



**KLORHEKSİDİN GLUKONAT VE LAVANTA
ESANSİYEL YAĞ KOMBİNASYONLARININ
METİSİLİN DİRENÇLİ *Staphylococcus aureus* (MRSA)
İZOLATLARI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Aslan GEZİCİ

**Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Arzu GÖRMEZ**

**2023
Her hakkı saklıdır.**



FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KLORHEKSİDİN GUKONAT VE LAVANTA ESANSİYEL YAĞ
KOMBİNASYONLARININ METİSİLİN DİRENÇLİ *Staphylococcus aureus*
(MRSA) İZOLATLARI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Aslan GEZİCİ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Arzu GÖRMEZ

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Erzurum

2023

Her hakkı saklıdır

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki tüm bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

20 / 06 / 2023

Aslan GEZİCİ

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KLORHEKSİDİN GLUKONAT VE LAVANTA ESANSİYEL YAĞ KOMBİNASYONLARININ METİSİLİN DİRENÇLİ *Staphylococcus aureus* (MRSA) İZOLATLARI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Aslan GEZİCİ

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Arzu GÖRMEZ

Metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) izolatlarında antimikrobiyal ilaçların yanında antiseptik maddelere karşı da artan dirençliliğin olduğu bilinmektedir. Bu nedenle yeni ve etkili antimikrobiyal ajanların belirlenmesi veya etkili olduğu tespit edilen bu maddelerin tedavilerde kullanıma hazır hale getirilmesi son derece önemlidir. Literatürde kombinasyonel tedavilerin öneminin arttığı bilindiğinden bu çalışmada MRSA izolatlarına karşı antibakteriyel etkinlik gösteren lavanta esansiyel yağı (LEO) ile klorheksidin (CHG) bileşiklerinin kombinasyonel etkileri araştırıldı. Bu bağlamda hastaneden temin edilen klinik izolatlar ile kültür koleksiyonundan alınan MRSA ve MSSA izolatlarına karşı antimikrobiyal ajanların hem tek başına hem de birlikte kullanımının *in vitro* koşullardaki etkisi disk difüzyon ve mikrodilüsyon testleri yapılarak değerlendirildi. Tüm izolatlar için direnç genlerinin (*mecA*, *qac A/B* ve *qacC*) varlığı araştırıldı ve kombine edilen bileşiklerin checkboard testi ile sinerjistik etkileri, time kill testi ile de farmakodinamik özellikleri belirlendi. Disk difüzyon testi sonuçlarına göre test edilen ajanların tamamının izolatlar üzerinde etkili olduğu tespit edildi ve MIC değerleri belirlendi. Direnç genlerinin varlığına yönelik yapılan çalışmalarda MSSA izolatı hariç tüm izolatlarda direnç genlerinin var olduğu, checkboard testi sonucuna göre kombinasyonun test edilen tüm izolatlar üzerinde sinerjistik etki gösterdiği ve time kill testi sonucunda da tüm izolatlara karşı 24 saat içinde bakterisidal aktivite sergilediği belirlendi. Bu çalışma, *S. aureus* izolatlarına karşı LEO&CHG kombinasyonlarının aktivitesini değerlendiren literatürdeki ilk çalışmadır. Bu bağlamda elde edilen *in vitro* bulgular doğrultusunda, *in vivo* çalışmaların tasarlanıp yürütülmesinin sonuçlara anlamlı katkı sağlaması ve klinik çalışmalar için de bir temel oluşturması beklenmektedir.

2023, 55 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Staphylococcus aureus*, MRSA, Lavanta Esansiyel yağı, Klorheksidin glukonat, *mecA*, *qac A/B*, *qacC*.

ABSTRACT

MS. Thesis

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF CHLORHEXIDINE GLUCONATE AND LAVENDER ESSENTIAL OIL COMBINATIONS ON METHICILLIN RESISTANT *Staphylococcus aureus* (MRSA) ISOLATES

Aslan GEZİCİ

Erzurum Technical University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Prof. Dr. Arzu GÖRMEZ

It is known that MRSA isolates have increased resistance to antiseptic agents as well as antimicrobial drugs. Since the importance of combination therapies against antimicrobial resistance is known to increase in the literature, the combinatorial effects of lavender essential oil (LEO) and chlorhexidine (CHG) compounds, which show antibacterial activity against MRSA isolates, were investigated in this study. In this context, the effect of antimicrobial agents against clinical isolates obtained from the hospital and MRSA and MSSA isolates from the culture collection was evaluated alone and in combination by performing disc diffusion and microdilution tests. The presence of resistance genes (*mecA*, *qac A/B* and *qacC*) was investigated for all isolates and the synergistic effects of the combined compounds were determined by the checkboard test, and their pharmacodynamic properties were determined by the time kill test. According to the results of the disk diffusion test, it was determined that all of the tested agents were effective on the isolates. It was determined that resistance genes were present in all isolates except the MSSA isolate, the combination showed a synergistic effect on all isolates tested according to the checkboard test result and a bactericidal effect within 24 hours against all isolates as a result of the time kill test. This is the first study which evaluates the activity of LEO&CHG combinations against *S. aureus* isolates. In line with the findings obtained in this context, designing and conducting *in vivo* studies are expected to significantly contribute to the results of the current study and also to provide the basis of clinical studies.

2023, 55 page

Keywords: *Staphylococcus aureus*, MRSA, Lavender Essential Oil, Chlorhexidine Gluconate, *mecA*, *qac A/B*, *qacC*.

TEŞEKKÜR

Tez alıőması s¼recinde yardımı ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Arzu GÖRMEZ'e, teőekk¼rlerimi sunarım.

Çalıőmalarıma katkılarından dolayı değerli hocam Arő. Gör. Damla R¼ZGAR'a ve değerli arkadaőım Merve YILDIRIM'a sonsuz teőekk¼rlerimi sunarım.

Laboratuvar çalıőmalarımı gerçekleőtirirken vermiő oldukları bilgilerden ötür¼ Arő. Gör. Ayőe ÜST¼N'e teőekk¼r ederim.

Hayatım boyunca her türlü s¼rete arkamda olduklarından emin olduğum sevgili aileme sonsuz teőekk¼rlerimi sunarım.

Aslan GEZİCİ
Haziran 2023

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	1
1.1.1. Tarihçesi ve sınıflandırması.....	1
1.1.2. Genel özellikleri.....	2
1.1.2.1 Hücre duvar yapısı ve özellikleri.....	4
1.1.2.2. Virülans özellikleri.....	5
1.1.2.3. Enfeksiyonları.....	6
1.1.3. Antibiyotik direnci.....	7
1.1.3.1. Metisilin dirençli <i>S. aureus</i> (MRSA).....	7
1.2. Antiseptikler.....	8
1.2.1. Antiseptik ve dezenfektanların etki mekanizmaları.....	8
1.2.2. MRSA izolatlarında antiseptik direnç.....	10
1.2.3. Klorheksidin glukonat (CHG).....	10
1.2.4. MRSA izolatlarında klorheksidine karşı gelişen direnç.....	11
1.3. Esansiyel Yağlar.....	13
1.3.1. Esansiyel yağların antimikrobiyal özelliklerinin tespit edilmesi.....	13
1.3.2. Esansiyel yağların endüstride kullanım alanları.....	15
1.3.3. Lavanta esansiyel yağı.....	15
1.3.3.1. Lavanta esansiyel yağlarının antimikrobiyal özellikleri.....	16
1.3.4.2. Lavanta esansiyel yağları ve mikroorganizmalar üzerindeki etkileri.....	16
1.4. Tezin Amacı.....	18
2. KAYNAK ÖZETLERİ	19
3. MATERYAL ve YÖNTEM	24

3.1. Materyal	24
3.1.1. Kullanılan izolatlar ve bileşikler.....	24
3.1.1.2. Kullanılan izolatlar.....	24
3.1.1.3. Kullanılan bileşikler.....	24
3.1.2. Kullanılan cihazlar.....	24
3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler.....	24
3.1.4. Kullanılan besiyerleri ve çözeltiler.....	26
3.2. Yöntem.....	28
3.2.1. <i>S. aureus</i> izolatlarının geliştirilmesi.....	28
3.2.2. Direnç genlerinin belirlenmesi.....	28
3.2.2.1. Genomik DNA izolasyonu.....	28
3.2.2.2. Direnç genlerinin PCR ile amplifikasyonu.....	29
3.2.3. Biyolojik Aktivite Testleri.....	31
3.2.3.1. Antibakteriyel testler	31
3.2.3.2. Checkerboard (Dama Tahtası) testi.....	32
3.2.3.3. Zamana bağlı öldürme testi (Time Kill Assay)	34
3.2.3. İstatistiksel analiz	34
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	35
4.1. <i>S. aureus</i> İzolatlarının Geliştirilmesi.....	35
4.2. Direnç Genlerinin PCR ile Amplifikasyon.....	35
4.3. Antibakteriyel Aktivite Sonuçları.....	37
4.3.1. Disk difüzyon testi sonuçları.....	37
4.3.2. Mikrodilüsyon testi sonuçları.....	39
4.3.3. LEO&CHG kombinasyonlarının disk difüzyon testi sonuçları.....	40
4.4. Checkerboard (Dama Tahtası) Testi Sonuçları.....	42
4.5. Zamana Bağlı Öldürme Testi (Time Kill Assay) sonuçları.....	43
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	47
KAYNAKLAR	49

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
°C	Santigrat Derece
CFU	Koloni oluşturan birim
CO ₂	Karbondioksit
dk	Dakika
kDa	Kilo dalton
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
N	Normalite
nm	Nanometre
OD	Optik dansite
rpm	Dakikadaki dönme sayısı
β	Beta
μl	Mikrolitre
μM	Mikromolar

Kısaltmalar

CHG	Klorheksidin Glukonat
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
FIC	Fraksiyonel İnhibisyon Konsantrasyonu
HCl	Hidroklorik Asit
LEO	Lavanta Esansiyel Yağı
MIC	Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
MRSA	Metisiline Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>

MSSA	Metisiline Duyarlı <i>Staphylococcus aureus</i>
PBP	Penisilin Bağlanma Proteinleri
PBP2a	Penisilssin Bağlanma Proteinleri 2a
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SCC	Stafilokokkal Kaset Kromozomu
UV	Ultraviyole



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. <i>S. aureus</i> 'un ışık mikroskobu görüntüsü	2
Şekil 1.2. Koyun kanlı agarda <i>S. aureus</i> 'un petri görüntüsü.....	3
Şekil 1.3. <i>S. aureus</i> 'un koyun kanlı agarda beta hemolitik kolonileri.....	3
Şekil 1.4. <i>S. aureus</i> hücre duvar yapısı.....	4
Şekil 1.5. <i>S. aureus</i> kaynaklı deri ve yumuşak doku enfeksiyonları.....	6
Şekil 1.6. Klorheksidinin etki mekanizması.....	11
Şekil 3.1. Disk difüzyon testi şematik gösterimi.....	31
Şekil 4.1. MRSA izolatlarının genomik DNA direnç genlerinin elektroforez görüntüsü.....	36
Şekil 4.2. MRSA izolatlarının genomik DNA direnç genlerinin elektroforez görüntüsü.....	36
Şekil 4.3. Disk difüzyon test sonuçları.....	38
Şekil 4.4. LEO&CHG Kombinasyonlarıyla oluşturulan disk difüzyon sonuçları	41
Şekil 4.5. Klinik izolat 1'in zamana bağlı ölüm grafiği.....	44
Şekil 4.6. Klinik izolat 2'nin zamana bağlı ölüm grafiği.....	45
Şekil 4.7. Klinik izolat 3'ün zamana bağlı ölüm grafiği.....	45
Şekil 4.8. MRSA ATCC 43300'ün zamana bağlı ölüm grafiği.....	46
Şekil 4.9. MSSA ATCC 25923'ün zamana bağlı ölüm grafiği.....	46

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. <i>S. aureus</i> sınıflandırması.....	1
Çizelge 1.2. Antiseptik ve dezenfektanların etki mekanizmaları ve hedef aldığı yapıları.....	9
Çizelge 1.3. Lavanta esansiyel yağı bileşenleri ve etki mekanizmaları.....	17
Çizelge 3.1. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar.....	25
Çizelge 3.2. Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler.....	26
Çizelge 3.3. PCR reaksiyonunda kullanılan primerler.....	30
Çizelge 3.4. PCR reaksiyon karışımı.....	30
Çizelge 3.5. PCR reaksiyon koşulları.....	30
Çizelge 3.6. Kombinasyon etkisi denenen klorheksidin glukonat ve lavanta esansiyel yağının kombinasyon dilüsyonları.....	33
Çizelge 4.1. DNA konsantrasyon değerleri.....	36
Çizelge 4.2. Disk difüzyon analiz sonuçları.....	38
Çizelge 4.3. LEO ve CHG kombinasyonlarının MIC ve ½ MIC değerleri.....	40
Çizelge 4.4. LEO&CHG kombinasyonları ile oluşturulan disk difüzyon analiz sonuçları.....	42
Çizelge 4.5. LEO ve CHG FIC değerleri ve sinerji durumları.....	42

1. GİRİŞ

1.1. *Staphylococcus aureus*

Klinik enfeksiyonlardan önemli bir patojen olan *S. aureus*, "üzüm benzeri" kümeler halinde oval yapıda morfolojik özellik sergileyen ve genellikle altın sarısı renginde kolonileri ile bilinen Gram-pozitif bakterilerdir. *S. aureus*, oksijenli veya oksijensiz ortamda (fakültatif), 18-40 °C arasındaki sıcaklıklarda ve %10'a kadar tuzlu ortamda gelişirler (Taylor and Unakal 2022).

