., Taniguchi, S., Yoshida, T., Shiota, S. & Tsuchiya, T. 2008. Enhancement of antibacterial effects of epigallocatechin gallate, using ascorbic acid. Phytochemistry, 69(18): 3111–3116.

Hau, J., Sarubbo, S., Houde, J. C., Corsini, F., Girard, G., Deledalle, C., Crivello, F., Zago, L., Mellet, E. & Jobard, G. 2017. Revisiting the human uncinate fasciculus, its subcomponents and asymmetries with stem-based tractography and microdissection validation. Brain Structure and Function, 222(4): 1645–1662.

Hemilä, H. 2017. Vitamin C and Infections. Nutrients 9: 339.

Hemilä, H. 1992. Vitamin C and the common cold. British Journal of Nutrition, 67(1): 3–16.

Hong, J.-M., Kim, J.-H., Kang, J. S., Lee, W. J. & Hwang, Y. 2016. Vitamin C is taken up by human T cells via sodium-dependent vitamin C transporter 2 (SVCT2) and exerts inhibitory effects on the activation of these cells in vitro. Anatomy & Cell Biology, 49(2): 88.

Hoshino, N., Kimura, T., Hayakawa, F., Yamaji, A. & Ando, T. 2000. Bactericidal activity of catechin-copper (II) complexes against Staphylococcus aureus compared with Escherichia coli. Letters in Applied Microbiology, 31(3): 213–217.

Humphries, R. M., Ambler, J., Mitchell, S. L., Castanheira, M., Dingle, T., Hindler, J. A., Koeth, L. & Sei, K. 2018. CLSI methods development and standardization working group best practices for evaluation of antimicrobial susceptibility tests. Journal of Clinical Microbiology, 56(4): e01934-17.

Isela, Ns.-N. R., Sergio, N.-C., Martínez-Sanmiguel, J. J., Hernandez-Delgadillo, R. & Cabral-Romero, C. 2013. Ascorbic acid on oral microbial growth and biofilm formation. The Pharma Innovation, 2(4, Part A): 103.

Jotić, A., Božić, D. D., Milovanović, J., Pavlović, B., Ješić, S., Pelemiš, M., Novaković, M. & Ćirković, I. 2016. Biofilm formation on tympanostomy tubes depends on methicillin-resistant Staphylococcus aureus genetic lineage. European Archives of Oto-Rhino-Laryngology, 273(3): 615–620.

Kallio, J., Jaakkola, M., Mäki, M., Kilpeläinen, P. & Virtanen, V. 2012. Vitamin C inhibits staphylococcus aureus growth and enhances the inhibitory effect of quercetin on growth of Escherichia coli in vitro. Planta Medica, 78(17): 1824–1830.

Karmakar, M., Katsnelson, M. A., Dubyak, G. R. & Pearlman, E. 2016. Neutrophil P2X 7 receptors mediate NLRP3 inflammasome-dependent IL-1β secretion in response to ATP. Nature Communications, 7(1): 1–13.

Katzung, B. G. & Trevor, A. J. 2014. Basic & Clinical Pharmacology, SMARTBOOKTM. McGraw Hill Professional.

Kayser, F. H., Benner, E. J. & Hoeprich, P. D. 1970. Acquired and native resistance of Staphylococcus aureus to cephalexin and other β-lactam antibiotics. Applied Microbiology, 20(1): 1–5.

Khameneh, B., Bazzaz, B. S. F., Amani, A., Rostami, J., & Vahdati-Mashhadian, N. 2016. Combination of anti-tuberculosis drugs with vitamin C or NAC against different Staphylococcus aureus and Mycobacterium tuberculosis strains. Microbial Pathogenesis, 93: 83–87.

Khan, G. A., Berglund, B., Khan, K. M., Lindgren, P.-E. & Fick, J. 2013. Occurrence and abundance of antibiotics and resistance genes in rivers, canal and near drug formulation facilities–a study in Pakistan. PloS One, 8(6): e62712.

