T.C.

HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ

TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ

ÜRİNER VE YARA ENFEKSİYONLARINDA İZOLE EDİLEN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ŞUŞLARINDA VİRÜLANS FAKTÖRLERLE ANTİBİYOTİK DİRENCİ ARASINDAKİ İLİŞKİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Davut Utku COŞGUN

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Nizami DURAN

HATAY – 2023

T.C.

HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ

TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ

ÜRİNER VE YARA ENFEKSİYONLARINDA İZOLE EDİLEN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ŞUŞLARINDA VİRÜLANS FAKTÖRLERLE ANTİBİYOTİK DİRENCİ ARASINDAKİ İLİŞKİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Davut Utku COŞGUN

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Nizami DURAN

Bu tez, HATAY Mustafa Kemal Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırmalar Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 22.TU.007 proje numarası ile desteklenmiştir.

TEZ ONAY SAYFASI
T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
TAYFUR ATA SÖKMEN TIP FAKÜLTESİ

ÜRİNER VE YARA ENFEKSİYONLARINDA İZOLE EDİLEN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ŞUŞLARINDA VİRÜLANSFAKTÖRLERLE ANTİBİYOTİK DİRENCİ ARASINDAKİ İLİŞKİ

Dr. Davut Utku COŞGUN

Tıp Fakültesi Dekanlığı Onayı
(İmza)…..……
Prof. Dr. Yusuf ÖNLEN
Tıp Fakültesi Dekanı

Bu tez çalışmasının "Tıpta Uzmanlık" derecesine uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

(İmza)…..……
Prof. Dr. Nizami DURAN
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımdan okunmuş ve her yönü ile "Tıpta Uzmanlık" tezi olarak uygun ve yeterli bulunmuştur.

(İmza)..……
Prof. Dr. Nizami DURAN
Tez Danışmanı

TEZ JÜRİSİ:

1.Prof. Dr. Nizami DURAN…….

2.Prof. Dr. Yusuf ÖNLEN……

3.Prof. Dr. Abdullah ARPACI……

III. İÇİNDEKİLER

III. İÇİNDEKİLER III
IV. TABLOLAR LİSTESİ VI
V. ŞEKİLLER LİSTESİ VII
VI. KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ IX
VII. TEŞEKKÜR XI
VIII. ÖZET XII
IX. ABSRACT XIV
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 6
2.1. *Staphylococcus aureus* 6
2.2. Kapsüler Polisakkaritler 8
2.3. Yüzey Proteinler 8
2.3.1. Stafilokok Protein-A 8
2.4. Ekstraselüler Toksinler 8
2.4.1. Hemolizinler 8
2.4.2. Panton-Valentine Lökosidin 8
2.4.3. Toksik Şok Sendromu Toksini 9
2.5. *S. aures'un* Enzimleri 9
2.5.1. Koagülaz 9
2.5.2. Stafilokinaz 9
2.5.3. Nükleazlar 10
2.5.4. Proteazları 10
2.5.5. Hiyalüronidaz 10
2.6. Antibiyotik Direnci 11
2.7. Direnç Türleri 11
2.7.1. Doğal Direnç 11
2.8. Direnç Aktarım Yolları 11
2.8.1. Yatay Gen Aktarımı 11
2.8.2. Kazanılmış (Adaptif) Direnç 12
2.9. Biyofilm Oluşumu 13

2.10. İlaç İnaktivasyonu 14
2.11. İlaç Hedefinin Değiştirilmesi 15
2.12. Hücre Zarı Geçirgenliği ve Efluks Sistemindeki Değişiklikler 15
2.13. Virülans Mekanizmaları 16
2.13.1. Virülans Faktörleri 16
2.13.2. Adezyon Molekülleri 17
2.14. İmmüniteden Kaçış 18
2.14.1. Toksinler 18
2.14.2. Hareket 19
2.14.3. Virülans Plazmidleri 19
2.15. Virülans ve Antibiyotik Direncinin Regülasyonu 20
2.15.1. Transkripsiyon Faktörleri 20
2.15.2. Post-Trnskripsiyonel Değişiklikler 20
2.15.3. Çevresel Akış 21
2.15.6. Stres Yanıtı 21
2.16. Biyofilm Oluşumu 22
2.17. Biyofilm Formasyonu 23
2.18. Bakteriyel İletişim 24
2.19. Virülans Genleri Transferi 25
3. GEREÇ VE YÖNTEM 26
3.1. Araç ve Gereçler 26
3.2. Deneylerde Kullanılan Kimyasallar 26
3.3. Örneklerin Toplanması ve Kültivasyon 27
3.4. Kullanılan Besiyerleri, Solüsyonlar 27
3.4.1. Besiyerleri 27
3.4.2. Fosfat Buffer Tamponu (PBS) 28
3.4.3. RPMI-1640 Besiyeri 28
3.4.4. Versen-Tripsin Solüsyonunun Hazırlanması 28
3.4.5. Hücre Kültrü Çalışmaları İçin PBS Hazırlanması 28
3.4.6. Tripan Mavisi ile Hücre Canlılığı Tayini 28
3.4.7. Kongo Kırmızısı Besiyerinin Hazırlanması 29
3.5. Çalışmada Kullanılan Suşlar 29

3.6. Hücre Kültürü Çalışmaları 29
3.7. Direnç ve Virülans Genlerinin Tespiti 30
3.7.1. Genomik DNA ekstraksiyonu 30
3.7.2. PCR AmpliZikasyonu 32
3.7.3. 50X TAE Elektroforez Tamponu: 1 litre 34
3.7.4. Yükleme (Loading) Tampunu (6X) 34
3.7.5. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi Tekniği ile Görüntülenmesi .. 35
3.7.6. İnvazyon Deneyi 35
3.7.7. Slime Üretimi 36
3.7.8. Direnç ve virülansın *S. aureus* suşlarında Hücre Adezyonu ve İnvazyonu Üzerindeki Etkinliklerinin Değerlendirilmesi 36
3.8. İstatistiksel Analiz 37
4. BULGULAR 38
5. TARTIŞMA 56
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 63
7. KAYNAKLAR 65
8. EKLER 76
9. ÖZGEÇMİŞ 77

IV. TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. Stafilokoklar için, multiplex PCR'da kullanılan primer dizileri..... 33
Tablo 2. Yara infeksiyonlarından izole edilen stafilokok türlerinde antibiyotik direnç paternleri. 39
Tablo 3.Üriner sistem infeksiyonlarından izole edilen stafilokok türlerinde antibiyotik direnç paternleri. 40
Tablo 4. Yara ve üriner sistem infeksiyonlarından izole edilen stafilokok türlerinde antibiyotik direnç paternleri. 41

V. ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Örnek çalışılan hastaların yaş oranları..... 38
Şekil 2. Yara infeksiyonlarından izole edilen S. aureus suşlarında antibiyotik direnç oranları. 39
Şekil 3. Üriner sistem infeksiyonlardan izole edilen stafilokok kökenlerinde ilaç direnç oranları. 40
Şekil 4. Yara ve üriner infeksiyonlardan izole edilen stafilokoklarda antibiyotik direnç oranları. 41
Şekil 5. PVL geninin PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü M: 100 bp DNA Ladder. 2-4 ve 6. 7. 8. ve 10: pvl (433 bp) pozitif örnekler; 5: pozitif kontrol,1. ve 9; negatif örnekler..... 44
Şekil 6. Yara örneklerinden izole edilen stafilokoklarda virulans genlerinin dağılımı 44
Şekil 7. Yara örneklerinden izole edilen stafilokoklarda metisilin direcine göre virülans genleri frekansı..... 44
Şekil 8. Üriner infeksiyonlardan izole edilen stafilokoklarda virülans genlerinin frekansı..... 45
Şekil 9. Üriner infeksiyonlardan izole edilen stafilokoklarda metisilin direnci varlığıile virülens genleri arasındaki korelasyon. 46
Şekil 10. Vero hücrelerinde metisilin dirençli ve duyarlı stafilokok türlerinin hücre adezyon test sonuçları. 46
Şekil 11. Vero hücrelerinde slime genleri varlığında metisilin dirençli ve duyarlı stafilokok türlerinin hücre adezyon test sonuçları. 47
Şekil 12. Vero hücrelerinde slime ve panton-valenSn lökosidin genlerinin metisilin dirençli ve duyarlı kökenlerde hücre adezyon test sonuçları. 48
Şekil 13. Vero hücrelerinde slime, panton-valenSn lökosidin ve hemolizin genlerinin metisilin dirençli ve duyarlı kökenlerde hücre adezyon test sonuçları. 49
Şekil 14. Vero hücrelerinde slime ve panton-valentin lökosidin, hemolizin ve klumping faktörün genlerinin metisilin dirençli ve duyarlı kökenlerde hücre adezyon test sonuçları. 50

Şekil 15. Vero hücrelerinde Metisilin dirençli ve duyarlı stafilokok türlerinin hücre invazyon test sonuçları. 51
Şekil 16. Vero hücrelerinde slime genleri varlığında metisilin dirençli ve duyarlı stafilokok türlerinin hücre invazyon test sonuçları. 51
Şekil 17. Vero hücrelerinde slime ve panton-valenSn lökosidin genlerinin metisilin dirençli ve duyarlı kökenlerde hücresel adezyon üzerindeki etkisi. 52
Şekil 18. Vero hücrelerinde slime, panton-valenSn lökosidin ve hemolizin genlerinin metisilin dirençli ve duyarlı kökenlerde hücresel adezyon üzerindeki etkisi. 53
Şekil 19. Vero hücrelerinde slime ve panton-valenSn lökosidin, hemolizin ve klumping faktörün genlerinin metisilin dirençli ve duyarlı kökenlerde hücresel adezyon üzerindeki etkisi. 55

VI. KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

ABC : ATP-binding cassette

ABD : Amerika Birleşik Devletleri

ATP : Adenozin Trifosfat

Coa : Koagülaz

Can :Kolajen bağlayıcı protein

CDC :Hastalık Kontrol Merkezi

CP :kapsüler polisakkarit

Ct : Cycle of quantification/qualification

DNA : Deoksiribo Nükleik Asit

ET :Eksfolyatif toksin

HIV : İnsan İmmün Yetmezlik Virusu

MRSA :methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

MFS : major facilitator superfamily

MATE : the multidrug and toxic compound extrusion

µg : Mikrogram

mg : Miligram

ml : Mililitre

mM : Milimolar

MMR : mismatch repair

PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PVL :Panton-Valentine lökosidin

PBP : penisilin bağlayıcı protein

SIP :Siderophore-interacting protein

Spv :Salmonella plazmid virülans

SMR : small multidrug resistance

TSST-1:Toksik Şok Sendromu Toksini 1

VISA :Vankomisine karşı orta seviye direnç gösteren Staphylococcus aureus

CLSI :Klinik ve Laboratuar Standartları Enstitüsü

PBS : Fosfat Buffer Tamponu

cDNA :Komplementer DNA

VII. TEŞEKKÜR

Asistanlık sürecinde ve tez çalışmalarım boyunca bana destek ve özverisini esirgemeyen, her türlü bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, zorlandığım zamanlarda beni yönlendiren ve yardımcı olan çok değerli hocam, tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Nizami DURAN'a,

Asistanlık eğitimim süresince bana her türlü desteği veren, bilgi ve deneyimlerini paylaşan Sayın Prof. Dr. Burçin ÖZER'e çok teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında yardımını esirgemeyen değerli arkadaşlarım Sayın Emrah AY'a teşekkür ederim.

6 Şubat depreminde kaybettiğimiz merhum Erhan TEK'e,

MKÜ Merkez Laboratuvarında beraber mesai tüm laboratuvar çalışanlarına, Hayatım boyunca her şartta yanımda olan, üstümde sonsuz emekleri ve fedakarlıkları bulunan değerli annem Nimet COŞGUN, babam Kadri COŞGUN ve kardeşlerim İbrahim Orçun COŞGUN ve Mustafa Anıl COŞGUN'a,

Her koşulda yanımda olduğunu gösteren, desteklerini esirgemeyen ve büyük sabırla asistanlık sürecime ortak olan sevgili eşim Zülal COŞGUN'a sonsuz teşekkürler.

6 şubat Depreminde kaybettiklerimizin anısına saygıyla…

Dr. Davut Utku COŞGUN

Hatay / 2023

VIII. ÖZET

Üriner Ve Yara Enfeksiyonlarinda İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarinda Virülans Faktörlerle Antibiyotik Direnci Arasindaki İlişki

Giriş ve Amaç: Günümüzde ilaç direnci infeksiyon hastalıklarının tedavisinde ciddi bir problemdir. Antibiyotik direnci her geçen gün öyle büyük bir sorun haline gelmektedir ki yakın bir gelecekte duyarlı tüm suşların ilaç dirençli kökenler haline gelmesi en büyük korkudur. Artan ilaç direnci yanında patojen mikroorganizmaların virülan faktörleri de infeksiyon hastalıklarının tedavisinde önemli sorunlar yaratmaktadır. Son yıllarda ilaç direnci ile virülans ilişkisinin söz konusu olabileceği tartışılmaktadır. Biz bu çalışmada üriner ve yara enfeksiyonlarından izole edilen Staphylococcus aureus kökenlerinde ilaç direnç profilleri ile virülans genlerinin (icaA, icaD, coa, pvl, tsst-1, hla, hlb, nuc, hla, pvl, clfA) frekansını araştırmayı, ilaç direnci ile virülanslık arasındaki ilişkiyi Vero hücrelerinde adezyon invazyon testleriyle araştırmayı amaçladık.

Materyal ve Yöntem: Çeşitli kliniklerden steril eküvyonlarla alınan yara örnekleri ve idrar örnekleri çevresel etkenlerden kotaminasyona dikkat edilerek transport besiyeri içinde mikrobiyoloji kültür laboratuvarına getirildi. Konvansiyonel yöntemler kullanılarak satafilokok izolasyonları ve ilaç direnç prodilleri belirlendi. Direnç ve virulans genlerinin varlığı multipleks PCR yöntemiyle araştırıldı. Adezyon invazyon deneyleri ise Vero Hüre hattında gerçekleştirildi.

Bulgular: Yara örneklerinde penisilin direnci %84.5 olarak en yüksek oranda tespit edilirken, oksasilin direncinin de oldukça yüksek olduğu (%42.3) bulundu. Bu örneklerde teikoplanin ve tigesiklin direnci tespit edilmedi. Üriner izolatlarda ise penisilin direnci yara örneklerinde olduğu gibi yüksek oranda bulunurken (%84.6) oksasilin direncinin yara izolatlarından anlamlı derecede daha düşük oluğu tespit edilmiştir (%22.8). Üriner sistem izolatlarında daptomisin, linezolid, teikoplanin ve vancomisin dirençli suşa rastlanmadı. Yara örneklerinde fibronektin, klumping faktör, nükleaz, hemolizin A ve hemolizin B genlerinin varlığı metisilin direncine göre değişmezken, panton-valentin lökosidin geni, slime genleri (icaA ve icaD) ve toksik şok sendromu toksini genlerinin varlığı metisilin dirençliyle direkt ilişkili olduğu tespit edildi. Üriner kaynaklı izolatlarda mecA geni varlığı ile fibronektin, klumping faktör, nükleaz, hemolizin genlerinin arasında anlamlı bir korelasyon tespit edilmezken, ica A ve ica D genleri ile hemolizin b geni varlığı arasında anlamlı bir ilişkinin varlığı saptandı. Slime üretimi, pvl, hemolizin aktivitesi ve klumping faktör pozitif olan metisilin dirençli S. aureus kökenleri ile slime üreten, pvl ve hemolizin aktivitesi pozitif olan kökenler arasında hücresel adezyon test sonuçlarının anlamlı derecede farklı olduğu tespit edilmiştir (p=0,0002). Panton valentin lökosidin geni pozitif, slime üreten, hemoliz yapabilen ve klumping faktör pozitif metisilin dirençli S. aureus kökenleri, Panton valentin lökosidin pozitif, slime üreten, hemoliz yapabilen suşlarla kıyaslandığında hücresel invazyon düzeylerinde anlamlı derecede artışlar tespit edilmiştir (p=0,0003).

Sonuç: Çalışmada yara örneklerinden izole edilen stafiloklarda metisilin direnci oldukça yüksek bulunmuştur. İzolatlarda vakomisin direncine rastlanması endişe

vericidir. Ayrıca artan virülasnlığın ilaç direnci arasında pozitifi bir korelasyon tespit edilmiştir. Artan virülans doğal olarak artan antibiyotik direncine yanıt olarak veya eşzamanlı olarak gelişebilir; dolayısıyla antibiyotik direncinin yayılması kontrol edilirken virülansın yayılması da kontrol edilmelidir.

Anahtar Kelimeler: *S. aureus*, ilaç direnci, virülans, adezyon, invazyon, korelasyon.

IX. ABSRACT

The Relationship Between Virulence Factors And Antibiotic Resistance In *Staphylococcus aureus* Strains Isolated In Urinary And Wound Infections

Background & Aim: Today, drug resistance is a serious problem in treating infectious diseases. Antibiotic resistance is becoming such a big problem day by day that the biggest fear is that all sensitive strains will become drug-resistant strains shortly. In addition to increasing drug resistance, virulent factors of pathogenic microorganisms also create important problems in treating infectious diseases. In recent years, it has been discussed that there may be a relationship between drug resistance and virulence. In this study, we investigated the drug resistance profiles and the frequency of virulence genes (icaA, icaD, coa, pvl, test-1, hla, hlb, nuc, hla, pvl, clfA) in Staphylococcus aureus isolates isolated from urinary and wound infections, and the relationship between drug resistance and virulence. We aimed to investigate the relationship between adhesion invasion tests in Vero cells.

Material and Method: Wound samples and urine samples taken from various clinics with sterile swabs were brought to the Microbiology culture laboratory in a transport medium, paying attention to contamination from environmental factors. Staphylococcus isolations and drug resistance profiles were determined using conventional methods. The presence of resistance and virulence genes was investigated by the multiplex PCR method. Adhesion invasion experiments were carried out on the Vero Hüre line.

Results: While penicillin resistance was detected at the highest rate in wound samples, 84.5%, oxacillin resistance was also quite high (42.3%). Teicoplanin and tigecycline resistance was not detected in these samples. While penicillin resistance was found at a high rate in urinary isolates (84.6%), as in wound samples, oxacillin resistance was found to be significantly lower than in wound isolates (22.8%). The urinary system isolates found no Daptomycin, Linezolid, Teicoplanin, and vancomycin-resistant strains. While the presence of fibronectin, clumping factor, nuclease, hemolysin A, and hemolysin B genes in wound samples did not change according to methicillin resistance, the presence of Pantone-valentin leucocidin gene, slime genes (icaA and icaD) and toxic shock syndrome toxin genes were found to be directly related to methicillin resistance. While no significant correlation was detected between the presence of the mecA gene and the fibronectin, clumping factor, nuclease, and hemolysin genes in urinary isolates, a significant relationship was found between the icaA and icaD genes and the presence of the hemolysin b gene. It was determined that the cellular adhesion test results were significantly different between methicillin-resistant S. aureus strains with positive slime production, pvl, hemolysin activity, and clumping factor, and slime-producing strains with positive pvl and hemolysin activity ($p = 0.0002$). Significant increases in cellular invasion levels were detected in Panton Valentin leukocidin positive, slime producing, hemolyzing and clumping factor positive methicillin-resistant S. aureus strains when compared to Panton Valentin leukocidin positive, slime producing, hemolyzing strains ($p=0.0003$).

Conclusion: In the study, methicillin resistance was quite high in staphylococcus isolated from wound samples. It is worrying that vancomycin resistance was found in isolates. Additionally, a positive correlation was detected between increased virulence and drug resistance. Increased virulence may develop naturally in response to or simultaneously with increasing antibiotic resistance; Therefore, while controlling the spread of antibiotic resistance, the spread of virulence must also be controlled.

Keywords: *S. aureus*, drug resistance, virulence, adhesion, invasion, correlation.

1. GİRİŞ

Günümüzde ilaç direnci infeksiyon hastalıklarının tedavisinde ciddi bir problemdir. Antibiyotik direnci her geçen gün öyle büyük bir sorun haline gelmektedir ki yakın bir gelecekte duyarlı tüm suşların ilaç dirençli kökenler haline gelmesi korkulan senaryodur. Artan ilaç direnci yanında patojen mikroorganizmaların virülan faktörleri de infeksiyon hastalıklarının tedavisinde önemli sorunlar yaratmaktadır. Son yıllarda artan virülansın ilaç direnci ilişkisine dikat çekilmekte olup, ilaç direncine katkı verebildiğine ilişkin raporlar bildirilmektedir (1).

Antimikrobiyal ajanların aşırı kullanımından kaynaklanan antibiyotik direnci, çeşitli mekanizmalardan, özellikle de antibiyotik direnç genlerinin yatay transferinden kaynaklandığı ayrıca virülans genlerinin aktarımının ilaç direnciyle ilişkili olabileceği konusunda da görüşler bulunmaktadır. Sözgelimi ilaç direnç geni aktarımının biyofilm oluşumuyla daha kolay gerçekleşebildiği bildirilmiştir. Biyofilm tabakası içinde dış ortamdan/faktörlerden korunan bakteriler sinyal iletim yolları aracılığıyla iletişim kurarak gen ifadesinde önemli değişikliklere yol açarak virulansı artırmakta ve antibiyotik direnç gelişimini hızlandırabilmektedir. Bu nedenle virulans ve dirençteki genetik değişimin biyofilm oluşumu dışındaki virulans faktörlerinin bağlantılarının araştırılması önem arz etmektedir. Artan virulans ile antibiyotik direncinin ortaya çıkışının neredeyse aynı anda ortaya çıktığı açıktır, ancak genetik ilişkileri pek araştırılmamıştır (2).

Bakterilerde virülans ve direnç arasındaki temel genetik etkileşimlerin gösterilmesi yeni ilaç hedeflerin belirlenmesi yolunu açabileceğinden infeksiyon hastalıklarının tedavi seçeneklerini iyileştirmek için yeni ilaç keşiflerinin yapılabilmesi ve ilaç geliştirme seçeneklerinin çoğaltılması açısından oldukça değerlidir. Çeşitli hayvan modellerinde bakterilerde virülans faktörlerinin çoklu ilaç direnci arasında bir ilişkinin olabileceğinden bahsedilse de virülans faktörleri ile antibiyotik direnci arasındaki mekanizma bilinmezliğini ya da belirsizliğini korumaktadır (3, 4).

İlaç direnci ve virülanslığı açısından insanlar için her zaman ciddi problem olan mikroorganizmaların başında Gram pozitif bakterilerden *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) gelmektedir. *S. aureus* tüm dünyada yaygın olarak görülen yüzeyel veya invaziv enfesikyonlara neden olan en yaygın bakteriyel patojenlerden biridir (5). Pnömoni ve diğer solunum yolu enfeksiyonları, cerrahi alan, protez eklem ve kardiyovasküler enfeksiyonlar ile bakteriyeminin önde gele sebeplerindedir. Sadece *S. aureus* bakteriyemisine bağlı ölümlerin yılda 20-50 vaka/100.000 arasında olduğu bildirilmektedir. Gelişmiş ülkelerde dahi *S. aureus* enfeksiyonlarına bağlı ölümlerin yıllık HIV, tüberküloz ve viral hepatitlere bağlı ölümlerin toplamından daha yüksek olduğu bildirilmektedir. Mortaliteye sebep olan pnomöni, osteomyelit, menenjit gibi enfeksiyonları yanında bakterinin furonkül, apse ve yara enfeksiyonları gibi cilt enfeksiyonlarının da önemli morbidite etkeni olduğu bildirilmektedir. Bu mikroorganizmanın sebep olduğu enfeksiyonlar tüm dünyada ülkelerin ekonomileri için de ciddi maliyetlere yol açmakta ve önemli bir halk sağlığı problemidir (6).

S. aureus enfeksiyonlarının tedavisi antibiyotik direnci sebebiyle giderek daha zor bir hal almaktadır. Özellikle metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) izolatlarında sıklıkla görülen antibiyotik direnci ciddi bir tehdittir. MRSA enfeksiyonlarında metisilin direnç oranlarının %50'lere kadar çıkabildiği bildirilmektedir (7). Ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalarda metisilin direncinin oldukça yüksek seyrettiğini bildiren çalışmalar mevcuttur (8, 12).

Metisilin direnci yanında *S. aureus*'a karşı diğer antibiyotiklere direnç de yaygın ve yüksek oranlarda seyretmektedir. Sözgelimi beta-laktam antibiyotiklere (penisilin ve türevleri) karşı görülen direnç hemen her ülkede oldukça yaygındır (9). Günümüzde *S. aureus*'a karşı en güçlü antibiyotik olan Vankomisin'e dahi düşük düzeylerde direnç bildirilmekte hatta bazen hemen hemen tüm mevcut antibiyotiklere karşı dirençli suşlara dahi rastlanabilmektedir (10). Spesifik antibiyotik direnci yanında biyofilm oluşumu ile spesifik olmayan antibiyotik direnci de bu mikroorganizma enfeksiyonları açısından önemli bir husustur. Biyofilm oluşumu ile mikroorganizma antibiyotiklerin etkisinden kendini koruyarak enfeksiyon oluşturabilmektedir. Özellikle konakta yabancı cisim ilişkili stafilokok enfeksiyonlarında (endokardit, osteomiyelit, konjonktivit gibi) biyofilm oluşumuna sık rastlanılmaktadır (11).

Stafilokoklarda enfeksiyonun şiddeti ilaç direnci yanında patojenin sahip olduğu virülans faktörleriyle yakından ilişkilidir. *S. aureus*'un çok çeşitli virülans faktörleri bulunmaktadır. Bu virülans faktörleri arasında çok sayıda enzim, toksin, immuniteden kaçınmada rol oynayan faktörler ve konak hücreye adezyon ve kolonizasyon proteinleri yer almaktadır (13).

Biyofim oluşumu *S. aureus*'un konakta antibiyotiklerden etkilenmeden enfeksiyonunu sürdürmesinin önemli bir yoludur. Biyofilm oluşumunun temel görevi bakteriyi fagositik hücrelerden korumak ve antimikrobiyaller için bir bariyer oluşturmaktır (14). Biyofilm bakterinin antibiyotiklere karşı direncini artırarak konağın savunmasına karşı korunan bir ortam oluşturarak patogenezde rol oynayan önemli bir faktördür (14). Bakterinin biyofilm üretme yeteneklerinin tespit edilerek virülan suşların tanımlaması oldukça önemlidir.

S. aureus konak hücrede ciddi hasarlar oluşturan önemli toksinler de salgılamaktadır. Bu toksinlerin salınımı, ilgili genlerin kontrolündedir. Bu toksinler başta eritrositler, trombositler, monositler ve nötrofiller olmak üzere geniş bir hücre yelpazesinde lizise neden oldukları için sitolitik bir etkiye sahiptir. *S. aureus*'un memeli hücre zarlarında porlar oluşturarak hedef hücreyi nekroze eden dermonekrotik ve nörotoksik işleve sahip alfa toksini ve eritrosit hasarına yol açan beta toksinleri de önemli virülans faktörleri arasında yer almaktadır (13).

S. aureus suşlarının Panton-Valentine lökosidin (pvl), eksfolyatif toksin (et), enterotoksinler, Toksik Şok Sendromu Toksini (tsst), hemolizinler, koagülaz enzimi gibi çeşitli toksin üretimi yaptıkları da bilinmektedir (15). Tsst geni toksini multisistemik hastalıklara bağlı toksik şok sendromu ile ilgili hücre dışı proteinlerin bir dizisini oluşturan toksik şok sendromu toksinini kodlamaktadır. Bu toksin lökositlerin kemotaksisini ve retiküloendotelyal sistemi bloke etmektedir. Ayrıca T lenfositlerin inhibisyonunu da tetiklemektedir. Bu toksini kodlayan *S. aureus* kökenleri genellikle cerrahi yaralarda, tamponlarda (menstrüel toksik şok), akciğerlerde (viral enfeksiyon ilişkili toksik şok), periton diyaliz kateterlerinde, epidermis ve ayrıca mukozal zarlarda bulunabilmektedir (16).

Bakterinin önemli toksinlerinden biri olan Panton-Valentine lökositin toksini ise bakterinin konak hücreden kaçınmasınında ve patogenezde önemli role sahiptir. Pvl

geni hücre geçirgenliğinin değişmesine, lökosit yıkımına neden olarak etkinlik göstermektedir (17). Pvl, nötrofiller ve makrofajlarda lökosit toksisitesi sergileyen, basit deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarından pnömoni, şiddetli sepsis ve nekrotizan fasit gibi invaziv hastalıklara kadar çeşitli hastalıklara neden olan *S. aureus*'un spesifik bir ekzotoksinidir. Pvl yakın zamanda toplum temelli metisiline dirençli *S. aureus* (c-MRSA) ile de ilişkilendirilmiştir (18).