1.1.1. Tarihçesi ve sınıflandırması

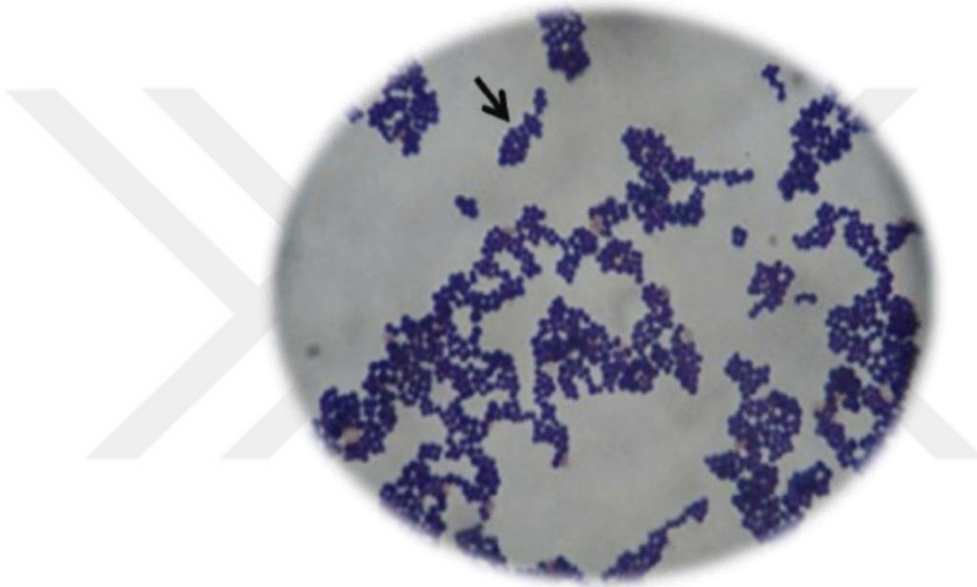
İnsan ve hayvanların florasında yer alan ve çeşitli enfeksiyonlara neden olan stafilokoklar ilk defa 1878 yılında Robert Koch tarafından tanımlanmıştır (Sıtkı Doğa 2018). Pasteur, 1880 yılında bu mikroorganizmaları sıvı besi yerinde üretmeye başlamış, İskoçyalı bilim adamı Alexander Ogston (1881) ise stafilokokların insanlarda apselere neden olduğunu ortaya koymuştur. Alexander Ogston fare ve kobaylarda yaptığı deneyler sonucunda stafilokokların hayvanlarda da hastalık yaptığını kanıtlamış ve ilk defa patojen olarak tanımlayarak mikroskopik morfolojilerini incelemiş ve üzüm salkımına benzediğini bildirmiştir (Parisi, 1985). Morfolojik yapısından yola çıkarak Yunancada üzüm salkımı anlamına gelen "staphyle" ve taneli yapıları nedeniyle yine Yunancada tane anlamına gelen "coccus", altın sarısı renginden dolayı da "aureus" eki verilerek isimlendirilmiştir. 1884 yılında Bergey, *S. aureus* bakterilerini, *Micrococcaceae* üyesine ait Gram pozitif bakteriler olarak sınıflandırmıştır (Garrity et al. 2000). *S. aureus*'un taksonomik sınıflandırması Çizelge 1.1.'de sunulmuştur.

Çizelge 1.1. *S. aureus* sınıflandırması

Domain	<i>Bacteria</i>
Şube	<i>Bacillota</i>
Sınıf	<i>Bacilli</i>
Takım	<i>Caryophanales</i>
Familya	<i>Staphylococcaceae</i>
Cins	<i>Staphylococcus</i>
Tür	<i>S. aureus</i>

1.1.2. Genel özellikleri

Micrococcaceae familyası, *Staphylococcus* cinsine ait olan ve içerisinde 40'dan fazla tür barındıran *S. aureus* hareketsiz, spor oluşturmeyen, 0,5-1,5 µm boyutlarında, Gram pozitif bakterilerdir. Morfolojik olarak üzüm salkımına benzer bir şekilde kümelenen, tekli veya ikişerli koklar olarak da gözlenebilen stafilokoklar içerisinde virülansı en yüksek tür olan *S. aureus* izolatları, koagülaz pozitif olmaları nedeniyle diğer stafilokok türlerinden ayrılmaktadırlar (Harris and Richards 2006; Jahan et al. 2015).



Şekil 1.1. *S. aureus* 'un ışık mikroskobu görüntüsü (Jahan et al. 2015)

S. aureus fakültatif anaerop bir bakteridir ve 15°C ile 45°C kadar geniş bir sıcaklık aralığında yaşamasına rağmen en iyi 35°C -37°C'de üremektedir. *S. aureus* birçok besi yerinde üreyebilse de en iyi geliştiği ortam 37°C'lik sıcaklık ve 7,4'lük pH'da %5'lik koyun kanlı agardır. Besi ortamında gelişimleri sonucunda oluşturdukları kolonilerin etrafında hemoliz görebilmek mümkündür. Yuvarlak ve oval şeklinde pürüzsüz, kabarık, parlak yüzeyli, S tipinde ve 1-2 mm boyutlarında altın sarısı renginde kolonileri ile bilinmektedirler (Kaito and Sekimizu 2007). Koloniler, rengini karotenoid pigmentlerinden almaktadırlar.



Şekil 1.2. Koyun kanlı agarda *S. aureus*'un petri görüntüsü (Yıldırım 2022)

S. aureus yüksek ısılara, kuruluğa, antibiyotiklere ve çeşitli kemoterapötik ajanlara karşı oldukça dayanıklıdır ve özellikle bu tür bileşiklere karşı da güçlü bir direnç geliştirme eğilimindedir. *S. aureus* uygun besi ortamında ve sıcaklıklarda kültüre edildiğinde +4°C'de 2-3 ay, -20°C'de 3-6 ay arasında hayata kalabilmektedir (Dicle 2018). *S. aureus* türlerinin çoğunda sarı pigment ve beta hemoliz görebilmek mümkündür. *S. aureus*'un hemoliz aktivitesi koyun kanlı agarda özellikle inkübasyon sürelerinin artırılması ile net bir şekilde gözlenebilirken, oksijensiz ortamlarda ve sıvı kültürlerde hemoliz oluşumu gözlenmemektedir (Kumar et al. 2016).

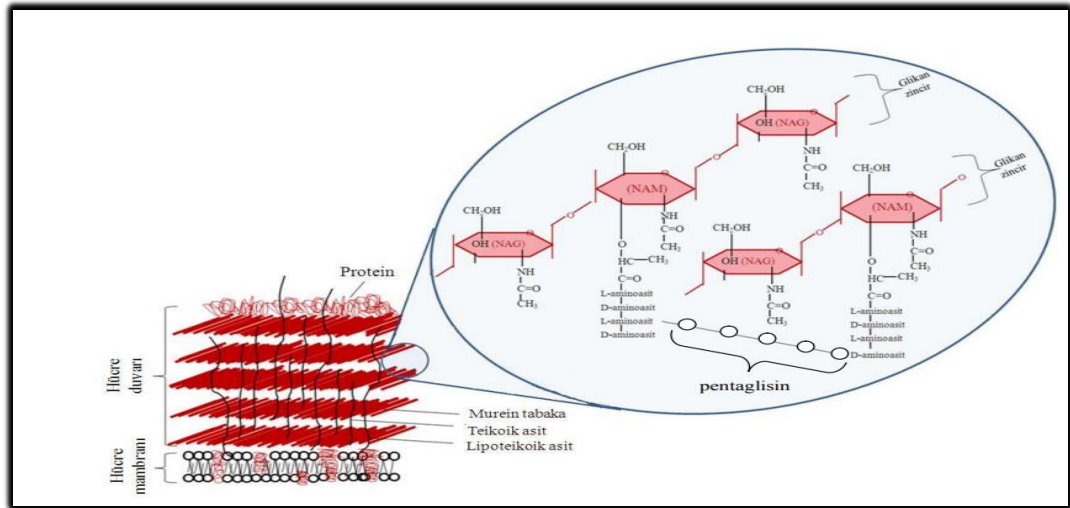


Şekil 1.3. *S. aureus*'un koyun kanlı agarda beta hemolitik kolonileri (Dicle 2018)

1. GİRİŞ

1.1.2.1 Hücre duvar yapısı ve özellikleri

Hücre duvarları temelde peptidoglikan ve teikoik asitlerden oluşmaktadır. Bu bileşenlerin yanında, türden türe farklı karbonhidrat ve proteinler de bulunabilmektedir. Hücre duvarının temel bileşeni, şeker olan mureindir. Peptidoglikanın yapısında yer alan murein neredeyse bütün prokaryotlarda bulunan doğrusal yapıdaki şeker birimlerinin birbirine bağlanması ile oluşan düz glikan zincirlerdir. Peptidoglikanın şeker yapıları N-asetilmuramikasit (NAM)'ın birinci karbonu ile N-asetilglukozamin (NAG)'nin dördüncü karbonu arasında oluşan bağlar ile birbirlerine bağlanmaktadır (Şekil 1.4.) (Alboy 2012). *S. aureus*'un hücre duvarında teikoik asit yapıları bulunmakta ve bu yapılar peptidoglikan tabakayı aşarak hücre duvarının dışına kadar uzanmaktadır. Teikoik asit yapıları *S. aureus*'a özgü moleküller olup antijenik özellik sergilemektedirler. *S. aureus*'un hücre duvarında bulunan teikoik asit yapılarının dışında hücrenin etrafını kaplayan proteinlerde genel olarak yüzey adezinleri, yani MSCRAMM (Microbial Surface Component Reacting With Adherence Matrix Molecules) olarak adlandırılmaktadırlar. *S. aureus* hücre duvarındaki başlıca yüzey adezinleri “clumping factor”, fibronektin bağlayan protein, kollajeni bağlayan protein ve Protein A'dır (Ryan and Ray 2004; Bannerman and Peacock 2006).



Şekil 1.4. *S. aureus* hücre duvar yapısı (Alboy 2012)

Hücre Duvarında Bulunan Yapıların Görevleri

Peptidoglikan yapısı: *S. aureus*'un endotoksine benzeyen bir yapı gösteren hücre duvarındaki bu yapı monositlerden interlökin-1 salınımını, kompleman aktivasyonunu ve ayrıca opsonik antikorların üretimini indükler. Bu özelliklerine ek olarak makrofajlardaki "tolllike" reseptörleri ile etkileşime girerek fagositik hücrelerden proinflamatuvar sitokinlerin salınımını uyarır (Dündar ve Dündar 2008).

Teikoik asitler: *S. aureus*'un duvarında yerleşik bulunan düz zincirlerden oluşan teikoik asitler birbirlerine fosfodiester köprüleri aracılığıyla bağlanan suda çözünür şeker-alkol-fosfat polimerleridir. Teikoik asitler stafilokok cinsine özgü pentaglisin antijenleridir. N-asetilglukozamin teikoik asitlerin 4. karbonuna α ya da β glikozidik bağlarıyla bağlanır. Teikoik asitlerin görevi hücrenin dış kısmında negatif yük oluşturarak çeşitli metal iyonları ile katyonların lokalizasyonu yanında otolitik enzimlerin aktivasyonunu sağlamak ve *S. aureus*'un konak hücre ile etkileşime girmesine yardımcı olmaktır (Dündar ve Dündar 2008).

Yüzey proteinleri: *S. aureus*'un hedef hücrenin yüzeyine yapışması ve konakta kolonize olmasını sağlayan yapılardır. Bu görevi yapan proteinler yüzey proteinleri olan MSCRAMM'lardır. Bu yapılar arasında en önemlisi Protein A dır. Protein A adezyon görevinin yanı sıra bakterinin fagositozdan korunmasına da yardımcı olmaktadır (Navarre and Schneewind 1999).

1.1.2.2. Virülans özellikleri

S. aureus izolatları insanlar başta olmak üzere birçok konakçı türü enfekte edip bulunduğu konak hücrede enfeksiyonlara sebep olmaktadır. İnsanlarda hafif deri lezyonlarından hayatı tehdit eden sistemik enfeksiyonlara kadar çok çeşitli hastalıklara neden oldukları bilinmektedir (Vaughn et al. 2020). Özellikle hücre duvarı yapıları ile konak hücreye yapışarak insanlarda, çoğunlukla burun delikleri ve deride kolonize olmakta ve çoğaldıktan sonra virülans etkinliklerini göstermektedirler. Hücresel yapılarında yer alan kapsül, peptidoglikan ve protein A gibi yapılar yanında hücre dışına salgıladıkları bazı toksin ve enzimler virülans özellik sergilemektedir. Bu yapılar konak

1. GİRİŞ

hücrelerin fagositik yapılarının inaktivasyonu, konak hücrenin savunma mekanizmalarını devre dışı bırakma ve konak hücrelerin yapılarını bozarak hücrelerde hasara neden olabilmektedir. İnsanlarda sıklıkla gözlenen stafilokoklara bağlı gıda zehirlenmeleri de salgıladıkları stafilokokkal enterotoksin (SE) kaynaklıdır (Cheung et al. 2021).