Kramarenko, G. G., Hummel, S. G., Martin, S. M. & Buettner, G. R. 2006. Ascorbate reacts with singlet oxygen to produce hydrogen peroxide. Photochemistry and Photobiology, 82(6): 1634–1637.

Lee, D., Das, S., Dawson, N., Dobrijevic, D., Ward, J. & Orengo, C. 2016. Novel Computational Protocols for Functionally Classifying and Characterising Serine Beta-Lactamases. PLoS Computational Biology, 12: e1004926. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004926

Lee, H.-Y., Huang, Y., Bruneau, N., Roll, P., Roberson, E. D. O., Hermann, M., Quinn, E., Maas, J., Edwards, R. & Ashizawa, T. 2012. Mutations in the gene PRRT2 cause paroxysmal kinesigenic dyskinesia with infantile convulsions. Cell Reports, 1(1): 2–12.

Levinson, W. & Jawetz, E. 2000. Medical Microbiology and Immunology. 6th edit McGraw-Hill. New York.

Levy, S. B. & Marshall, B. 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. Nature Medicine, 10(12): S122–S129.

Lho, I., Kishikawa, S., Kamesaki, Y., Kato, F., & Murata, A. 1991. Effects of iron (II)-ascorbate complex on various bacteria. Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan (Japan).

Liang, Y., Tu, C., Tan, C. & El-Sayed, M. A. E.-G. 2019. Antimicrobial resistance, virulence genes profiling and molecular relatedness of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains isolated from hospitalized patients in Guangdong Province, China. Infection and Drug Resistance, 12: 447.

Livermore, D. M. 2000. Antibiotic resistance in staphylococci. International Journal of Antimicrobial Agents, 16: 3–10.

Lundqvist, J., Yde, C. W. & Lykkesfeldt, A. E. 2014. 1α, 25-dihydroxyvitamin D3 inhibits cell growth and NFκB signaling in tamoxifen-resistant breast cancer cells. Steroids, 85: 30–35.

Lykkesfeldt, J. & Tveden-Nyborg, P. 2019. The pharmacokinetics of vitamin C. Nutrients, 11(10): 2412.

MacFaddin, J. F. 2000. Biochemical tests for identification of medical bacteria.

Magdesian, K. G. 2017. Antimicrobial pharmacology for the neonatal foal. Veterinary Clinics: Equine Practice, 33(1): 47–65.

Mai-Prochnow, A., Bradbury, M., Ostrikov, K. & Murphy, A. B. 2015. Pseudomonas aeruginosa biofilm response and resistance to cold atmospheric pressure plasma is linked to the redox-active molecule phenazine. PloS One, 10(6): e0130373.

Mathur, T., Singhal, S., Khan, S., Upadhyay, D. J., Fatma, T. & Rattan, A. 2006. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods. Indian Journal of Medical Microbiology, 24(1): 25–29.

Mirani, Z. A., Khan, M. N., Siddiqui, A., Khan, F., Aziz, M., Naz, S., Ahmed, A. & Khan, S. I. 2018. Ascorbic acid augments colony spreading by reducing biofilm formation of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 21(2): 175.

Moreillon, P. 2008. New and emerging treatment of Staphylococcus aureus infections in the hospital setting. Clinical Microbiology and Infection, 14: 32–41.

Mousavi, S., Bereswill, S. & Heimesaat, M. M. 2019. Immunomodulatory and antimicrobial effects of vitamin C. European Journal of Microbiology and Immunology, 9(3): 73–79. https://doi.org/10.1556/1886.2019.00016

Mueller, J. H. 1941. Muller Hinton Agar. Proc Soc Exp. Bio Med, 48: 330–333.

Mulu, W., Kibru, G., Beyene, G. & Damtie, M. 2012. Postoperative Nosocomial Infections and Antimicrobial Resistance Pattern of Bacteria Isolates among Patients Admitted at Felege Hiwot Referral Hospital, Bahirdar, Ethiopia. Ethiopian Journal of Health Sciences, 22(1): 7–18. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22984327%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3437975

Naresh, R., Dwivedi, S. K., Swarup, D. & Patra, R. C. 2002. Evaluation of ascorbic acid treatment in clinical and subclinical mastitis of Indian dairy cows. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 15(6): 905–911.