S. aureus hemolizinler, ekzotoksinler, lökosidinler, süperantijenler, kapsüller ve salgılanan enzimler de dahil olmak üzere çok çeşitli virülans faktörlerini barındırabilmektedir. Mikroorganizmanın bu yeteneği konak savunmasının üstesinden gelinmesinde rol oynamaktadır. Bunlardan bazıları alfa-hemolizin de dahil olmak üzere toksinler genomda kodlanırken Panton-Valentine lökosidin gibi diğerleri profaj gibi hareketli genetik elementler üzerinde kodlanır. Eritrositlerin *S. aureus* tarafından lizizi esas olarak hemolizinler (alfa, beta, delta toksinleri ve gama) tarafından gerçekleştirilmektedir. Eritorositlerdeki komponentlerden mikroorganizma tarafından kolayca alınmasına aracılık etmektedir. Sözgelimi alfa-hemolizin hla geni tarafından kodlanan ve *S. aureus*'un klinik izolatları tarafından salgılanan, insanlarda pnömoni ve sepsis gibi klinik semptomlara yol açan toksindir. Hlb geni beta toksin veya sfingomiyelinaz olarak da bilinen enzimi kodlamaktadır. Bu toksin en önemli görevlerinden biri siliyer epitel hücrelerinin fonksiyonlarını bozarak patojenite oluşturmasıdır (19).

S. aureus'da yüzeyle ilişkili adezinler, bakteriyel adezyonda, kolonizasyonunda ve biyofilm yapımı gibi fonksiyonlarda görev alabilmektedir. Klumping faktörleri (A ve B) hücre matris moleküllerini tanıyarak konak hücre adezyonunda dolayısıyla da patojenitede rol oynamaktadırlar. Koagülaz *S. aureus* tarafından salgılanan ve konakçıda plazmanın pıhtılaşmasına neden olan bir enzim olup oldukça önemli bir virülans faktördür. Fibrinojenin fibrine dönüşmesine neden olur ve fibrin üretimi bakteriyi fagositozdan korur (20).

Biz bu çalışmada üriner sistem ve yara enfeksiyonlarından izole edilen *S. aureus* kökenlerinde ilaç direnç profilleri ile virülans genlerinin (icaA, icaD, coa, pvl, tsst-1, hla, hlb, nuc, hla, pvl, clfA) frekansını araştırmayı, ilaç direnci ile virülanslık

arasındaki korelasyonu ise Vero hücre hattında adezyon invazyon testleriyle araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Staphylococcus aureus*

S. aureus kok şekilli, üzüm salkımı benzeri olarak tanımlanan kümeler halinde düzenlenme eğiliminde olan Gram pozitif bakteridir. Yüksek tuz konsantrasyonlarında dahi üreyebilen bu bakteri (%10'a kadar) S tipi tipik koloniler oluşturur. Mikroorganizmanın respirasyon titpi aerobik veya anaerobic olarak (fakültatif) olarak tanımlanırken geniş bir üreme aralığında (18-40 ºC) çoğalabilmektedir (21, 22).

Mikroorganizma çok çeşitli klinik tablolara yol açan önemli bir bakteriyel insan patojenidir. Mikroorganizmanın enfeksiyonları hem toplum kaynaklı hem de hastane kaynaklı ortamlarda yaygın olup MRSA (metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*) gibi ilaç dirençli suşların tedavisi daha da zorlaşmaktadır. Mikroorganizma sağlıklı bireylerin cildinde, mukozalarında (genellikle burun bölgesinde) normal flora üyesi olarak bulunabilmektedir. Normal flora üyesi olan *S. aureus* sağlıklı ciltte enfeksiyona neden olmazken, kan dolaşımına veya iç organlara bulaştığındaciddi enfeksiyonlara yol açabilmektedirler. Bulaş temel olarak direkt kontakla gerçekleşse de kontakt dışında bulaş yolları da bulunmaktadır (21).

Mikroroganizmanın katalaz ve koagülaz aktivitesi pozitif olup, novobiyosine duyarlı ve mannitol fermantasyonu da pozitiftir. MRSA suşları bakteri kromozomu üzerinde bir mec geni taşımakta olup bu gen ekspresyonu yapan bakterilerde yüksek direnç oranları bildirilmektedir. Mec geni PBP-2a proteinini (penisilin bağlayıcı protein 2a) kodlamaktadır. PBP-2a penisilin bağlayıcı bir proteindir (PBP) veya bakteri hücre duvarında peptidoglikan üretimini katalize eden temel bakteri hücre duvarı enzimidir (23).

PBP-2a'nın diğer PBP'lere kıyasla beta-laktamlara (ayrıca diğer penisilin türevli antibiyotiklere) bağlanma afinitesi daha düşüktür, bu nedenle PBP-2a birçok antibiyotik varlığında bile bakteri hücre duvarının sentezini katalize etmeye devam edebilmektedir. Sonuç olarak, PBP-2a sentezleyen *S. aureus* suşları birçok antibiyotik varlığında çoğalabilmekte olup birçok antibiyotiğe de dirençlidir. *S. aureus* insanlarda en yaygın bakteriyel enfeksiyonlardan biridir ve bakteriyemi, endokardit, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, osteomiyelit, septik artrit, protez cihaz enfeksiyonları, akciğer enfeksiyonları (pnömoni ve ampiyem gibi), gastroenterit, menenjit, toksik şok sendromu ve idrar yolu enfeksiyonlarına sebep olabilir (23).

Suşa ve enfeksiyon bölgesine bağlı olarak bu bakteriler invaziv enfeksiyonlara ve/veya toksin aracılı hastalıklara neden olabilmektedir Patofizyoloji *S. aureus* enfeksiyonunun tipine bağlı olarak büyük ölçüde değişmektedir. Konak immünyanıtından kaçma mekanizmaları, antifagositik kapsül üretimi, konak antikorlarının sekrete edilmesi, biyofilm oluşumu, hücre içi hayatta kalma ve lökositlerin kemotaksisinin bloke edilmesini içermektedir. Mikroorganizmanın enfeksiyözitesine bakterilerin hücre dışı matriks proteinlerine ve fibronektine bağlanmasına, fibrinojen bağlayıcı proteinler, kümelenme faktörleri ve teikoik asitler gibi bakteri hücre duvarı ile ilişkili proteinler aracılık etmektedir. Ayrıca, stafilokok süperantijenleri (TSST-1 veya toksik şok sendromu toksini 1) de enfeksiyöz endokardit, sepsis ve toksik şok sendromunda önemli virülans faktörleridir. Pnömoni enfeksiyonları, PVL, Protein A ve alfa-hemolizinin bakteriyel üretimi ile ilişkili olup enfeksiyonları bazı viral ve metabolik hastalıkların varlığında (influenza, kistik fibrozis gibi) daha sık ortaya çıkmakta progresyonu daha ciddi olabilmektedir (24).

2.2. Kapsüler Polisakkaritler

Kapsüler polisakkaritler MRSA'nın hücre duvarını çevreleyen polisakkarit polimerleridir. Klinik MRSA izolatlarının %76-90'ının kapsüler polisakkarit ürettiği bildirilmiştir ve serolojik olarak farklı 11 kapsüler polisakkarit tipi (CP 1'den CP11'e kadar) tanımlanmıştır. Kapsüler polisakkaritler, kompleman ve antikor aracılı opsonizasyonu bozar ve fagositozu inhibe ederek *S. aureus*'un virülansını arttırmaktadır (25, 26).

2.3. Yüzeyel Proteinler

2.3.1. Stafilokok Protein-A

Stafilokokal protein A dolaşımdaki IgG'ye bağlanan, kompleman sisteminin opsonizasyonunu önleyen ve mikroorganizmayı fagositoz sürecinden koruyan bir hücre duvarı komponentidir (24, 27).

2.4. Ekstraselüler Toksinler

2.4.1. Hemolizinler

MRSA suşları alfa, beta, gama ve delta toksin üretimi yapabilmektedir. Alfa toksini çoğu patojenik MRSA suşu tarafından üretilmekte ve ana virülans faktörü olarak kabul edilmektedir. Alfa toksin üreten kökenlerle meydana gelen enfeksiyonların daha mortal seyrettiği bildirilmiştir. S. aureus enterotoksinlerinin hem insanlarda hem de hayvanlarda gıda zehirlenmelerne yol açabildiği bilinmektedir (24, 28).

2.4.2. Panton-Valentine Lökosidin

Panton-Valentine lökosidin güçlü bir stafilokok ekzotoksinidir ve aktivitesine iki salgı proteini aracılık etmektedir; F ve S tipleri. PVL toksini insanda polimorf-nükleer hücrelerin plazma zarını parçalamaktadır. Ayrıca PVL polimorf-nükleer hücrelerden oksijen-metabolitlerinin salınımını, interlökin-8 salınımını, lizozimlerin üretimini ve insan bazofillerinden histamin salınımını da uyarmaktadır. PVL'nin hayvanlarda komplike inflamatuar reaksiyonlara, nekrotik lezyonlara, bazofil degranülasyonuna ve lökositik infiltrasyona neden olduğu bildirilmiştir (23, 29).

2.4.3. Toksik Şok Sendromu Toksini

Toksik şok sendromu toksini insanlarda toksik şok sendromuna (TSS) neden olan S. aureus'un en güçlü süperantijenlerinden biridir. Hastalık, TNF-α, IL-1 veIL-2 üretimini active eden TSST'nin salınması nedeniyle meydana gelmektedir. Toksik şok sendromu, yüksek morbidite ve mortalitenin eşlik ettiği ciddi bir hastalıktır. TSST kadınları genellikle adet döneminde, sıklıkla 2. ve 3. günlerde etkiler. Bu dönemde S. aureus vajinada hızlı çoğalmakta ve toksin üretimi gerçekleştirmektedir. Hem sistemik hem de gastrointestinal bozukluklarla karakterize edilen hastalık, ateş, baş ağrısı, kusma, karın ağrısı, aşırı diyare, jeneralize miyalji tablosundan ibarettir (30, 31).

2.5. *S. aureus*'un Enzimleri

2.5.1. Koagülaz

S. aureus'un en önemli enzimlerinden biridir. Bu enzim (koagülaz: coa) insan plazmasının pıhtılaşmasına yol açar. Günümüzde özellikle farklı MRSA izolatları arasındaki N-terminal kodlama alanında dikkate değer sekans çeşitliliği (%50'den fazla) ile yaklaşık on iki farklı koagülaz izoformu tanımlanmıştır. Koagülaz enzimi protrombin bağlanmasına yol açar (24, 32).

2.5.2. Stafilokinaz

Stafilokinaz enzimi fibrin pıhtılarının parçalanması için plazminojeni uyaran ve ardından bakterinin üremesini sağlayan hücre dışı bir enzimdir. MRSA'nın lizojenik suşları tarafından salınan enzimdir. Stafilokinaz esas olarak türe özgüdür ve genellikle köpek, tavşan, koyun, keçi ve insan plazmasını koagüle edebilirken diğer memeli plazmalarının koagüle edemediği nbildirilmiştrir Bkaterinin stafilokinaz sentezlemesinin olumlu yanlarından biri biyofilm oluşumunu ile ters ilişki içinde olmasıdır. Stafilokinaz enzim üğretimi yapan mikroorganizmaların (MRSA suşlarının) biyofilm oluşturmadığı ya da düşük düzey biyofilm üretimiyle ilişkili olduğı bildirilmiştir (24, 33).

2.5.3. Nükleazlar

DNase'lar da denilmektedir. Stafilokokkal nükleaz ilk olarak S. aureus'un kültür filtratları olarak kabul edilmiştir. Stafilokokkal nükleaz ısıya dayanıklı ve sentezlenebilmesi Ca2+ varlığına bağımlıdır. İki tipi mevcuttur; DNA ve RNA substratlarını yok eden endo ve ekzonükleazlar. MRSA'da Nuc ve Nuc2 stafilokokal nükleaz üretimi görülür. Aralarındaki temel farklılık hücre lokalizasyonundan kaynaklıdır. Nuc, NucB ve NucA olmak üzere iki farklı izoforma sahip hücre dışı bir enzimken, nuc2 ise yüzeye bağlı olarak bulunmaktadır (23, 34).

2.5.4. Proteazları

Üç tip stafilokokal proteaz vardır: 1-serin proteazlar, 2-metalloproteazlar ve 3-sistein proteazlar. Konak savunmasından kaçınma ve bakteri yayılımında önemli bir rol oynamaktadırşar. Bugüne kadar bir metalloproteaz-2 sistein proteaz (staphopain A ve staphopain B) ve 9 çeşitli serin proteaz dahil olmak üzere yaklaşık 12 farklı proteaz türü tanımlanmıştır (35).

2.5.5. Hiyalüronidaz

Hyaluronik asit; birbirini izleyen β-1,3 ve β-1,4 glikozidik bağlarla bağlanan N-asetil-glukozamin ve glukuronik asidin tekrar eden birimlerinden oluşan bir polisakkarit molekülüdür. Memelilerde hücre ve doku bütünlüğünün yanı sıra konakta bağışıklık yanıtının düzenlemesinden sorumlu olan hücre dışı matrikslerin önemli bir bileşenidir. Staphylococcal hyaluronidase "yayılma faktörü", hyaluronik asidin hem hücre dışı matrislerde hem de biyofilmlerde disakkaritlere parçalanmasından ve ardından bakteriyel yayılmadan sorumludur (20, 36).

2.6. Antibiyotik Direnci

Antibiyotiklerin keşfi infeksiyon hastalıklarının tedavisinde devrim niteliğinde buluştur. Yaklaşık elli yıldır kullanılmakta olan antibiyotikler mikroorganizmalar tarafından üretilen bazı enzim, protein ve peptipler gibi bileşikler tarafından etkisizleştirimekte ve ilaçlara karşı dirençli hale gelebilmektedir (38). Bakteriler antibiyotiklere karşı direnç oluşturmak ve çeşitli direnç mekanizmaları geliştirmişlerdir. Bu amaçla genel olarak bakteriler direnci doğal yolla ya da gen aktarım yollarından biriyle kazanmaktadırlar. Çevresel faktörler fizyolojik değişiklikleri tetikleyebilmekte ve bu durum da mutasyonlara ve antibiyotik inaktivasyonu yol açarak ilaç direncine sebep olabilmektedir (37).

2.7. Direnç Türleri

2.7.1. Doğal Direnç

Antibiyotik üreten bakterilerde doğal olarak bulunan antimikrobiyal direnci kodlayan genler doğal direnci oluşturmaktadır. Antibiyotik direnci ve yayılımı bakterilerden gelen antibiyotik direnç genlerinin bir sonucu olabileceği gibi çevresel faktörlerin etkisiyle de gelişebilmektedir (39). Antibiyotikler bakteriler üzerinde seçici bir baskı oluşturmakta, evrimi hızlandırmakta ve çoklu ilaca dirençli fenotipler üretmek için genetik ve metabolizmada eş zamanlı regülasyonlara imkan sağlamaktadır (40) Bakterilerin antibiyotiklerin varlığında canlı kalabilmesi antibiyotik seçici baskıları altında direnç kazanma yeteneği, direnç genotiplerini hem indüklemek hem de sürdürmek için bir eşik antibiyotik konsantrasyonunun gerekli olduğunu kabul edilmektedir (41).

2.8. Direnç Aktarım Yolları

2.8.1. Yatay Gen Aktarımı

Antibiyotik direnci çoğu enfeksiyonların polimikrobiyal olması sebebiyle patojenlerin yakınlığı nedeniyle genellikle bakteriler arasında yatay gen transferi yoluyla gerçekleşmektedir (42). Yatay gen transferi üç yolla gerçekleşebilir: Çevresel DNA entegrasyonu sonucu, bakteriyofaj efeksiyonları yardımıyla, gen aktarım yollarıyla (43).

Genetik materyalin türler arasında yer değiştirebilmesi sadece antibiyotik direncinin transferini değil, aynı zamanda direncin tek bir ilacın ötesine yayılmasını da yol açabilmektedir. Yüksek seviyeli direnç genellikle bir yan ürün olarak aynı sınıftaki bir antibiyotiğe karşı düşük seviyeli direnç üretebilmektedir (44, 45).

Konakta antibiyotik kullanımı antibiyotik baskısı oluşturabileceğinden bu durum bakterileri yüksek oranda mutasyona sürüklemektedir (46). Tedavide antibiyotik kullanımı veya düşük dozlarla tedavi verilmesi mutasyon yoluyla novo direnç gelişimini tetikleyebilmektedir. Buna örnek olarak mikobakterilerde gelişen ilaç direnci gösterilebilir (47) (Escherichia coli/Salmonella enterica türlerinde florokinonlara karşı gelişen idirenç ile (48) Pseudomonas aeruginosa'da görülen ilaç dirençleri) (44). Bakterilerde artan mutasyon oranı yanlış eşleşme onarım (MMR: mismatch repair) sistemini oluşturan genlerdeki (mutS, mutL, mutH, mutT, mutY, mutM ve uvrD) değişikliklerden kaynaklanmaktadır (49).

MMR sistemindeki mutasyonlar ayrıca genetik rekombinasyonun yaygınlığını arttırarak antibiyotik direnç mekanizmalarına çeşitlilik sağlayabilmektedir (50). Yanlış eşleşme onarım sistemlerindeki genetik değişikliklerin yanında giraz ve topoizomeraz enzimlerindeki mutasyonlar (Salmonella'da kinolon direnci) (51), antibiyotiklerin oluşturduğu oksidatif hasar ve stres tepkileri (52) mutasyon ihtimalleri yükseltmektedir.

2.8.2. Kazanılmış (Adaptif) Direnç

Adaptif direnç genellikle çevredeki mikrobiyotasında gelen baskılar nedeniyle ortaya çıkan mikroorganizmanın ekolojik nişinin bir yansımasıdır. Adaptif dirençte en önemli mekanizma ortamdaki antibiyotik rezervlerinin bu baskıyı oluşturmasıyla ilişkilidir (44). Adaptif direnç; biyofilm oluşumu, enzim kaynaklı antibiyotik inaktivasyonu, antibiyotik hedefindeki değişikliklerini, hücre geçirgenliğindeki

değişiklikler ve akış pompası düzenlemesi gibi çevresel olarak tetiklenen genetik değişikliklerin tamamını içermektedir (45).

2.9. Biyofilm Oluşumu

Bakterilerin çoğu özellikle yabancı cisim varlığında veya düşük doz antibiyotik konsantrasyonlarına uzun süreli maruz kalma durumunları gibi çevresel stres söz konusu olduğunda biyofilm tabakası içinde canlılığını sürdürmektedir. Biyofilm oluşumunun Gram pozitif bakterilerde peptitlerin, Gram negatif bakterilerde ise otoindüktörler gibi küçük moleküllerin hücre-hücre iletişimi (yani çekirdek algılama) yoluyla koordine edilen bir takım olay aracılığıyla meydana geldiği bildirilmiştir (53). Sinyal kaskadları peptitler veya otoindüktör moleküllerin kritik hücre dışı konsantrasyonunun saptanması ile başlamakta ve adezyon, metabolik değişiklikler, koruyucu glikokaliks üretimi, virülansın yukarı regülasyonu ve azalmış antibiyotik duyarlılığı ile sonuçlanmaktadır (53). Glikokaliks oluşumundan önce bakteriyel adezyonun bozulması planktonik bakterilerin antibiyotiklerden etkilenme mekanizması benzer şekilde gerçekleşmektedir (54, 55).

Biyofilm ile gelişen direncin sadece glikokaliks oluşumuyla ilişkili olamayacağı, aynı zamanda bakteriyel flora ile de ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca bakteriyel floranın patojenin sadece antibiyotik duyarlılığı ve direnç noktasına ulaşmada da rol oynayabileceği düşünülmektedir. Biyofilm üretebilen mikroorganizmaların antibiyotikleri inaktive edebilen enzimler salgılayabildikleri, efluks mekanizmasının çalışmasını yukarı regüle edebildikleri de bildirilmiştir. Bunun yanında biyofilm içerisinde çoğalan mikroorganizmaların oksidatif stresi arttıkları da bildirilmiştir. Biyofilm yapı çok ilaca dirençli bir fenotipi hızlı bir şekilde oluşturabilme yeteneğinde bir oluşum olup farklı grup ilaçlara da hızlı direnç mekanizması gelişimde rol oynamaktadır (55, 56).

Kolonizasyon yapan bakteriler bir biyofilm içindeki metabolik olarak eski bir alt popülasyondur. Genel olarak çoğu antibiyotiğin etkinliği bakterilerin metabolik aktivitesiyle yakından ilişkilidir. Sözgelimi aktif olarak bölünen P. aeruginosa'da hücre duvarı sentezini hedefleyen β-laktamlar çok etkilidir ve aktif replikasyon sırasında nükleik asit replikasyonunu bozan kinolonlar yüksek düzeyde aktivite sergilemektedir. Nükleik asit replikasyonu yapmayan bakteriler çoğalan hücrelere kıyasla antibiyotiklerden daha düşük düzeyde etkilenmektedir. Yavaşlamış çoğalmanın bu durağan fazı sırasında hücreler antibiyotiklerle muamele edildiğinde aynı antibiyotik konsantrasyonunda logaritmik üreme fazındaki hücrelerle karşılaştırıldığında daha yüksek hayatta kalma oranına sahip olan kalıcı bir fenotip sergilemektedir. Bu durum ilaç ilgisizliği olarak adlandırılmaktadır (55, 57).

2.10. İlaç İnaktivasyonu

Antibiyotik direncinin yaygın bir mekanizması antibiyotiğin enzimatik modifikasyonunu veya yok edilmesini içermektedir (58). Genel olarak, dört antibiyotik modifiye edici enzim sınıfı bilinmektedir (58, 59).

- Hidrolazlar,
- Transferazlar,
- Redoks enzimleri
- Lizazlar

Bunların çoğu ekzotoksin olarak kabul edilir ve virülansı artırırken aynı zamanda antibiyotik direnci sağlamaktadırlar. B-laktam halkasını parçalayan amidazlar gibi hidrolazlar, genellikle antibiyotik biyolojik aktivitesi için gerekli olan esterler ve amidler gibi hidrolitik olarak duyarlı kimyasal bağları parçalamaktadır. Suda çözünen bu enzimler bakterilerle temas etmeden önce antibiyotik moleküllerini yakalayarak profilaktik bir karşı önlem olarak bakterilerden kolayca atılabildiğinden, antibiyotik direnci ve virülans artışı sağlamak için oldukça popüler bir stratejidir (58). Sözgelimi grup transferazlar gibi açiltransferazlar fosfotransferazlar tiyoltransferazlar nükleotidetransferazlar, ADP-riboziltransferazlar, glikoziltransferazlar, antibiyotik hedef bağlanmasını inhibe etmek için antibiyotiklerle kovalent modifikasyonlar oluşturan bakteriyel enzimlerdir (60). Aminoglikozid direnci genellikle antibiyotik

inaktivasyonuna yol açan transferaz (asetiltransferazlar, nükleotidiltransferazlar ve fosfotransferazlar) temelinde ortaya çıkmaktadır (59, 61).

Redoks enzimleri antibiyotik modifikasyonları yapabilen gruptur. Bu gruba örnek olarak TetX enzimi tarafından sağlanan tetrasiklin direnci verilebilir (62). Lizazlar ise karbon-karbon, karbon-oksijen, karbon-azot ve karbon-sülfür bağlarını hidrolitik veya oksidatif bölünmeden bağımsız bir mekanizma ile keserek aktivite göstermektedir. Streptogramin direncinden sorumlu olan Vgb buna bir örnektir (59, 63).

2.11. İlaç Hedefinin Değiştirilmesi

Antibiyotik hedefleri, ilaç hedefinin korunması gibi yeniden programlanabilmekte veya kamufle edilebilmektedir (64). Bu tür bir örnek yatay gen transferi ve mecA geni kazanımına dayanan, bakterilerin hücre duvarı biyosentezine sorunsuz devam edebilmesi için birçok β-laktam antibiyotiğe düşük afiniteli bir bağlanma sağlayan penisilin bağlayıcı protein 2'dir (PBP2) (65). Antibiyotiklerin hedef bölgesinin modifikasyonu (örneğin, rRNA'nın metilasyonu) da uygunluk için sınırlı maliyetlerle afiniteyi azaltmada rol oynayabilir (59, 64).

2.12. Hücre Zarı Geçirgenliği ve Efluks Sistemindeki Değişiklikler

Bakteriyel efluks pompaları hem Gram-pozitif hem de özellikle Gram-negatif bakterilerde çözünmüş maddeleri, metabolitleri, quorum sensing moleküllerini, toksinleri, özellikle de antimikrobiyal bileşikleri aktif olarak dışarı pompalayarak hücre homeostazını ve iletişimi sürdürmek için koruyucu bir mekanizma olarak evrimleşmiştir (66,67).

Bakteriyel ilaç efluks pompalarının beş önemli ailesi mevcuttur:

- ATP bağlayıcı kaset (ABC) süper ailesi,
- Ana kolaylaştırıcı süper ailesi (MFS),
- Çoklu ilaç ve toksik bileşik ekstrüzyon (MATE) ailesi,

- Küçük çoklu ilaç direnci (SMR) ailesi (ilaç/metabolit taşıyıcı süper ailesinin bir alt grubu)
- Direnç-nodülasyon-bölünmesi (RND) üst ailesi (68-71).

Mikroorganizmaların tek bir efluks pompasında up-regülasyon yoluyla çoklu ilaç direnci kazanılabilmesi oldukça etkin bir sistemdir (66). E.coli izolatları üzerinde yapılan bir çalışmada test edilen 33 antimikrobiyal bileşikten 31'inin çoklu ilaç akış sistemi tarafından dışa akışa duyarlı olduğu bildirilmiştir (72). İlaç spesifitesindeki eksiklik efluks up-regülasyonunun diğer direnç mekanizmalarıyla özellikle de dış membran geçirgenliğindeki değişikliklerle sinerji oluşturduğu bildirilmiştir. Bu durum yeni geliştirilmekte olan ilaçlar için ciddi tehdittir (67, 73).

2.13. Virülans Mekanizmaları

Antibiyotik direncinin ve virülansın bulaşmasının aşağıda özetlendiği gibi birçok paralel mekanizmasının olduğu bildirilmiştir.

2.13.1. Virülans Faktörleri

Virülans sadece bakterilerin konakta hastalığa neden olma kabiliyetini (yani patojenite derecesini) değil, aynı zamanda bakterilerin bir konağa sızma ve kolonileşme kabiliyetini de kapsamaktadır. Önceleri virülans patojen merkezli bir özellik olarak düşünülmüş ve doksanlı yılların sonunda ise virülansın genetik faktör ilişkili olduğu görüşü ortaya çıkmıştır. Genetik virülans faktörleri bakterilerin flagella, fimbriae, adezyonlar, biyofilm gibi fiziksel özelliklerini kapsamaktadır (13, 74).

Ayrıca virülans faktörler patojen açısından rekabet avantajı sağlamak için konak hücre yüzeyini değiştiren çeşitli enzimler, toksinler ve antibiyotikler gibi biyokimyasal faktörleri de düzenleyebilmektedir (75). Birçok açıdan genetik olarak kodlanmış antibiyotik direnci, konak patogenezini tetikleyerek kalıcı veya kronik hastalıkların gelişmesine yol açabildiğinden virülans faktörlerinin bir alt türü olarak kabul edilebilir (76). Çünkü virülans faktörler konak direnç genlerini ve ilişkili transkripsiyonel ve translasyonel regülatörleri teşvik etmekte ve kalıcı veya kronik hastalıklara yol açarak patogenezde önemli rol oynamaktadır. Antibakteriyel

seçeneklerin araştırılmasında yeni hedeflerin tanınması ve geliştirilmesi virülans mekanizmasın belirlenmesi büyük öneme sahiptir. Antibiyotik araştırmalarında virülans ve antibiyotik direnç genleri ile bunların ilişkili transkripsiyonel ve translasyonel önemi büyüktür. Bu tip araştırmalarda virülans aktarımı dikkate alınmalı ve antibiyotiğin potansiyel kombinatoryal yaklaşımında yeni araçların araştırılmasında ilaçlanabilir hedefleri tanımak ve değerlendirmek için kritik öneme sahiptir (13).

2.13.2. Adezyon Molekülleri

Bakterilerin biyotik ve abiyotik yüzeylere yapışma ve biyofilm oluşturma kabiliyeti, bakteriyel patojenitenin yanı sıra virülansta da artışa neden olmaktadır. Bakteriyel bağlanma flagella, pili, fimbriae gibi hücre yüzeyi yapıları vasıtasıyla olmaktadır (77). Flagellanın regülasyonu bir operon aracılığıyla genetik olarak kontrol edilmektedir (78) Hangi mekanizma olursa olsun genetik olarak kontrol edilen adezyon moleküllerinin up-regülasyonu biyofilm gelişimini düzenlemektedir. Adezyon, quarum senecense ve biyofilm gelişimi, bakterilerin antibiyotik baskısına seçici bir şekilde yanıt verebildiği karmaşık bir mekanizmadır (13, 78).

Bakterilerin konak hücrelere invazyonu hücre membranlarını parçalayan kollajenaz, hiyalüronidaz ve lesitinaz gibi enzimlerin up-regülasyonu ile kolaylaştırılır. Ayrıca Staphylococcus aureus gibi bazı bakteriler bir fibronektin köprüsü veya kolajen bağlayıcı protein (cna) aracılığıyla osteoblastlara sızabilmektedir. Bakteriler profesyonel olmayan fagositik hücrelerin aktin hücre iskeletini yeniden düzenleyerek bir fermuar veya tetik mekanizması yoluyla bir hücre sinyal kaskadını tetikleyebilmektedir (13, 79).