1.1.2.3. Enfeksiyonları

S. aureus, bağışıklık sisteminden kaçması ve birçok bilinen enfeksiyonlara neden olma yeteneği ile bilinen fırsatçı bir patojendir. *S. aureus*, bakteriyemi, enfektif endokardit, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları (impetigo, folikülit, çıban, karbonkül, selülit, haşlanmış deri sendromu ve diğerleri), osteomyelit, septik artrit, prostetik cihaz enfeksiyonları, pulmoner enfeksiyonlar (pnömoni ve ampiyem), gastroenterit, menenjit, toksik şok sendromu ve idrar yolu enfeksiyonlarına neden olurlar (Tong et al. 2015). Konak hücrelere ve enfeksiyon bölgesine bağlı olarak, bu bakteriler invaziv enfeksiyonlara ve/veya toksin aracılı hastalıklara da neden olabilirler. Enfeksiyonlar, *S. aureus* türlerine ve konak bölgelere bağlı olarak büyük ölçüde değişiklik gösterebilmektedir (Taylor and Unakal 2022). Hastalıklara neden olabilecek mekanizmaların çeşitliliği, hastalığa neden olan enfeksiyonun altında yatan sebeplerin anlaşılmasını zorlaştırmıştır (Pollitt et al. 2018). Ayrıca çoklu antibiyotik dirençli (Metisilin dirençli *S. aureus*) türlerin ortaya çıkmaları nedeniyle de enfeksiyonların tedavileri güçleşmiştir.



Şekil 1.5. *S. aureus* kaynaklı deri ve yumuşak doku enfeksiyonları (Tong et al. 2015)

1.1.3. Antibiyotik direnci

S. aureus izolatlarında antibiyotik direnci ilk defa 1930'larda sülfonamidlere karşı başlamıştır. Günümüzde ise linezolid ve daptomisin türü antibiyotiklere karşı da direnç gelişiminin olduğu bilinmektedir. Penisilinin keşfedilip kullanılmaya başlandığı 1940'lı yıllarda *S. aureus* enfeksiyonlarında kayda değer azalmalar olsa da penisilinaz (beta-laktamaz) enzimi sentezlemeye başlayan izolatların gelişimi ile kısa sürede penisiline karşı direnç ortaya çıkmaya başlamıştır. Buna bağlı olarak 1959 yılında beta-laktamaz enzimine karşı etkili, yarı sentetik bir penisilin olan metisilin ile geliştirilen çözüm, oldukça kısa sürmüş ve 1961 yılında İngiltere'de COL izolatı olarak tanımlanan ilk MRSA izolatı tespit edilmiştir. MRSA izolatları 1970 ve 1980'li yıllarda İngiltere ve Avrupa'da ciddi salgınlara neden olmuş ve sonraki yıllarda da dirençli yeni izolatların ortaya çıkması ile çoklu ilaç direnci gösteren değişik MRSA izolatları, hem hastanelerde hem de toplumda ciddi enfeksiyonlara yol açmıştır (Sancak 2011). *S. aureus*'larda antibiyotik direnci kromozom dışında ekstrakromozal yapılarda da kodlanmakta ve konjugasyon yoluyla başka türlere aktarılmaktadır. Gelişen antibiyotik direncinin ana nedeni aşırı antibiyotik kullanımı ve buna bağlı olarak patojenlerde gelişen direnç mekanizmaları ile direnç genlerinin aktarılması olarak sıralanmaktadır. Ulaşım teknolojilerinin gelişimiyle uzun mesafelere seyahatlerin artmasının da sürece katkı sağladığı bilinmektedir (Schito 2006).

1.1.3.1. Metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA)

S. aureus'ta metisilin direnci β -laktamaz enzimini inhibe eden penisilin türevlerine karşı kazanılmış direnç olarak tanımlanır. β -laktam antibiyotikleri ve türevlerine karşı β -laktamaz ve fem faktörleri tarafından oluşan direnç mekanizmaları yanında MRSA'da görülen en yaygın direnç PBP2a ile oluşan dirençtir. Stafilokoklarda metisilin direnci Stafilokok Kaset Kromozom (Staphylococcal Casette Chromosome; SCC) olarak adlandırılan taşıyıcı bir genetik eleman üzerinde kodlanır. SCC, ilk olarak 1960'larda tanımlanmış olup günümüzde yaklaşık 12 SCC varlığı bilinmektedir. Tüm SCC tipleri, penisilin bağlanma proteini 2a (PBP2a)'yı kodlayan peptidoglikan transpeptidaz özelliğindeki *mecA*'yı ve bu genlerin ifadesini düzenleyen *mecR1* ve *mecI* genlerini taşımaktadır. *mecA* geni 2,1 kb boyutlarında olup sadece metisilin dirençli

1. GİRİŞ

izolatlarda bulunmakta ve eksojen bir SCC *mec* geni tarafından kodlanmaktadır. *mecR1* geni hücre zarında sinyal taşıma görevi olan *mecR1* proteinini, *mecI* geni ise *mecA* genin ifadesini düzenleyen *mecI* proteinini kodlamaktadır. *mecA* geninin ifadesinin kontrolü *mecI*, *mecR1* ve *mecR2* genleri yanında *blaZ*, *blaI* ve *blaRI* ifadelerinin düzenleyici genlerine de bağlıdır (Lee et al. 2018). Normalde *mecR1* ve *mecI* proteinleri ortamda bir uyarıcı bulunmadığı zaman, *mecA* genini baskılayarak PBP2a üretimini baskılamaktadırlar. Ortamda metisilin antibiyotiği bulunduğu durumda ise uyarıcı olarak görev yapmakta ve *mecA* geni üzerindeki baskılayıcı genler ortadan kalkıp *mecA* geni serbest kalarak PBP2a üretmeye başlamaktadır. Bu durum ise direnç oluşumuna neden olmaktadır (Shalaby et al. 2020). 78 kDa ağırlığındaki PBP2a, β -laktam antibiyotiklerine karşı düşük afinite göstermekte ve β -laktam ya da β -laktam türevi bir antibiyotiğe maruz kaldığında peptidoglikan sentezine devam ederek hücreyi antibiyotiğin etkisinden korumaktadır (Yıldırım 2022).

1.2. Antiseptikler

Antiseptikler genel olarak canlı dokular üzerine uygulanan ancak oradaki mikroorganizmaları öldürmeyen bunun yerine mikroorganizmaların üreme veya büyüme hızını yavaşlatan ya da engelleyen maddeleri tanımlamak için kullanılmaktadırlar. Canlı dokulara uygulanan antiseptiklerin dokulara zarar vermemesi için içeriğindeki antiseptik madde yoğunluğu düşük tutulmaktadır. İçeriğinde antiseptik madde yoğunluğunun artırılması durumunda, mikroorganizmaların üzerindeki etkileri artmakta ise de uygulandıkları canlı dokularda da önemli hasarlara neden olmaktadır (Tümay ve Filazi 2020).

1.2.1. Antiseptik ve dezenfektanların etki mekanizmaları

Mikroorganizmaların gelişimini önlemek amacıyla kullanılan antiseptik ve dezenfektanların hedef yapıları ve etki mekanizmaları Çizelge 1.2.'de kısaca özetlenmiştir.

1. GİRİŞ

Çizelge 1.2. Antiseptik ve dezenfektanların etki mekanizmaları ve hedef aldığı yapıları (McDonnell and Russell 1999).

Hedef Aldığı Hücre Yapıları	Antiseptik veya Dezenfektan Çeşidi	Etki Mekanizmaları
Hücre Duvarı	Glutaraldehitler	Proteinlerin çapraz bağlanmasını engellerler.
	EDTA	Gram-negatif bakterilerde Mg^{+2} 'un uzaklaştırılması ve lipopolisakaritlerin salınmasına neden olurlar.
Hücre Zarı	QAC'ler	Fosfolipid çift katmanını etkileyerek zar hasarına neden olurlar.
	Klorheksidin	Düşük konsantrasyonlarda zar bütünlüğünü bozarlar, yüksek konsantrasyonlarda ise sitoplazmanın donmasına neden olurlar.
	Diaminler	Amino asitlerin yapılarını bozarlar.
	PHMB, aleksidin	Membran lipitlerinin yapılarını bozarak boşluklar oluştururlar.
	Fenoller	Hücre zarında sızıntılara neden olurlar.
Makromoleküllerin Çapraz Bağlanması Hedef Alanlar	Formaldehit	Proteinler, RNA ve DNA'ya çapraz bağlanarak yapılarını bozarlar.
	Glutaraldehit	Hücre ve hücre zarındaki proteinleri çapraz bağlayarak yapısal değişiklikler oluştururlar.
DNA İnterkalasyonu Hedef Alanlar	Akridinler	DNA'daki iki baz çifti arasına girer ve protein sentezini engellerler.
DNA Üzerindeki Yapıları Hedefleyenler	Halojenler	DNA sentezinin inhibisyonuna neden olurlar.
	Hidrojen Peroksit, Gümüş İyonları	DNA zincirinin kırılmasına sebep olurlar.
Oksitleyici Ajanlar	Halojenler	Tiyol gruplarının disüfitlere, sülfoksitlere veya disülfoksitlere oksidasyonunu gerçekleştirirler.
	Peroksijenler	Hidrojen peroksit: enzimler ve proteinlerdeki tiyol gruplarını oksitleyen serbest hidroksi radikallerinin (OH) oluşumuna neden olurlar.

1.2.2. MRSA İzolatlarında Antiseptik Direnç

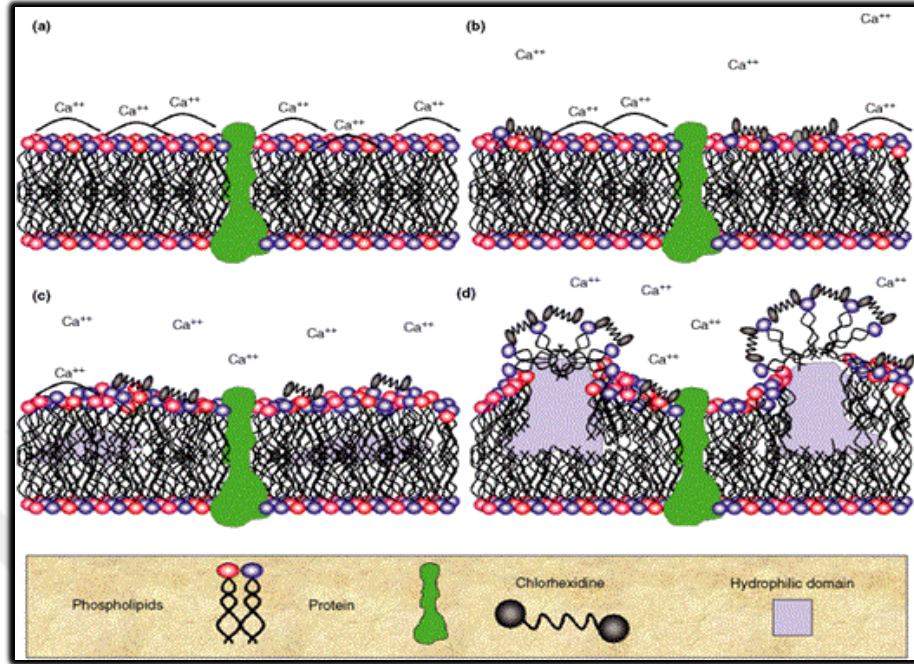
Antibiyotiklerin bilinçsiz ve aşırı kullanımını sonucunda toplum ve hastane kökenli *S. aureus* izolatlarında antibiyotik dirençliliğinin oluşması günümüzde antiseptik ve dezenfektan maddelere karşı da direnç kazanımı sinyalleri vermekte ve bu nedenle temkinli olmayı gerektirmektedir. Dirençli izolatların oluşumu hastane gibi sağlık merkezlerinde bulaşı artırmak yanında söz konusu kişilerin topluma karışması sonucunda toplum içerisinde de yayılabilmekte ve tedavisi güç salgın oluşumlarına neden olabilmektedir. Bu gibi etkilerinden dolayı antiseptiklere karşı gelişen direnç ve bu direncin mekanizmaları ile tespiti antibiyotik direncinin takibi kadar önem arz etmektedir (Bayraktar 2019).