Neopane, P., Nepal, H. P., Shrestha, R., Uehara, O. & Abiko, Y. 2018. In vitro biofilm formation by Staphylococcus aureus isolated from wounds of hospital-admitted patients and their association with antimicrobial resistance. International Journal of General Medicine, 11: 25.

Opara, L. U., Al-Ani, M. R. & Al-Shuaibi, Y. S. 2009. Physico-chemical properties, vitamin C content, and antimicrobial properties of pomegranate fruit (Punica granatum L.). Food and Bioprocess Technology, 2(3): 315–321.

Otto, M. 2014. Staphylococcus aureus toxins. Current Opinion in Microbiology, 17: 32–37.

Ozcengiz, G., & Demain, A. L. 2013. Recent advances in the biosynthesis of penicillins, cephalosporins and clavams and its regulation. Biotechnology Advances, 31(2): 287–311.

Page, R. 2012. The linguistics of self-branding and micro-celebrity in Twitter: The role of hashtags. Discourse & Communication, 6(2): 181–201.

Pandit, S., Mokkapati, V., Helgadóttir, S. H., Westerlund, F. & Mijakovic, I. 2017. Combination of cold atmospheric plasma and vitamin C effectively disrupts bacterial biofilms. Clin Microbiol, 6(3): 10–13.

Papp-Wallace, K. M., Endimiani, A., Taracila, M. A. & Bonomo, R. A. 2011. Carbapenems: past, present, and future. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 55(11): 4943–4960.

Parija, S. C. 2014. Textbook of Microbiology & Immunology-E-book. Elsevier Health Sciences.

Pauling, L. 1974. Are recommended daily allowances for vitamin C adequate? Proceedings of the National Academy of Sciences, 71(11): 4442–4446.

Pereira, V. C., Martins, A., Suppo de Souza Rugolo, L. M. & de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha, M. 2009. Detection of oxacillin resistance in Staphylococcus aureus isolated from the neonatal and pediatric units of a Brazilian teaching hospital. Clinical Medicine. Pediatrics, 3, CMPed-S2085.

Perez-Cruz, I., Carcamo, J. M., & Golde, D. W. 2003. Vitamin C inhibits FAS-induced apoptosis in monocytes and U937 cells. Blood, 102(1): 336–343.

Pincus, D. H. 2006. Microbial identification using the bioMérieux Vitek® 2 system. Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods. Bethesda, MD: Parenteral Drug Association, 1–32.

Prescott, L. M., Harley, J. P. & Klein, A. 2007. Microbiology of freshwater. McGraw Hill, New-York, 56: 669–682.

Queenan, A. M., Shang, W., Bush, K. & Flamm, R. K. 2010. Differential selection of single-step AmpC or efflux mutants of Pseudomonas aeruginosa by using cefepime, ceftazidime, or ceftobiprole. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 54(10), 4092–4097.

Rocchetti, G., Lucini, L., Gallo, A., Masoero, F., Trevisan, M. & Giuberti, G. 2018. Untargeted metabolomics reveals differences in chemical fingerprints between PDO and non-PDO Grana Padano cheeses. Food Research International, 113: 407–413.

Rowland, S.-J. & Dyke, K. G. 1989. Characterization of the staphylococcal beta-lactamase transposon Tn552. The EMBO Journal, 8(9): 2761–2773.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. (Issue Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.

Sambrook, J. & Russell, D. W. 2006. Agarose gel electrophoresis. Cold Spring Harbor Protocols, 2006(1): pdb-prot4020.

Sanders, C. C., Gates, M. L. & Sanders Jr, W. E. 1988. Heterogeneity of class I beta-lactamase expression in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 32(12): 1893–1895.