Bacterize patojenlerde kaynakların kullanımı ve demir için rekabet virülans ile ilişkilendirilmiştir (80). Bir çalışmada siderophore-interacting protein (SIP)'in sadece demir kazanımı için değil, aynı zamanda optimal virülans için de gerekli olduğu bildirilmiştir. SIP geninin silinmesinin biyofilm oluşumunda azalma ve Vero hücrelerine adezyon ve invazyonda azalma ile sonuçlandığı bildirilmiştir (13, 81).

2.14. İmmüniteden Kaçış

Salmonella enterica serovar typhimurium üzerinde yapılan bir çalışmada salmonella plazmid virülans (spv) lokusunun balık larvalarında bakterinin öldürücü dozunu azalttığı (LD50), nötrofilleri ve makrofajları inhibe ederek bakteriyel replikasyonun hızlanmasına sebep olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, "spv" lokusunun otofagozomların oluşumunu engelleyerek S. typhimurium'un bakteriyel otofajiyi önlediği de tespit edilmiş, çalışmada "spv" lokusunun doğuştan gelen bağışıklık tepkisinin bastırılmasında rol oynadığı sonucuna varılmıştır (82). Bunun yanında, sideroforların glikozile yapısındaki çeşitliliğin sadece işlevde ve özgüllüğü aynı anda arttırmakla kalmadığı, aynı zamanda konak savunma mekanizmalarından kaçışa da yardım ettiği saptanmıştır. Çeşitli bakteriyel patojenler, konağın bağışıklık sinyalini manipüle etmek için moleküler taklitçiliğin yanı sıra konak sitokinleri ve diğer faktörlerle doğrudan etkileşim kurma becerisini geliştirmiştir. Bunlar, bağışıklıktan kaçınmaya yönelik bakteriyel stratejilerin sadece küçük bir bölümüdür. Bakteriler konağın bağışıklıktan kaçınmasına katkıda bulunan çok sayıda virülans faktörü geliştirmişlerdir (24, 83).

2.14.1. Toksinler

Birçok bakteri virülans genlerinin ekspre olmasıyla çeşitli toksin salınımı gerçekleştirebilir. Bunlar ya bakteriyel hücre ölümüyle ortaya çıkan lipopolisakkarit tabakanın lipit kısmını oluşturan endotoksinler ya da hücre dışına salınan ekzo-toksinler olarak sınıflandırılabilir. Kistik fibrozisli çocuklardan izole edilen P. aeruginosa üzerinde yapılan bir çalışmada virülans genleri toxA, lasB ve exoS'un ekspresyonunda önemli artışlar olduğu bildirilmiştir. Bu genler hastalığın hem kronik hem de akut formlarında yer almakta olup doku hasarı ve biyofilm oluşumunda rol oynamaktadır (84). S. aureus, yukarıda tartışıldığı gibi, konak dokuya sızmaya ve besin elde etmeye yardımcı olmak için bir dizi toksin salgılama yeteneklerine haizdir. Ayrıca bu patojenler bakteriyel çoğalmada rol oynayan hemolizin, lökotoksin, eksfoliyatif toksin ve enterotoksin dahil olmak üzere diğer birçok toksinin yanı sıra sitolitik toksinler de üretmektedir (85). Bakteriyel virülansın bu ortak mekanizması yeni ilaç hedeflerin kaynağı olarak araştırılmalıdır (24).

2.14.2. Hareket

Bakteriyel patojenler yüzme, seğirme ve sürü halinde hareket etme gibi çeşitli farklı hareket tarzları sergilemektedir. Artan ve değişken hareketlilik sadece bir patojenin fiziksel konumunu değiştirmesine izin vermekle kalmaz, aynı zamanda çok sayıda virülans geninin aşırı ekspresyonu ile de ilişkilidir. Bir çalışmada tip III sekresyon ve demir taşınması gibi virülans genlerinin artan ekspresyonunun yanı sıra polimiksin B, gentamisin ve siprofloksasine karşı antibiyotik direncinde artışın bakteriyel hareketlilikle ilişkili olduğu bildirilmiştir (24, 86).

2.14.3. Virülans Plazmidleri

Plazmidler bakterilerin aynı türden bakteriler arasında olduğu kadar farklı bakteri türleri arasında da genetik materyal aktarmak için kullandıkları bir yoldur. Patojenik bakterilerdeki birçok plazmid, virülans, antibiyotik direnç genlerini veya kromozom üzerindeki virülans genlerini aktive etmek için gerekli genleri kodlamaktadır. Buna en güzel örnek E. coli serotiplerden biri olan O157:H7'dir. Bu serotip büyük bir virülans plazmidine sahip olup bu plazmidin enterohemolizin, tip-2 salgı sistemi, katalaz-peroksidaz, adezin faktör, metalloproteaz gibi çeşitli genleri kodlayabildiği bildirilmiştir (87, 88).

Hayvanlardan ve çeşitli çevresel örneklerden izole edilen shiga toksin üreten ve üretmeyen E.coli suşları üzerinde yapılan bir çalışmada virülans ve yeni antibiyotik direnç plazmidlerini tanımlamak için tüm genom dizileri karşılaştırılmış, çoğu shiga toksin üreten suşlarda olmak üzere toplam 39 yeni plazmid tanımlanmıştır. Bu plazmidlerden 8'inin antibiyotik gruplarında direnci kodlayan 29 antibiyotik direnç geni içerdiği bildirilmiştir. Plazmidlerin çoğu birden fazla antibiyotik direnç geni ihtiva ettiğinden geniş spektrumlu antibiyotik direncine yol açabilmektedirler. Bu çalışmada virülans plazmidlerinin farklı orijinlerden izole edilen birçok izolatlarda veya serotiplerde bulunabileceği gösterilmiş olup, çoklu virülans ve antibiyotik direnç genlerine sahip plazmidlerin kolayca yayılabileceğini göstermektedir (87, 89).

2.15. Virülans ve Antibiyotik Direncinin Regülasyonu

Virülans ve antibiyotik direnç genlerinin regülasyonu oldukça komplikedir. Bu regülasyon ayrı olaylar olarak düşünülse de birbiriyle bağlantılıdır. Çoğu zaman virülans genlerinin düzenlenmesi antibiyotik direnç genlerinin ekspresyonunu etkileyebileceği gibi bunun tersi de söylenebilir. Ne yazık ki bu genlerin regülasyonu gen ekspresyonunu doğrudan ve dolaylı olarak etkileyebilen bir dizi çevresel faktörden etkilenmektedir. Metilasyon gibi transkripsiyon sonrası modifikasyonlar, ribo-regülasyon, çevresel algılama, stres yanıtı ve quorum sensing yoluyla biyofilm oluşumu dahil olmak üzere en yaygın gen regülasyon şekilleridir (20).

2.15.1. Transkripsiyon Faktörleri

Transkripsiyon faktörleri hem virülans hem de antibiyotik direnç genlerinde global gen düzenleyicileri aracılığıyla doğrudan veya dolaylı olarak gen ekspresyonunu regüle edebilmektedir. Metisiline dirençli S. aureus'ta özellikle de vankomisine (VISA) karşı orta seviye direnç gösteren suşlarda, transkripsiyon faktörleri aracılığıyla antibiyotik direnç genlerinin düzenlenebildiği bildirilmiştir (20, 90).

2.15.2. Post-Trnskripsiyonel Değişiklikler

Post-translasyonel modifikasyonlar iyi bilinen bir regülasyon şekli olsa da virülans ve antibiyotik direncinin düzenlenmesi de post-transkripsiyonel regülasyonlara bağlıdır. Stabil RNA transkriptleri üretmek için bir kalite kontrol mekanizması olarak hareket eden transkripsiyon sonrası modifikasyonlar, prokaryotlarda bildirilenden çok daha yaygın olarak meydana gelir (91, 92).

RNA bağlayıcı elementler transkripsiyon sonrası modifikasyonlardan sorumlu olsa da RNA türleri aynı zamanda virülans ve antibiyotik direnç genlerinin ribo-regülasyonundan da sorumludur. Sonlandırma bazlı ribo-düzenleyicilerde, antibiyotiğin varlığı ya baştan sona okumaya ya da erken sonlandırmaya olanak sağlamakta ve sonuçta antibiyotik direncinin oluşmasına yol açmaktadır (93).

2.15.3. Çevresel Akış

Hem antibiyotik direncinin hem de virülansın etkili bir şekilde düzenlenmesinde, temel ilke bakterinin dış ortamını özellikle de ortamdaki antibiyotiğin varlığını ve konsantrasyonunu algılama ve bunlara yanıt verme yeteneğiyle ilişkilidir. Dış ortam ilişkili metabolik süreçlerin bozulması, biyofilm oluşumu gibi virülans faktörlerin ekspresyonunu da dolaylı olarak etkilemektedir. Antibiyotik varlığında pnömokoklarda bakteriyosin üretiminin etkilenmesi buna güzel bir örnektir (94). Bir çalışmada Ramoplanin dirençli S. aureus suşları bu antibiyotiğin varlığında çok kısa bir süre içinde diğer antibyotiklere hızla direnç geliştiği bildirilmiştir (91, 95).

2.15.4. Stres Yanıtı

Çoklu stres yanıt yolları antibiyotik direnci ve virülansın düzenlenmesinde kilit oyuncular olarak tanımlanmıştır. Oksijen konsantrasyonu gibi çevresel faktörler, transkripsiyon faktörlerinin virülans ve antibiyotik direnç genleri üzerindeki etkisini değiştirebilmektedir. Sözgelimi bir transkripsiyon faktörü (Cra), aerobik koşullar altında patojenite faktörleri güçlü şekilde aktive edilirken bir başka transkripsiyon faktörü (FusR) aynı koşullar altında inhibe edilebilmektedir (96). Örneğin S. aureus'ta iki bileşenli sistem SrrAB anaerobik solunum için gereklidir. SrrAB'nin bakterinin virülans faktörleri olan serin proteaz ve α-hemolizinin atılımına yardımcı olan regülatör sistemi (RNA agr-RNAIII) inhibe ettiği gösterilmiştir (97). Ayrıca hücre dışı polisakkariti artıran ica operonunun ekspresyonunu artırdığı da bildirilmiştir (95).

Stres yanıtının MRSA suşlarında beta-laktam antibiyotik direncinde kilit bir rol oynadığı gösterilmiştir (98). Başka bir çalışmada ise düşük ve yüksek eksternal kalsiyum konsantrasyonlarının bakteriyel virülans faktörleri üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir. Pseudomanas'da bakteriyel hareketliliğin, piyosiyanin üretiminin ve tobramisin duyarlılığının azalmasını mutasyonların tetiklediği bildirilmiştir (97).

Ayrıca karbon depolama düzenleyici sisteminin stres ilişkili olarak değişiklik gösterebildiği ve bu durumun da bakteriyel virülansı etkilediği bildirilmiştir. Bir

çalışmada *L. monocytogenes*'de bağırsaktaki çeşitli virülans genlerini aktive eden strese duyarlı sigma faktörü olduğu da bildirilmiştir (99).

Virülans ve antibiyotik direnci arasında genetik transkripsiyonel faktörler aracılığıyla yapılan regülasyon oldukça komplikedir. Bu konuda çok çeşitli bakteriler üzerinde yapılmış çalışmalar mevcuttur. Bir çalışmada P. aeruginosa'da typA geninde görülen bir mutasyonun bakteriyel virulansı azalttığı, adezyon ve biyofilm oluşumunu tetiklediği bildirilmiştir. Ayrıca bu mutasyonun antibiyotik direncini arttırdığı ve tip III sekresyon sisteminin aşağı yönde regüle ettiği bildirilmiştir (100). Bu çalışmadan farklı olarak başka bir çalışmada ise pseudomonaslarda antibiyotik direnci ve virülans arasında ters bir korrelasyon olduğunu, antibiyotik direnç ve virülans ilişkisinin türe özgü olabileceğini bildirmiştir (101). Ayrıca tip A geninin enteropatojenik E. coli'de flagella, tip III salgı sistemi ve virülans faktörlerinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (96). Bir çalışmada Acinetobacter baumannii'de gerçekleştirilen transpozon tabanlı bir genetik tarama, yalnızca konakta çoğalma için gerekli olmayan, aynı zamanda antibiyotik direnci ve çevresel stres koşullarında da mevcut olan ve virülans ile antibiyotik direnci arasında bir bağlantının varlığını vurgulayan 30 transkripsiyon faktörünü tanımlamıştır (102). Bir çalışmada P. aeruginosa'nın karbapenem antibiyotiklere dirençten sorumlu OprD genindeki mutasyonun bakterinin mukozal kolonizasyonunu, invazyon yeteneğini, makrofajlar için sitotoksisitesini arttırdığı da bildildirilmiştir (91, 103).

2.16. Biyofilm Oluşumu

Virülans ve antibiyotik direnci arasındaki ilişki genellikle bir biyofilm topluluk yapısının oluşumunda görülür. Biyofilm oluşumu patojenitenin önemli bir parçası olup karmaşık bir transkripsiyonel düzenleme ağı tarafından regüle edilir. Biyofilm oluşumu birkaç adımda gerçekleşmekte olup her adımı tipik olarak belirli bir hücre yüzeyi organeli ile ilişkilidir. Bakterinin bir yüzeye gevşekçe bağlanıp tekrar ayrılabildiği tersinir bağlanma flagella, fimbria ve pili tarafından desteklenmektedir. Hücreler birkez adezin ve bir miktar ekstraselüler polimer matriks üretmeye başladığında, hücrelerin yüzeye geri dönüşümsüz olarak bağlandığı kabul edilir. Olgunlaşma aşamasında, bağlı hücreler çoğalmaya ve biyofilmin üç boyutlu yapısını

oluşturmaya yardımcı olan bir hücre dışı polisakkarit matrisi üretimi başlamaktadır (104, 105, 107).

Biyofilm oluşumunun başlaması sadece bir virülans düzenleyicisi olarak kabul edilebilen qourum sensing (çekirdek algılama) ile gerçekleşmez, aynı zamanda biyofilm yapısının direnci de hem virülans hem de antibiyotik direncinin bir düzenleyicisi olarak kabul edilebilir. Bir biyofilm oluştuktan sonra, yine quorum sensing veya iki bileşenli sistemler aracılığıyla biyofilm içindeki ek virülans genlerini aktive edebilir. Sözgelimi L. monocytogenes'te VirR/S sistemi antibiyotiklere ve gıda koruyuculaa karşı direnç de dahil olmak üzere çok sayıda genin ekspresyonunu kontrol etmektedir (106). Ayrıca biyofilmler yapısı gereği antibiyotiklere karşı daha dirençli olmalarının yanı sıra, hücrelerin yakınlığı nedeniyle antibiyotik direncinin ve virülansın transferini ve yayılmasını da kolaylaştırmaktadırlar. Bu süreç bir antimikrobiyalin varlığı gibi çevresel stress altına girdiğinde daha da hızlanmaktadır (107, 108).

2.17. Biyofilm Formasyonu

Biyofilmler virülans ve antibiyotik direncinin iletimini arttırmaktadır. CDC (Hastalık Kontrol Merkezi) bakterilerin çoğunun bir biyofilmde ya da salgılanan bir ekzopolisakkarit, mukoid matris tarafından korunan bir bakteri topluluğunda meydana geldiğini bildirmiştir. İlginç bir şekilde bakterinin bu formasyonu virülans genlerinin senkronize düzenlenmesi de dahil olmak üzere topluluk davranışına yol açmaktadır. Biyofilmler serbest yüzen planktonik muadillerine kıyasla antibiyotiklere karşı 1000 kata kadar daha dirençli olabilmektedir. Ayrıca, glikokaliks adı verilen mukoid bir matris tarafından korunan bu topluluk, antibiyotik direncinin yayılmasını da kolaylaştırmaktadır (109). Bir çalışmada antibiyotiğe dirençli P.aeruginosa suşlarının biyofilm üretimini arttırdığı ve biyofilm formasyonunun antibiyotik direncini koordine edici bir düzenleyici proteine sahip olduğu gösterilmiştir (107, 110).

Biyofilm üreten mikroorganizmalarla yapılan çalışmalarda biyofilm Formasyonu geliştiren tek tip patojenlerin dahi mortaliteye sebep olabilirlerken, özellikle son yıllarda çeşitli çalışmalarda da bildirildiği gibi biyofilm içerisinde çok

tipte patojenlerin yer alabileceği ve hem antibiyotik direncinde daha ciddi sorunlar oluşturduğu hem de progresyonun daha ciddi olabildiği bildirilmiştir (111). Tek tipte patojen barındıran biyofilm formasyonuna göre çok tipte patojenin yer aldığı biyofilm farmasyonunda mikroorganzima metabolizmalarının daha yavaş ve farklı yapılarda olabildiği bildirilmiştir (112). Bir çalışmada biyofilm oluşturan mikst bakteriyel patojenlerin (P. aeruginosa ve S. aureus) bir tavşan modelinde yara iyileşmesi incelenmiş iyileşmenin ayrı suşlarla infeksiyonlara göre daha uzun ve progresyonun daha kötü olduğu bilirilmiştir (113). Biyofilm bileşimi ne olursa olsun biyofilmin oluşumunun virülansı artırdığı açıktır (107).

2.18. Bakteriyel İletişim

Bakteriler arasındaki iletişim, biyofilm oluşumu, sporlanma, antibiyotik direnci ve çeşitli diğer virülans faktörlerinin düzenlenmesi gibi birçok hücresel fonksiyon için gereklidir. Bakteriler ya quorum sensing (çekirdek algılama) ya da bakterilerin direkt veya planlı iletişim biçimleri olan iki bileşenli sistemler aracılığıyla iletişim kurar (114).

Çekirdek algılama (quorum sensing)'lı hücreden hücreye iletişim bakteri yoğunluğuna dayalı olarak hücresel eylemleri koordine eder. Çekirdek algılama mekanizmalarında bakteriler otoindüktörler olan kimyasal sinyal molekülleri salgılamaktadırlar. Bakteri yoğunluğu arttıkça, yakın çevredeki otoindüktör konsantrasyonu da artmakta ve çevredeki bakteriler üzerindeki hücre sinyal reseptörleri ile etkileşime girmektedir (107, 115).

Gram negatif bakteriler arasındaki iletişime asillenmiş homoserin lakton otoindüktörleri aracılık etmektedir. Bunun yanında otoindüktör; otoindüktör 1 ve 2 sırasıyla türe özgü iletişim moleküllerine ve türler arası iletişim moleküllerine aracılık etmektedir. Gram pozitf bakterilerde ise otomatik indükleyici olarak da bilinen peptitler çekirdek algılamasını kolaylaştırmaktadır. Bakteriler hem biyofilm oluşumu için hem de virülansı arttırabilmek için iletişim aracı olarak çekirdek algılamasını kullanabilmektedir (116). Bir çalışmada qourum sensing moleküllerinin hücresel bağlanmayı ve biyofilm oluşumunu kontrol eden genleri etkileyerek suşun virülansını

arttırdığı bildirilmiştir (117). Biyofilm oluşumunu artıran virülans. genlerinin güçlendirilmesi, antibiyotik direnç genlerinin değişimini kolaylaştırabilir (107).

Virülans ayrıca iki bileşenli bakteriyel iletişim sistemleri aracılığıyla da arttırılabilmektedir. İki bileşenli sistemler sinyal molekülünün bir fosforilasyon kaskadı olayına neden olan bir histidin kinaz reseptör proteinine bağlanmasıyla çalışmaktadır. S. aureus'ta birden fazla hücresel işlevi kontrol eden iki bileşenli bir sistem virülans için esas olup stafilokok enfeksiyonlarıyla mücadelede potansiyel bir hedef olarak araştırılmaktadır. Spesifik bakteriyel iletişim mekanizmasından bağımsız olarak iletişimin virülansı arttırdığı ve seçici yaşam veya ölüm baskısının olmaması ve bakteriyel direncin ortaya çıkma şansı çok az olan yeni ilaç hedefler sağlayabilmektedir (107, 118).

2.19. Virülans Gen Transferi

Virülans gen aktarımı antibiyotik direnç genlerinin transferine benzer şekilde spontan mutasyonlar ve yatay gen transferi yoluyla gerçekleşebilmektedir. Yatay gen transferi genlerin hem tek tür arasında hem de birden fazla tür arasında aktarılmasını imkan sağlayabilmektedir. Bu şekilde bir aktarım yakınlıkla kolaylaşlaşmaktadır. Bir planktonik mikroorganizma sesil bir mikroorganizmaya dönüştüğünde plazmidler aracılığıyla aktarım hızlanmaktadır (119, 120, 121).

Antibiyotik direncinde plazmid aracılı yatay gen transferinin rolünü araştıran bir çalışmada, hastanede yatan hastalardan ve sağlıklı gönüllülerden alınan bağırsak mikrobiyotaları karşılaştırılmış izole hastalar arasında da birçok ortak ilaç direnç genlerinin varlığı tespit edilmiştir. Çalışmada ilginç olarak izole bir sağlıklı gönüllüde de bir ilaç direnç geni tanımlanması olmuştur. Bu hastada ilaç direnci kaynağının normal filara ilişkili mi yoksa nozokomiyal kaynaklı mı olduğu tanımlanamamıştır. Yakınlık nedeniyle yatay gen transferine yanında ortamın pH'sı gibi çevresel faktörşerin etkili olabileceği akılda tutulmalıdır. Atık su kaynaklarından izole edilen bakterilerde yüksek tetrasiklin direncinin düşük pH ilişki olduğu bildirilmiştir. Bu durum bir plazmit üzerinde yer alan tetrasiklin direnç genlerinin yatay olarak aktarılmasıyla doğrudan ilişkilidir (120, 121, 122).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araç ve Gereçler

Bu çalışma Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında yapılmıştır. Çalışmada çeşitli klniklerden toplanan yara ve üriner örneklerinden izole edilen tplam 188 S. aureus (97 yara ve 91 üriner sistem) izolatı dahil edildi. Çalışmada S. aureus oksasilin, klindamsin, eritromisin, siprofloksasin, vankomisin, penisilin, gentamisin, TMP-SXT, rifampin duyarlılıkları Vitek-2 (bioMeuriux, France) otomatize sistemle belirlendi. Mikroorganizmaların duyarlılık testleri Klinik ve Laboratuar Standartları Enstitüsü (CLSI) kriterlerine uygun olarak yapıldı. Ayrıca izolatlardan multipleks PCR yöntemiyle ilaç direnç ve metisilin direnç geni (mecA geni) ve virülans genleri (icaA, icaD, coa, pvl, tsst-1, hla, hlb, nuc) varlığı, RT-PCR yöntemiyle araştırıldı. Bakteriyel virülans ile metisilin direnç ilişkisi ise Vero (Afrika yeşil maymun böbrek hücre hattı) hücre kültüründe adezyon ve invazyon deneyleri ile araştırıldı.

3.2. Deneylerde Kullanılan Kimyasallar

- Agaroz (Sigma, ABD)
- Kanlı agar (biEOMrieux, Fransa)
- Müller Hinton Agar (Merck, Almanya)
- Buffer (Fermentas, EU)
- Mg (Fermentas, EU)
- dNTP (Fermentas, EU)
- dH2O (Fermentas, EU)
- Taq polimeraz enzimi (Thermo Scientific Fermentas, EU)
- DNA Ladder (100 bp, Fermentas, EU)
- Etil Alkol (Merck, Almanya)
- Etidium Bromid (Sigma, ABD)
- Potasyum dihidrojen fosfat, KH2PO4 (Sigma, ABD)
- Proteinaz K (Sigma, ABD)

- Potasyum klorür, KCl (Sigma, ABD)
- Sodyum hidrojen fosfat, Na2HPO4 (Sigma, ABD)

3.3. Örneklerin Toplanması ve Kültivasyon

Çeşitli kliniklerden steril eküvyonlarla alınan yara ve idrar örnekleri çevresel etkenlerden kotaminasyona dikkat edilerek transport besiyeri içinde Mikrobiyoloji kültür laboratuvarına getirildi. Mikrobiyoloji laboratuvarına gelen örnekler %5 koyun kanlı agara inoküle edilerek inoküle edilerek 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İzole edilen mikroorganizmaların identifikasyonu, Gram boyama, katalaz testi, plazma koagülaz testi, oksidaz ayıracı ve biyokimyasal reaksiyonlar temeline dayanan biyokimyasal testlerle gerçekleştirildi (ihtiyaç duyulduğunda otomatize kültür sistemleri de kullanılmıştır). İdentifiye edilen izolatlar istenilen örnek sayısına ulaşılıncaya kadar içerisinde %20 oranında gliserol (Merck, Almanya) bulunan buyyonda -70 °C'de muhafaza edildi.

3.4. Kullanılan Besiyerleri, Solüsyonlar

3.4.1. Besiyerleri

Kanlı agar, Müeller-Hinton Agar ve Triptik Soy Buyyon ticari olarak toz halinde temin edildi (bioMeurieux, Fransa). Besiyerlerin sırasıyla 40, 34 ve 3 gr tartılarak bidistile su ile ayrı ayrı 1000 ml'ye tamamlandı. Otoklavda 121°C de 15 dakika sterilize işleminden sonra kanlı agara 45-50°C'ye kadar soğutulduğunda %5.0 (v/v) oranında, steril şartlarda alınmış koyun kanı ilave edilip karıştırıldıktan sonra petri kutularına dağıtıldı.

Müeller-Hinton Agar otoklavizasyondan sonra 9 cm çapında steril petri plaklarına döküldü. Triptik Soy Buyyon ise sterilazyondan sonra oda ısısında 30 dk. bekletilerek +4 °C'ye kaldırıldı. Triptik soy broth besiyerinden saklama besiyeri hazırlamak için soğutulduktan sonra içerisine 25 ml gliserol eklendi. Daha sonra 1'er ml olarak eppendorf tüplere porsiyonlanarak bakteriyel izolatların derin dondurucuda saklanması için kullanıldı.

3.4.2. Fosfat Buffer Tamponu (PBS)

- 8.0 gr NaCl
- 0.2 gr KCl
- 1.15 gr Na2HPO4
- 0.2 gr KH2PO4 tartılarak distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı ve pH'sı 7.2 olacak şekilde ayarlanarak +4ºC'de muhafaza edildi.

3.4.3. RPMI-1640 Besiyeri

Besiyeri ticari olarak toz (powder) olarak temin edildi. Laboratuvarda 2 gr Sodyum Bikarbonat (NaHCO3) 1 lt besiyeri için hazır paket halindeki toz besiyerine eklendi ve 1 lt distile su ile erlenmayer içinde karıştırıldı. Homojenize olması için erlenmayerin ağzı kapatılıp karıştırıcıda 30 dk. kadar karıştırıldı. Homojen hale gelen karışımın ciltrasyon yöntemiyle sterilizasyonu gerçekleştirildi.

3.4.4. Versen-Tripsin Solüsyonunun Hazırlanması

Bu solüsyonun hazırlanması için 8 gr NaCl, 0.2 gr KCl, 2.37 gr Na2HPO4 12 H2O, 0.2 g KH2PO4, 1 g titriplex lll (versen) ve 1.25 gr tripsin 1 lt distile su ile erlenmayer içinde karıştırıldı. Erlenmayerin ağzı kapatılarak karıştırıcıda 30 dk. karıştırılıp homojenize edildi. Homojen hale gelen karışımın filtrasyon yöntemiyle sterilizasyonu gerçekleştirildi.

3.4.5. Hücre Kültrü Çalışmaları İçin PBS Hazırlanması

Solüsyonun hazırlanması için 8 gr. NaCl, 0.2 gr. KCl, 2.37 gr. Na_2HPO_4 12 H_2O ve 0.2 gr. KH_2PO_4 1 lt distile su ile erlenmayer içinde karıştırıldı. Erlenmayerin ağzı kapatılarak karıştırıcıda 30 dk karıştırılıp homojenize edildi. 121 ºC 15 psi 15 dk otoklavda sterilizasyonu yapıldı.

3.4.6. Tripan Mavisi ile Hücre Canlılığı Tayini

Hücre canlılığı tespitinde tripan mavisi yöntemi kullanıldı. Ölü hücrelerin membran bütünlüğünde bozulma olması nedeniyle boya ölü hücrelerin içine girer ve hücreleri boyar. Mikroskopta bakıldığında mavi boyanan hücreler ölü, boya almamış

(mavi boyanmamış) hücreler canlı olarak tespit yorumlanır. Hücre canlılığı tespit için tripan mavisi boyası PBS ile %1 oranında karıştırıldı. Versen-Tripsin çözeltisi ile toplanan hücreler hazırlanan tripan mavisi boyası ile 1:1 olacak şekilde karıştırıldı. Oda ısısında 15 dk. bekletildikten sonra mikroskopta incelenerek hücre canlılığı tayini ve hücre sayımı yapıldı.

3.4.7. Kongo Kırmızısı Besiyerinin Hazırlanması

Ticari olarak temin edilen Brain-Hearth infusion (BHI) broth besiyerinden 37 g, 10 gr agar, 50 gr sükroz, 800 mg Kongo kırmızısı hassas terazide tartılıp erlenmayer içine konuldu. Bidistile suyla 1 litreye tamamlandı. Manyetik karıştırıcıda homojenize edildikten sonra sterilizasyon işlemi için

3.5. Çalışmada Kullanılan Suşlar

Deneylerde Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı bakteri kültür koleksiyonunda bulunan Metisiline dirençli ve *Staphylococcus aureus* suşu (ATCC 33592) ve duyarlı *Staphylococcus aureus* suşu (ATCC 22913) suşları kullanıldı.