1.2.3. Klorheksidin Glukonat (CHG)

Klorheksidin, hastanelerde ve toplumda hijyen amaçlı yaygın olarak kullanılan antiseptiklerden biri olup ilk kez 1954 yılında kullanılmaya başlanmıştır (Davies et al. 1954). Klorheksidin sıvı formda %70 izopropil alkol ile ya da pudra şeklinde hijyen amacıyla genel ve cerrahi öncesi antisepsi olarak kullanılmaktadır (Weinstein et al. 2008). Antiseptik olarak kullanılan klorheksidin genellikle %0,5 veya %4 konsantrasyonlarında suda çözünebilen glukonat formu ile kullanılmaktadır (Weinstein et al. 2008). Klorheksidin sahip olduğu hidrofilik ve hidrofobik yapıları sayesinde negatif yüklü bakteri duvarına yapışarak hücre duvarında geçirgenliği artırmakta ve bakteri hücresinde ozmotik dengeyi bozarak etki göstermektedir (Hugo and Longworth 1964). Klorheksidin molekülleri sahip oldukları biguanid grupları ile bakterilerin hücre zarı ve hücre duvarıyla etkileşime girerek orada bulunan anyonik bölgelere sıkıca bağlanmaktadır (Şekil 1.6.). Klorheksidin özellikle hücre zarında fosfolipid bağları arasına girdiği veya hücre zarının yapısında bulunan Mg^{2+} ve Ca^{2+} gibi divalen katyonların yerine geçerek hücre zarının yapısını ve bunun sonucunda potasyum iyonları ile protonların hücre içine girmesine neden olarak ozmotik dengeyi bozduğu bilinmektedir (Gilbert and Moore 2005). Klorheksidin daha çok Gram pozitif bakteriler üzerinde etkili olmasına rağmen Gram negatifler, anaeroblar, mantarlar ve bazı zarflı virüslere karşıda etkili olabilmektedir (Hugo and Longworth 1964). Ortamda serum, sekresyon veya doku

1. GİRİŞ

parçaları gibi organik materyallerin varlığında klorheksidinin bakteri sporlarına karşı etkinliğinin azaldığı da bilinmektedir (Russell and Day 1993).



Şekil 1.6. Klorheksidinin etki mekanizması (Gilbert and Moore 2005)

1.2.4. MRSA izolatlarında klorheksidine karşı gelişen direnç

Antiseptiklere karşı izolatlar duyarlı, fenotipik olarak dirençli ve dirençli olarak değerlendirilebilir. Antibiyotiklere karşı olduğu gibi antiseptiklere karşı direnç mekanizmaları da doğal veya sonradan kazanılmış olabilir. Klorheksidin gibi antiseptiklere karşı sonradan kazanılan direnç çoğunlukla mobil genetik elemanlar üzerinde kodlanan 16 eflüks pompa geni ile ilişkilendirilir (Paulsen et al. 1996; Maillard 2007). Eflüks proton pompaları ATP veya proton motif gücü (PMF) ile harekete geçen ve hücre içerisinde hedef aldığı antibiyotik ve antiseptiklere göre çalışan ve bu tür maddelerin hücre dışına geri atılımını yapan mekanizmalar olarak tanımlanabilir. Eflüks pompaları *S. aureus*'da klorheksidine karşı oluşan dirençten sorumlu mekanizmalar olarak bilinmektedir (Russell 2002).

Biyositlere karşı eflüks pompa ile ilgili dirençten *qacA*, *B*, *E*, *E11*, *F*, *G*, *H*, *J*, *Z*, *smr* ve *norA* gibi en az 11 genin sorumlu olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda bu

1. GİRİŞ

genlerin bir kısmının stafilokoklarda bulunmadığı görülmüştür. Antiseptiklere karşı dirençten sorumlu olabileceği düşünülen bu genler DNA yapıları, protein özellikleri, substratlara karşı afiniteleri ve üzerinde kodlandıkları plazmidlere göre majör kolaylaştırıcı süper aile (MFS) ve küçük çoklu ilaç direnç ailesi (SMR) olarak iki ayrı grupta değerlendirilirler. Bu gruplar içerisinde bulunan proteinler, belirli oranlarda hücre duvarının bitişik yapısal olarak ilgisiz katyonik ve lipofilik substratlara efluks aracılı direnci kodlamakta ve PMF ile harekete geçmektedirler (Littlejohn et al. 1991; Paulsen et al. 1996). SMR gen ailesi klorheksidin dışında genellikle belirli biyosidlere karşı direnci kodlarken MFS gen ailesi tüm biyosidlere karşı direnç genlerini kodlayabilir. Bu proteinler stafilokoklarda klorheksidin lipofilik katyonların dışarı atılmasına sebep olurlar. PMF bağımlı efluks sistemini kodlayan *qacA* geni *S. aureus*' da ilk tanımlanan genidir (Tennent et al. 1989; Littlejohn et al. 1991). MFS 1 ailesi üyelerinden olan *qacA* ve *qacB* hücre membranının 14 farklı bölgesinde lokalize olan büyük molekül ağırlığına sahip proteinlerdir. Bazı araştırmacılar *qacA* ve *qacB* genlerinin birbirleri ile yüksek homolojiye sahip olduklarını bu nedenle *qacA/B* olarak tanımlanmaları gerektiğini bildirmişlerdir (Alam et al. 2003). Yapılan dizi analizleri sonucunda *qacA* ile *qacB* dizileri arasında 7 nükleotidlik farklılık olduğu ve bu farklılığın 323. kodonda Asp-Ala değişimi şeklindeki tekli amino asit değişikliğine sebep olduğu ve bu iki genden *qacB*'nin divalent katyonların akışını sağlayamadığı tespit edilmiştir. *qacA* geni klorheksidin ve etidyum gibi divalent katyonlar ile benzalkonyum ve setrimid gibi monovalan katyonlara karşı dirençten sorumlu genlerdir. *qacA* geni farklı kimyasal gruplarda yer alan 30 farklı katyonik lipofilik bileşiği substrat olarak kullanabilir. Bakteri genomlarında kromozomlar ve pSK1 ailesinden büyük plazmidler üzerinde yerleşmiştir. *qacB* ise monovalen ve bazı düşük yoğunluktaki divalent katyonik bileşiklere karşı dirençten sorumludurlar. *qacB* geni *qacA* geni ile yakın ilişki içerisinde. *qacA* stafilokoklarda klorheksidin duyarlılığını azaltan gen olarak kabul görmektedir. Koagülaz negatif stafilokoklarda smr adı verilen *qacC* geninin ise klorheksidine karşı fenotipik olarak bir direnç geliştirdiği, ancak bu gelişen direncin stabil olmadığı bilinmektedir (Mitchell et al. 1998).

1.3. Esansiyel Yağlar

Bitkiler eski çağlardan günümüze hem bilimsel araştırmalar da hem de ticaret amacıyla ilaç sektöründe, fitoterapide, aromaterapide, gıda ve kozmetik yapımı gibi pek çok alanda kullanılmaktadır (Hammer et al. 1999). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre tedavi amacıyla kullanılan tıbbi bitki sayısının 20.000'e yakın olduğu ve bu bitkilerden yaklaşık 500'ünün üretiminin yapıldığı bilinmektedir. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde nüfusun çok büyük bir bölümü bitki kaynaklı tedavileri benimsemekte ve Dünya'da üretimi yapılan çoğu sentetik ilacın etken maddesi de bitkilerden sağlanmaktadır (Kandavel 2010).

Esansiyel yağlar bitkilerin tüm aksamlarından özellikle de yaprak, kabuk, kök, çiçek, meyve, odun ve reçine yapılarından üretilmektedir. Esansiyel yağlar, yapılarında bulunan etken madde türüne göre başta antimikrobiyal (antibakteriyel, antiviral, antifungal) olmak üzere, sedatif, karminatif ve diüretik gibi birçok etkiye sahiptirler (Lahlou 2004; Maksimovic et al. 2005; Çelik ve Çelik 2007). Yapılarında bulunan etken maddeler ve geniş kullanım alanlarından dolayı esansiyel yağlar birçok bilim adamının dikkatini çekmekte ve bilimsel araştırmalarda kullanılmaktadır. Özellikle tedavilerde kullanılan antibiyotiklere karşı gelişen direnç ve bunun sonucunda dirençli mikroorganizmaların yayılımıyla mücadele etmek için tıbbi bitkilerin ekstraktları ve esansiyel yağların bu patojenlere karşı oluşturdukları aktiviteler üzerine de yoğun şekilde çalışmalar yapılmaktadır (Leal-Cardoso and Fonteles 1999; Nostro et al. 2000; Dağcı vd 2002; El-Shazly et al. 2002; Lahlou 2004; Yarnell and Abascal 2004). Ülkemizde de son yıllarda birçok tıbbi bitki, enfeksiyon hastalıklarının tedavi etmek amacıyla ilaçlara alternatif olarak kullanılmaktadır (Aslan et al. 2021).

1.3.1. Esansiyel yağların antimikrobiyal özelliklerinin tespit edilmesi

Esansiyel yağlar, bitkilerin uygun organik çözücülerle preslenmesi, bu pres sonucu oluşan organik maddelerden su buharının distilasyonu veya ekstraksiyonu gibi süreçler sonucunda elde edilmektedir (Dorman and Deans 2000). Genellikle aromatik bitkilerden elde edilen esansiyel yağların uçucu ve hidrofobik olduğu ayrıca kendine has bir kokusunun bulunduğu bilinmektedir. Esansiyel yağların sahip oldukları bu özellikler

1. GİRİŞ

onların biyolojik olarak aktif olduklarını düşündürmektedir. Biyolojik aktivite testlerinden biri olan antimikrobiyal özelliklerin belirlenmesi amacıyla yapılan testler CLSI standartlarına göre uygulanmakta ve her türlü laboratuvarında kolaylıkla yapılabilmektedir. Antimikrobiyal özelliklerin belirlenmesi amacıyla uygulanan yöntemlerin başında agar difüzyon, micro-well ve micro-broth dilüsyon yöntemleri gelmektedir (Janssen et al. 1987). Bu yöntemlere ek olarak esansiyel yağların inhibisyon zon çaplarını belirlemek üzere son yıllarda kullanılan diğer yöntemlerde disk difüzyon ve well difüzyon yöntemleridir (Abu-Shanab et al. 2004). Her türlü laboratuvar koşullarında yapılabilirliği olan ve yaygın olarak kullanılan bu testlerde nicel ve nitel veriler gözlemlenerek kaydedilmektedir. Bu amaçla ilk olarak petride uygun bir katı besi ortamı hazırlanır ve üzerine mikroorganizma ekimi yapılır, akabinde petri üzerine ya da açılan bir çukura etkinliği gözlenmek istenen antimikrobiyal madde konular ve inkübasyona bırakılır. İnkübe edilen petrilere maddelerin etkinliği oluşan inhibisyon zon çapları ölçülerek değerlendirilir. Disk, agar ya da well difüzyon yönteminde antimikrobiyal aktivitesi gözlenen bitki ekstraktları veya uçucu yağların etkinlik gösterdiği en düşük dozun belirlenmesi amacıyla da micro-well, micro-broth ya da tüp dilüsyon yöntemleri kullanılmaktadır. Her üç yöntemde de antimikrobiyal özellikleri belirlenecek maddeler ve hedef aldığı mikroorganizmaların etkileşime girmeleri sağlanmakta ve uygun konsantrasyonda belli oranlarda hazırlanan karışımlar inkübasyona bırakılmaktadır. Test edilen antimikrobiyal maddeye karşı üremenin olup olmadığı kuyucuk ya da tüplerde oluşan renk değişiklikleri ile absorbansları belirlenmekte ve bakterinin gelişmediği en düşük konsantrasyon değeri, minimum inhibitör konsantrasyonu (MIC) olarak belirlenmektedir. Tüm bu yöntemlerde kullanılan agar üzerine uygulama (agar difüzyon), agar da kuyucuk açılması (well difüzyon), besi ortamı üzerine disk yerleştirilmesi (disk difüzyon), 96 kuyucuklu plateler (well-dilüsyon), eppendorf tüpleri (mikro-dilüsyon) ya da deney tüpleri (tüp dilüsyon) kullanımına dayalı olarak yöntemin adı değişmektedir (Janssen et al. 1987; Dorman and Deans 2000).

1.3.2. Esansiyel yağların endüstride kullanım alanları

Ekolojik sistemin en önemli canlılarından biri olan bitkiler besin zincirinde ki önemleri kadar tıbbi açıdan etkinlik göstermeleri nedeniyle de eski zamanlardan günümüze kadar farklı amaçlarla yetiştirilip kullanılmıştır. İlaç endüstrisinin gelişimine

1. GİRİŞ

paralel olarak her ne kadar tedavilerde bitkisel ilaçların yerini sentetik ilaçlar almaya başlasa da özellikle gelişmiş toplumlarda yeşile dönüş adı altında doğal beslenme, doğal ürünlerle tedavi gibi hususlara yönelim artmış ve yeniden sentetik ilaçların yerini almaya başlamışlardır (Aslan 2005). Günümüzde de yan etkilerinin az olması ve birçok hastalık üzerinde etkinlik göstermesi gibi özelliklerinden dolayı tedavide tıbbi bitkilerin değeri ve kullanımı hızla artmaktadır. Halk arasında bilinen ve tedavilerde sıklıkla kullanılan bitkilerin yapılan bilimsel araştırmalar ile önemleri ortaya konulmakta ve tüm bitki temelli tedaviler bir bilim dalı olan fitoterapi adı altında incelenmektedir (Aslan 2005). DSÖ verilerine göre dünyada 3 milyardan fazla insanın, gelişmiş ülkelerde ise toplumun yaklaşık % 80'inin fitoterapi yöntemlerini kullandığı bilinmektedir (Eloff 1998).