Seif-El-Din, S. S., El-Rehewy, M. S., Ghazaly, M. M. & Abd-Elhamid, M. H. 2011. Biofilm formation by blood stream Staphylococcal isolates from febrile pediatric cancer patients at South Egypt Cancer Institute. The Journal of American Science, 7(1): 674–686.

Sharma, N., Singh, N. K., & Bhadwal, M. S. (2011). Relationship of somatic cell count and mastitis: An overview. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 24(3), 429–438.

Shin, W. S. 2016. Combination Antibacterial Therapy against B-lactam Drug Resistance. June. https://conservancy.umn.edu/bitstream/handle/11299/182200/Shin_umn_0130E_17314.pdf?sequence=1

Shoeb, H. A., Al-Shora, H. I. & Abdel-Salam, T. 1995. Ascorbate as an induction inhibitor of β-lactamase in a strain of Enterobacter cloacae. Letters in Applied Microbiology, 21(6): 398–401.

Sidhu, M. S., Heir, E., Sørum, H. & Holck, A. 2001. Genetic linkage between resistance to quaternary ammonium compounds and β-lactam antibiotics in food-related Staphylococcus spp. Microbial Drug Resistance, 7(4): 363-371.

Sorice, A., Guerriero, E., Capone, F., Colonna, G., Castello, G. & Costantini, S. 2014. Ascorbic acid: its role in immune system and chronic inflammation diseases. Mini Reviews in Medicinal Chemistry, 14(5): 444–452.

Stapleton, P. D. & Taylor, P. W. 2002. Methicillin Resistance in Staphylococcus Aureus: Mechanisms and Modulation. Science Progress, 85(1): 57–72. https://doi.org/10.3184/003685002783238870

Strohle, A., Wolters, M. & Hahn, A. 2011. Micronutrients at the interface between inflammation and infection ascorbic acid and calciferol. Part 1: general overview with a focus on ascorbic acid. Inflammation & Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy)(Discontinued), 10(1): 54–63.

Suzuki, A., Kurosawa, S., Shishido, T., Pejchal, J., Yokota, Y., Futami, Y. & Yoshikawa, A. 2012. Fast and high-energy-resolution oxide scintillator: Ce-doped (La, Gd) 2Si2O7. Applied Physics Express, 5(10): 102601.

Sykes, N. O., Macdonald, S. J. & Page, M. I. 2002. Acylating agents as enzyme inhibitors and understanding their reactivity for drug design. Journal of medicinal chemistry, 45(13): 2850-2856.

Thakuria, B. & Lahon, K. 2013. The beta lactam antibiotics as an empirical therapy in a developing country: an update on their current status and recommendations to counter the resistance against them. Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR, 7(6): 1207.

Thompson, K. M. & Jefferson, K. K. 2009. Adaptation to stress: biofilms and small colony variants. Crossley KB, Jefferson KK, Archer GL, Fowler VG. Staphylococci in Human Disease. Blackwell, 109–124.

Van Gorkom, G. N. Y., Klein Wolterink, R. G. J., Van Elssen, C. H. M. J., Wieten, L., Germeraad, W. T. V. & Bos, G. M. J. 2018. Influence of vitamin C on lymphocytes: an overview. Antioxidants, 7(3): 41.

Van Gorkom, G. N. Y., Lookermans, E. L., Van Elssen, C. H. M. J. & Bos, G. M. J. 2019. The effect of vitamin C (ascorbic acid) in the treatment of patients with cancer: a systematic review. Nutrients, 11(5): 977.

Verghese, R. J., Mathew, S. K., & David, A. 2017. Antimicrobial activity of Vitamin C demonstrated on uropathogenic Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae. Journal of Current Research in Scientific Medicine, 3(2): 88.

Vilchèze, C., Hartman, T., Weinrick, B., & Jacobs, W. R. 2013. Mycobacterium tuberculosis is extraordinarily sensitive to killing by a vitamin C-induced Fenton reaction. Nature Communications, 4(1): 1–10.