3.6. Hücre Kültürü Çalışmaları

Çalışmada bakteriyel adezyon-invazyon testlerinin yapılması için Vero hücre hattı kullanıldı. Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kültür kültür koleksiyonundan temin edilmiştir.

Çalışmada hücre hücre kültürü deneylerinde hücrelerin çoğaltılması ve idamesi için içerisinde %10 oranında fetal dana serumu, 10 mM HEPES, 4 mM glutaminli 100 IU/ml penisilin/streptomisin ihtiva eden RPMI 1640 sıvı besiyeri kullanıldı. Hücrelerin inkübasyonu 37°C, %5 CO_2 ve %95 hava bulunduran inkübatörde gerçekleştirildi. Hücrelerin üretilmesi için $1x10^6$ hücre/ml olacak şekilde farklı hacimlerde (100, 250 ve 500 ml'lik) kültür kaplarına kültür kabının yüzde 10'u nispetinde besiyeri bulunan kaplarda inkübe edildi. Hücrelerin çoğalması için 3-7 gün

arasında üreme günlük takip edilerek hücreler kültür kabı yüzeyinde monolayer tarzda ürediklerinde pasaj işlemleri gerçekleştirildi. İnkübasyon süresi içinde besiyeri pH'ında değişme gözlemlendiğinde besiyeri değişimi yapıldı. Hücreler kültür kabından, hazırlanan tripsinizasyon solüsyonu ile kaldırılarak 50 ml'lik santrifüj tüplerine alınıp 1500 rpm'de 15 dk. santrifüj edilerek hücre pelleti toplandı. Hücre canlılığı ve sayısı %0.9'luk NaCl içinde hazırlanmış %1'lik tripan mavisi ile hemositometrede mikroskop altında belirlendi.

Adezyon ve invazyon testleri düz tabanlı mikroplaklarda yapıldı. Kuyucuklara içerisinde %10 oranında fetal dana serumu bulunan RPMI 1640 besiyeri ile ml'sinde $1x10^6$ hücre olacak şekilde hücre inoküle edildi. Çalışmada slime üreten ve üretmeyen metisilin direnci *S. aureus* kökenleri ile slime üreten ve üretmeyen *msrA* ve *blaZ* kökenleri Vero hücre hattı kullanılarak gerçekleştirildi. İnkübasyon sonunda invazyon yapan bakterilerde direnç genleri ekspresyon düzeyleri belirlendi.

3.7. Direnç ve Virülans Genlerinin Tespiti

3.7.1. Genomik DNA Ekstraksiyonu

Genomik DNA ekstraksiyonu için ticari olarak temin edilen GF-1 Bacterial DNA Extraction Kit (Vivantis, Amerika) kullanıldı. Ekstraksiyon adımları aşağıdaki şekilde uygulandı.

- Saklama besiyeri içinde -80 °C'de muhafaza edilen S. aureus kökenleri benmaride (37 °C'de) çözülerek kanlı besiyerine pasajlanarak ve 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonunda saf tek bir koloniden alınarak steril içerinde 3 ml Müller Hinton Broth bulunan besiyerlerine ekimleri yapıldı ve yeniden aynı şartlarda inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonunda tüpler 4000 devirde 15 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrasında süpernatant atıldı.
- Tüplerde bulunan pelletin üzerine 1000 µl serum fizyolojik konularak vortekslenerek pipetlendi
- Sonra 6000 g' de 2 dakika santrifüj yapılarak süpernatan atıldı.

- Pellet üzerine ticari kit içerisinde buluan solüsyon B1'den 100 µl eklenedi ve güçlü şekilde pipetaj yapılarak resüspanse edildi.
- Hücre süspansiyonu üzerine önceden hazırlanmış lizozim solsyonundan 20 µl (50 mg/ml) eklendi, vortekslenerek 37˚C' de 20 dakika inkübe edildi.
- Ardından tüpler 10.000 g'de 3 dakika santrifüj edilerek süpernatanat atıldı.
- Pellet üzerine 180 µl R2 solğsyonu konularak resüspanse edildi ve sonra üzerine 20 µl proteinaz K eklendi. Vortekslenerek 65˚C, 1000 rpm'de 20 dakika inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonunda tüplere 400 µl BG solğsyonu eklendi ve homojen bir solüsyon elde edilene kadar tüp birkaç kez ters-düz edilerek karıştırıldı, 65˚C'de 10 dakika inkübe edildi.
- Sonra tüplere 200 µl %100'lük etil alkol eklenerek vortekslendi.
- Bu karışım toplama tüpü içine yerleştirilmiş spin kolonlara aktarıldı.
- Tüpler 10.000 g'de 1 dakika santrifüj edilerek sıvı içeren alttaki tüp atıldı ve kolon yeni bir toplama tüplerine yerleştirildi.
- Sonra tüplere 750 µl yıkama tamponu eklendi ve 10.000g'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı atıldı ve kolon tekrar aynı tüpe yerleştirildi.
- Kalan etanolü uzaklaştırmak için 10.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Spin kolon 1.5 ml'lik bir mikrosantrifüj tüpe transfer edildi.
- Mikrosantrifüj tüpe transfer edilen spin kolon üzerine 50-100 µl 70˚C' ye ısıtılmış elüsyon solüsyonu ilave edilerek oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi.
- Tüpler 10.000g'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Son olarak spin kolon atıldı ve mikrosantrifüj tüpünün içindeki elüsyon tamponunda genomik DNA elde edildi.
- Tüpler 10.000 g'de 1 dakika santrifüj edilerek sıvı içeren alttaki tüp atıldı ve kolon yeni bir toplama tüplerine yerleştirildi.
- Sonra tüplere 750 µl yıkama tamponu eklendi ve 10.000g'de 1 dakika
- santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı atıldı ve kolon tekrar aynı tüpe yerleştirildi.
- Kalan etanolü uzaklaştırmak için 10.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.

- Spin kolon 1.5 ml'lik bir mikrosantrifüj tüpe transfer edildi.
- Mikrosantrifüj tüpe transfer edilen spin kolon üzerine 50-100 µl 70˚C' ye
- Isıtılmış elüsyon solüsyonu ilave edilerek oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi.
- Tüpler 10.000g'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Son olarak spin kolon atıldı ve mikrosantrifüj tüpünün içindeki elüsyon tamponunda genomik DNA elde edildi.

3.7.2. PCR Amplifikasyonu

Ekstrakte edilen S. aureus DNA örneklerinden ticari olarak temin edilen; mecA, icaA, icaD, coa, pvl, tsst-1, hla, hlb, nuc ve clfA primerleri kullanılarak ısı döngü cihazında PCR amplifikasyonu gerçekleştirildi (Tablo 1).

Tablo 1. Stafilokoklar için**,** multiplex PCR'da kullanılan primer dizileri.

Primer	Hedef gen	Primer dizisi (5'-3')	Fragment boyutu (bp)	Kaynak
16S rDNA	*Fw*	*5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'*	*420-1500*	127
	Rv	*5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'*		
mecA	*Fw*	*5'-* ACTGCTATCCACCCTCAAAC *-3'*	*163*	123, 124
	Rv	*5'-* CTGGTGAAGTTGTAATCTGG*-3'*		
icaA	*Fw*	5'-CGAGACCAAGATTCAATAAG-3'	*1315*	123, 124
	Rv	5'-AAAGAAAACCACTCACATCAGT-3'		
icaD	*Fw*	5'-ATCATTAGGTAAAATGTCTGCACATGATCCA-3'	*381*	123, 124
	Rv	5' -GCATCAASTGTATTGGATAGCCAAAAGC-3'		
coa	*Fw*	*5'-CGAGACCAAGATTCAATAAG-3'*	*900*	125
	Rv	*5'-AAAGAAAACCACTCACATCAGT-3'*		
pvl	*Fw*	5' -ATCATTAGGTAAAATGTCTGCACATGATCCA-3'	*433*	123, 124
	Rv	5' -GCATCAASTGTATTGGATAGCCAAAAGC-3'		
tsst-1	*Fw*	*5'-CGTAAGCCCTTTGTTGCTTG-3'*	*143*	123, 124
	Rv	*5'-TGTCAGACCCACTACTATAC-3'*		
hla	*Fw*	*5'-CGAAAGGTACCATTGCTGGT-3'*	*744*	128
	Rv	*5'- CCAATCGATTTTATATCTTTC -3'*		
hlb	*Fw*	*5'-GCAATATAAACGCGCTGATTTAATCG-3'*	*420*	126
	Rv	*5'-GAGTGCCTTTATTGACATTAAGGTCG-3'*		
nuc	*Fw*	*5'-GCGATTGATGGTGATACGGT-3'*	*279*	126
	Rv	*5'-AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC-3'*		
clfA	*Fw*	*5'-ATTGGCGTGGCTTCAGTGCTTG-3'*	*357*	126
	Rv	*5'-GCTTGATTGAGTTGTTGCCGGTGT-3'*		

Stafilokoklar için; PCR karışımı 25 µl olarak ayarlanarak aşağıdaki thermal cycler programlarında amplifikasyonlar gerçekleştirildi.

Bileşen	**Her örnek için µl hacim**
Distile su	15.5
Buffer	2.5µl
dNTP	0.5µl
Taq DNA Polimeraz	1µl
$MgCI_2$	2.5µl
P1 forward (F)	1µl
P1 reverse (R)	1µl
Genomik DNA	1µl
Toplam	25µl

Aşama	Tanımlama	Sıcaklık	Süre	
1	İlk denatürasyon	94 °C	5 dk.	
2	Denatürasyon	94 °C	45 sn.	35 siklus
	Bağlanma (Annealing)	58 °C	50sn.	
	Uzama	72 °C	1 dk.	
3	Son uzama (final extension)	72 °C	7 dk.	
4	Bekleme	+4 °C	∞	

3.7.3. 50X TAE Elektroforez Tamponu: 1 litre

-242 gr Tris Base (Sigma)

-57.1 ml Glasiyal asetik asit

-100 ml 0.5 M EDTA (pH 8) (Sigma)

Öncelikle Tris base 600 ml distile su içerisinde çözüldü, sonra glasiyal asetik asit ve son olarak EDTA eklendi. Son hacim distile su ile 1 litreye tamamlandı. TAE 50X olacak şekilde stok solüsyon olarak hazırlandı ve 1xTAE olacak şekilde sulandırılarak kullanıldı.

3.7.4. Yükleme (Loading) Tamponu (6X)

- 40 gr sükroz

- 0.25 gr Bromfenol mavisi

Yukarıda miktarları verilen maddeler karıştırılarak 100 ml olacak şekilde distile su içinde çözdürüldü. Porsiyonlanarak -20 °C‘de muhafaza edildi.

3.7.5. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi Tekniği ile Görüntülenmesi

Isı döngü cihazında amplifikasyon işleminden sonra ürünler %2'lik agaroz jelde yürütülerek incelendi. Agaroz jelin hazırlanmasında TAE (Tris-Asetat-EDTA) tamponu kullanıldı. TAE 50X olacak şekilde stok solüsyon olarak hazırlandı ve 1xTAE olacak şekilde sulandırılarak kullanıldı.

- 50X TAE Elektroforez Tamponu: 1 litre
- 242 gr Tris Base (Sigma)
- 57.1 ml Glasiyal asetik asit
- 100 ml 0.5 M EDTA (pH 8) (Sigma)

Bu amaçla 242 gr Tris base 600 ml distile su içerisinde çözdürüldükten sonra glasiyal asetik asit eklendi. Son olarak ise EDTA eklendi ve son hacim distile su ile 1 litreye tamamlandı.

- Elektroforez için stok TAE solüsyonundan 1xTAE olacak şekilde distile su ile dilüe edildi.

3.7.6. İnvazyon Deneyi

- Hücre kültürlerinde biyofilm üreten MSSA ve MRSA kökenlerinde bakterilerin hücrelere adezyon testleri için pleytin kuyucuklarına antibiyotik solüsyonlarından hazırlanarak ilave edildi. Antibiyotik solüsyonun ilavesinden sonra kültür pleytleri 37 °C'de kısa süreliğine (yaklaşık 10 dk) inkübasyona bırakıldı. Bu süre zarfından hücre yüzeyi ve ortamdaki bakteriler inaktive edilmiş oldu.
- Ardından pleytin kuyucuklarına PBS solüsyonu ilave edilerek yukarıda adezyon deneylerinde olduğu gibi hücre yüzeyleri 3 kez yıkandı.
- Bu aşamadan sonra benzer şekilde hücrelerin üzerine 0.025% Triton X-100 ilave edilerek oda ısısında yaklaşık 5 dakika inkübe edildi.
- Kuyucuklarda oluşan lizat hoomojenize edilerek her bir kuyucuktan alınan örneğin Mueller-Hinton agara ekimleri yapılarak 37 °C'de 24 saat inkübasyonu takiben koloni sayımları gerçekleştirildi.

3.7.7. Slime Üretimi

S. aureus kökenlerinin biyofilm oluşturma potansiyelleri fenotipik olarak Kongo kırmızısı yöntemiyle gerçekleştirildi. Hücre kültürlerinde antibiyotiklerle muamele edilen S. aureus kökenleri Kongo-kırmızısı besiyerine ekim yapılarak biyofilm üretimi slime pozitif *S. aureus* kökenleriyle karşılaştırıldı. Mikroorganizma inokülasyonunu takiben 37 °C 48 saatlik inkübasyon sonrası yapılan değerlendirmede Kongo-kırmısısı besiyerinde siyah renkte kolonilerin varlığı slime üretimi pozitif, açık renkli kolonilerin varlığı ise slime üretimi negatif olarak değerlendirildi.

3.7.8. Direnç ve virülansın *S. aureus suşlarında* Hücre Adezyonu ve İnvazyonu Üzerindeki Etkinliklerinin Değerlendirilmesi

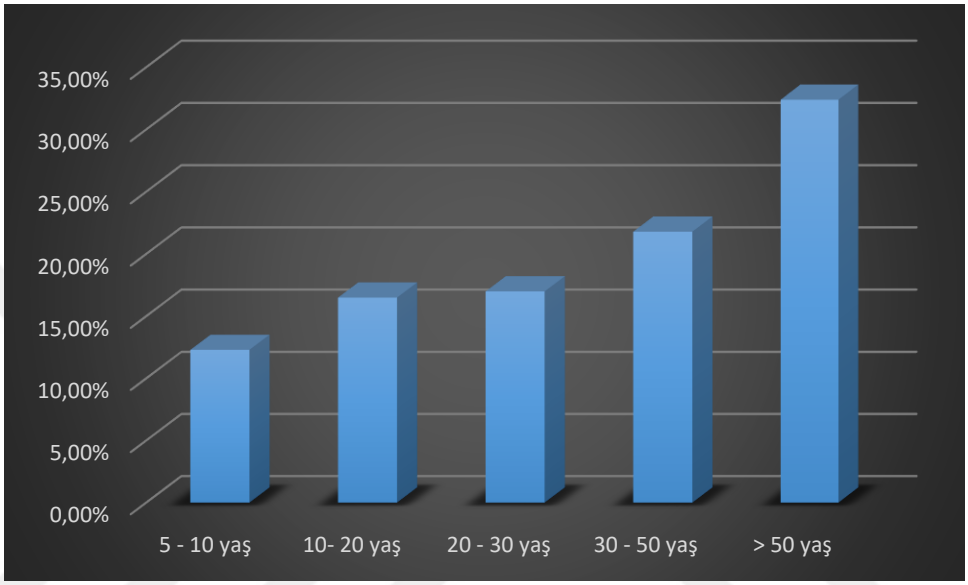
- Biyofilm üreten MSSA ve MRSA kökenlerinde hücresel adezyon ve invazyon etkinliklerini incelemek için deneyler 12-24 kuyucuklu düz tabanlı pleytlerde gerçekleştirildi.
- Bu amaç için S. aureus'un Mueller-Hinton agara pasajlanan taze kültürleri kullanıldı. Bu işlemlerden önce ise Vero hücre hattı her bir ml'sinde 1x106 hücre olacak şekilde hazırlanmış ve en az %80 oranında kültür kabı yüzeyini kaplamış hücreler üzerine antibiyotik solüsyonları (oksasilin; 10 µg/ml, gentamisin; 200 µg/ml ve penisilin; 100 µg/ml) non-toksik konsantrasyonlarda hücrelere inoküle edilerek 2 saat 37 ºC'de inkübe edildi.
- Daha sonra ise S. aureus'un 24 saatlik taze kültürlerinden hazırlanan $1x10^8$ yoğunluktaki bakteri solüsyonu kimyasal bileşiklerle muamele edilen hücre kültür besiyerlerine ilave edildi.
- Adezyon deneylerinin sonuçlandırılması için 37 ºC'de 3 saat inkübasyonu gerçekleştirildi. Pleytin kuyucuklarına PBS solüsyonu ilave edilerek aspire edildi. Bu işlem 3 kez tekrarlanarak hücrelerin yıkama işlemleri gerçekleştirildi.
- Adezyon testleri için bu aşamadan sonra; hücreler 0.025% Triton X-100 ile muamele edilerek ve bu solüsyon ile en 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda hücreler ve mikroorganizmalardan oluşan karışım homojenize edilerek ve pleytin her bir kuyucuğundan alınan örnekler Mueller-Hinton agara ekimleri gerçekleştirildi. İnkübasyondan 24 saat sonra bakteri koloni sayımları gerçekleştirildi.

3.8. İstatistiksel Analiz

Biz bu çalışmada üriner sistem ve yara enfeksiyonlarından izole edilen *S. aureus* kökenlerinde ilaç direnç profilleri ile virülans genlerinin (icaA, icaD, coa, pvl, tsst-1, hla, hlb, nuc, hla, pvl, clfA) frekansını araştırmayı, ilaç direnci ile virülanslık arasındaki korelasyonu ise Vero hücre hattında adezyon invazyon testleriyle araştırmayı amaçladık. İstatiksel Analiz: Çalışmada elde edilen verilerin analizi için tek ve/veya çift yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA test) ve Student's-T Testi kullanıldı. Ortalamalar arası farkların önem dereceleri test edilirken tüm analizlerde farklar $p<0.05$ ise istatiksel olarak anlamlı kabul edildi. Gruplar arası herhangi bir farkın oluşup oluşmadığı önce Kruskal-Wallis ve sonrasında ise her grubun kontrol grubuna göre farkını saptamak için Mann-Whitney testleri uygulanarak analizler yapıldı. Tüm istatiksel analizler Graphpad Prizma yazılımı programı kullanılarak gerçekleştirildi. Ortalamalar arası farkların önem dereceleri test edilirken tüm analizlerde farklar $p<0.05$ istatiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen hastaların yaş aralığı 5-83 arasında olup yaş ortalaması 34.8±19.9 idi. Hastaların 23'si (%12.3) 5-10, 31'si (%16.5) 10-20, 32'si, (%17.0) 20-30, 41'i (%21.8) 30-50 ve 61'i (%32.4) ise 50 yaşından büyük idi (Şekil 1).

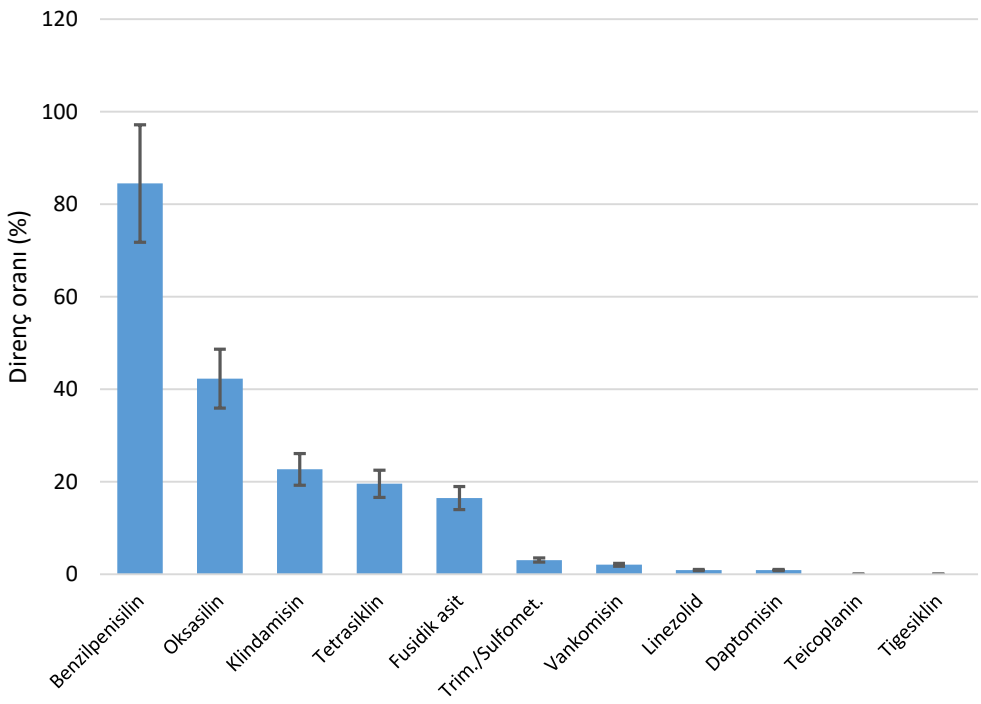


Şekil 1. Örnek çalışılan hastaların yaş oranları

Çalışmada yara ve üriner sistem infeksiyonlarından izole edilen stafilokoklarda MİK referans değerleri dikkate alınarak antibiyotik direnç profilleri belirlenmiştir (Tablo 2, şekil 2). Yara örneklerinde penisilin direnci %84.5 olarak en yüksek oranda tespit edilirken, oksasilin direncinin de oldukça yüksek olduğu (%42.3) bulunmuştur. Örneklerde teikoplanin ve tigesiklin direnci tespit edilmezken, vankomisin, linezolid ve daptomisin dirençli vakalara da rastlanmıştır (Şekil 2).

Tablo 2. Yara infeksiyonlarından izole edilen stafilokok türlerinde antibiyotik direnç profilleri.

Antibiyotik	MİK (µg/L)	n: 97	(%)
Benzilpenisilin	0.03-0.5	82/97	84,5
Oksasilin	0.25-4	41/97	42,3
Klindamisin	0.12-4	22/97	22,7
Tetrasiklin	1-16	19/97	19,6
Fusidik asit	0.5-32	16/97	16,5
Trimotoprim/Sulfometaksazol	10-160	3/97	3,1
Vancomisin	0.5-32	2/97	2,1
Daptomisin	0.25-2	1/97	0,9
Linezolid	1-2	1/97	0,9
Teikoplanin	0.5-32	0/97	0
Tigesiklin	0.12-0.25	0/97	0

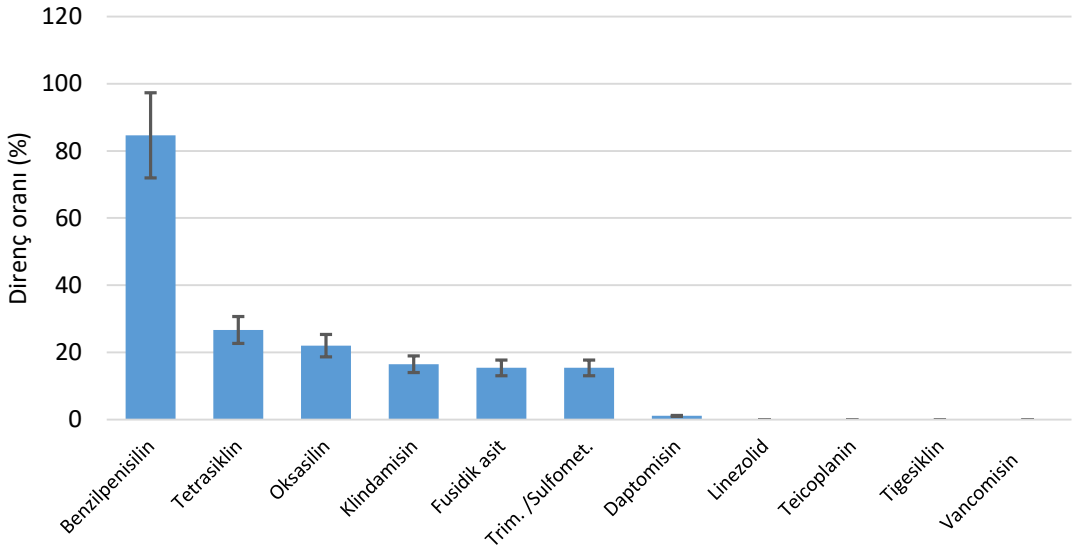


Şekil 2. Yara infeksiyonlarından izole edilen *S. aureus* suşlarında antibiyotik direnç oranları.

Üriner sistem infeksiyonlarından izole edilen suşlarda ise penisilin direnci yara örneklerinde olduğu gibi yüksek oranda bulunurken oksasilin direncinin anlamlı derecede daha düşük oluğu tespit edilmiştir (%22.8). Üriner sistem etkenleri olarak izole edilen stafilokoklarda tetrasiklin direnci, penisilin direncini takip eden yüksek direnç profilli antibiyotik olurken (%26.7), Daptomisin, Linezolid, Teikoplanin ve vancomisin dirençli suşşa rastlanılmamıştır (Tablo 3, şekil 3).

Tablo 3. Üriner sistem infeksiyonlarından izole edilen stafilokok türlerinde antibiyotik direnç profilleri.

Antibiyotik	MİK (µg/L)	n:91	%
Benzilpenisilin	0.25-4	77/91	84,6
Tetrasiklin	0.12-4	24/91	26,7
Oksasilin	1-16	20/91	22,0
Klindamisin	0.25-2	15/91	16,5
Fusidik asit	0.5-32	14/91	15,4
Trimotoprim/Sulfometaksazol	10-160	14/91	15,4
Daptomisin	1-2	1/91	1,1
Linezolid	0.03-0.5	0/91	0
Teikoplanin	0.5-32	0/91	0
Tigesiklin	0.12-0.25	0/91	0
Vancomisin	0.5-32	0/91	0

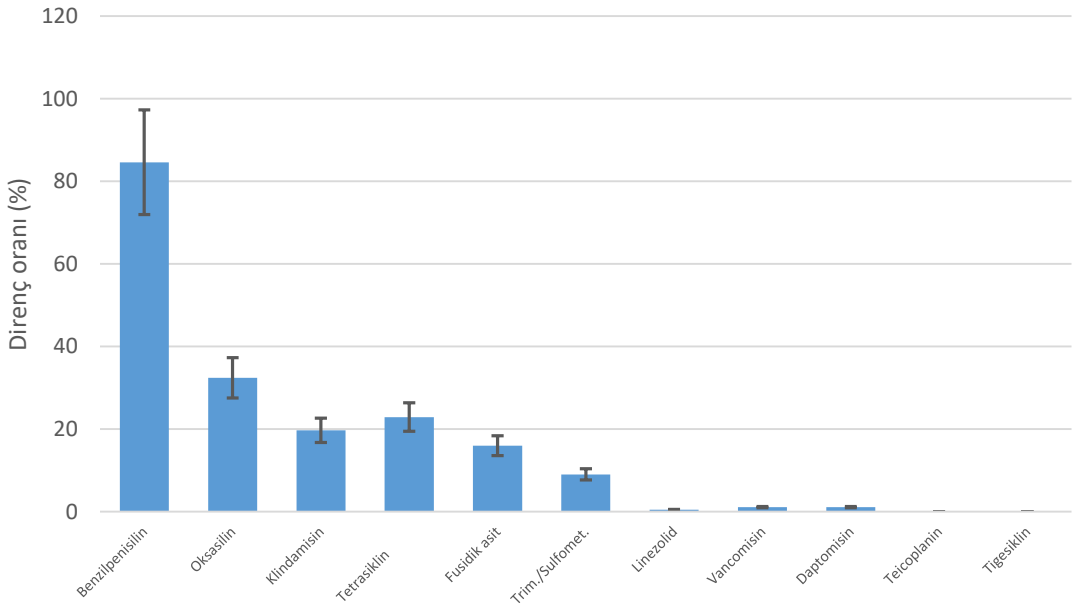


Şekil 3. Üriner sistem infeksiyonlardan izole edilen stafilokok kökenlerinde ilaç direnç oranları.

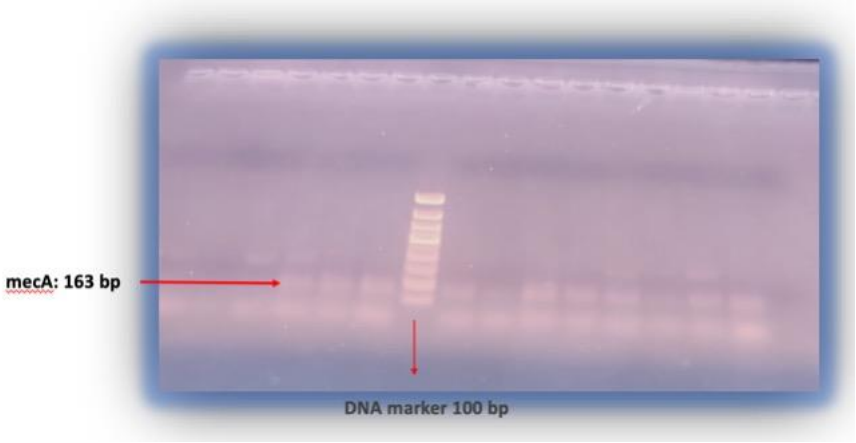
Tablo 4. Yara ve üriner sistem infeksiyonlarından izole edilen stafilokok türlerinde antibiyotik direnç profilleri.