Tıbbi bitkiler ve esansiyel yağlar ilaç olarak kullanımının yanısıra, gıda ve kozmetik sektörler başta olmak üzere birçok sektörde de kullanılmakta ve yüksek ekonomik değere sahip olmaktadır (Çelik ve Çelik 2007). Tıbbi bitkilerin özellikle yaprak, tohum, gövde ve köklerinden elde edilen bitkisel ekstraktların önemli biyolojik aktivitelerinin bulunduğu bilinmektedir (Ertürk ve Demirbag 2003).

1.3.3. Lavanta esansiyel yağı (LEO)

Lavanta bitkisinin çoğu hibrit olmak üzere 39 tür ve 400 tescilli çeşidi bulunmaktadır. Yapısı, bulunduğu yer ve kimyasal bileşenleri farklılık gösteren bu bitkiler yapraklı, çiçekleri olan tek yıllık otsu bitkilerdir. Akdeniz bölgesinden köken alan lavantalar başta Avrupa olmak üzere Kuzey Afrika, Güney Asya, Arap Yarımadası ve Amerika'da yetiştirilmektedir. Lavanta bitkisi sahip oldukları esansiyel yağlar sayesinde ilaç, gıda, kozmetik ve parfüm endüstrisinde sıklıkla kullanılmakta ve ekonomik değerleri oldukça yüksektir (Aprotosoie et al. 2017).

Lavanta, Labiatae (Lamiaceae) familyasına ait bir bitkidir. Ticari olarak kullanılan lavanta esansiyel yağlarının çoğu *Lavandula* türü olan *Lavandula angustifolia* ve *Lavandula latifolia*'nın türleri ile lavandinler olarak adlandırılan her iki türün melezlenmesiyle elde edilen hibrit lavanta türüdür. *Lavandula stoechas* ve *Lavandula dentata* türleri halk arasında ağrıların dindirilmesi amacıyla yaygın olarak kullanılan türlerdir. *L. angustifolia* içeriğindeki yüksek linalool (linalil asetat) ve az miktarda kafur

1. GİRİŞ

bulundurmasından dolayı kozmetik ve aromaterapi endüstrilerinde en çok kullanılan türlerden biridir. Her türlü iklim koşullarına adapte olabilen ve yetiştirilen lavanta bitkisi pH aralığı 7-7,5 arasında yer alan işlenmiş topraklarda iyi gelişir. Genel olarak yoğun sıcak, rüzgârlı hava ve don olaylarına karşı dayanıklıdır. Lavanta bitkisi iyi bir şekilde büyümesi için güneş ışığına ve az miktarda gübreye ihtiyaç duymaktadır. Üretim aşamasında gübrenin çok kullanılması durumunda yağ içeriği azalmakta, yoğun yaprak gelişimi olmakta ve bundan dolayı yağ içeriği yüksek çiçeklerin sayısı azalmaktadır. Bu nedenle yüksek yağ içerikli olması amacıyla budama yapılması gerekmektedir (Woronuk et al. 2011).

1.3.3.1. Lavanta esansiyel yağlarının antimikrobiyal özellikleri

Lavanta esansiyel yağlarının tür farklılığına dayalı olarak içerdikleri yağ miktarları ile içeriğindeki aktif bileşenler değişmekte ve bu bağlamda farklı biyolojik aktivite sergileyebilmektedir. Pek çok lavanta türünün mikroorganizmalara özellikle de MRSA ve vankomisine dirençli *Enterococcus* gibi dirençli patojenik mikroorganizmalara karşı güçlü antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu, bu durumun da esansiyel yağın içeriğinde bulunan etken maddelerin miktarıyla paralel olduğu bilinmektedir (Cavanagh and Wilkinson 2005). *L. stoechas* esansiyel yağlarının bakteriler, mayalar ve ipliksi mantarlar gibi bir çok mikroorganizmaya karşı oldukça etkili geniş spektrumlu bir lavanta türü olduğu; *Lavandula coronopifolia* esansiyel yağlarının MRSA ya karşı güçlü bakterisidal etki gösterdiği; *Lavandula luisieri* esansiyel yağlarının da özellikle *Aspergillus* ve mayalara karşı antifungal etkinlik gösterdiği bilinmektedir (Dagli vd 2015).

1.3.3.2. Lavanta esansiyel yağları ve mikroorganizmalar üzerindeki etkileri

Lavanta esansiyel yağları genel olarak linalool, linek asetat, β -ocimene ve levandulol gibi monoterpenlerden oluşmaktadır. Aynı zamanda β -karyofilen gibi seskiterpen bileşikler ile lavandulil asetat esterleride içerebilmektedir. Lavanta esansiyel yağlarında bulunan bazı bileşenler ve bu bileşenlerin mikroorganizmalar üzerinde etkiledikleri yapılar Çizelge 1.3.'de gösterilmiştir (Leong et al. 2021). Lavanta esansiyel yağları sahip oldukları hidrofobik özelliklerinden dolayı çoğunlukla mikroorganizmalar da hücre duvarı ve hücre zarını hedef alarak antimikrobiyal etkisini göstermektedir. Söz

1. GİRİŞ

konusu esansiyel yağlar bakterilerin hücre içi ve hücre dışı geçirgenliğini sağlayan hücre zarının temel bileşeni olan çift tabakalı fosfolipit zarın yanısıra hücre duvarının yapısını oluşturan peptidoglikan tabaka ile de etkileşime girerek hasar oluşumuna neden olmakta ve bunun sonucunda hücre bütünlüğü yok olan bakterilerin ölümüne neden olmaktadır (Yang et al. 2020; Yap et al. 2021).

Çizelge 1.3. Lavanta esansiyel yağı bileşenleri ve etki mekanizmaları (Leong et al. 2021)

Kimyasal bileşenler	Moleküler gösterimi	LEO'da bulunma yüzdesi (%)	Antimikrobiyal etki mekanizması
Linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	20-40	Hücre zarının yapısını bozarak bakterinin büyümesini engeller.
Linalil asetat	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	25-50	Hücre zarının yapısını bozar.
β-ocimene	C ₁₀ H ₁₆	3-5	Hücre zarının yapısını bozar.
Terpinen-4-ol	C ₁₀ H ₁₈ O	3-8	Hücre zarının yapısını bozarak bakterinin büyümesini engeller. Biyofilm oluşumunu engeller.
Okaliptol (1,8-sineol)	C ₁₀ H ₁₈ O	1-4	Hücre zarının yapısını bozarak bakterinin büyümesini engeller. Akış pompalarının işlevini bozar.
Kafur	C ₁₀ H ₁₆ O	1-10	Hücre zarının yapısını bozarak bakterinin büyümesini engeller. Biyofilm oluşumunu engeller.
β-karyofilen	C ₁₅ H ₂₄	2-5	Hücre zarının yapısını bozar.
Sardunya	C ₁₀ H ₁₈ O	2-5	Hücre zarının yapısını bozar. Biyofilm oluşumunu engeller.
Lavanta asetat	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	3-8	Bakterilerin büyümesini engeller.
Linalil antranilat	C ₇ H ₂₃ NO ₂	2-12	Hücre zarının yapısını bozar.

1.4. Tezin Amacı

Bakteriyel izolatların pek çok antibiyotiğe karşı direnç kazanmış olması nedeniyle günümüzde enfeksiyonel hastalıkların tedavisi oldukça zordur. Bu nedenle yeni ve etkili bileşiklerin tespit edilmesi veya etkili olduğu tespit edilen bileşiklerin tedavilerde kullanıma hazır hale getirilmesi son derece önemlidir. *S. aureus* ciddi enfeksiyonlara neden olan önemli bir patojendir. Bu patojenin özellikle metisilin ve türevlerine karşı geliştirmiş olduğu direnç nedeniyle tedavisi oldukça güçtür. Metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) izolatlarında antimikrobiyal ilaçların yanında antiseptik maddelere karşı da artan dirençliliğinin olduğu ve bu durumun toplum sağlığı için son derece önemli bir tehdit olduğu görülmektedir. Bu antiseptiklerden en önemlisi ve en çok kullanılanlardan biri olan klorheksidin ve türevlerine karşı gelişen dirençlerin varlığı da sağlık için önemli bir tehditin habercisidir. Her ne kadar organizmalardaki antibiyotik ve antiseptik dirençlilik mekanizmaları birbirinden farklı ise de ikisinin de ortak yanı izolatların bu maddelere karşı azalan duyarlılıkları ve gelecekte ciddi enfeksiyon oluşturma potansiyeli arz etmeleridir. Literatürde yapılan çalışmalarda antimikrobiyal ya da antiseptik özelliği bilinen birçok esansiyel yağın söz konusu izolatlarda önemli düzeyde inhibasyona neden olduğu görülmektedir. Bu noktadan hareket ederek planlanan tezde öncelikle metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) izolatlarına karşı lavanta esansiyel yağının (LEO) sonrasında ise CHG ile kombinasyonlarının etkileri araştırılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Tez çalışması ile ilişkili olarak lavanta esansiyel yağı başta olmak üzere pek çok bitkinin antimikrobiyal ajanlarla kombine halde kullanılmasına ilişkin günümüze kadar yapılan çalışmaların kısa bir özeti aşağıda sunulmuştur.

Fyfe et al. (1998) tarafından yapılan çalışmada rezene, anason ve fesleğen esansiyel yağları ile bu yağların benzoik asit ve metil paraben kombinasyonlarının *Listeria monocytogenes* ve *Salmonella enteriditis*'e karşı inhibisyon etkileri araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda metil-paraben ile kombine edilen esansiyel yağların benzoik asitle yapılan kombinasyonlardan daha etkili olduğu, *L. monocytogenes*'e karşı en etkili inhibitör etkinin anason esansiyel yağı ve metil-paraben kombinasyonunda, *S. enteriditis*'e karşı da fesleğen esansiyel yağının tek başına kullanıldığı durumlarda gözlemlendiği bildirilmiştir (Fyfe et al. 1998).

Filoché et al. (2005) tarafından yapılan çalışmada, tarçın, çay ağacı (*Melaleuca alternifolia*), manuka (*Leptospermum scoparium*), *Leptospermum morrisonii*, arnika, okaliptüs, greyfurt, uçucu yağ gargarası, Listerine Cool Mint ve iki bileşeni ile mentol ve timol uçucu yağların tek başına ve klorheksidin diğlukonat ile kombinasyonunun *Streptococcus mutans* ile *Lactobacillus plantarum*'un planktonik ve biyofilm kültürlerine karşı antimikrobiyal etkileri araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda test edilen uçucu yağ ve bileşenlerin birçoğunun antimikrobiyal aktivitesinin olduğu, en yüksek aktivitenin (1,25-2,5 mg/ml) tarçında görüldüğü, özellikle uçucu yağ-klorheksidin kombinasyonlarının biyofilm kültürlerine karşı oldukça etkili olduğu ve eşdeğer bir büyüme inhibisyonu elde etmek için gereken klorheksidin miktarının, tarçın, manuka, *L. morrisonii*, timol ve Listerine ile kombinasyon halinde kullanıldığında 4-10 kat azaldığı sonucuna varılmıştır (Filoché et al. 2005).

Karpanen et al. (2008) tarafından yapılan çalışmada, *S. epidermidis* biyofilmleri üzerine çay ağacı, okaliptüs ve timol esansiyel yağları ile klorheksidin diğlukonat kombinasyonunun sinerjistik etkileri dama testi yöntemi ile araştırılmıştır. Çalışmada en iyi aktivitenin timol esansiyel yağında gözlemlendiği, dama testi sonucunda ise klorheksidin

2. KAYNAK ÖZETLERİ

diglukonat ve okaliptüs yağı kombinasyonunun güçlü bir antibiyofilm etkinlik gösterdiği bildirilmiştir (Karpanen et al. 2008).

Hendry et al. (2009) tarafından yapılan çalışmada okaliptüs esansiyel yağının etken maddesi olan 1,8-sineol ile hastane ortamlarında sıklıkla kullanılan antiseptiklerden biri olan klorheksidin diglukonatın ayrı ayrı ve kombinasyon halinde *S. aureus*, MRSA, *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *C. albicans* izolatlarına karşı antibiyofilm etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda MRSA ve *P. aeruginosa* izolatlarına karşı klorheksidin diglukonat ve 1,8-sineol kombinasyonlarının sinerjistik etki gösterdiği, diğer izolatlara karşı ise antagonistik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Hendry et al. 2009).

Roller et al. (2009) tarafından yapılan çalışmada farklı lavanta türlerinden (*Lavandula angustifolia*, *L. latifolia*, *L. stoechas* ve *L. luisieri*) ekstrakte edilen esansiyel yağların 1 ila 20 µl arasında değişen konsantrasyonlarda uygulandıkları MRSA ve MSSA izolatlarına karşı inhibiyon etkileri test edilmiş ve test edilen izolatlara karşı 0,8 ile 3 cm arasında inhibisyon zonu oluşturduğu rapor edilmiştir (Roller et al. 2009).