Virués-Ortega, J. 2010. Applied behavior analytic intervention for autism in early childhood: Meta-analysis, meta-regression and dose–response meta-analysis of multiple outcomes. Clinical Psychology Review, 30(4): 387–399.

Walton, G. M. & Rockoff, H. 2013. History of the American economy. Cengage Learning.

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

Wu, J.-Y., Nguyen, V. P., Nguyen, C. T., Sutula, D., Bordas, S. & Sinaie, S. 2018. Phase field modeling of fracture. Advances in Applied Mechancis: Multi-Scale Theory and Computation, 52.

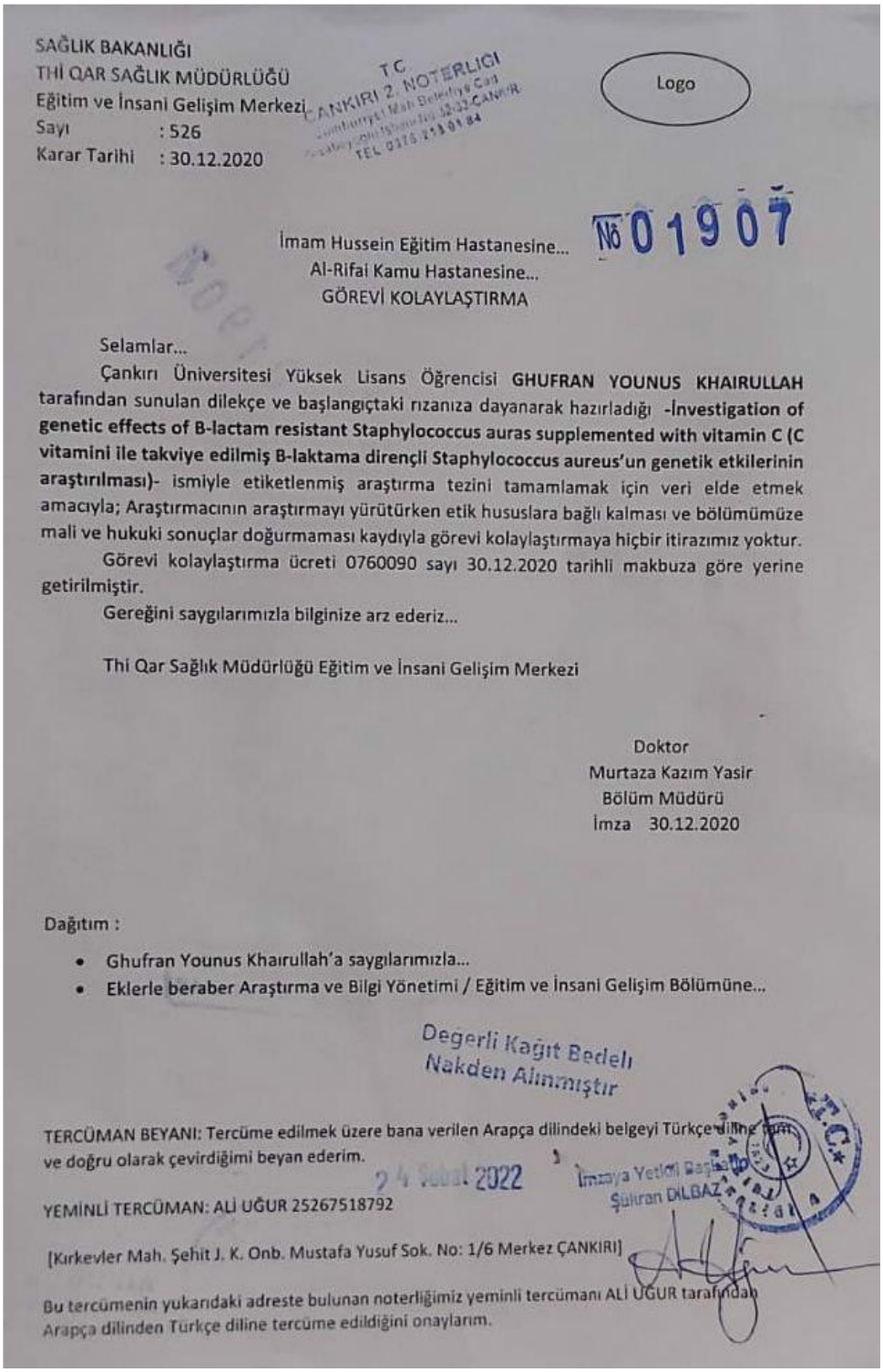
Xavier, J. de B., Picioreanu, C., & van Loosdrecht, M. C. M. 2005. A general description of detachment for multidimensional modelling of biofilms. Biotechnology and Bioengineering, 91(6): 651–669.