Antibiyotik	MİK (µg/L)	n: 188 Yara+üriner: toplam	%
Benzilpenisilin	0.03-0.5	77+82: 159	84,6
Oksasilin	0.25-4	41+20: 61	32,4
Klindamisin	0.12-4	22+15:37	19,7
Tetrasiklin	1-16	19+24:43	22,9
Fusidik asit	0.5-32	16+14: 30	16,0
Trimotoprim/Sulfometaksazol	10-160	3+14: 17	9,0
Linezolid	1-2	0+1:1	0,5
Vancomisin	0.5-32	2+0:	1,1
Daptomisin	0.25-2	1+1:2	1,1
Teicoplanin	0.5-32	0	0
Tigesiklin	0.12-0.25	0	0

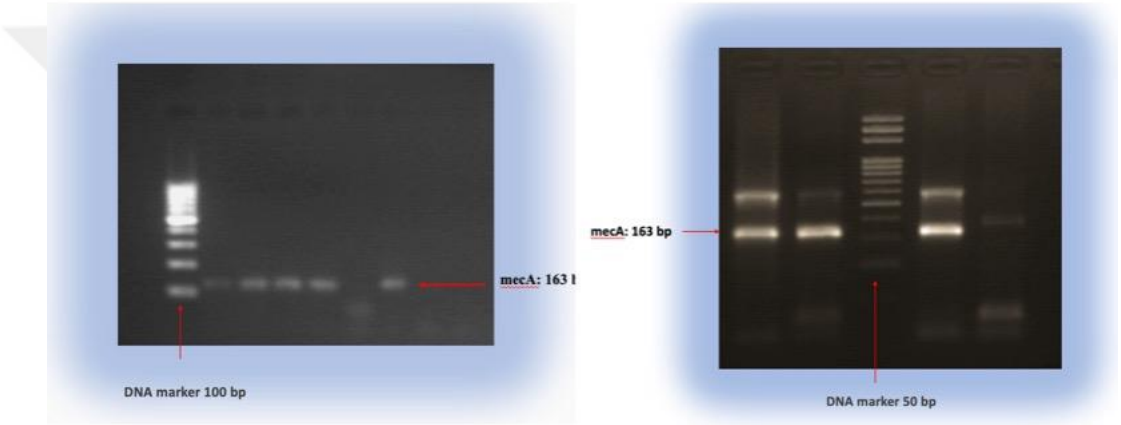
Yara ve üriner sitem infeksiyonu etkeni olarak izole edilen stafilokoklarda ise toplam ilaç direnç profilleri değerlendirildiğinde penisilin, oksasilin ve klindamisin direnç oranlarının sırasıyla %84,6, 32,4 ve 19,7 olduğu saptanmıştır. Teikoplanin ve tigesikline direnç görülmemiştir (Şekil 4; Tablo 4).



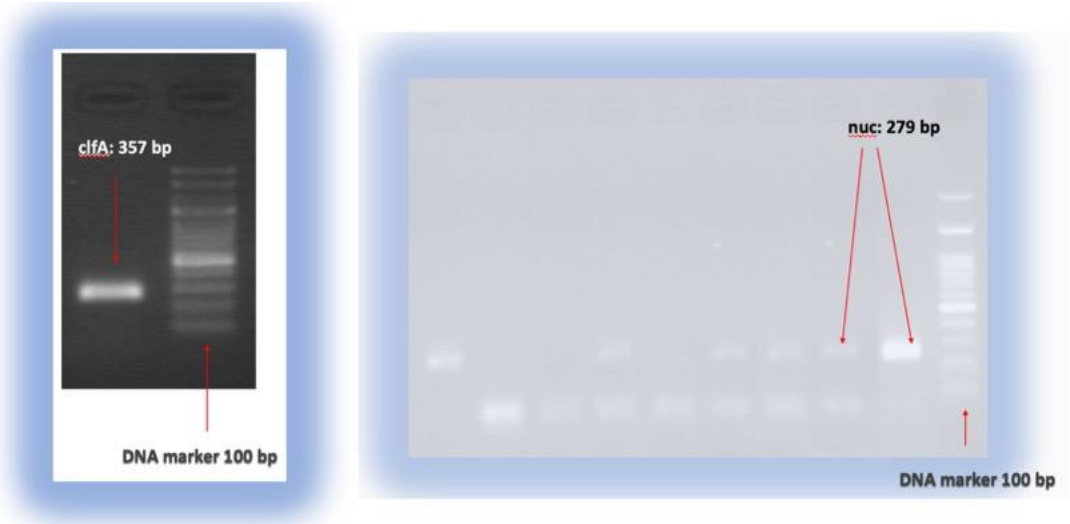
Şekil 4. Yara ve üriner infeksiyonlardan izole edilen stafilokoklarda antibiyotik direnç oranları.



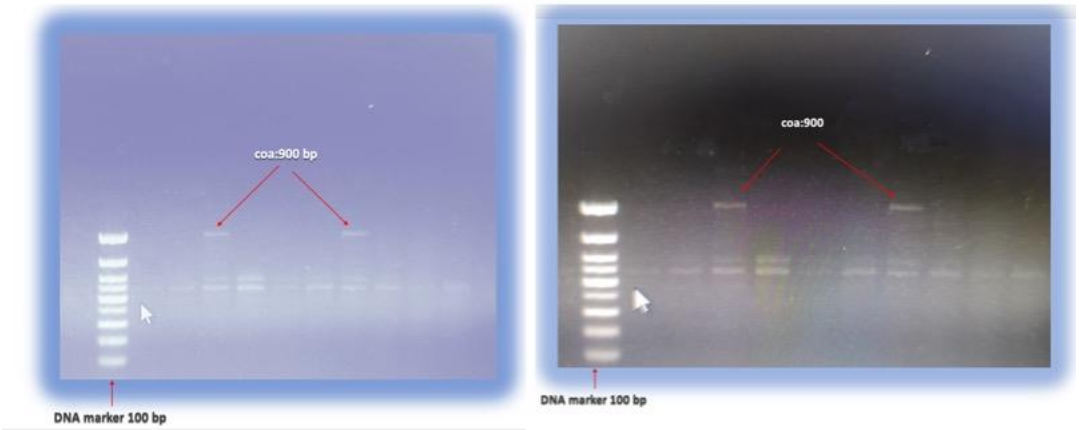
A1. MecA geni 163 bp, DNA marker 100 bp.



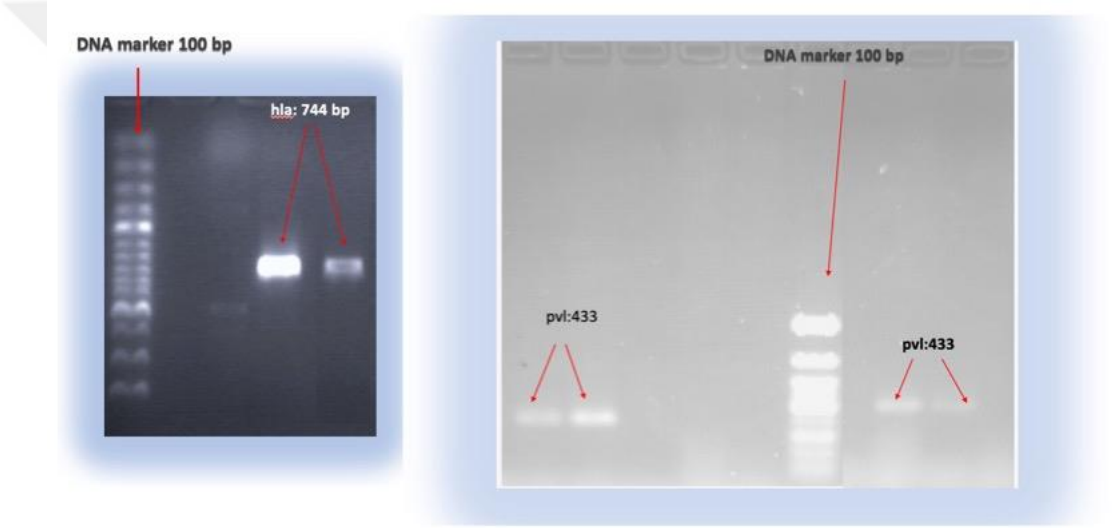
A2. MecA geni 163 bp, DNA marker 100 bp.



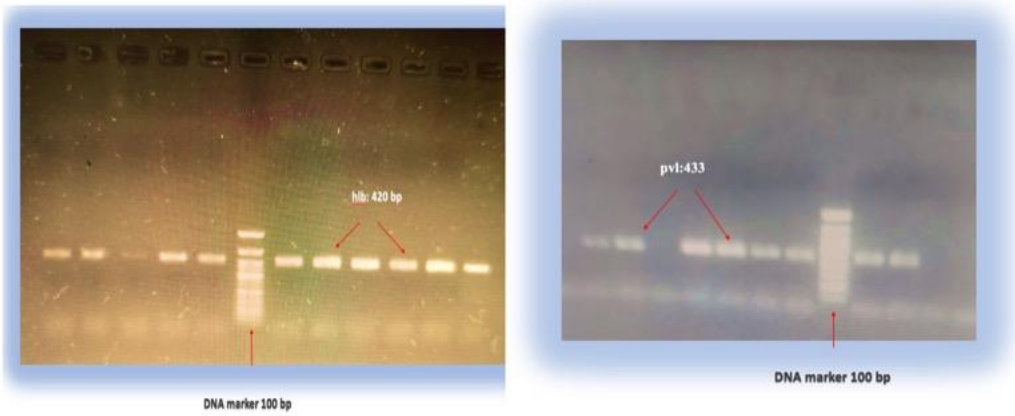
B. clfA geni 357 bp, nuc: 279 bp, DNA marker 100 bp.



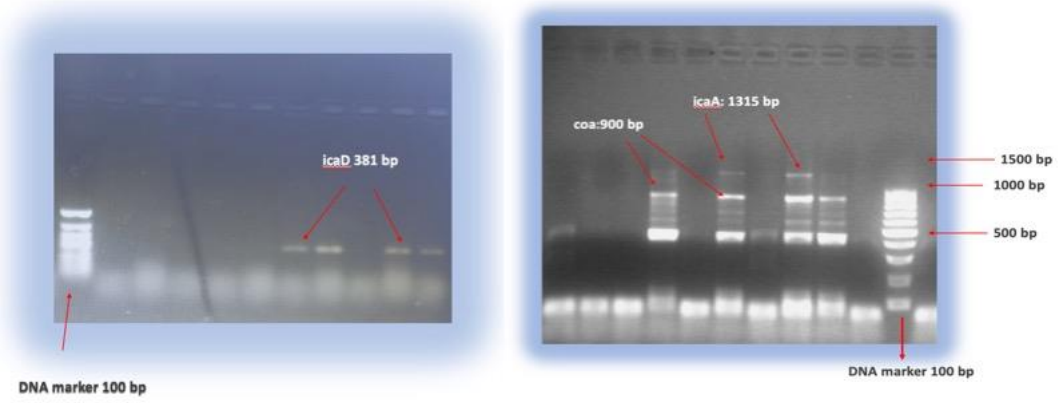
C. coa geni 900 bp, DNA marker 100 bp.



D. Hla geni 744 bp, pvl geni 433 bp, DNA marker 100 bp.



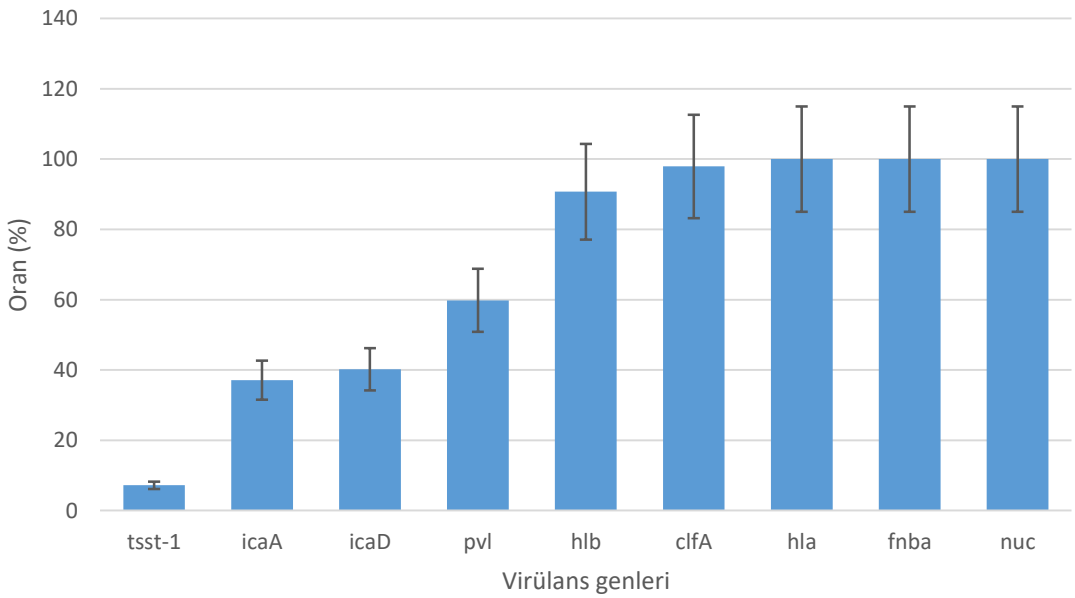
E. Hlb geni 420 bp, pvl geni 433 bp, DNA marker 100 bp.



F. icA geni 1315 bp, icaD geni 381 bp, coa geni 900 bp, DNA marker 100 bp.

Şekil 5. A-F. MecA, icaA, icaD, coa, hla, hlb, clfA ve nuc genlerinin PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüleri. Marker: 100 bp.

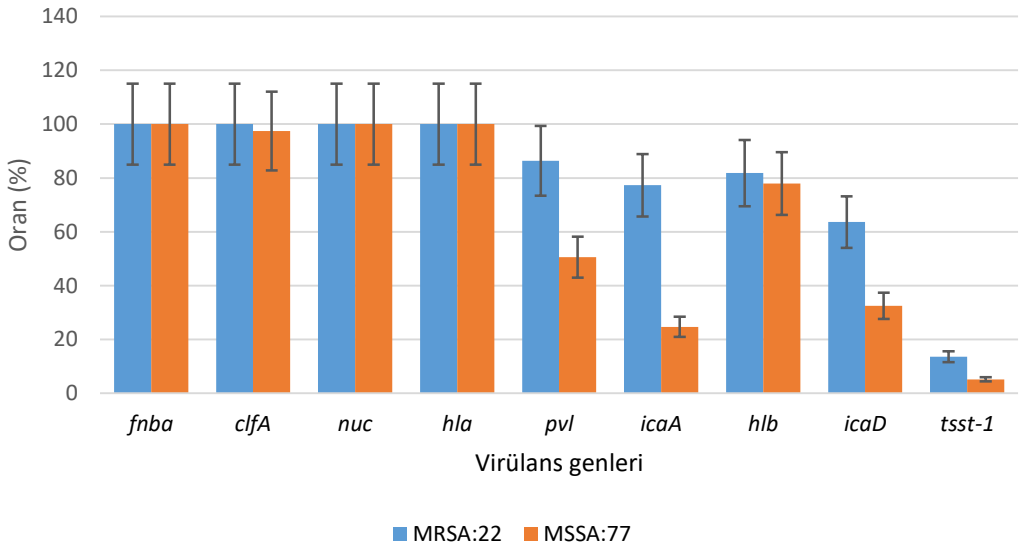
Yara örneklerinden izole edilen virulans genlerinin dağılımı Şekil 10'da verilmiştir. Nükleaz (nuc), fibronektin (fnba) ve hemolizin a (hla) genleri varlığı tüm suşlarda varlığı tespit edilirken, benzer şekilde clumping factor A (clfA)'nın yüksek düzeylerde varlığı saptanmıştır. Bu örneklerde en düşük düzeyde tespit edilen virülans geni ise toksik şok sendromu (TSST-1) geni idi (%7.2).



Şekil 6. Yara örneklerinden izole edilen stafilokoklarda virulans genlerinin dağılımı.

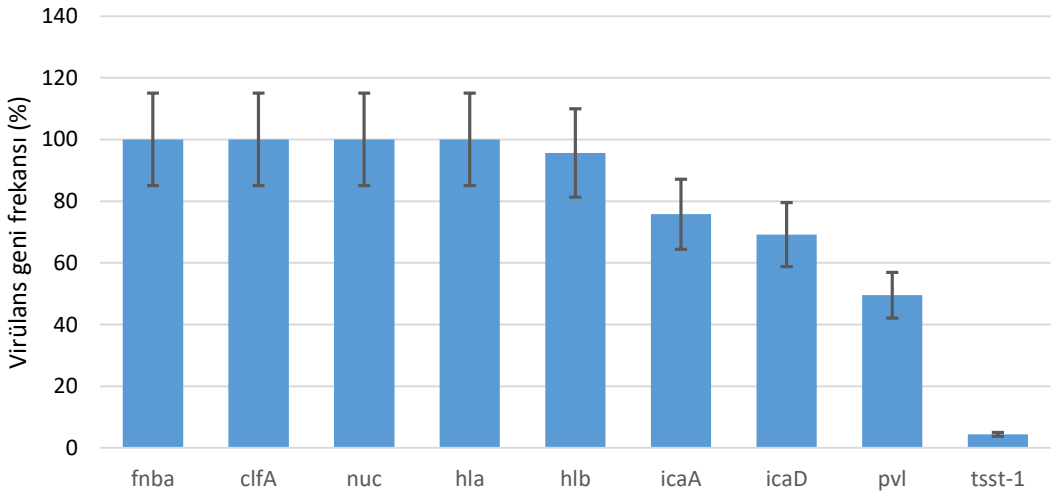
Yara örneklerinde virülans geni varlığı ile metisilin dirençli kökenlerde virülans genlerinin dağılımı incelendiğinde ise fibronektin (fnba), klumping faktör

(clfA), nükleaz (nuc), hemolizin a (hla) ve hemolizin b (hlb) genlerinin varlığı metisilin direncine göre değişmezken, panton-valentin lökosidin (pvl), slime genleri (icaA ve icaD) ve toksik şok sendromu (tsst-1) genlerinin varlığı metisilin direnciyle direkt ilişkili tespit edilmiştir (Şekil 6 ve 7).



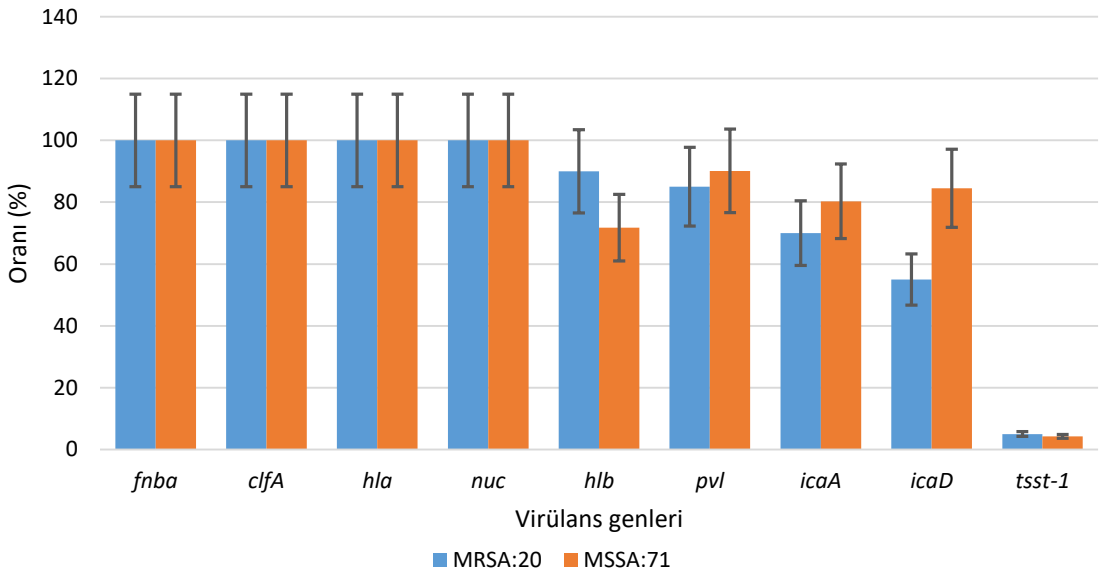
Şekil 7. Yara örneklerinden izole edilen stafilokoklarda metisilin direcine göre virülans genleri frekansı.

Üriner sistem orjinli stafilokoklarda icaA, icaD, pvl ve tsst-1 genlerinin frekansı sırasıyla %75.8, 69.2, 49.5 ve 4.4 idi. Suşların tamamında diğer virülans genleri (fnba, clfa, nuc ve hla: %100) varlığı tespit edilmiştir (Şekil 8).



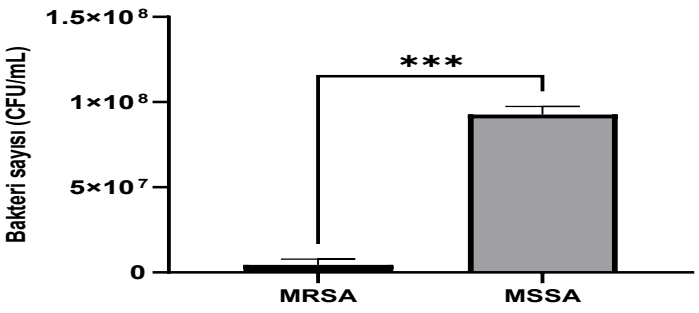
Şekil 8. Üriner infeksiyonlardan izole edilen stafilokoklarda virülans genlerinin frekansı.

Enfeksiyöz etken olarak ürüner sistemden izole edilen stafilokoklarda mecA geni varlığı ile fnba, clfA, nuc, hla ve hlb genlerinin arasında anlamlı bir korelasyon tespit edilmezken, icaA ve icaD geleri ile hemolizin b geni varlığı arasında anlamlı bir ilişkinin varlığı saptandı (Şekil 9).



Şekil 9. Üriner infeksiyonlardan izole edilen stafilokoklarda metisilin direnci varlığı ile virülans genleri arasındaki korelasyon.

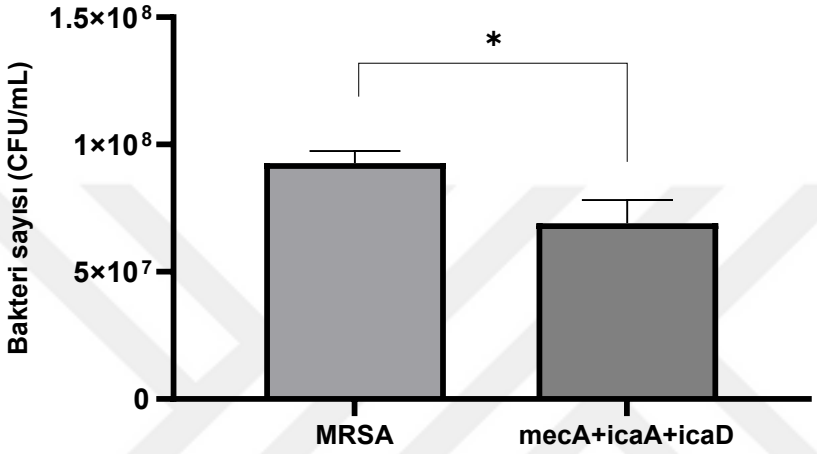
Vero hücreleriyle muamele edilen MRSA ve MSSA suşlarında hücresel adezyon sonuçları şekil 14'te verilmiştir. Deneylerde metisilin dirençli kökenlerin istatiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek hücresel invazyon yaptığı tespit edilmiştir (Şekil 14).



Gruplar	Özet	P değeri
MRSA vs MSAA	***	0,0003

Şekil 10. Vero hücrelerinde metisilin dirençli ve duyarlı stafilokok türlerinin hücre adezyon testi sonuçları.

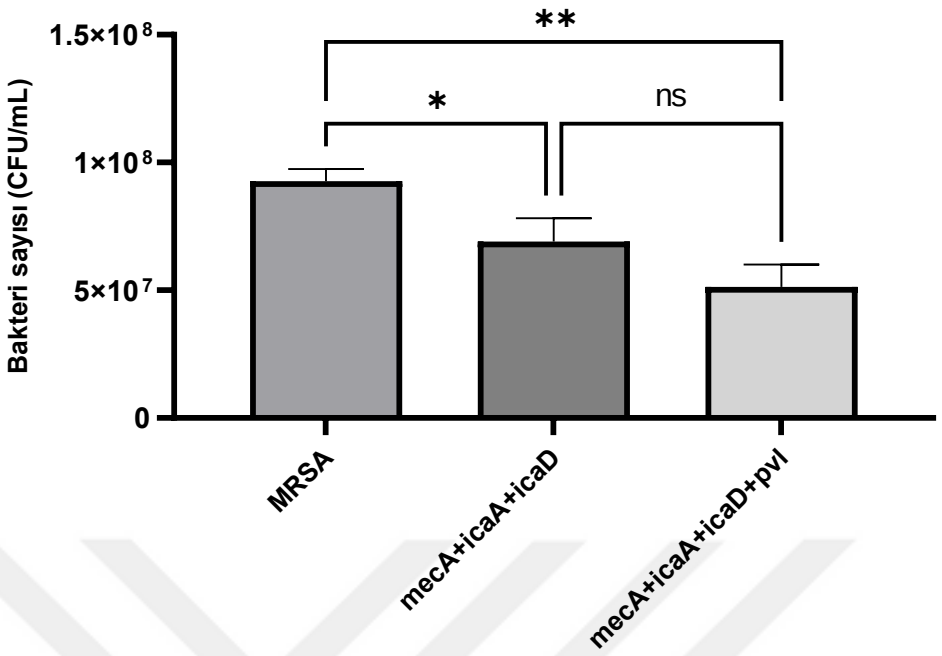
Şekil 11'te de görüldüğü gibi metisilin duyarlı ve dirençli *S. aureus* kökenleri ile metsilin dirençli artı slime üretimi yapan suşların hücresel adezyon sonuçları verilmiştir. Bakteriyel slime üretiminin metisilin direnci varlığında hücrelerde metisilin duyarlı kökenlerle kıyaslandığında anlamlı derecede fark tespit edilirken, MRSA kökenleri ile slime üreten MRSA kökenleri arasında istatiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmemiştir (Şekil 11).



Gruplar	Özet	P değerleri
MRSA vs. mecA+icaA+icaD	*	0,0165

Şekil 11. Vero hücrelerinde slime genleri varlığında metisilin dirençli ve duyarlı stafilokok türlerinin hücre adezyon testi sonuçları.

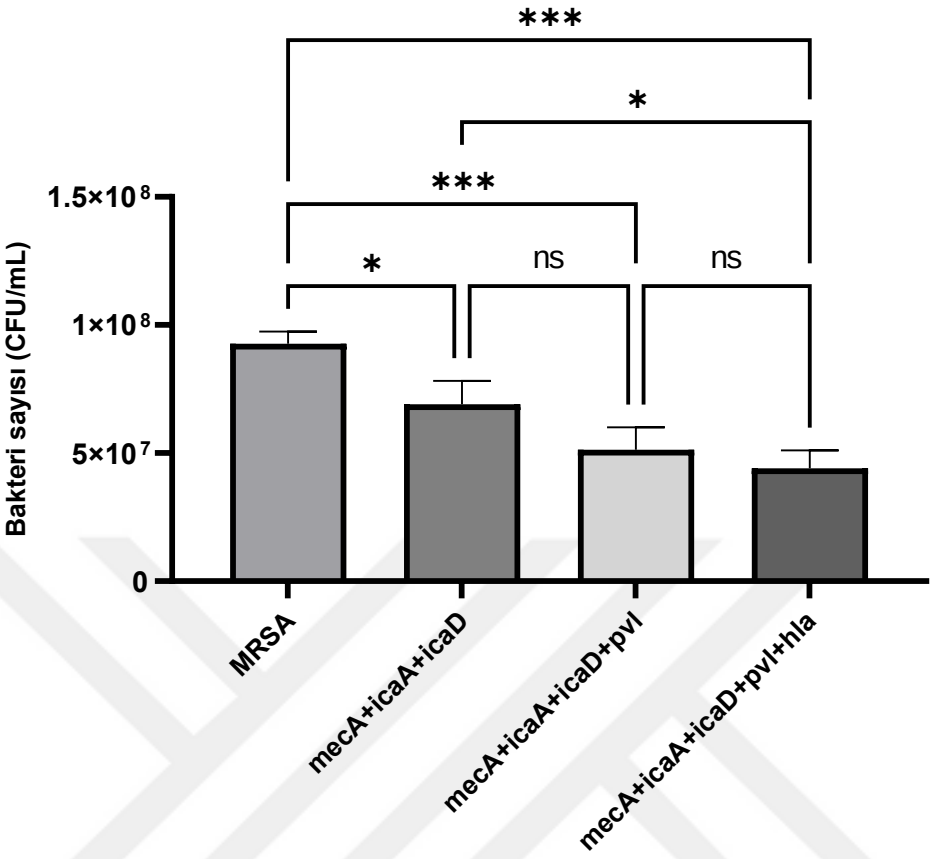
Panton valentin lökosidin virülans geninin metisilin dirençli slime üretimi yapan suşlarla kıyaslandığında hücresel adezyon testleri arasında anlamlı bir fark tespit edilmezken (p=0,0574), slime genleri ve pvl genlerini birlikte taşıyan metisilin dirençli kökenlerin metisilin dirençli ve duyarlı *S. aureus* suşları arasında istatiksel olarak anlamlı derecede farklılıklar tespit edilmiştir (sırasıyla p=0,0004 ve p=0,0002; Şekil 12).