Cho et al. (2011) tarafından yapılan çalışmada imipeneme dirençli *Klebsiella pneumoniae* (IRKP) izolatlarına karşı yeşil çay bitkisinden ekstrakte edilen esansiyel yağın önemli bir bileşeni olan epigallocatechin gallate ile imipenem antibiyotiği kombinasyon halinde uygulanmış ve her iki uygulamanın da sonuçları sinerjistik etkileri ile karşılaştırılmıştır. Çalışmada yapılan antimikrobiyal duyarlılık testleri sonucunda test edilen tüm izolatların imipeneme dirençli oldukları, dama tahtası ve zamana bağlı öldürme testleri sonucunda da kombine edilen maddelerin sinerjistik etkiye sahip oldukları tespit edilmiştir. Çalışmanın sonucunda epigallocatechin gallate ve imipenem kombinasyonunun IRKP izolatlarına karşı güçlü antibakteriyel aktivite sergilediği rapor edilmiştir (Cho et al. 2011).

Zuzarte et al. (2012) tarafından yapılan çalışmada, *Lavandula multifida* bitkisinden elde edilen esansiyel yağlar gaz kromatografisi (GC) ve kütle spektroskopisi (MS) kullanılarak analiz edilmiş ve fenolik bileşenlerce zengin bu bitki türünden elde edilen esansiyel yağların çeşitli maya ve fungus türleri (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus*) ile çeşitli dermatofitler üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Çalışmanın sonucunda *L. multifida* esansiyel yağının fungal gelişimi inhibe ettiği, sahip olduğu monotерpen bileşikler ile fungusların sitoplazmik zarlarında hasara neden olarak etki gösterdiği ve dolayısıyla kandidozu tedavi etmek için tamamlayıcı olarak kullanılabilceği bildirilmiştir (Zuzarte et al. 2012).

Yap et al. (2013) tarafından yapılan çalışmada tarçın kabuğu, lavanta, mercanköşk ve çay ağacı bitkilerinden elde edilen esansiyel yağlar ampisilin, piperasilin, sefazolin, sefuroksim, karbesinilin ve meropenem antibiyotikleri ile kombine edilerek *Escherichia coli* (J53 R1, J53 pMG321, J53 pMG309) izolatlarına karşı sinerjistik etkileri sıvı mikrodilüsyon ve dama tahtası yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır. Yapılan testler sonucunda test edilen 35 kombinasyondan sadece dört tanesinin (piperasilin-lavanta yağı, piperasilin-tarçın kabuğu yağı, piperasilin-nane yağı ve meropenem-nane yağı) izolatlara karşı sinerjistik etki gösterdiği bildirilmiştir (Yap et al. 2013).

De Rappwe et al. (2016) tarafından yapılan çalışmada *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *Candida albicans* izolatlarına karşı *Lavandula angustifolia*'dan izole edilen LEO, kloramfenikol, siprofloksasin, nistatin ve fusidik asit gibi antimikrobiyal ajanlarla kombine edilerek patojen izolatlar üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Sinerjistik etkilerinin belirlenmesi için gerçekleştirilen dama tahtası ve izobologram deneyleri sonucunda en güçlü etkinin *P. aeruginosa* (Σ FIC 0,29)'ya karşı kloramfenikol kombinasyonunda gözlemlendiği bununla beraber LEO'nun tüm antimikrobiyal ajanlarla sinerjistik etki gösterdiği bildirilmiştir (de Rapper et al. 2016).

Alabdullatif et al. (2017) tarafından yapılan çalışmada *Artemisia herba-alba*, *Rosmarinus officinalis*, *L. multifida*, *Origanum marjoram* ve *Thymus capitatus* esansiyel yağları ile CHG kombinasyonlarının *S. epidermidis*'e karşı antibiyofilm aktivitesi ve *in vivo* testler de tavşan derileri üzerinde ki etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda %30 konsantrasyondan fazla esansiyel yağ kullanımının hayvan derilerinde tahrişe neden olduğu, gaz kromatografisi ve kütle spektroskopisi sonucunda bu esansiyel yağın yüksek seviyede linalool içerdiği tespit edilmiştir. Aynı zamanda etken madde olarak tespit edilen linalool-CHG kombinasyonlarının izopropil alkol ile antibiyofilm aktivitesini önemli ölçüde artırdığı ve dolayısıyla potansiyel olarak cilt dezenfeksiyonunda kullanılabilceği bildirilmiştir (Alabdullatif et al. 2017).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Şimşek and Duman (2017) tarafından yapılan çalışmada, dama tahtası yöntemi kullanarak *S. aureus*, MRSA, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* ve *C. albicans* izolatlarına karşı CHG ve okaliptüs esansiyel yağından izole edilen 1,8-sineol kombinasyonlarının sinerjistik etkileri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda CHG ve 1,8-sineol kombinasyonlarının test edilen izolatlardan sadece *P. aeruginosa*'ya karşı aditif diğer tüm izolatlara karşı ise sinerjistik etki gösterdiği, bu nedenle de CHG'ye karşı dirençli izolatların ortadan kaldırılmasına neden olarak cilt antisepsisinde faydalı olabileceği öne sürülmüştür (Şimşek and Duman 2017).

Adaszynska-Skwirzynska et al. (2019) tarafından yapılan çalışmada *S. aureus* ATCC 25923, MRSA ve *P. aeruginosa* ATCC 9027 izolatlarına karşı LEO, LEO aktif bileşeni linalool ile gentamisin antibiyotik kombinasyonlarının etkileri araştırılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda hem LEO-gentamisin hemde linoool-gentamisin kombinasyonlarının *S. aureus* ve MRSA izolatlarına karşı güçlü sinerjistik etki gösterdiği, ancak *P. aeruginosa* izolatlarına karşı FICI>0,700 olduğundan dolayı aditif etki gösterdiği rapor edilmiştir (Adaszynska-Skwirzynska et al. 2019).

Kwiatkowski et al. (2019) tarafından yapılan çalışmada, MRSA izolatlarına karşı LEO ile etkili bir antiseptik olan oktenidin dihidroklorür (OCT)'ün tek tek ve kombinasyon halinde antibakteriyel aktiviteleri ve sinerjistik etkileri araştırılmıştır. Çalışmada dama tahtası test sonuçlarına göre LEO ve OCT kombinasyonlarının MRSA'ya karşı sinerjistik etki gösterdiği, zamana bağlı öldürme testleri sonucunda ise kullanılan bu kombinasyonun beş saat sonrasında bakterilerin büyümesini inhibe etdikleri rapor edilmiştir. Çalışma sonucunda bu kombinasyonun MRSA izolatlarında hücre duvar yapısını değiştirerek, hücre zarının geçirgenliğini artırarak etki gösterdiği ve antiseptik özellikteki OCT'a karşı duyarlılığı artırdığı ve bu nedenle profilaktik ve terapötik potansiyel bir bileşik olarak tercih edilebileceği öngörülmüştür (Kwiatkowski et al.2019).

Yang et al. (2020) tarafından yapılan çalışmada LEO ve karbapenemaz inhibitörü olan meropenem antibiyotiği kombinasyonlarının karbapenaz dirençli *K. pneumoniae* izolatına karşı inhibitör etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmalarında dama tahtası ve zamana bağlı öldürme testleri ile LEO ve meropenem arasındaki sinerjistik etkinin tespiti, zeta potansiyel ölçümleri ve etidyum bromür iç/dış akış deneyleri

2. KAYNAK ÖZETLERİ

kullanılarak da hücre zarı üzerindeki etki mekanizmaları aydınlatmaya çalışılmıştır. Çalışma sonucunda LEO ve meropenem'in *K. pneumoniae*'ye karşı güçlü sinerjistik etki gösterdiği, aynı zamanda bakteri sitoplazmik zar yapısındaki protein kaybı ile hücre zarı yapılarında değişime neden olduğu ve bunun sonucunda da bakterinin hücre zarında geçirgenliği artırdığı rapor edilmiştir (Yang et al. 2020).

Leong et al. (2021) tarafından yapılan bir çalışmada lavanta esansiyel yağlarının bileşenleri tespit edilerek antibakteriyel aktiviteleri belirlenmiştir. Çalışma sonucunda lavanta esansiyel yağ bileşenlerinin linalool, linek asetat, β -ocimene ve levandulol gibi monoterpenlerden oluştuğu ve bu yapıların genel olarak mikroorganizmaların hücre zarları ile etkileşime girerek aktivite gösterdiği ve bu bileşenlerin tek tek hedef aldığı hücre yapıları belirlenip rapor edilmiştir (Leong et al. 2021).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan izolatlar ve bileşikler

3.1.1.2. Kullanılan izolatlar

Tez çalışmasında kullanılan klinik izolatlar Erzurum Şehir Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarından, MRSA ATCC 43300 ve MSSA ATCC 25923 izolatları ise Erzurum Teknik Üniversitesi Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı koleksiyonundan temin edilmiştir.

3.1.1.3. Kullanılan bileşikler

Biyolojik aktivite çalışmalarında kullanılan Lavanta Esansiyel Yağı saf şekilde Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesinden temin edilmiştir. Yine çalışmalarda sıvı formu kullanılan CHG (%20), Drogosan İlaç Sanayi ve Ticareti A. Ş.'den temin edilmiştir. Tez çalışmasında Lavanta Esansiyel yağı %5 DMSO içerisinde çözdürülerek, CHG ise %2 sıvı formuna seyreltilerek kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan cihazlar

Tez çalışmasında istifade edilen cihazların listesi Çizelge 3.1.'de gösterilmiştir.

3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler

Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler Çizelge 3.2.'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.1. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Cihaz Modeli
+4°C Soğutucu	J.P. Selecta
-20°C Soğutucu	J.P. Selecta
-80°C Derin dondurucu	Thermo Scientific FDE
CO ₂ inkübatör	ESCO Cell Culture
Çalkalamalı İnkübatör	Zhicheng-ZHWY-2102C
Çeker Ocak	TuraLab
Elektroforez Sistemi	BioRad Mini ReadySub-Cell™ ve Mini
Hassas Terazı	Shimadzu ATX 224
Homojenizatör	Qiagen TissueLyser LT
Jel Görüntüleme Sistemi	BioRad ChemiDoc™ MP
Magnetik Isıtıcı	Daihan, shr
Class II Biyogüvenlik Kabini	ESCO NordicSafe™
Class II Biyogüvenlik Kabini	ESCO Airstream
Mini Santrifüj	WiseSpin CF10
Nanodrop	Biotek EPOCH
Otoklav	JSR, JSAC-60
PCR Cihazı	SensoQuest Thermocycler
Rotor-Gene Q	Qiagen
Soğutmalı Santrifüj	Hettich Zentrifugen Universal 320R
Spektrofotometre	Thermo Scientific Multiskan Go
Statik İnkübatör	Memmert IN110
Su Banyosu	Daihan
Ultra Saf Su Cihazı	Millipore, Q-3W
Ultrasonik su banyosu	Çalışkan Ultrasonic Cleaner
UV Görüntüleyici	Analytikjena
Vorteks	WisdWisemix VM-10

Çizelge 3.2. Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal Madde	Markası
50X TAE	Ecotech
Agaroz	BIOMAX
Benzaldehit	Sigma-Aldrich
DMSO	EMPLURA® MERCK
EDTA	Sigma-Aldrich
Etanol	ISOLAB
Etilasetat	TEKKİM
Fenol:Kloroform:İzoamialkol	Sigma-Aldrich
Hidroklorik asit	Sigma-Aldrich
İzopropanol	MERCK
Kloroform	Sigma-Aldrich
Sodyum Hidroksit	MERCK
Sodyum Sülfat	MERCK
TRİzol	Invitrogen
Trietilamin	Sigma-Aldrich
Tripsin	Sigma-Aldrich
Tris	Sigma-Aldrich

3.1.4. Kullanılan besiyerleri ve çözeltiler

Luria Bertani Agar (LBA) (Bileşenler (g/L): Maya Ekstrakt: 5,0, Tripton: 10,0, Sodyum klorit: 10,0, Agar: 15,0):1 L dH₂O içerisine 40 g LBA tartılarak konulup karıştırılırdı. Otoklavda 15 dk 121°C’de sterilize edilen besi ortamı oda sıcaklığında 50°C’ye kadar soğutularak petrilere döküldü ve kullanıma hazır hale getirildi.

Luria Bertani Broth (LB) (Bileşenler (g/L): Maya Ekstrakt: 5,0, Tripton: 10,0, Sodyum klorit: 10,0): 1L dH₂O içerisine 25 g LB tartılarak çözdürülürdü ve hazırlanan karışım otoklavda 15 dk 121°C’de steril edildi.

Mueller Hinton Agar (MHA) (Bileşenler (g/L): Et Ekstrakt: 2,0, Nişasta: 1,5, Kazein:17,5, Agar: 15): 1L dH₂O içerisine 36 g MHA tartılarak konuldu ve hazırlanan çözelti karıştırıldıktan sonra 15 dk 121°C’de otoklav cihazında sterilize edildi. Otoklavlanan çözelti oda sıcaklığında soğutulup petrilere dökülerek hazırlandı.

Mueller Hinton Broth (MHB) (Bileşenler (g/L): Et Ekstrakt: 2,0, Nişasta: 1,5, Kazein:17,5,): 1L dH₂O içerisinde 26,5 g MHB tartılarak çözdürüldü ve hazırlanan karışım 15 dk 121°C’de otoklavda sterilize edildi.

Bakteriyel DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler

%70’lik Etanol: Etil alkol (35 ml) üzerine dH₂O (15 ml) ilave edilerek hazırlandı.