Zapun, A., Contreras-Martel, C., & Vernet, T. 2008. Penicillin-binding proteins and β-lactam resistance. FEMS Microbiology Reviews, 32(2): 361–385.

## EKLER

### EK 1. Etik Onay

## EK 1. Etik Onay



SAĞLIK BAKANLIĞI
THİ QAR SAĞLIK MÜDÜRLÜĞÜ
Eğitim ve İnsani Gelişim Merkezi
Sayı : 526
Karar Tarihi : 30.12.2020

T.C. ÇANKIRI 2. NOTERLİĞİ

Logo

No 01907

İmam Hussein Eğitim Hastanesine...
Al-Rifai Kamu Hastanesine...
GÖREVİ KOLAYLAŞTIRMA

Selamlar...

Çankırı Üniversitesi Yüksek Lisans Öğrencisi **GHUFRAN YOUNUS KHAIRULLAH** tarafından sunulan dilekçe ve başlangıçtaki rızanıza dayanarak hazırladığı **-İnvestigation of genetic effects of B-lactam resistant Staphylococcus auras supplemented with vitamin C (C vitamini ile takviye edilmiş B-laktama dirençli Staphylococcus aureus'un genetik etkilerinin araştırılması)**- ismiyle etiketlenmiş araştırma tezini tamamlamak için veri elde etmek amacıyla; Araştırmacının araştırmayı yürütürken etik hususlara bağlı kalması ve bölümümüze mali ve hukuki sonuçlar doğurmaması kaydıyla görevi kolaylaştırmaya hiçbir itirazımız yoktur.

Görevi kolaylaştırma ücreti 0760090 sayı 30.12.2020 tarihli makbuza göre yerine getirilmiştir.

Gereğini saygılarımızla bilginize arz ederiz...

Thi Qar Sağlık Müdürlüğü Eğitim ve İnsani Gelişim Merkezi

Doktor
Murtaza Kazım Yasir
Bölüm Müdürü
İmza 30.12.2020

Dağıtım :

- Ghufran Younus Khairullah'a saygılarımızla...
- Eklerle beraber Araştırma ve Bilgi Yönetimi / Eğitim ve İnsani Gelişim Bölümüne...

Degerli Kağıt Bedeli
Nakden Alınmıştır

TERCÜMAN BEYANI: Tercüme edilmek üzere bana verilen Arapça dilindeki belgeyi Türkçe diline tam ve doğru olarak çevirdiğimi beyan ederim.

24 Şubat 2022

İmzaya Yetkili Başkan
Şükran DİLBAZ

YEMİNLİ TERCÜMAN: ALİ UĞUR 25267518792

[Kırkevler Mah. Şehit J. K. Onb. Mustafa Yusuf Sok. No: 1/6 Merkez ÇANKIRI]

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

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Ghufran Younus Khairullah ALQRAGULI

### Eğitim

| | | |
|---|---|---|
| Yüksek Lisans | Çankırı Karatekin Üniversitesi<br>Fen Bilimleri Enstitüsü<br>Biyoloji Anabilim Dalı | 2020-Halen |
| Lisans | Thi Qar Üniversitesi<br>Fen Bilimleri Enstitüsü<br>Biyoloji Anabilim Dalı | 2007-2010 |