Gruplar	Özet	P değerleri
MRSA vs. mecA+icaA+icaD	*	0,0231
MRSA vs. mecA+icaA+icaD+pvl	**	0,0016
mecA+icaA+icaD vs. mecA+icaA+icaD+pvl	ns	0,0722

Şekil 12. Vero hücrelerinde slime (icaA, icaD) ve pvl genlerinin metisilin dirençli ve duyarlı kökenlerde hücre adezyonu test sonuçları.

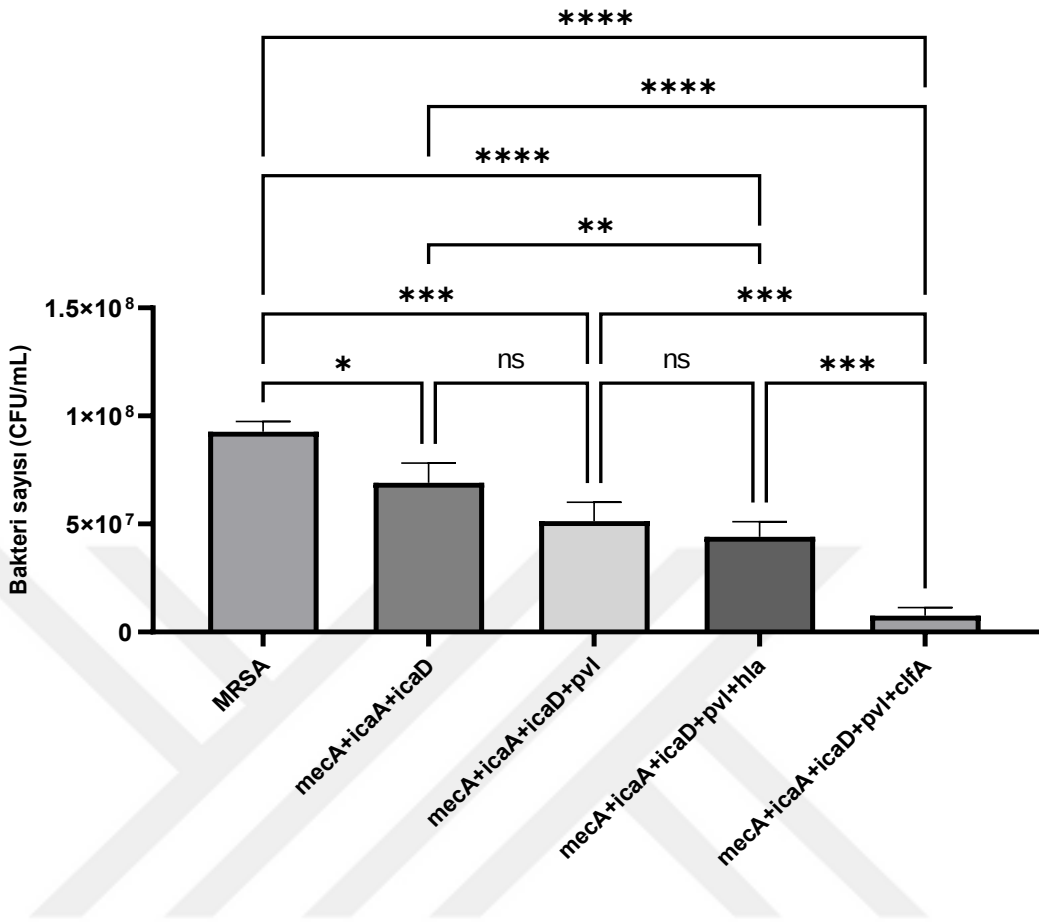
Hemolizin aktivitesi tespit edilen slime üreten, panton valentin lökosidin geni pozitif metisilin dirençli suşlarla, slime üretimi yapan panton valentin lökosidin geni pozitif suşlar arasında kültür sıvısında bakteri sayımları arasında anlamlı bir fark saptanmazken (p=0,0671), slime üretimi yapan metisilin dirençli suşlarla kıyaslandığında anlamlı derecede azalma tespit edilmiştir (p=0,0093; Şekil 13).



Gruplar	Özet	P değerleri
MRSA vs. mecA+icaA+icaD	****	<0,0001
MRSA vs. mecA+icaA+icaD+pvl	****	<0,0001
MRSA vs. mecA+icaA+icaD+pvl+hla	****	<0,0001
mecA+icaA+icaD vs. mecA+icaA+icaD+pvl	***	0,0003
mecA+icaA+icaD vs. mecA+icaA+icaD+pvl+hla	*	0,0132
mecA+icaA+icaD+pvl vs. mecA+icaA+icaD+pvl+hla	***	0,0002

Şekil 13. Vero hücrelerinde slime (icaA ve icaD), pvl ve hemolizin genlerinin (hla ve hlb) metisilin dirençli ve duyarlı kökenlerde hücre adezyon test sonuçları.

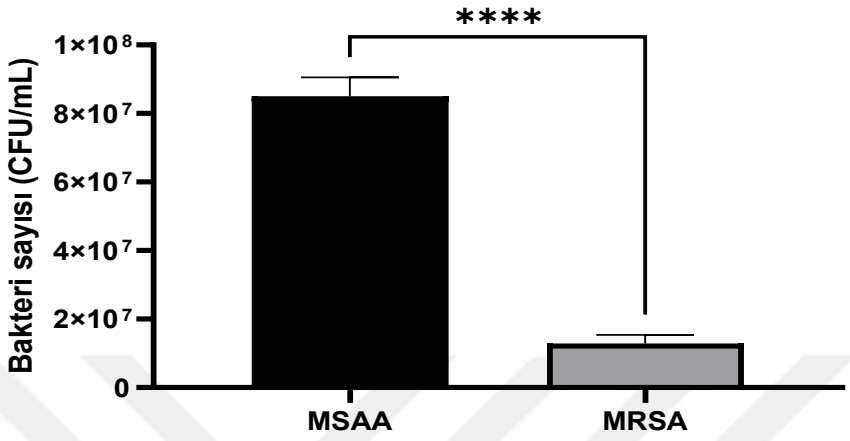
Slime üretimi, panton valentin lökosidin genleri, hemolizin aktivitesi ve klumping faktörü pozitif olan metisilin dirençli *S. aureus* kökenleri ile slime üreten, pvl ve hemolizin aktivitesi pozitif olan kökenler arasında hücresel adezyon test sonuçlarının anlamlı derecede farklı olduğu tespit edilmiştir (p=0,0002; Şekil 14).



Gruplar	Özet	P değerleri
MRSA vs. mecA+icaA+icaD	*	0,0136
MRSA vs. mecA+icaA+icaD+pvl	***	0,0002
MRSA vs. mecA+icaA+icaD+pvl+hla	****	<0,0001
MRSA vs. mecA+icaA+icaD+pvl+clfA	****	<0,0001
mecA+icaA+icaD vs. mecA+icaA+icaD+pvl	ns	0,0688
mecA+icaA+icaD vs. mecA+icaA+icaD+pvl+hla	**	0,0096
mecA+icaA+icaD vs. mecA+icaA+icaD+pvl+clfA	****	<0,0001
mecA+icaA+icaD+pvl vs. mecA+icaA+icaD+pvl+hla	ns	0,7080
mecA+icaA+icaD+pvl vs. mecA+icaA+icaD+pvl+clfA	***	0,0001
mecA+icaA+icaD+pvl+hla vs. mecA+icaA+icaD+pvl+clfA	***	0,0006

Şekil 14. Vero hücrelerinde slime ve panton-valentin lökosidin, hemolizin ve klumping faktörü genlerinin metisilin dirençli ve duyarlı kökenlerde hücre adezyon test sonuçları.

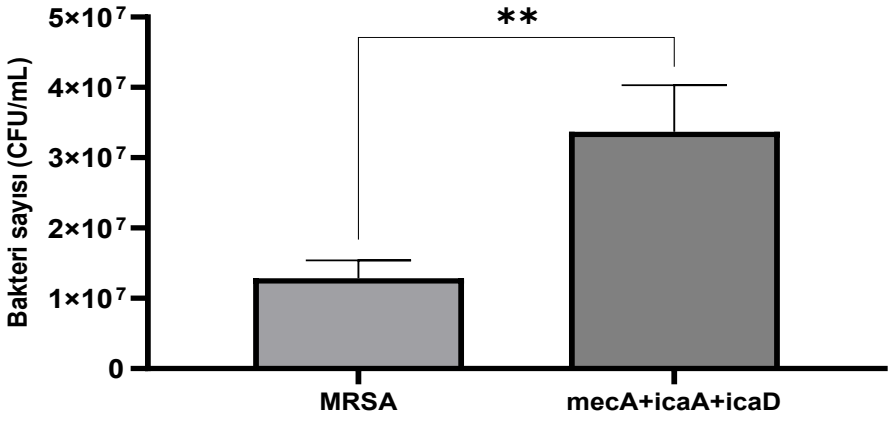
Şekil 15'da görüldüğü gibi metisilin dirençli *S. aureus* kökenlerinin Vero hücrelerine metisilin duyarlı kökenlerle kıyaslandığında analamlı derecede yüksek oranda invazyon yaptığı tespit edilmiştir (p<0.0001; Şekil 15).



Gruplar	Özet	P değeri
MRSA vs MSSA	****	<0,0001

Şekil 15. Vero hücrelerinde Metisilin dirençli ve duyarlı stafilokok türlerinin hücre invazyon test sonuçları.

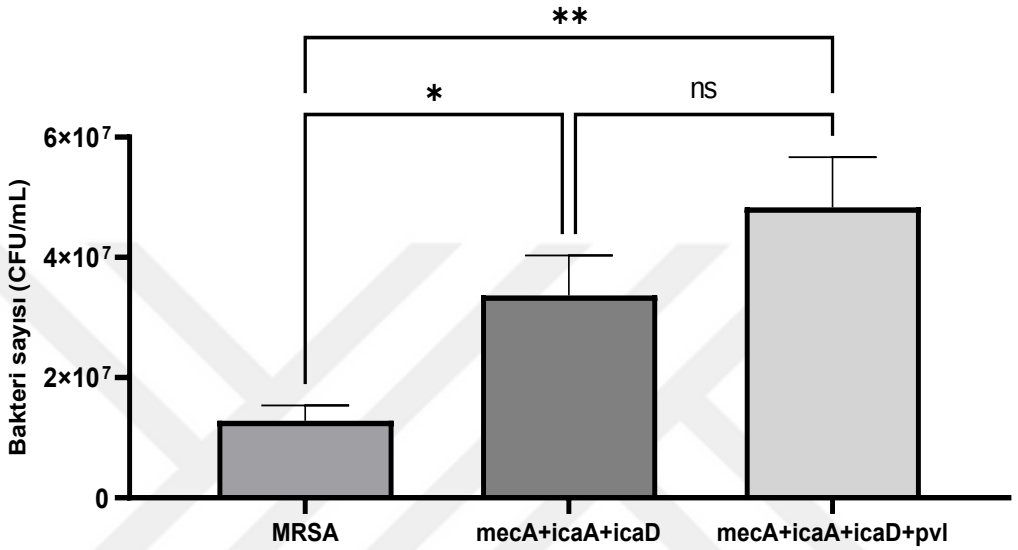
Metisilin dirençli *S. aureus* kökenleri ile slime üreten metisilin dirençli kökenler kıyaslandığında slime üretiminin hücresel invazyonu anlamlı düzeyde arttırdığı tespit edilmiştir (p=0,0086; Şekil 16).



Gruplar	Özet	P değeri
MRSA vs MSSA	**	<0,0072

Şekil 16. Vero hücrelerinde slime genleri varlığında metisilin dirençli ve duyarlı stafilokok türlerinin hücre invazyon test sonuçları.

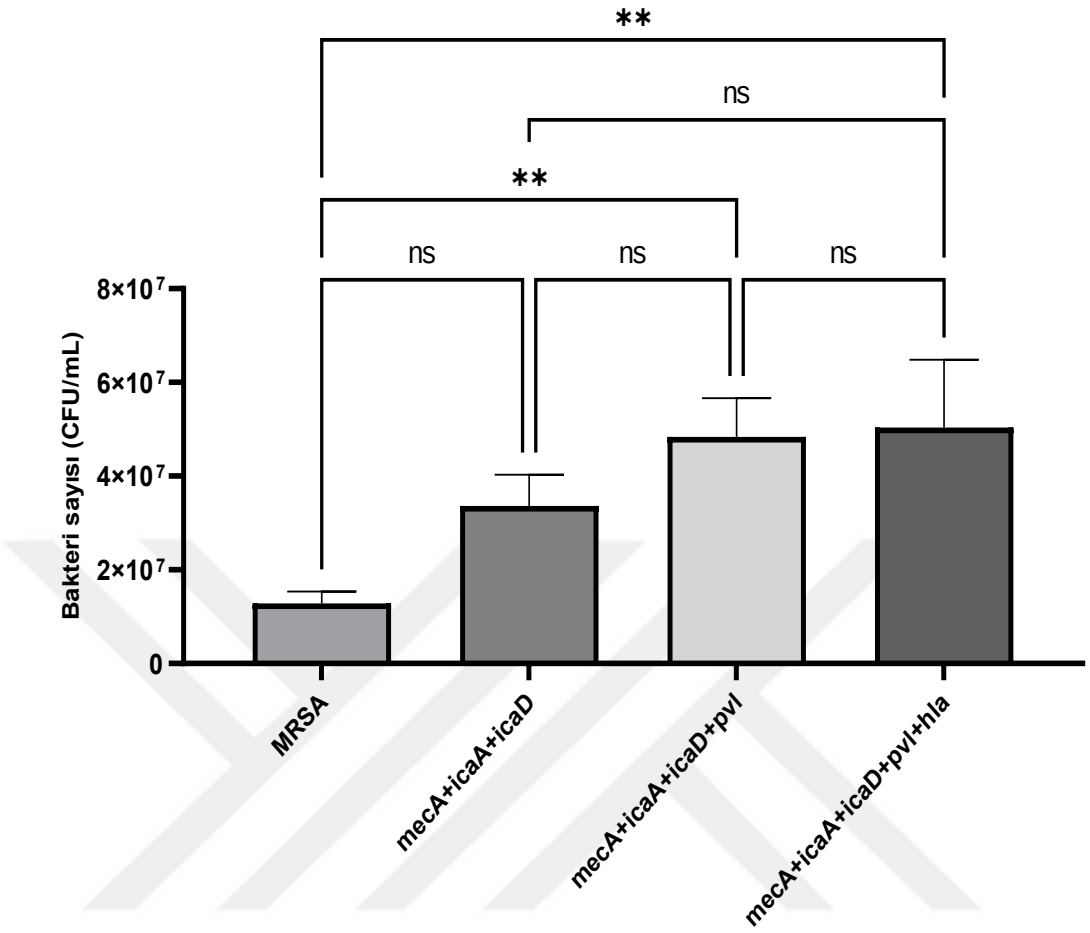
Slime üreten metisilin dirençli *S. aureus* kökenleri ile panton valentin lökosidin geni pozitif olan slime üreten metislin direçli kökenler arasında istatiksel olarak bir anlamlılık olmasa da (p=0,0743), metisilin dirençli kökenler ile kıyaslandığında hücresel adezyonun anlamlılık derecesinin arttığı tespit edilmiştir (p=0.0004; Şekil 17).



Gruplar	Özet	P değerleri
MRSA vs. mecA+icaA+icaD	*	0,0231
MRSA vs. mecA+icaA+icaD+pvl	**	0,0016
mecA+icaA+icaD vs. mecA+icaA+icaD+pvl	ns	0,0722

Şekil 17. Vero hücrelerinde slime ve panton-valentin lökosidin genlerinin metisilin dirençli ve duyarlı kökenlerde hücresel invazyon üzerindeki etkisi.

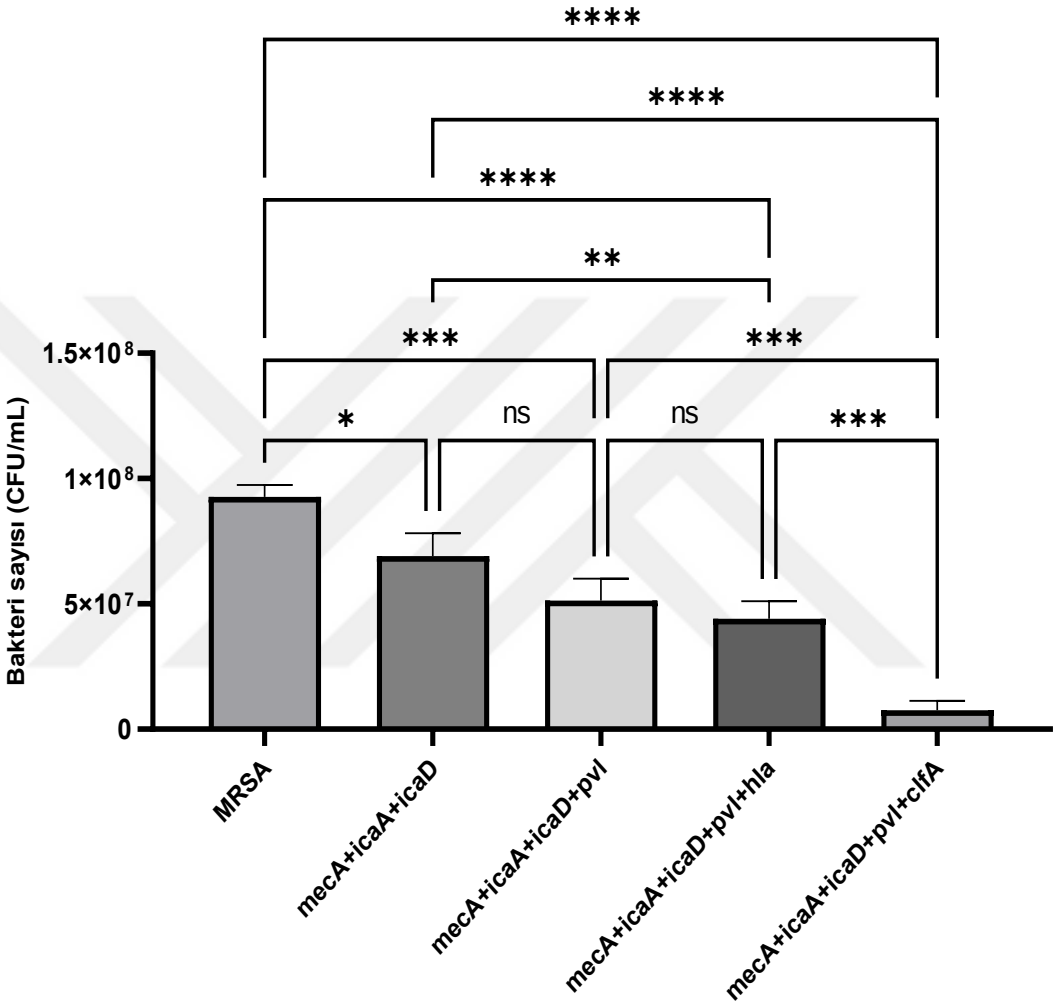
Panton valentin lökosidin pozitif, slime üreten metisilin dirençli *S. aureus* kökenleriyle Panton valentin lökosidin pozitif, slime üreten, hemoliz üreten metisilin dirençli *S. aureus* kökenleri arasında istatiksel olarak anlamlı derecede artış olmasa da hemoliz üreten kökenlerde hücrelere bakteriyel invazyonda artışlar tespit edilmiştir (p=0,9982; Şekil 18).



Gruplar	Özet	P değerleri
MRSA vs. mecA+icaA+icaD	ns	0,0869
MRSA vs. mecA+icaA+icaD+pvl	**	0,0060
MRSA vs. mecA+icaA+icaD+pvl+hla	**	0,0043
mecA+icaA+icaD vs. mecA+icaA+icaD+pvl	ns	0,2713
mecA+icaA+icaD vs. mecA+icaA+icaD+pvl+hla	ns	0,1899
mecA+icaA+icaD+pvl vs. mecA+icaA+icaD+pvl+hla	ns	0,9926

Şekil 18. Vero hücrelerinde slime, panton-valentin lökosidin ve hemolizin genlerinin metisilin dirençli ve duyarlı kökenlerde hücresel invazyon üzerindeki etkisi.

Panton valentin lökosidin pozitif, slime üreten, hemoliz yapabilen ve klumping faktör pozitif metisilin dirençli *S. aureus* kökenleri, Panton valentin lökosidin pozitif, slime üreten, hemoliz yapabilen suşlarla kıyaslandığında hücresel invazyon düzeylerinde anlamlı derecede artışlar tespit edilmiştir (p=0,0002; Şekil 19).



Gruplar	Özet	P değerleri
MRSA vs. mecA+icaA+icaD	*	0,0136
MRSA vs. mecA+icaA+icaD+pvl	***	0,0002
MRSA vs. mecA+icaA+icaD+pvl+hla	****	<0,0001
MRSA vs. mecA+icaA+icaD+pvl+clfA	****	<0,0001
mecA+icaA+icaD vs. mecA+icaA+icaD+pvl	ns	0,0688
mecA+icaA+icaD vs. mecA+icaA+icaD+pvl+hla	**	0,0096
mecA+icaA+icaD vs. mecA+icaA+icaD+pvl+clfA	****	<0,0001
mecA+icaA+icaD+pvl vs. mecA+icaA+icaD+pvl+hla	ns	0,7080
mecA+icaA+icaD+pvl vs. mecA+icaA+icaD+pvl+clfA	***	0,0001
mecA+icaA+icaD+pvl+hla vs. mecA+icaA+icaD+pvl+clfA	***	0,0006

Şekil 19. Vero hücrelerinde slime ve panton-valentin lökosidin, hemolizin ve klumping faktörün genlerinin metisilin dirençli ve duyarlı kökenlerde hücresel invazyon üzerindeki etkisi.

5. TARTIŞMA

Bakterilerin antibiyotiklerden, konakçıdan veya çevreden gelen seçici baskılar gibi sebeplerden dolayı sürekli olarak evrimi söz konusudur. Bu evrilme mikroorganizmanın lehine veya aleyhine olacak şekilde ortaya çıkabilmektedir. Bu çalışma antibiyotik direncini arttıran mutasyonların mikroorganizmaların sahip olduğu birtakım virülans faktörlerin, patojeniteye etkisi olabileceği noktasından hareketle virülans faktörlerin antibiyotik direnci ile ilişkisinin ortaya konması amacıyla planlanmıştır. Bu amaçla yara ve üriner sistem örneklerinden izole edilen *S. aureus* izolatları kullanılmıştır (24).

Bu çalışma ile bakterinin patojenik potansiyelin azalması veya artması direnç profilleri üzerinde nasıl ortaya çıkmaktadır sorusunun cevabı aranmıştır. Virülanslığın özellikle ilaç dirençli patojenlerde tezahür eden etkilerinin ne olduğu açıklanmaya çalışılmıştır. İlaç dirençli patojenlerde değişen virülans potansiyeli hastalığın sonucunu modüle eden mekanizmaların aydınlatılması açısından önem taşımaktadır. Bu çalışma ile ilaç direnci-virülans korelasyonunun en kapsamlı olarak araştıtıldığı çalışmalardan biridir. İlaç direnci ile virülans faktörleri ilişkisinin izahı insan patojenleriyle mücadelede ve/veya ilaç direncini yenmede yeni bir bakış açısı getirebilecektir.

Günümüzün en önemli sağlık sorunlarından biri günden güne artan ilaç direnç oranlarıdır. Antimikrobiyallerin yaygın kullanılması çoğu problemi de beraberinde getirmektedir. Yoğun ve yaygın ilaç kullanımı mikroorganizmalar üzerinde ekolojik bir baskı oluşturabilmekte, insanlarda ve çevrede kolonize olabilen mikrobiyal popülasyonlarda antimikrobiyel direncin ortaya çıkmasına yol açabilmektedir (24).

Çalışmamızda yara örneklerinde nuc, fnba, hla, clfA ve hlb geni frekanslarının üriner izolatlara benzer oranlarda olduğu bulunmuştur. Yara izolatlarında slime genlerinin frekansının üriner izolatlardan anlamlı derecede düşük olduğu tespit edilirken bu örneklerde pvl ve tsst genleri frekansının üriner enfeksiyon etkenlerinden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Yara örneklerinde pvl, icaA, icaD ve tsst genleri ile metisilin direnci arasında analamlı bir korelasyon tespit edilmezken, üriner

izolatlarda icaD geni dışında tüm virülans genlerinin varlığı ile metisilin direnci arasından anlamlı bir korelasyon tespit edilmiştir (129).

Vero hücrelerinde MRSA ve MSSA suşlarınının hücre adezyon oranları kıyaslandığında MRSA izolatlarının adezyon oranlarının MSSA suşlarından anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0.0003$). Metisilin dirençli ve slime üreten suşların yalnızca metisilin dirençli suşlarla hücresel adezyon oranları kıyaslandığında, slime üretiminin hücre adezyonunu arttırdığı, slime üretimi ile hücre adezyonu arasında pozitif bir korelasyonun olduğu tespit edilmiştir ($p>0.05$).

Bunun yanında, slime üreten ve panton-valentin lökosidin genleri pozitif olan MRSA suşlarının hücresel adezyon oranı MRSA izolatları ile kıyaslandığında hücre adezyonu üzerinde anlamlı düzeyde olmasa da artışlar saptanmıştır ($p<0.0574$). Pvl ile hücresel adezyon arasında pozitif bir korelasyonun saptanmıştır. *S. aureus* önemli hemolitik aktivite gösteren bakterilerden biridir. Benzer şekilde hemolizin aktivitesi de hücresel adezyonunu arttırıcı bir aktivite göstermiş ve pozitif bir korelasyon varlığı tespit edilmiştir.

Stafiloklarda hücre yüzey prteinleri önemli virülans faktörlerden olup bu proteinlerden biri de klumping faktör A'dır. Deneylerde slime üreten, hemolitik aktivite gösteren Panton-valentin lökosidin etkinliği pozitif olan MRSA izolatlarının (mecA+icaA+icaD+pvl+hla) adezyon oranları klumping faktör A varlığında (mecA+icaA+icaD+pvl+clfA genleri taşıyan *S. aureus* izolatlarında) hücresel adezyonun anlamlı derecede daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0.0002$).

Mikroorganizmalarda biyofilm oluşumu fiziksel ve biyokimyasal yollarla antimikrobiyel ilaç direncinin artmasına yol açmaktadır (6). Biyofilm, bir substrata veya arayüze birbirine geri dönülemez şekilde bağlanan hücrelerle karakterize edilen hücre dışı polimerik maddelerin (protein, DNA ve polisakaritten oluşan) üretilen bir matrise gömülerek oluşturulmuş büyüme hızı ve gen transkripsiyonu açısından değişiklik gösteren bir fenotipidir [5]. Biyofilm formda üreyen mikroorganizmların serbest üreyen bakterilerden fizyolojik olarak farklılıklar sergileyebileceği bildirilmiştir (9, 10, 130).

Biyofilmler bakterilerin zorlu çevre koşullarına daha iyi direnç göstermesini sağlamaktadır (11). Bakterilerin bu formu insan, hayvan infeksiyonlarında konakta veya gıda işleme tesisleri gibi besin kaynağının bulunduğu alanlarada yaygın olarak bulunabilmektedir (14). Biyofilmlerin dezenfektanlara/ antimikrobiyallere/ antibiyotiklere karşı artan direnci insan ve hayvan sağlığı ve gıda endüstrileri için çok ciddi tehdit oluşturmaktadır (14). Biyofilm yapısı patojenleri yüzeylerden koparılıp atılmasına, dezenfektanlara ve ilaçlara karşı koruyan bir örtüdür (15). Biyofilm koruma mekanizmalarının geleneksel antibiyotiklere dirençten sorumlu mekanizmalardan farklı olduğu bildirilmiştir (16). Biyofilm yapı (hücre dışı polimerik maddeler matrisi: EPS matrisi) dezenfektanların difüzyonunu sınırlayarak veya proteinler ve hücre dışı polisakkaritlerle kimyasal etkileşim ya da inaktivasyon yoluyla antimikrobiyal etkiyi geciktirmekte veya inhibe edebilmektedir (17). Bakteriyel üreme hızı, biyofilm içindeki heterojenlik, genel stres tepkisi, quarum sensing mekanizmaları, biyofilm fenotipinin indüksiyonu ve efluks (akış) pompalarının ekspresyonu gibi faktörler direnç mekanizmasında rol oynayabilmektedir (18). Ayrıca biyofilm oluşumu bakteriyel virülans faktörlerinin düzenlenmesini ve hücre dışı polimerlerin salgılanmasında da rol oynayabilir (26). Özellikle yatay gen transferi antimikrobiyel dirençte önemli bir role sahip olabilir. Biyofilmlere özgü dar intraselüler mesafe, direnç genlerinin yayılmasını kolaylaştırır ve biyofilm matrisinde hücre dışı DNA'nın varlığını oluşturur (27, 130).