%75’lik Etanol: Etil alkol (37,5 ml) üzerine dH₂O (12,5 ml) ilave edilerek hazırlandı.

1X TAE tamponu: 50X TAE tampondan 20 ml alınarak 1.000 ml’ye tamamlayacak şekilde üzerine 980 ml distile su eklenerek hazırlandı.

EDTA (MA: 372,2 g/mol) Tamponu (0,5 M pH 8,0): 18,6 g EDTA tartılarak 100 ml dH₂O içerisinde çözdürüldü ve tampon üzerine 5 M NaOH ilave edilerek pH’sı 8,0’e ayarlandı.

TE Tamponu: 1 ml Tris-HCl (1 M, pH 8,0) tamponu ve 200 µl EDTA (0,5 M pH 8,0) karıştırılarak üzerine dH₂O ilave edildi ve son hacim 100 ml’ya tamamlandı.

Tris-HCl Tamponu (1 M, pH 8,0): Molekül ağırlığı 121,14 g/mol olan Tris’den 12,14 g tartılarak 100 ml dH₂O içerisinde çözdürüldü ve 1 N HCl ilave edilerek tampon pH’sı 8,0’e ayarlandı.

3.2. Yöntem

3.2.1. *S. aureus* izolatlarının geliştirilmesi

Klinik ve kültür izolatları frozen stoklarından alınarak LB agar besiyerine ekim yapıldı ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. LB agar besiyerinde büyüyen izolatlar çalışmalarda kullanılmak üzere LB broth besiyerinde çalkalayıcı inkübatörde 24 saat 37 °C’de inkübe edildi.

3.2.2. Direnç genlerinin belirlenmesi

MRSA izolatlarında hedeflenen gen bölgelerinin belirlenmesi amacıyla ilk olarak genomik DNA izolasyonları yapıldı.

3.2.2.1. Genomik DNA izolasyonu

Çalışmada kullanılan izolatların tamamının genomik DNA izolasyonu manuel olarak gerçekleştirilmiş olup kullanılan protokol aşağıda sunulmuştur.

1. Genomik DNA izolasyonu için MRSA izolatları LB agar besiyerinde inkübasyona bırakıldı.
2. LB agar besi ortamında büyütülen MRSA izolatları 3 ml LB sıvı besi ortamına aktarılmış ve 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakıldı.
3. İnkübasyonu takiben MRSA izolatları 13.500 rpm de 3 dk santrifügasyona tabii tutuldu.
4. Santrifüj sonrasında süpernatant atılarak pellet üzerine 1 ml lizis buffer eklendi ve 30 dk homojenize edildi.
5. Homojenizatörden sonra 10 dk 12.000 rpm’de santrifüj yapıldı ve üst faz yeni tüpe aktarıldı.
6. Yeni tüpe alınan karışımların üzerlerine 2 µl RNAaz eklendi ve daha sonra 15 dk 37°C’de inkübe edildi.
7. İnkübasyondan sonra fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:1) çözeltisinden eşit hacimde eklenerek 10 dk 12.000 rpm’de santrifüje tabii tutuldu.

8. Santrifüj sonrasında üst faz yeni bir tüpe alınarak %100 etanol eşit hacimde eklendi ve -20°C'de 1 saat inkübe edildi.
9. İnkübasyondan sonra 10 dk +4°C'de 12.000 rpm de santrifüj edildi ve üst faz atılıp pellet üzerine %70'lik etanolden 1 ml eklendi.
10. 10 dk +4°C'de 12.000 rpm de santrifüj sonrasında üst faz atılıp pellet havada kurutularak 1x TE buffer da çözdürüldü (Görmez 2011).

İzole edilen DNA'ların konsantrasyonlarının belirlenmesi: 2 µl TE buffer ortamında 260 nm'de izole edilen DNA'ların absorbansları ölçüldü ve akabinde 280 nm'de absorbansı ölçülerek, saflık analizi için A260/A280 değerleri belirlendi (Rüzgâr 2019).

Genomik DNA'nın agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi: Agaroz (1,2 g), 100 ml 1X TAE tamponu içerisine eklenerek mikrodalga fırında 2-3 dk ısıtılarak çözdürüldü. Sıcaklığı düşürüldükten sonra agaroz çözeltisine etidyum bromürden (konsantrasyonu 0,5 µg/ml) 4 µl eklenildi ve hafifçe karıştırılarak karışım elektroforez küvetine döküldü ve jel üzerine taraklar yerleştirildi. Katılaşılan jel üzerine tampon (1X TAE) ilave edildi ve ilk kuyucuğa 50 bp DNA marker (GeneDirex DNA Ladder RTU 50 bp, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 800, 900, 1.000, 1.200, 1.500 bp), diğer kuyucuklara da DNA örnekleri (5 µl DNA örneği+ 2,0 µl 6X yükleme tamponu ile karıştırılarak) yüklendi. DNA örnekleri 50 dk 90 voltta yürütüldükten sonra oluşan bant profilleri UV altında görüntülendi (Görmez 2011).

3.2.2.2. Direnç genlerinin PCR ile amplifikasyonu

Çalışmada test edilen izolatlarda *mecA*, *qacA/B* ve *qacC* direnç genlerinin varlığını belirleyerek gen bölgelerini amplifiye etmek amacıyla 30 µl'lik PCR reaksiyonu hazırlandı. Pozitif kontrol olarak *ftsZ* geninin tercih edildiği PCR çalışmalarında kullanılan primerler Çizelge 3.3.'de, reaksiyon karışımı Çizelge 3.4.'de, reaksiyon koşulları ise Çizelge 3.5.'de verilmiştir (Görmez 2011).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Çizelge 3.3. PCR reaksiyonunda kullanılan primerler

Primer	Forward	Reverse
<i>qacA/B</i>	GCAGAAAGTGCAGAGTTTCG	CCAGTCCAATCATGCCTG
<i>qacC(smr)</i>	GCCATAAGTACTGAAGTTATTGGA	GACTACGGTTGTAAAGACTAAACCT
<i>ftsZ</i>	AGCTGCAGAGGAATCTCGTGAACA	TCCGCCACCCATAACCAGAAGT
<i>mecA</i>	GTTAGATTGGGATCATAGCGTCATT	GCCTAATCTCATATGTGTTCTGTAT

Çizelge 3.4. PCR reaksiyon karışımı

Reaktif	Miktar (µl)
10X PCR tamponu	3
dNTP mix(dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 10 mM) Forward primer	0,6
Reverse primer	3
DMSO	3
MgCl ₂	1,2
Taq DNA polimeraz (5 unit/µl)	1,8
Ultra Pure dH ₂ O	0,3
Template DNA	12,1
Toplam:	30 µl

Çizelge 3.5. PCR reaksiyon koşulları

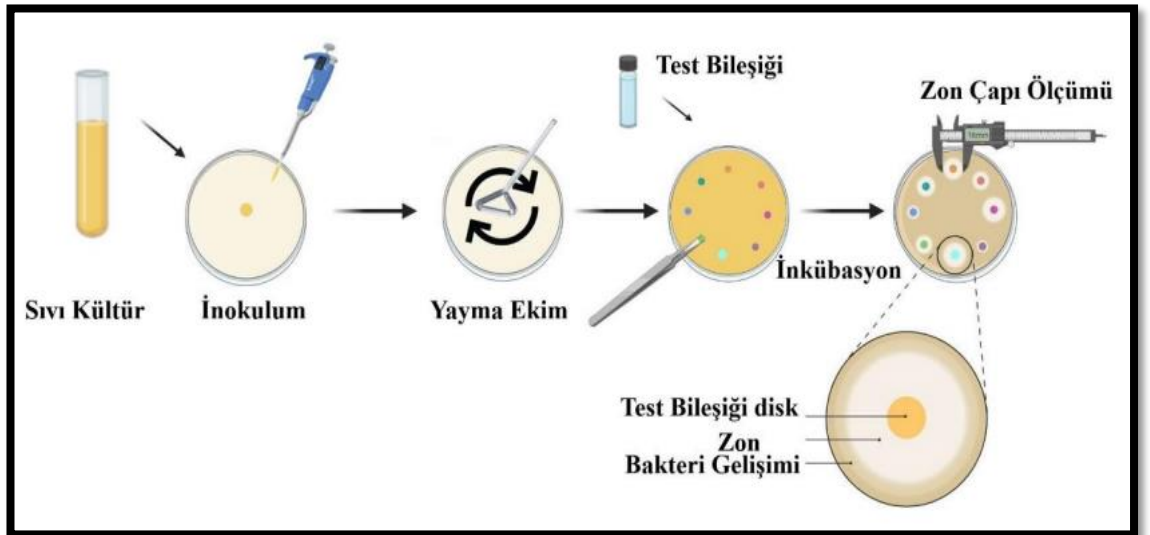
Aşamalar	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Döngü sayısı
Ön denatürasyon	94	2	1
Denatürasyon	94	1	36
Bağlanma	50	1	36
Uzama	72	2	36
Son uzama	72	5	1

PCR ürünlerinin elektroforezi: PCR sonucunda çoğaltılan DNA örnekleri jele yüklenildi ve elektroforezde (50 dk 90 voltta) yürütülerek görüntülendi.

3.3. Biyolojik Aktivite Testleri

3.3.1. Antibakteriyel testler

Disk difüzyon metodu: LB agarda kültüre edilen izolatlar steril 0,85'lik NaCl çözeltisinde konsantrasyonu 0,5 McFarland (10^8 CFU/mL)'a göre ayarlandı. Konsantrasyonu ayarlanan bakteriyel inokulumlar MHA yüzeyine steril swap ile yayıldıktan sonra disklere 10 µL emdirilmiş 1.000 µl/ml konsantrasyonlardaki LEO ve CHG bileşikler petrilere yerleştirildi, 37°C'de 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda bakteri gelişiminin görülmediği disklerin etrafındaki zon çapı ölçülerek antibakteriyel aktiviteler belirlendi. İnhibisyon zonunun çapı mm şeklinde ölçülerek, standart zon tablolarına göre değerlendirmeler yapıldı ve mikroorganizmanın kullanılan antimikrobik ajanlara karşı duyarlılık durumu belirlendi. Pozitif kontrol olarak ampisilin, negatif kontrol olarak da DMSO kullanıldı. Her bir deneme üç tekrarlı çalışıldı ve sonuçlar karşılaştırılmalı olarak değerlendirildi (Şekil 3.1.) (Özgeriş et al. 2021).



Şekil 3.1. Disk difüzyon testi şematik gösterimi (Yıldırım 2022)

Mikrodilüsyon metodu: LEO ve CHG'nin minimal inhibisyon konsantrasyon (MIC) değeri CLSI'dan modifiye edilen mikrodilüsyon yöntemiyle belirlendi. Bu amaçla

ilk olarak LEO 5% (v/v) dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözdürülerek hazırlandı. Test izolatları MHB besi ortamında bir gün öncesinden 37°C'de inkübasyona bırakıldı ve izolatların hücre yoğunluğu 0,5 McFarland'a göre 10⁶ CFU/mL'ye ayarlandı. LEO ve CHG bileşikleri 96 kuyucuklu plate ilk kuyucuktan başlanarak seri dilüsyon yöntemiyle (1.000-0,01 µl/ml) inokule edildi ve son olarak konsantrasyonu ayarlanan bakteri izolatlarından 100 µL eklenildi. Platelere 18-24 saat süreyle 37°C'de inkübe edildikten sonra kuyucuklarda oluşan bulanıklık spektrofotometrede (600 nm) ölçülerek bakteri üremesinin görülmediği konsantrasyonlar MIC değerleri olarak belirlendi. Pozitif kontrol olarak ampisilin, negatif kontrol olarak da DMSO kullanıldı. Her bir deneme üç tekrarlı çalışıldı ve sonuçlar karşılaştırılmalı olarak değerlendirildi (Özgeriş et al. 2021).

LEO ve CHG kombinasyonlarının disk difüzyon testi: Bu deneyde disk difüzyon metodundan farklı olarak MIC değerleri belirlenen LEO ve CHG bileşiklerinin kombinasyon halinde aktiviteleri test edildi. LB agarda kültüre edilen izolatların steril 0,85'lik NaCl çözeltisinde konsantrasyonu 0,5 McFarland (10⁸ CFU/mL)'a göre ayarlandı. Konsantrasyonu ayarlanan bakteriyel inokulumlar MHA yüzeyine steril swap ile yayıldıktan sonra disklere 10 µL emdirilmiş MIC konsantrasyonlardaki LEO ve CHG kombinasyonları, petrilere yerleştirildi, 37°C'de 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda bakteri gelişiminin görülmediği disklerin etrafındaki zon çapı ölçülerek antibakteriyel aktiviteler belirlendi. İnhibisyon zonunun çapı mm şeklinde ölçülerek, standart zon tablolarına göre değerlendirmeler yapıldı ve mikroorganizmanın kullanılan antimikrobik ajanlara karşı duyarlılık durumu belirlendi. Pozitif kontrol olarak ampisilin, negatif kontrol olarak da DMSO kullanıldı. Her bir deneme üç tekrarlı çalışıldı ve sonuçlar karşılaştırılmalı olarak değerlendirildi (Özgeriş et al. 2021).