Hücresel istila ve mortalite bakımından MRSA suşları, MSSA suşlarından daha öldürücü olmasa da MRSA suşlarının virülanslarını artırabilecek veya belirli klinik sendromlara neden olmalarını sağlayabilecek faktörlere veya genetik yapıya sahip olacağı bildirilmiştir (131). Çalışmamızda MRSA ve MSSA suşlarının Vero hücrelerine invazyon sonuçları kıyaslandığında hücresel invazyonun MRSA gruplarında MSSA gruplarından istatiksel olarak anlamlı derecede yüksek olmasını bununla ilişkili olduğunu düşünmekteyiz. Yani metisiline direnç mekanizmasının mikroorganizmanın virülensini doğrudan etkileyebilecek genetik özellikler kazandırabileceğiyle alakalı olduğunu düşünmekteyiz.

MRSA izolatları ile icaA, icaD slime genleri taşıyan slime üretiminin olduğu metisilin dirençli suşların invazyon test sonuçlarının da anlamlı derecede yüksek

olmasının aynı mekanizmadan kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz (Şekil 16; $p<0.086$).

Önemli Gram pozitif bakterilerden olan *S. aureus* insan ve hayvan dokularında, yüzeylerde ve gıda endüstrisindeki hemen hemen tüm çevresel koşullar altında biyofilm oluşturabilmektedir (28). Kommensal ve fırsatçı bir patojendir ve belirli koşullar altında cilt enfeksiyonları, bakteriyemi, endokardit, pnömoni ve gıda zehirlenmesi gibi çok çeşitli bulaşıcı hastalıklara neden olabilir. *S. aureus* biyofilm oluşumu komplike genetik faktörler tarafından düzenlenmekte olup en az iki farklı biyofilm tipi üretebilirler. Bunlardan ilki *ica* operona bağımlı diğeri ica operondan bağımsız biyofilm oluşumudur (28). Bir çalışmada biyofilm koşullarında 160'tan fazla genin aşırı eksprese edildiği bildirilmiştir. Bu genler bağlanma faktörlerini, polisakkarit hücre içi yapışmayı (PIA) ve peptidoglikan modelleme faktörlerini kodlamaktadır (10). Ayrıca birçok proteinin hücresel yapışma ve biyofilm matrisi gelişiminde önemli bileşenler olduğu gösterilmiştir (29). Bunlar arasında yüzeyle ilişkili proteinler (protein A), fibrinojen bağlayıcı proteinler (fnbPA ve fnbPB), biyofilmle ilişkili protein (bap) ve klumping (topaklanma) faktörü (clf) bulunur.

Klumping faktör A (clfA) *S. aureus*'un en önemli bağlayıcı proteinlerindendir. ClfA *S. aureus*'un fibrinojen ve fibrine yapışmasının hücre yüzeyiyle ilişkili temel bir proteindir (132). Çalışmamızda clfA geni taşıyan MRSA izolatlarının hem hücresel adezyonu hem de hücreye invazyonunu diğer MRSA iolalatlarıyla kıyaslandığında istatiksel olarak anlamlı derecede arttırdığı tespit edilmiştir ki ($p<0.002$), bu bulgu çalışmanın özgün sonuçlarından biridir.

S. aureus biyofilmleriyle ilişkili gıda güvenliğine ilişkin kaygılar ve gıda endüstrisinde bu sorunu yönetmenin yüksek maliyeti göz önüne alındığında, *S. aureus*'un biyofilm oluşumu ile ilgili mekanizmalar hakkında detaylı bilgi sahibi olunması önemlidir. Bugüne kadar birçok çalışma patojeniteye odaklanırken ve çok azı ise *S. aureus*'un protein ekspresyonundaki biyofilm oluşumuna bağlı farklılıkları ele almıştır (31, 32). Biyofilm ile ilgili proteinlerin tanımlanması ve karakterizasyonu, *S. aureus*'ta biyofilm oluşumunun mekanizması ve/veya süreci hakkında önemli bilgiler sağlayabilir.

Panton-Valentine lökosidin toksini üreten *Staphylococcus aureus*'un (pvlSA) tekrarlayan yumuşak doku enfeksiyonlarından ve nekrotizan pnömoni, piyomiyozit ve osteomiyelit gibi daha ciddi invaziv enfeksiyonlardan sorumlu olduğu bildirilmektedir (133). Panton-Valentine lökosidin *Staphylococcus aureus* tarafından salgılanan ve nekrotizan pnömoni ile ilişkilendirilen orlar oluşturarak hücre ölümüne sebep olan bir toksindir. PVL'nin nekroz veya apoptoz yoluyla polimorfonükleer hücre ölümünü indüklediği bildirilmiştir (134). Pvl pozitif MRSA suşlarının pvl geni taşımayan suşlara kıyasla hücre invazyonunu anlamlı olmayan ölçüde arttırdığı tespit edilmiştir (Şekil 17; mecA+icaA+icaD vs. mecA+icaA+icaD+pvl; $p<0.0743$).

Hemolizinler *S. aureus*'a bağlı tüm hastalıkların patogenezinde önemli rol oynamaktadır. Hemolizler konakçı hücre zarının parçalanmasına, bağışıklık sisteminin bozulmasına veya bakterinin immuniteden kaçmasına ve hayatta kalması yardımcı olurken, hücre lizisi sonucu besin maddelerinin serbest kalmasına ve enfeksiyonun progresyonunun kötüleşemesine yol açar (135).

Çalışmada MRSA suşlarında hemolizin geni varlığının hem konak hücre adezyonuna hem de invazyonunu arttırdığı tespit edilmiştir. Slime üreten, panton valentin lökosidin genlerini taşıyan MRSA izolatlarıyla kıyaslandığında hemolizin genleri taşıyan suşlarının daha yüksek düzeyde invaziv karekter sergiledği tespit edilmiştir.

Antimikrobiyal direnç sorununun insanlığın gelecekte karşılaşacağı en önemli problemlerden biri olacağı düşünülmektedir. Bu sebeple antimikrobiyal direncin yayılmasını öneleyebilmek için insanları, hayvanları ve çevreleriyle ilişkili olarak ilaç direnci kaynaklarıyla ilişkili çalışmaların yapılması ve direnç mekanizmasının anlaşılması önelenebilmesi açsısından da son derece büyük öneme sahiptir. Bakterilerin en yaygın bulaş yollarından biri temas olup, temas ettiği yüzeye yapışarak canlılığını sürdürmesiyle ilişkilidir. Bakterilerin yapıştıkları yüzeyde canlılıklarını sürdürebilmeleri için en önemli mekanizma biyofilm oluşturmasıdır. *S. aureus*'un en önemli virulans faktörlerinden biri yüzeylerde ve çok çeşitli çevresel koşullarda oluşturdukları biyofilm formudur. Biyofilm oluşumu *S. aureus*'un zorlu koşullarda canlılığını sürdürebilmesi açısından büyük önme sahiptir (136).

S. aureus kökenlerinde biyofilmle ilişkili proteinlerin tanımlanması ve karakterizasyonun amaçlandığı bir çalışmada bakterinin çok farklı tipte protein sentezleri gerçekleştirdiği tespit edilmiştir. Proteomik analizlerde biyofilm oluşturan formlarda 14 farklı protein ekspresyonundan bahsedilmiştir. Ayrıca alkol dehidrojenaz, ATP'ye bağımlı 6-fosfofruktokinaz ve fruktoz-bisfosfat aldolaz gibi üç tipte protein sentezinin olduğu bildirilmiştir. Bunun yanında, biyofilm oluşturan formlardaki bakterilerde katabolit mekanizmaların farklı şekilde düzenlendikleri, daha düşük oksijen ilişkili metabolizmaların arttığı bildirilmiştir (37).

Biyofilm oluşumu besinlerin mevcut olduğu yüzeylerde veya insan veya hayvan gibi canlı konak dokularında kalıcılığın en etkili biçimlerinden biridir. Bakteriyel kalıcılık bu yapının yüksek orandaki antimikrobiyal direnciyle yakından ilişkilidir. Bu çalışmada *S. aureus* izolatlarının biyofilm oluşum mekanizmalarını ile antimikrobiyal direnç ilişkisi araştırılmıştır. Biyofilm oluşumu ile artan antibiyotik direncinin öncelikle katabolitlerin kontrolü, yeni protein üretimi ve antimikrobiyal aktiviteye sahip alkol gibi bileşiklerin detoksifikasyonu ile ilgili olduğu bildirilmiştir. Biyofilm konformasyonunda hücresel glikoliz ve aerobik metabolizmaların daha düşük düzeyde aktif olduğu bildirilmiştir. Sonuçta aerobik metabolizmadan daha az H_2O_2 üretimi ve katalaz proteininin ölçülebilir bir şekilde yetersiz sentezlenmesine yol açmaktadır (37).

Antimikrobiyallere karşı direnç ve tolerans, stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde ciddi sorunlar yaratmaktadır. Çünkü bazı vakalarda suşların mevcut antimikrobiyal ilaçların çoğuna duyarlı olmasına rağmen evrimin ciddi olduğu ve tedaviye sınırlı yanıt verdiği gözlemlenebilmektedir. Bu durumlarda olası açıklamalardan biri virülans profili olabilir (137).

Çeşitli yara örneklerinden çok sayıda stafilokok izolatının analiz edildiği bir çalışmada suşların proteazlar, toksinler, lipazlar ve DN-azlar gibi çok çeşitli virülans faktörleri salgıldıkları bildirilmiştir. En sık tanımlanan virülans faktörlerinin proteaz, kazeinaz, lipaz enzimleri salgıladıkları, suşlarının yarıya yakının ise biyofilm ürettikleri tespit edilmiştir. Çalışmada cna, hlg, clfB, clfA, tst, fnbA ve coag ve fnbB, can, bbp ve fib virulans genlerinin yüksek oranda tespit edildiği bu gen genlere sahip suşların ise daha yüksek bir biyofilm geliştirme kapasitesi saptandığı bildirilmiştir.

Yara infeksiyonlarında bakteriyel tutunmayı etkileyen dokuya penetrasyonu ve invazyonu ciddi enfeksiyon gelişme riskini artırmaktadır. Pürülan salgılardan izole edilen suşların daha yüksek biyofilm ürettikleri bildirilmiştir. Benzer şekilde cilt infeksiyonlarına yol açan stafilokokların da virülans faktörlerinin yüksek oranda sentezlendiği bildirilmiştir (37, 130).

Çalışma sonuçlarımız virülansın bulaşıcı sürecin gelişiminde anahtar bir unsur olduğu ve virülans modülasyonunun çeşitliliğinin ve karmaşıklığının anlaşılmasının, yeni ve kişiselleştirilmiş terapötik yaklaşımlar için temel alternatif stratejilerden birini temsil ettiği fikrini desteklemektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmadan elde ettiğimiz sonuçları aşağıdaki gibi sıralayabiliriz.

- Yara ve üriner sistem infeksiyonlarından izole edilen S. aureus izolatlarında en yüksek ilaç direnci olan penisilin direnci çok yakın oranlarda bulunmuştur (sırasıyla, %84.5 ve 84.6)
- Metisilin direnci yara izolatlarında (%42.3) üriner izolatlardan (%22) anlamlı derecede daha yüksek olarak saptanmıştır.
- Yara örneklerinde teikoplanin ve tigesiklin direncine rastlanmamıştır.
- Yara örneklerinde 2 örnekte (%2.1) vankomisin dirençli izolat tespit edilmiştir (VISA).
- Üriner sistem örneklerinden izole edilen S. aureus izolatlarında teikoplanin, tigesiklin, daptomisin ve linezolid direncine ratlanmamıştır.
- Yara izolatlarından virülans genlerden hla, fnba ve nuc genleri izolatların tümünde tespit edildi.
- Yara izolatlarında en düşük oranda (%7.2) tespit edilen virülans geni tsst geni idi.
- Üriner izolatlarda yara örneklerinde olduğu gibi hla, fnba ve nuc genleri pozitiliği %100 idi. Ayrıca clfA geni varlığı da tüm üriner sistem izolatlarında pozitif olarak saptandı.
- MRSA suşları MSSA suşları ile hücresel adezyon açısından kıyaslandığında, MRSA suşlarının anlamlı derecede daha yüksek adezyon oranları tespit edildi (MRSA vs MSAA; $p<0.0003$).
- Slime genleri üreten MRSA izolatlarında MRSA kökenleriyle kıyaslandığında anlamlı derecede daha yükzek hücresel adezyon oranları saptandı (MRSA vs. mecA+icaA+icaD).
- Panton-valentin lökosidin geni varlığı slime üreten MRSA izolatlarında hücresel adezyonu arttırmıştır (MRSA vs. mecA+icaA+icaD+pvl; $p<0.0004$).
- Hemolizin virülans geni hücresel adezyon üzerinde anlamlı düzeyde etkili bulunmuştur (MRSA vs. mecA+icaA+icaD+pvl+hla; $p<0.0001$).
- Klumping faktör A S. aureus kökenlerinde hüresel adezyon üzerinde anlamlı derecede etkinlik sergilemiştir (MRSA vs. mecA+icaA+icaD+pvl+clfA; $p<0.0001$).

- MRSA izolatları Vero hücrelerine MSSA iozlatlarından anlamlı derecee daha yüksek oranda invazyon yapmıştır (MRSA vs MSSA; $p<0.001$).
- Slime üretimininn MRSA kökenlerinde hücresel invazyonu anlamlı deredece arttırdığı tespit edilmiştir (MRSA vs. mecA+icaA+icaD; $p<0.0086$).
- Panton-valentin lökosidin geni varlığında MRSA izolatlarında hücresel invazyon anlamlı derecede artmaktadır (MRSA vs. mecA+icaA+icaD+pvl; $p<0.0743$).
- Hemolizn geni taşıyan MRSA izolatlarında hücresel invazyon MRSA kökenleri ile kıyaslandığında anlamlı derecede yüksek bulundu (MRSA vs. mecA+icaA+icaD+pvl+hla; $p<0.0021$).
- Klumping faktör A geni taşıyan MRSA izolatlarının hücresel invazyon oranları MRSA suşları ile kıyaslandığında anlamlı derecede yüksek olarak saptandı (MRSA vs. mecA+icaA+icaD+pvl+clfA; $p<0.0001$).

Artan antibiyotik direnci sorunu günümüzde toplumumuzu rahatsız eden en önemli halk sağlığı problemlerinden biridir. Ne yazık ki, bu büyük probleme tek bir etiyoloji olarak yaklaşmak çözümleri sınırlamaktadır. Bu küresel sorunda önemli bir ilerleme kaydedebilmek için antibiyotik direncinin ve virülansının hem düzenlenmesi hem de aktarılmasının karşılıklı etkileşimini dikkate alan yeni bir yaklaşım benimsenmelidir. Antibiyotik direnci ve virülans artışı sağlayan altta yatan genetik unsurlar arasındaki bağlantı, bakterilerin quorum sensing ve iki bileşen sistemi aracılığıyla hem doğrudan hem de dolaylı olarak iletişim kurma becerisine yakından bağlıdır. Bu genlerin değişimi, aktarımı, ifadesi ve düzenlenmesi yalnızca her iki genetik unsurun aynı plazmid üzerinde bulunduğu durumlarda değil, aynı zamanda bakteriler biyofilm içindeyken de kolaylaşır. Artan virülans doğal olarak artan antibiyotik direncine yanıt olarak veya eşzamanlı olarak gelişebilir; dolayısıyla antibiyotik direncinin yayılmasın kontrol edilirken virülansın yayılmasını da kontrol edilmelidir. Bu, yaşam ya da ölüm seçici baskıları uygulamayan yeni kombinasyon anti-virülans stratejileri yoluyla gerçekleştirilebilir. Virülans ve antibiyotik direncinin düzenlenmesini, özellikle de bunların düzenlenmesinin birbirlerini nasıl etkileyebileceğini anlayarak; bu daha spesifik ve yönlendirilmiş ilaç tedavileri sağlamamıza olanak tanıyacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Roux D, Danilchanka O, Guillard T, Cattoir V, Aschard H, Fu Y, Angoulvant F, Messika J, Ricard JD, Mekalanos JJ, Lory S, Pier GB, Skurnik D. Fitness cost of antibiotic susceptibility during bacterial infection. Sci Transl Med. 2015 Jul 22;7(297):297ra114. doi: 10.1126/scitranslmed.aab1621. PMID: 26203082
2. Vestergaard M, Frees D, Ingmer H. Antibiotic Resistance and the MRSA Problem. Microbiol Spectr. 2019 Mar;7(2).
3. Wang G, Zhao G, Chao X, Xie L, Wang H. The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae*. Int J Environ Res Public Health. 2020 Aug 28;17(17):6278.
4. Roux D, Danilchanka O, Guillard T, Cattoir V, Aschard H, Fu Y, Angoulvant F, Messika J, Ricard JD, Mekalanos JJ, Lory S, Pier GB, Skurnik D. Fitness cost of antibiotic susceptibility during bacterial infection. Sci Transl Med. 2015 Jul 22;7(297):297ra114. doi: 10.1126/scitranslmed.aab1621. PMID: 26203082
5. Rasigade JP, Dumitrescu O, Lina G. New epidemiology of Staphylococcus aureus infections. Clin Microbiol Infect. 2014 Jul;20(7):587-8. doi: 10.1111/1469-0691.12718. PMID: 24930666.
6. McCaig LF, McDonald LC, Mandal S, Jernigan DB. Staphylococcus aureus-associated skin and soft tissue infections in ambulatory care. Emerg Infect Dis. 2006 Nov;12(11):1715-23. doi: 10.3201/eid1211.060190. PMID: 17283622; PMCID: PMC3372331.
7. Stefani S, Chung DR, Lindsay JA, Friedrich AW, Kearns AM, Westh H, Mackenzie FM. Meticillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. Int J Antimicrob Agents. 2012 Apr;39(4):273-82. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2011.09.030. Epub 2012 Jan 9. PMID: 22230333.
8. Dağı HT, Fındık D, Demirel G, Arslan U. Detection of Methicillin Resistance and Various Virulence Factors in Staphylococcus aureus Strains Isolated from Nasal Carriers. Balkan Med J. 2015 Apr;32(2):171-5.
9. Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of Staphylococcus aureus. J Clin Invest. 2003 May;111(9):1265-73. doi: 10.1172/JCI18535. PMID: 12727914; PMCID: PMC154455.
10. McGuinness WA, Malachowa N, DeLeo FR. Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*. Yale J Biol Med. 2017 Jun 23;90(2):269-281. PMID: 28656013; PMCID: PMC5482303.
11. Dai W, Wu Y, Bi J, Wang S, Li F, Kong W, Barbier J, Cintrat JC, Gao F, Gillet D, Su W, Jiang C. Antiviral Effects of ABMA against Herpes Simplex Virus Type 2 In Vitro and In Vivo. Viruses. 2018 Mar 9;10(3):119. doi: 10.3390/v10030119. PMID: 29522484; PMCID: PMC5869512.
12. Gür D, Unal S, Akalin HE. Resistance patterns in Turkey. Int J Antimicrob Agents. 1995 Sep;6(1):23-6.
13. Cheung GYC, Bae JS, Otto M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus.* Virulence. 2021 Dec;12(1):547-569.
14. Schilcher K, Horswill AR. Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies. Microbiol Mol Biol Rev. 2020 Aug 12;84(3):e00026-19. doi: 10.1128/MMBR.00026-19. PMID: 32792334; PMCID: PMC7430342.

15. Tristan A, Ferry T, Durand G, Dauwalder O, Bes M, Lina G, Vandenesch F, Etienne J. Virulence determinants in community and hospital meticillin-resistant Staphylococcus aureus. J Hosp Infect. 2007 Jun;65 Suppl 2:105-9. doi: 10.1016/S0195-6701(07)60025-5. PMID: 17540252.
16. Oliveira WF, Silva PMS, Silva RCS, Silva GMM, Machado G, Coelho LCBB, Correia MTS. Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis infections on implants. J Hosp Infect. 2018 Feb;98(2):111-117. doi: 10.1016/j.jhin.2017.11.008. Epub 2017 Nov 22. PMID: 29175074.
17. Waleed, A. A. "Detection of the Panton-Valentine leukocidin gene in Swedish isolates of methicillin-resistant Staphylococcus aureus using a multiplex PCR assay." Journal of Bacteriology and Parasitology. J. Bacteriol. Parasitol 153.3 (2019): 215-218.
18. Balakirski G, Hischebeth G, Altengarten J, Exner D, Bieber T, Dohmen J, Engelhart S. Recurrent mucocutaneous infections caused by PVL-positive Staphylococcus aureus strains: a challenge in clinical practice. J Dtsch Dermatol Ges. 2020 Apr;18(4):315-322. doi: 10.1111/ddg.14058. Epub 2020 Mar 20. PMID: 32196137.
19. Hayashida A, Bartlett AH, Foster TJ, Park PW. *Staphylococcus aureus* beta-toxin induces lung injury through syndecan-1. *Am J Pathol.* 2009;174:509–18.
20. Jenul C, Horswill AR. Regulation of Staphylococcus aureus Virulence. Microbiol Spectr. 2019 Apr 5;7(2):10.1128/microbiolspec. GPP3-0031-2018.
21. Lowy FD. Staphylococcus aureus infections. N Engl J Med. 1998 Aug 20;339(8):520-32.
22. Ahmad-Mansour N, Loubet P, Pouget C, Dunyach-Remy C, Sotto A, Lavigne JP, Molle V. *Staphylococcus aureus* Toxins: An Update on Their Pathogenic Properties and Potential Treatments. Toxins (Basel). 2021 Sep 23;13(10):677.
23. Lee AS, de Lencastre H, Garau J, Kluytmans J, Malhotra-Kumar S, Peschel A, Harbarth S. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Nat Rev Dis Primers. 2018 May 31;4:18033.
24. Tasneem U, Mehmood K, Majid M, Ullah SR, Andleeb S. Methicillin resistant Staphylococcus aureus: A brief review of virulence and resistance. J Pak Med Assoc. 2022 Mar;72(3):509-515.
25. Baselga R, Albizu I, Amorena B. Staphylococcus aureus capsule and slime as virulence factors in ruminant mastitis. A review. Vet Microbiol. 1994 Apr;39(3-4):195-204.
26. O'Riordan K, Lee JC. Staphylococcus aureus capsular polysaccharides. Clin Microbiol Rev. 2004 Jan;17(1):218-34. doi: 10.1128/CMR.17.1.218-234.2004. PMID: 14726462; PMCID: PMC321462.
27. Rigi G, Ghaedmohammadi S, Ahmadian G. A comprehensive review on staphylococcal protein A (SpA): Its production and applications. Biotechnol Appl Biochem. 2019 May;66(3):454-464. doi: 10.1002/bab.1742. Epub 2019 Mar 21. PMID: 30869160.
28. von Hoven G, Husmann M. Staphylococcus aureus α-Toxin's Close Contacts Ensure the Kill. Trends Microbiol. 2019 Feb;27(2):89-90. doi: 10.1016/j.tim.2018.11.010. Epub 2018 Dec 13. PMID: 30554769.
29. Chamon RC, de Oliveira TLR, Ferreira RBR, Moreira LO, Dos Santos KRN. Panton-Valentine leukocidin (PVL) isoforms among Staphylococcus aureus lineages isolated from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. Braz J Microbiol. 2020

Dec;51(4):1509-1513. doi: 10.1007/s42770-020-00386-y. Epub 2020 Oct 26. PMID: 33104973; PMCID: PMC7688806.
30. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of Staphylococcus aureus. Clin Microbiol Rev. 2000 Jan;13(1):16-34,
31. Balakirski G, Hischebeth G, Altengarten J, Exner D, Bieber T, Dohmen J, Engelhart S. Recurrent mucocutaneous infections caused by PVL-positive Staphylococcus aureus strains: a challenge in clinical practice. J Dtsch Dermatol Ges. 2020 Apr;18(4):315-322. doi: 10.1111/ddg.14058. Epub 2020 Mar 20. PMID: 32196137.
32. Peetermans M, Verhamme P, Vanassche T. Coagulase Activity by Staphylococcus aureus: A Potential Target for Therapy? Semin Thromb Hemost. 2015 Jun;41(4):433-44. doi: 10.1055/s-0035-1549849. Epub 2015 May 14. PMID: 25973589.
33. Bokarewa MI, Jin T, Tarkowski A. Staphylococcus aureus: Staphylokinase. Int J Biochem Cell Biol. 2006;38(4):504-9. doi: 10.1016/j.biocel.2005.07.005. Epub 2005 Aug 2. PMID: 16111912.
34. Ohr RJ, Anderson M, Shi M, Schneewind O, Missiakas D. EssD, a Nuclease Effector of the Staphylococcus aureus ESS Pathway. J Bacteriol. 2016 Dec 13;199(1):e00528-16. doi: 10.1128/JB.00528-16. PMID: 27795323; PMCID: PMC5165103.
35. Williams MR, Nakatsuji T, Sanford JA, Vrbanac AF, Gallo RL. Staphylococcus aureus Induces Increased Serine Protease Activity in Keratinocytes. J Invest Dermatol. 2017 Feb;137(2):377-384. doi: 10.1016/j.jid.2016.10.008. Epub 2016 Oct 17. PMID: 27765722; PMCID: PMC5258850.
36. Ibberson CB, Jones CL, Singh S, Wise MC, Hart ME, Zurawski DV, Horswill AR. Staphylococcus aureus hyaluronidase is a CodY-regulated virulence factor. Infect Immun. 2014 Oct;82(10):4253-64. doi: 10.1128/IAI.01710-14. Epub 2014 Jul 28. PMID: 25069977; PMCID: PMC4187871.
37. Guo H, Tong Y, Cheng J, Abbas Z, Li Z, Wang J, Zhou Y, Si D, Zhang R. Biofilm and Small Colony Variants-An Update on Staphylococcus aureus Strategies toward Drug Resistance. Int J Mol Sci. 2022 Jan 22;23(3):1241.
38. Tay SB, Yew WS. Development of quorum-based anti-virulence therapeutics targeting Gram-negative bacterial pathogens. Int J Mol Sci. 2013 Aug 9;14(8):16570-99. doi: 10.3390/ijms140816570. PMID: 23939429; PMCID: PMC3759926.
39. Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiol Mol Biol Rev. 2010 Sep;74(3):417-33. doi: 10.1128/MMBR.00016-10. PMID: 20805405; PMCID: PMC2937522.
40. Vranakis I, Goniotakis I, Psaroulaki A, Sandalakis V, Tselentis Y, Gevaert K, Tsiotis G. Proteome studies of bacterial antibiotic resistance mechanisms. J Proteomics. 2014 Jan 31;97:88-99. doi: 10.1016/j.jprot.2013.10.027. Epub 2013 Oct 30. PMID: 24184230.
41. Sabouri Ghannad M, Mohammadi A. Bacteriophage: time to re-evaluate the potential of phage therapy as a promising agent to control multidrug-resistant bacteria. Iran J Basic Med Sci. 2012 Mar;15(2):693-701. PMID: 23494063; PMCID: PMC3586887.
42. Binnewies TT, Motro Y, Hallin PF, Lund O, Dunn D, La T, Hampson DJ, Bellgard M, Wassenaar TM, Ussery DW. Ten years of bacterial genome sequencing:

comparative-genomics-based discoveries. Funct Integr Genomics. 2006 Jul;6(3):165-85. doi: 10.1007/s10142-006-0027-2. Epub 2006 May 12. PMID: 16773396.
43. von Wintersdorff CJ, Penders J, van Niekerk JM, Mills ND, Majumder S, van Alphen LB, Savelkoul PH, Wolffs PF. Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. Front Microbiol. 2016 Feb 19;7:173. doi: 10.3389/fmicb.2016.00173. PMID: 26925045; PMCID: PMC4759269.
44. Andersson DI, Hughes D. Evolution of antibiotic resistance at non-lethal drug concentrations. Drug Resist Updat. 2012 Jun;15(3):162-72. doi: 10.1016/j.drup.2012.03.005. Epub 2012 Apr 18. PMID: 22516308.
45. Yamamoto T, Nishiyama A, Takano T, Yabe S, Higuchi W, Razvina O, Shi D. Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus: community transmission, pathogenesis, and drug resistance. J Infect Chemother. 2010 Aug;16(4):225-54.
46. Fernández L, Hancock RE. Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. Clin Microbiol Rev. 2012 Oct;25(4):661-81. doi: 10.1128/CMR.00043-12. Erratum in: Clin Microbiol Rev. 2013 Jan;26(1):163. PMID: 23034325; PMCID: PMC3485749.
47. Almeida Da Silva PE, Palomino JC. Molecular basis and mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: classical and new drugs. J Antimicrob Chemother. 2011 Jul;66(7):1417-30. doi: 10.1093/jac/dkr173. Epub 2011 May 9. PMID: 21558086.
48. Jeong HS, Kim JA, Shin JH, Chang CL, Jeong J, Cho JH, Kim MN, Kim S, Kim YR, Lee CH, Lee K, Lee MA, Lee WG, Shin JH, Lee JN. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance and mutations in the gyrase and topoisomerase IV genes in Salmonella isolated from 12 tertiary-care hospitals in Korea. Microb Drug Resist. 2011 Dec;17(4):551-7. doi: 10.1089/mdr.2011.0095. Epub 2011 Aug 10. PMID: 21830947.
49. Oliver A, Baquero F, Blázquez J. The mismatch repair system (mutS, mutL and uvrD genes) in Pseudomonas aeruginosa: molecular characterization of naturally occurring mutants. Mol Microbiol. 2002 Mar;43(6):1641-50. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02855.x. PMID: 11952911.
50. Rodríguez-Rojas A, Rodríguez-Beltrán J, Couce A, Blázquez J. Antibiotics and antibiotic resistance: a bitter fight against evolution. Int J Med Microbiol. 2013 Aug;303(6-7):293-7. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.02.004. Epub 2013 Mar 19. PMID: 23517688.
51. Rushdy AA, Mabrouk MI, Abu-Sef FA, Kheiralla ZH, Mohamed Abdel-All S, Saleh NM. Contribution of different mechanisms to the resistance to fluoroquinolones in clinical isolates of Salmonella enterica. Braz J Infect Dis. 2013 Jul-Aug;17(4):431-7. doi: 10.1016/j.bjid.2012.11.012. Epub 2013 Jun 3. PMID: 23742803; PMCID: PMC9428056.
52. Foster PL. Stress-induced mutagenesis in bacteria. Crit Rev Biochem Mol Biol. 2007 Sep-Oct;42(5):373-97. doi: 10.1080/10409230701648494. PMID: 17917873; PMCID: PMC2747772.
53. Riool M, de Breij A, Drijfhout JW, Nibbering PH, Zaat SAJ. Antimicrobial Peptides in Biomedical Device Manufacturing. Front Chem. 2017 Aug 24;5:63. doi: 10.3389/fchem.2017.00063. PMID: 28971093; PMCID: PMC5609632.

54. Cavallaro A, Taheri S, Vasilev K. Responsive and "smart" antibacterial surfaces: common approaches and new developments (Review). Biointerphases. 2014 Jun;9(2):029005. doi: 10.1116/1.4866697. PMID: 24985209.
55. Peng Q, Tang X, Dong W, Sun N, Yuan W. A Review of Biofilm Formation of Staphylococcus aureus and Its Regulation Mechanism. Antibiotics (Basel). 2022 Dec 22;12(1):12.
56. Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. Int J Antimicrob Agents. 2010 Apr;35(4):322-32. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011. Epub 2010 Feb 10. PMID: 20149602.
57. Kester JC, Fortune SM. Persisters and beyond: mechanisms of phenotypic drug resistance and drug tolerance in bacteria. Crit Rev Biochem Mol Biol. 2014 Mar-Apr;49(2):91-101. doi: 10.3109/10409238.2013.869543. Epub 2013 Dec 13. PMID: 24328927.
58. Wright GD. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. Adv Drug Deliv Rev. 2005 Jul 29;57(10):1451-70. doi: 10.1016/j.addr.2005.04.002. PMID: 15950313.
59. Wu S, Lin K, Liu Y, Zhang H, Lei L. Two-component signaling pathways modulate drug resistance of Staphylococcus aureus (Review). Biomed Rep. 2020 Aug;13(2):5.
60. Disney MD. Studying modification of aminoglycoside antibiotics by resistance-causing enzymes via microarray. Methods Mol Biol. 2012;808:303-20. doi: 10.1007/978-1-61779-373-8_21. PMID: 22057534; PMCID: PMC3809005.
61. Tillotson GS, Theriault N. New and alternative approaches to tackling antibiotic resistance. F1000Prime Rep. 2013 Dec 3;5:51. doi: 10.12703/P5-51. PMID: 24381727; PMCID: PMC3854692.
62. Yang W, Moore IF, Koteva KP, Bareich DC, Hughes DW, Wright GD. TetX is a flavin-dependent monooxygenase conferring resistance to tetracycline antibiotics. J Biol Chem. 2004 Dec 10;279(50):52346-52. doi: 10.1074/jbc.M409573200. Epub 2004 Sep 27. PMID: 15452119.
63. Mukhtar TA, Koteva KP, Hughes DW, Wright GD. Vgb from Staphylococcus aureus inactivates streptogramin B antibiotics by an elimination mechanism not hydrolysis. Biochemistry. 2001 Jul 31;40(30):8877-86. doi: 10.1021/bi0106787. PMID: 11467949.
64. Wilson DN. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. Nat Rev Microbiol. 2014 Jan;12(1):35-48. doi: 10.1038/nrmicro3155. PMID: 24336183.
65. Worthington RJ, Melander C. Combination approaches to combat multidrug-resistant bacteria. Trends Biotechnol. 2013 Mar;31(3):177-84. doi: 10.1016/j.tibtech.2012.12.006. Epub 2013 Jan 18. PMID: 23333434; PMCID: PMC3594660.
66. Li XZ, Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. Drugs. 2009 Aug 20;69(12):1555-623. doi: 10.2165/11317030-000000000-00000. PMID: 19678712; PMCID: PMC2847397
67. Kaur B, Gupta J, Sharma S, Sharma D, Sharma S. Focused review on dual inhibition of quorum sensing and efflux pumps: A potential way to combat multi drug resistant Staphylococcus aureus infections. Int J Biol Macromol. 2021 Nov 1;190:33-43

68. Lubelski J, Konings WN, Driessen AJ. Distribution and physiology of ABC-type transporters contributing to multidrug resistance in bacteria. Microbiol Mol Biol Rev. 2007 Sep;71(3):463-76. doi: 10.1128/MMBR.00001-07. PMID: 17804667; PMCID: PMC2168643.
69. Kuroda T, Tsuchiya T. Multidrug efflux transporters in the MATE family. Biochim Biophys Acta. 2009 May;1794(5):763-8. doi: 10.1016/j.bbapap.2008.11.012. Epub 2008 Dec 6. PMID: 19100867.
70. Jack DL, Yang NM, Saier MH Jr. The drug/metabolite transporter superfamily. Eur J Biochem. 2001 Jul;268(13):3620-39. doi: 10.1046/j.1432-1327.2001.02265.x. PMID: 11432728.
71. Tseng TT, Gratwick KS, Kollman J, Park D, Nies DH, Goffeau A, Saier MH Jr. The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. J Mol Microbiol Biotechnol. 1999 Aug;1(1):107-25. PMID: 10941792.
72. Li X, Zolli-Juran M, Cechetto JD, Daigle DM, Wright GD, Brown ED. Multicopy suppressors for novel antibacterial compounds reveal targets and drug efflux susceptibility. Chem Biol. 2004 Oct;11(10):1423-30. doi: 10.1016/j.chembiol.2004.08.014. PMID: 15489169.
73. Frobert E, Burrel S, Ducastelle-Lepretre S, Billaud G, Ader F, Casalegno JS, Nave V, Boutolleau D, Michallet M, Lina B, Morfin F. Resistance of herpes simplex viruses to acyclovir: an update from a ten-year survey in France. Antiviral Res. 2014 Nov;111:36-41. doi: 10.1016/j.antiviral.2014.08.013. Epub 2014 Sep 8. PMID: 25218782.
74. Bekal S, Brousseau R, Masson L, Prefontaine G, Fairbrother J, Harel J. Rapid identification of Escherichia coli pathotypes by virulence gene detection with DNA microarrays. J Clin Microbiol. 2003 May;41(5):2113-25. doi: 10.1128/JCM.41.5.2113-2125.2003. PMID: 12734257; PMCID: PMC154688.
75. Kim MJ, Han JK, Park JS, Lee JS, Lee SH, Cho JI, Kim KS. Various Enterotoxin and Other Virulence Factor Genes Widespread Among Bacillus cereus and Bacillus thuringiensis Strains. J Microbiol Biotechnol. 2015 Jun;25(6):872-9. doi: 10.4014/jmb.1502.02003. PMID: 25791850.
76. Emaneini M, Jabalameli F, Mirsalehian A, Ghasemi A, Beigverdi R. Characterization of virulence factors, antimicrobial resistance pattern and clonal complexes of group B streptococci isolated from neonates. Microb Pathog. 2016 Oct;99:119-122. doi: 10.1016/j.micpath.2016.08.016. Epub 2016 Aug 20. PMID: 27554272.
77. Giaouris E, Heir E, Desvaux M, Hébraud M, Møretrø T, Langsrud S, Doulgeraki A, Nychas GJ, Kačániová M, Czaczyk K, Ölmez H, Simões M. Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. Front Microbiol. 2015 Aug 20;6:841. doi: 10.3389/fmicb.2015.00841. PMID: 26347727; PMCID: PMC4542319.
78. Thakur P, Chawla R, Tanwar A, Chakotiya AS, Narula A, Goel R, Arora R, Sharma RK. Attenuation of adhesion, quorum sensing and biofilm mediated virulence of carbapenem resistant Escherichia coli by selected natural plant products. Microb Pathog. 2016 Mar;92:76-85. doi: 10.1016/j.micpath.2016.01.001. Epub 2016 Jan 11. PMID: 26792674.

79. Ribet D, Cossart P. How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues. Microbes Infect. 2015 Mar;17(3):173-83. doi: 10.1016/j.micinf.2015.01.004. Epub 2015 Jan 29. PMID: 25637951.
80. Holden VI, Bachman MA. Diverging roles of bacterial siderophores during infection. Metallomics. 2015 Jun;7(6):986-95. doi: 10.1039/c4mt00333k. PMID: 25745886.
81. Tu J, Lu F, Miao S, Ni X, Jiang P, Yu H, Xing L, Yu S, Ding C, Hu Q. The siderophore-interacting protein is involved in iron acquisition and virulence of Riemerella anatipestifer strain CH3. Vet Microbiol. 2014 Jan 31;168(2-4):395-402. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.11.027. Epub 2013 Nov 28. PMID: 24345412.
82. Wu SY, Wang LD, Li JL, Xu GM, He ML, Li YY, Huang R. Salmonella spv locus suppresses host innate immune responses to bacterial infection. Fish Shellfish Immunol. 2016 Nov;58:387-396. doi: 10.1016/j.fsi.2016.09.042. Epub 2016 Sep 22. PMID: 27666190.
83. Sperandio B, Fischer N, Sansonetti PJ. Mucosal physical and chemical innate barriers: Lessons from microbial evasion strategies. Semin Immunol. 2015 Mar;27(2):111-8. doi: 10.1016/j.smim.2015.03.011. Epub 2015 May 1. PMID: 25936225.
84. Faraji F, Mahzounieh M, Ebrahimi A, Fallah F, Teymournejad O, Lajevardi B. Molecular detection of virulence genes in Pseudomonas aeruginosa isolated from children with Cystic Fibrosis and burn wounds in Iran. Microb Pathog. 2016 Oct;99:1-4. doi: 10.1016/j.micpath.2016.07.013. Epub 2016 Jul 25. PMID: 27457974.
85. Kong C, Neoh HM, Nathan S. Targeting Staphylococcus aureus Toxins: A Potential form of Anti-Virulence Therapy. Toxins (Basel). 2016 Mar 15;8(3):72. doi: 10.3390/toxins8030072. PMID: 26999200; PMCID: PMC4810217
86. Overhage J, Bains M, Brazas MD, Hancock RE. Swarming of Pseudomonas aeruginosa is a complex adaptation leading to increased production of virulence factors and antibiotic resistance. J Bacteriol. 2008 Apr;190(8):2671-9. doi: 10.1128/JB.01659-07. Epub 2008 Feb 1. PMID: 18245294; PMCID: PMC2293252.
87. Alibayov B, Baba-Moussa L, Sina H, Zdeňková K, Demnerová K. Staphylococcus aureus mobile genetic elements. Mol Biol Rep. 2014 Aug;41(8):5005-18.
88. Lim JY, Yoon J, Hovde CJ. A brief overview of Escherichia coli O157:H7 and its plasmid O157. J Microbiol Biotechnol. 2010 Jan;20(1):5-14. PMID: 20134227; PMCID: PMC3645889.
89. Losada L, DebRoy C, Radune D, Kim M, Sanka R, Brinkac L, Kariyawasam S, Shelton D, Fratamico PM, Kapur V, Feng PC. Whole genome sequencing of diverse Shiga toxin-producing and non-producing Escherichia coli strains reveals a variety of virulence and novel antibiotic resistance plasmids. Plasmid. 2016 Jan;83:8-11. doi: 10.1016/j.plasmid.2015.12.001. Epub 2015 Dec 31. PMID: 26746359.
90. Cameron DR, Jiang JH, Kostoulias X, Foxwell DJ, Peleg AY. Vancomycin susceptibility in methicillin-resistant Staphylococcus aureus is mediated by YycHI activation of the WalRK essential two-component regulatory system. Sci Rep. 2016 Sep 7;6:30823. doi: 10.1038/srep30823. PMID: 27600558; PMCID: PMC5013275.

91. Lakhundi S, Zhang K. Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. Clin Microbiol Rev. 2018 Sep 12;31(4):e00020-18.
92. Mohanty BK, Kushner SR. The majority of Escherichia coli mRNAs undergo post-transcriptional modification in exponentially growing cells. Nucleic Acids Res. 2006;34(19):5695-704. doi: 10.1093/nar/gkl684. Epub 2006 Oct 12. PMID: 17040898; PMCID: PMC1636475.
93. Dar D, Shamir M, Mellin JR, Koutero M, Stern-Ginossar N, Cossart P, Sorek R. Term-seq reveals abundant ribo-regulation of antibiotics resistance in bacteria. Science. 2016 Apr 8;352(6282):aad9822. doi: 10.1126/science.aad9822. PMID: 27120414; PMCID: PMC5756622.
94. Kjos M, Miller E, Slager J, Lake FB, Gericke O, Roberts IS, Rozen DE, Veening JW. Expression of Streptococcus pneumoniae Bacteriocins Is Induced by Antibiotics via Regulatory Interplay with the Competence System. PLoS Pathog. 2016 Feb 3;12(2):e1005422. doi: 10.1371/journal.ppat.1005422. PMID: 26840404; PMCID: PMC4739728.
95. Subramanian D, Natarajan J. Network analysis of S. aureus response to ramoplanin reveals modules for virulence factors and resistance mechanisms and characteristic novel genes. Gene. 2015 Dec 10;574(1):149-62. doi: 10.1016/j.gene.2015.08.006. Epub 2015 Aug 6. PMID: 26255091.
96. Grant AJ, Farris M, Alefounder P, Williams PH, Woodward MJ, O'Connor CD. Co-ordination of pathogenicity island expression by the BipA GTPase in enteropathogenic Escherichia coli (EPEC). Mol Microbiol. 2003 Apr;48(2):507-21. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.t01-1-03447.x. PMID: 12675808.
97. Guragain M, King MM, Williamson KS, Pérez-Osorio AC, Akiyama T, Khanam S, Patrauchan MA, Franklin MJ. The Pseudomonas aeruginosa PAO1 Two-Component Regulator CarSR Regulates Calcium Homeostasis and Calcium-Induced Virulence Factor Production through Its Regulatory Targets CarO and CarP. J Bacteriol. 2016 Jan 11;198(6):951-63. doi: 10.1128/JB.00963-15. PMID: 26755627; PMCID: PMC4772601.
98. Aedo S, Tomasz A. Role of the Stringent Stress Response in the Antibiotic Resistance Phenotype of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. Antimicrob Agents Chemother. 2016 Mar 25;60(4):2311-7. doi: 10.1128/AAC.02697-15. PMID: 26833147; PMCID: PMC4808156.
99. Heroven AK, Böhme K, Dersch P. The Csr/Rsm system of Yersinia and related pathogens: a post-transcriptional strategy for managing virulence. RNA Biol. 2012 Apr;9(4):379-91. doi: 10.4161/rna.19333. Epub 2012 Feb 16. PMID: 22336760.
100. Neidig A, Yeung AT, Rosay T, Tettmann B, Strempel N, Rueger M, Lesouhaitier O, Overhage J. TypA is involved in virulence, antimicrobial resistance and biofilm formation in Pseudomonas aeruginosa. BMC Microbiol. 2013 Apr 9;13:77. doi: 10.1186/1471-2180-13-77. PMID: 23570569; PMCID: PMC3639842.
101. Bartoli C, Lamichhane JR, Berge O, Varvaro L, Morris CE. Mutability in Pseudomonas viridiflava as a programmed balance between antibiotic resistance and pathogenicity. Mol Plant Pathol. 2015 Oct;16(8):860-9. doi: 10.1111/mpp.12243. Epub 2015 Apr 15. PMID: 25649542; PMCID: PMC6638476.
102. Gebhardt MJ, Gallagher LA, Jacobson RK, Usacheva EA, Peterson LR, Zurawski DV, Shuman HA. Joint Transcriptional Control of Virulence and Resistance to

Antibiotic and Environmental Stress in Acinetobacter baumannii. mBio. 2015 Nov 10;6(6):e01660-15. doi: 10.1128/mBio.01660-15. PMID: 26556274; PMCID: PMC4659468.
103. Skurnik D, Roux D, Cattoir V, Danilchanka O, Lu X, Yoder-Himes DR, Han K, Guillard T, Jiang D, Gaultier C, Guerin F, Aschard H, Leclercq R, Mekalanos JJ, Lory S, Pier GB. Enhanced in vivo fitness of carbapenem-resistant oprD mutants of Pseudomonas aeruginosa revealed through high-throughput sequencing. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Dec 17;110(51):20747-52. doi: 10.1073/pnas.1221552110. Epub 2013 Nov 18. PMID: 24248354; PMCID: PMC3870709.
104. Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG. Pseudomonas aeruginosa displays multiple phenotypes during development as a biofilm. J Bacteriol. 2002 Feb;184(4):1140-54. doi: 10.1128/jb.184.4.1140-1154.2002. PMID: 11807075; PMCID: PMC134825.
105. Hodille E, Rose W, Diep BA, Goutelle S, Lina G, Dumitrescu O. The Role of Antibiotics in Modulating Virulence in *Staphylococcus aureus.* Clin Microbiol Rev. 2017 Oct;30(4):887-917.
106. Lebreton A, Cossart P. RNA- and protein-mediated control of Listeria monocytogenes virulence gene expression. RNA Biol. 2017 May 4;14(5):460-470. doi: 10.1080/15476286.2016.1189069. Epub 2016 May 24. PMID: 27217337; PMCID: PMC5449094.
107. Lister JL, Horswill AR. *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. Front Cell Infect Microbiol. 2014 Dec 23;4:178.
108. Déziel E, Gopalan S, Tampakaki AP, Lépine F, Padfield KE, Saucier M, Xiao G, Rahme LG. The contribution of MvfR to Pseudomonas aeruginosa pathogenesis and quorum sensing circuitry regulation: multiple quorum sensing-regulated genes are modulated without affecting lasRI, rhlRI or the production of N-acyl-L-homoserine lactones. Mol Microbiol. 2005 Feb;55(4):998-1014. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04448.x. PMID: 15686549.
109. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet. 2001 Jul 14;358(9276):135-8. doi: 10.1016/s0140-6736(01)05321-1. PMID: 11463434.
110. Drenkard, E., Ausubel, F. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* 416, 740–3 (2002).
111. Kapur N, Grimwood K, Masters IB, Morris PS, Chang AB. Lower airway microbiology and cellularity in children with newly diagnosed non-CF bronchiectasis. Pediatr Pulmonol. 2012 Mar;47(3):300-7. doi: 10.1002/ppul.21550. Epub 2011 Sep 7. PMID: 21901858.
112. Lee KW, Periasamy S, Mukherjee M, Xie C, Kjelleberg S, Rice SA. Biofilm development and enhanced stress resistance of a model, mixed-species community biofilm. ISME J. 2014 Apr;8(4):894-907. doi: 10.1038/ismej.2013.194. Epub 2013 Oct 24. PMID: 24152718; PMCID: PMC3960537.
113. Seth AK, Geringer MR, Hong SJ, Leung KP, Galiano RD, Mustoe TA. Comparative analysis of single-species and polybacterial wound biofilms using a quantitative, in vivo, rabbit ear model. PLoS One. 2012;7(8):e42897. doi: 10.1371/journal.pone.0042897. Epub 2012 Aug 8. PMID: 22905182; PMCID: PMC3414496.

114. Brunsing RL, La Clair C, Tang S, Chiang C, Hancock LE, Perego M, Hoch JA. Characterization of sporulation histidine kinases of Bacillus anthracis. J Bacteriol. 2005 Oct;187(20):6972-81. doi: 10.1128/JB.187.20.6972-6981.2005. PMID: 16199567; PMCID: PMC1251614.
115. Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. Annu Rev Microbiol. 2001;55:165-99. doi: 10.1146/annurev.micro.55.1.165. PMID: 11544353.
116. Bassler BL, Wright M, Showalter RE, Silverman MR. Intercellular signalling in Vibrio harveyi: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. Mol Microbiol. 1993 Aug;9(4):773-86. doi: 10.1111/j.1365-2958.1993.tb01737.x. PMID: 8231809.
117. Wang T, Guan W, Huang Q, Yang Y, Yan W, Sun B, Zhao T. Quorum-sensing contributes to virulence, twitching motility, seed attachment and biofilm formation in the wild type strain Aac-5 of Acidovorax citrulli. Microb Pathog. 2016 Nov;100:133-140. doi: 10.1016/j.micpath.2016.08.039. Epub 2016 Sep 1. PMID: 27594669.
118. Delauné A, Dubrac S, Blanchet C, Poupel O, Mäder U, Hiron A, Leduc A, Fitting C, Nicolas P, Cavaillon JM, Adib-Conquy M, Msadek T. The WalKR system controls major staphylococcal virulence genes and is involved in triggering the host inflammatory response. Infect Immun. 2012 Oct;80(10):3438-53. doi: 10.1128/IAI.00195-12. Epub 2012 Jul 23. PMID: 22825451; PMCID: PMC3457574.
119. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet. 2001 Jul 14;358(9276):135-8. doi: 10.1016/s0140-6736(01)05321-1. PMID: 11463434.
120. Partridge SR, Kwong SM, Firth N, Jensen SO. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. Clin Microbiol Rev. 2018 Aug 1;31(4):e00088-17.
121. Pantosti A, Sanchini A, Monaco M. Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus.* Future Microbiol. 2007 Jun;2(3):323-34.
122. Jitwasinkul T, Suriyaphol P, Tangphatsornruang S, Hansen MA, Hansen LH, Sørensen SJ, Permpikul C, Rongrungruang Y, Tribuddharat C. Plasmid metagenomics reveals multiple antibiotic resistance gene classes among the gut microbiomes of hospitalised patients. J Glob Antimicrob Resist. 2016 Sep;6:57-66. doi: 10.1016/j.jgar.2016.03.001. Epub 2016 Apr 19. PMID: 27530840.
123. Duran N, Dogramaci Y, Demir C, et al. Detection of slime and methicillin resistance genes in Staphylococci isolated from nasal samples of patients with orthopaedic implants. Med Sci Monit 2010;16(8):BR271-7.
124. Vasudevan P, Nair MK, Annamalai T, et al. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. Vet Microbiol 2003;92(1-2):179–85
125. Mehrotra M, Wang G, Johnson WM. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin-1, and methicillin resistance. J Clin Microbiol 2000; 38: 1032- 1035
126. Paniagua-Contreras G., Sáinz-Espu T., Monroy-Pérez E., Rodríguez-Moctezuma J.R., Arenas-Aranda D., Negrete-Abascal E., Vaca S. Virulence markers in *Staphylococcus aureus* strains isolated from hemodialysis catheters of Mexican patients. *Adv. Microbiol.* 2012;2:476–487. doi: 10.4236/aim.2012.24061.

127. Lane D. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics.* Elsevier; Amsterdam, The Netherlands: 1991. 16S/23S rRNA sequencing; pp. 177–203.
128. Tavares A., Nielsen J.B., Boye K., Rohde S., Paulo A.C., Westh H., Schønning K., de Lencastre H., Miragaia M. Insights into alpha-hemolysin (Hla) evolution and expression among *Staphylococcus aureus* clones with hospital and community origin. *PLoS ONE.* 2014;9:e98634
129. Guo Y, Song G, Sun M, Wang J, Wang Y. Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus.* Front Cell Infect Microbiol. 2020 Mar 17;10:107.
130. Venkatesan N, Perumal G, Doble M. Bacterial resistance in biofilm-associated bacteria. Future Microbiol. 2015;10(11):1743-50.
131. Gordon RJ, Lowy FD. Pathogenesis of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection. Clin Infect Dis. 2008 Jun 1;46 Suppl 5(Suppl 5):S350-9.
132. McDevitt D, Francois P, Vaudaux P, Foster T J. Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of *Staphylococcus aureus.* Mol Microbiol. 1994;11:237–248.
133. Hall MJ, Steer JA, Keenan J. Panton-Valentine leukocidin Staphylococcus aureus osteomyelitis of the adult tibia--a case report. Ann R Coll Surg Engl. 2010 Mar;92(2):W17-9.
134. Genestier AL, Michallet MC, Prévost G, Bellot G, Chalabreysse L, Peyrol S, Thivolet F, Etienne J, Lina G, Vallette FM, Vandenesch F, Genestier L. Staphylococcus aureus Panton-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils. J Clin Invest. 2005 Nov;115(11):3117-27.
135. Sireesha Divyakolu, Rosy Chikkala, Kamaraju Suguna Ratnakar, Venkataraman Sritharan, "Hemolysins of *Staphylococcus aureus*—An Update on Their Biology, Role in Pathogenesis and as Targets for Anti-Virulence Therapy"published by Advances in Infectious Diseases, Vol.9 No.2, 2019
136. Kawada-Matsuo M, Le MN, Komatsuzawa H. Antibacterial Peptides Resistance in *Staphylococcus aureus*: Various Mechanisms and the Association with Pathogenicity. Genes (Basel). 2021 Sep 28;12(10):1527.
137. Ternent, L.; Dyson, R.J.; Krachler, A.-M.; Jabbari, S. Bacterial fitness shapes the population dynamics of antibiotic-resistant and -susceptible bacteria in a model of combined antibiotic and anti-virulence treatment. *J. Theor. Biol.* 2015.

8. EKLER

HMKÜ

GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL

KARAR FORMU

KARAR BİLGİLERİ	**Karar No:** 27	**Tarih:** 14/04/2022
	KARAR 27- Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Nizami DURAN'ın (Arş.Gör.Dr.Davut Utku COŞGUN'un uzmanlık tezi) "Üriner ve yara enfeksiyonlarında izole edilen Staphylococcus aureus şuşlarında virülans faktörlerle antibiyotik direnci arasındaki ilişki" isimli çalışması görüşülmüş olup; çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve etik kurallara uygun bulunmuş olup; çalışmanın finans kaynağı olarak gösterilen, **Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nden (BAP) gerekli belgelerin Kurulumuza ulaştıktan sonra** Çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.	
ETİK KURUL ÜYELERİ		
Çalışma Esası:	İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu	
Etik Kurul Başkanı	Prof.Dr.İbrahim Halil ÇERÇİ	

ETİK KURUL ÜYELERİ

Ünvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki		Katılım	
Prof.Dr.İbrahim Halil ÇERÇİ Başkan	Veteriner	HMKÜ Veteriner Fakültesi	E	E☐	H✓	E✓	H☐
Prof.Dr.Hülya YALÇIN Başkan Yrd.	Nükleer Tıp	HMKÜ Tıp Fakültesi	K	E☐	H✓	E✓	H☐
Prof.Dr. A.Güler OKYAY Başkan Yrd.	Kadın Hast. Ve Doğum	HMKÜ Tıp Fakültesi	E	E☐	H✓	E☐	H✓
Prof.Dr.Alper ASLAN Üye	Beden Eğitimi	HMKÜ BESYO	E	E☐	H✓	E☐	H✓
Prof.Dr.Tümay ÖZGÜR Üye	Patoloji	HMKÜ Tıp Fakültesi	K	E☐	H✓	E✓	H☐
Doç.Dr.Cengiz ARLI Üye	Kulak Burun Boğaz	HMKÜ Tıp Fakültesi	E	E☐	H✓	E✓	H☐
Dr.Öğr.Üyesi Fatma ÖZ Üye	Anatomi	HMKÜ Tıp Fakültesi	K	E✓	H☐	E✓	H☐
Doç.Dr Fundagül B. ZORTUK Üye	Diş Hekimi	HMKÜ Diş Hekimliği Fakültesi	K	E☐	H✓	E✓	H☐
Doç.Dr. Oğuzhan ÖZCAN Üye	Tıbbi Biyokimya	HMKÜ Tıp Fakültesi	E	E☐	H✓	E☐	H✓
Doç.Dr. Oğuz AKKUŞ Üye	Kardiyoloji	HMKÜ Tıp Fakültesi	E	E☐	H✓	E✓	H☐
Doç.Dr.Sibel SEVİNÇ Üye	Hemşirelik	HMKÜ Sağlık Hiz. YO.					

[redacted]

9. ÖZGEÇMİŞ

[redacted] yılında [redacted] doğdum. Liseye kadar Hatay ve İstanbul'da çeşitli okullarda okudum. Lise öğrenimini Çorum Fen Lisesi'de tamamladım. 2015 yılında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden mezun oldum.2019 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Mikrobiyoloji Bölümünde eğitimine başladım.