3.3.2. Checkerboard (Dama tahtası) testi

Checkerboard testi, MRSA klinik ve kültür izolatlarına karşı LEO ve CHG antimikrobiyalleri arasında sinerjistik etkinin olup olmadığını belirlemek amacıyla gerçekleştirildi. MIC değerleri belirlenen bileşenler mikropatlere yerleştirildi. Mikroplate üzerindeki her bir kuyucuğa 100 µL 0,5 McFarland standardına ayarlanmış bakteri ilave edildi. Toplam hacim 200 µL olacak şekilde kuyucuklara MHB besiyeri eklenildi ve mikropatlere 24 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra,

3. MATERYAL ve YÖNTEM

elde edilen sonuçlar ve fraksiyonel inhibisyon konsantrasyonu (FIC) değeri aşağıdaki formüller (3.1, 3.2 ve 3.3) kullanılarak hesaplandı. FIC değeri belirlenirken; $FICI \leq 0,5$ sinerji; $0,5 < FICI < 1$ aditif etki; $1 < FICI < 4$ etkisiz ve $FICI > 4$ antagonizm skalası kullanılarak sonuçlar değerlendirildi. Her bir deneme üç tekrarlı çalışıldı ve sonuçlar karşılaştırıldı (Chovanová et al. 2016).

$$FIC(LEO) = \frac{\text{kombinasyon durumunda LEO'nun MIC değeri}}{\text{Tek başına LEO'nun MIC değeri}} \quad (3.1)$$

$$FIC(CHG) = \frac{\text{kombinasyon durumunda CHG'nin MIC değeri}}{\text{Tek başına CHG'nin MIC değeri}} \quad (3.2)$$

$$\Sigma FICI = ((FIC LEO) + (FIC CHG)) \quad (3.3)$$

Çizelge 3.6. Kombinasyon etkisi denenen klorheksidin glukonat ve lavanta esansiyel yağı kombinasyon dilüsyonları ($\mu\text{g/ml}$).

Üreme Kontrol	a*0,97	a0,48	a0,24	a0,12	a0,06	a0,03	a0,015
b*1.000	a0,97 b1.000	a0,48 b1.000	a0,24 b1.000	a0,12 b1.000	a0,06 b1.000	a0,03 b1.000	a0,015 b1.000
b500	a0,97 b500	a0,48 b500	a0,24 b500	a0,12 b500	a0,06 b500	a0,03 b500	a0,015 b500
b250	a0,97 b250	a0,48 b250	a0,24 b250	a0,12 b250	a0,06 b250	a0,03 b250	a0,015 b250
b125	a0,97 b125	a0,48 b125	a0,24 b125	a0,12 b125	a0,06 b125	a0,03 b125	a0,015 b125
b62,5	a0,97 b62,5	a0,48 b62,5	a0,24 b62,5	a0,12 b62,5	a0,06 b62,5	a0,03 b62,5	a0,015 b62,5
b31,25	a0,97 b31,25	a0,48 b31,25	a0,24 b31,25	a0,12 b31,25	a0,06 b31,25	a0,03 b31,25	a0,015 b31,25
b15,62	a0,97 b15,62	a0,48 b15,62	a0,24 b15,62	a0,12 b15,62	a0,06 b15,62	a0,03 b15,62	a0,015 b15,62
b7,81	a0,97 b7,81	a0,48 b7,81	a0,24 b7,81	a0,12 b7,81	a0,06 b7,81	a0,03 b7,81	a0,015 b7,81
b3,90	a0,97 b3,90	a0,48 b3,90	a0,24 b3,90	a0,12 b3,90	a0,06 b3,90	a0,03 b3,90	a0,015 b3,90
b1,95	a0,97 b1,95	a0,48 b1,95	a0,24 b1,95	a0,12 b1,95	a0,06 b1,95	a0,03 b1,95	a0,015 b1,95
b0,97	a0,97 b0,97	a0,48 b0,97	a0,24 b0,97	a0,12 b0,97	a0,06 b0,97	a0,03 b0,97	Sterilite Kontrol

* a: CHG b: LEO

3.2.3.3. Zamana bağılı öldürme testi (Time Kill Assay)

LEO ve CHG bileşiklerinin ayrı ayrı ve kombinasyon halinde zamana bağılı olarak öldürme eğrisini belirlemek amacıyla yapılan bu deneyde ilk olarak 0,5 McFarland konsantrasyonunda 5 ml'lik MRSA kültürleri hazırlandı. Her tüpe, içeriğinde ½ MIC değerlerinde LEO ve CHG ile kombinasyonları eklenildi ve 37°C'de inkübasyona bırakıldı. 0, 0,5, 3, 6, 10 ve 24. saatlerde örneklerden 0,1 ml alınıp, MHB besiyerinde 10⁴'lük seyreltmelerden sonra MHA besiyerine yayma plak yöntemi ile ekildi. Petrilerin 24 saatlik inkübasyonu sonunda oluşan koloniler sayılarak CFU/ml hesabı yapıldı (Formül 3.4.) (Chovanová et al. 2016).

$$\text{CFU /ml} = \frac{\text{Koloni sayısı} \times \text{Dilüsyon faktörü}}{\text{Petriye yayılan miktar (mL)}} \quad (3.4)$$

3.2.3. İstatistiksel Analiz

Tez çalışması neticesinde elde edilen verilerin GraphPad Prism 9.3.0 (463) software programı ile istatistiksel analizleri gerçekleştirildi ve sonuçlar ortalama ± standart hata olarak değerlendirildi. İstatistiksel anlamlılıklar için Unpaired t test kullanıldı ve p<0,05 değerleri anlamlı olarak kabul edildi (p<0,05: önemli, p<0,01: çok önemli, p<0,0005: yüksek derecede önemli, p<0,0001: yüksek derecede çok önemli, p>0,05: önemsiz).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. *S. aureus* İzolatlarının Geliştirilmesi

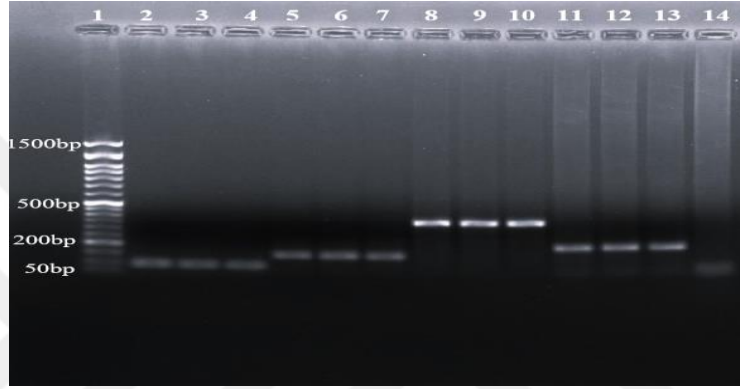
Klinik ve kültür izolatları frozen stoklarından alınarak LB agar besiyerine ekim yapıldı ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. LB agar besiyerinde büyüyen bakteriler her çalışma için ayrı ayrı hazırlanarak LB broth besiyerinde çalkalayıcı inkübatörde 24 saat 37 °C’de inkübasyonda bekletildi.

4.2. Direnç Genlerinin PCR ile Amplifikasyonu

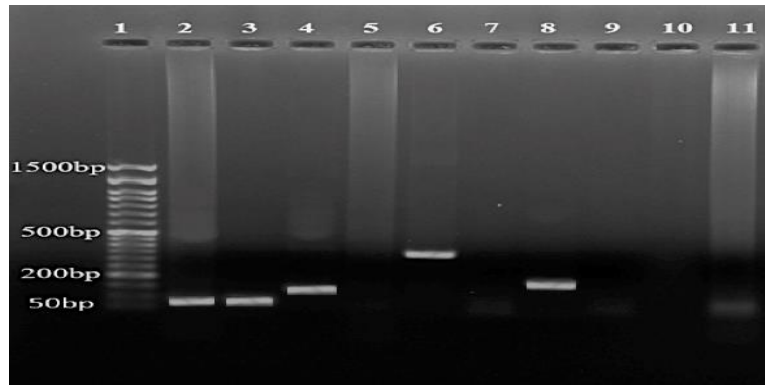
MRSA izolatların da direnç genleri genomik DNA ve plazmid DNA üzerinde kodlanmaktadır. Plazmid üzerinde kodlanan direnç mekanizmaları izolatların bulunduğu çevre ve ortam koşullarına göre değişiklik gösterebileceğinden bu çalışmada sadece kromozom üzerinde kodlanan direnç genlerinin varlığı araştırıldı. Bu genlerin varlığını tespit etmek amacıyla ilk olarak MRSA izolatlarından manuel olarak genomik DNA izolasyonları gerçekleştirildi. Genomik DNA konsantrasyonları Çizelge 4.1.’de verilmiştir. İzole edilen DNA’lar direnç genlerine spesifik primerler ile amplifiye edildiğinde ise pozitif kontrol olarak kullanılan MRSA ile hastane ortamından alınan üç klinik izolatta *mecA*, *qacA/B* ve *qacC* genlerinin olduğu, negatif kontrol olarak kullanılan MSSA izolatında ise beklenildiği üzere dirençten sorumlu genlerin olmadığı teyit edildi. Şekil 4.1. ve 4.2.’de direnç genlerinin elektroforez görüntüleri verilmiştir. MRSA izolatlarında varlığı tespit edilen direnç genlerinin hakkında ki bulgular hastane kaynaklı metisiline karşı direnç gelişiminden sorumlu *mecA* geni ile CHG gibi kuarterner amonyum bileşiklerinden oluşan antiseptiklere karşı gelişen direnç ile ilişkilendirilen *qac A/B* ve *qacC* direnç genlerinin varlığına yönelik literatürdeki verilerle uyumludur (Maillard 2007; Lee et al. 2018).

Çizelge 4.1. DNA konsantrasyon değerleri

Bakteriyel İzolatlar	DNA Konsantrasyonları (ng/µl)
MRSA ATCC 43300	87,15
MSSA ATCC 25923	93,21
Klinik İzolat 1	76,30
Klinik İzolat 2	69,34
Klinik İzolat 3	81,63



Şekil 4.1. MRSA izolatlarının genomik DNA direnç genlerinin elektroforez görüntüsü (1: 50kb Marker, 2: Klinik izolat 1 *ftsZ*, 3: Klinik izolat 2 *ftsZ*, 4: Klinik İzolat 3 *ftsZ*, 5: Klinik İzolat 1 *mecA*, 6: Klinik İzolat 2 *mecA*, 7: Klinik izolat 3 *mecA*, 8: Klinik İzolat 1, *qacA/B* 9: Klinik İzolat 2 *qacA/B*, 10: Klinik İzolat 3 *qacA/B*, 11: Klinik İzolat 1 *qacC*, 12: Klinik İzolat 2 *qacC*, 13: Klinik İzolat 3 *qacC* 14: Negatif kontrol.



Şekil 4.2. MRSA izolatlarının genomik DNA direnç genlerinin elektroforez görüntüsü (1: 50kb Marker, 2: MRSA ATCC 43300 *ftsZ*, 3: MSSA ATCC 25923 *ftsZ*, 4: MRSA ATCC 43300 *mecA*, 5: MSSA ATCC 25923 *mecA*, 6: MRSA ATCC 43300 *qacA/B*, 7: MSSA ATCC 25923 *qacA/B*, 8: MRSA ATCC 43300 *qacC* 9: MSSA ATCC 25923 *qacC*, 10: Boş kuyucuk 11: Negatif kontrol.

MRSA izolatlarında gelişen dirençten sıklıkla stafilokokkal kaset kromozomu Staphylococcal Casette Chromosome; SCC) üzerinde yer alan, *mec* gen ailesi üyesi olan, *mecA* geni sorumludur (Ray et al. 2016). Bu gen tarafından kodlanan PBP2a proteini vasıtasıyla da *S. aureus* izolatları, metisilin ve diğer β -laktam grubu antibiyotiklere karşı direnç geliştirmektedir. Bu nedenle günümüzde metisilin direncinden sorumlu gen olan *mecA* geni direnç mekanizmalarının çalışılmasında altın standart olarak kabul edilmektedir (Ibrahim et al. 2011). MRSA izolatlarında yapılan genom analizlerinde klorheksidin ve kuaterner amonyum bileşiklerine (QAC) karşı gelişen dirençten ise efluks pompa genleri olan *qac* genleri sorumlu tutulmaktadır (Maillard 2007). MRSA izolatlarında bu direnç ile ilişkilendirilen genler *qacA/B* ve *qacC* (*smr*) genleridir. *qacA* ve *qacB* genleri DNA yapılarındaki yüksek homoloji nedeniyle genellikle birlikte değerlendirilmekte ve efluks pompa genleri adı altında gruplandırılmaktadırlar (Alam et al. 2003). Söz konusu genlerin direnç mekanizmaları tam olarak aydınlatılmamasına rağmen bu genlerin de diğer efluks pompa genleri gibi antiseptikleri hücre dışına atarak etki gösterdikleri düşünülmektedir (Russell 2002). Literatürde yapılan çalışmalarda çoğu MRSA izolatlarında bu genlerin var olduğu ve metisilin direncinin oluşumunda da görevlerinin olabileceği düşünülmektedir (Anthonisen et al. 2002).

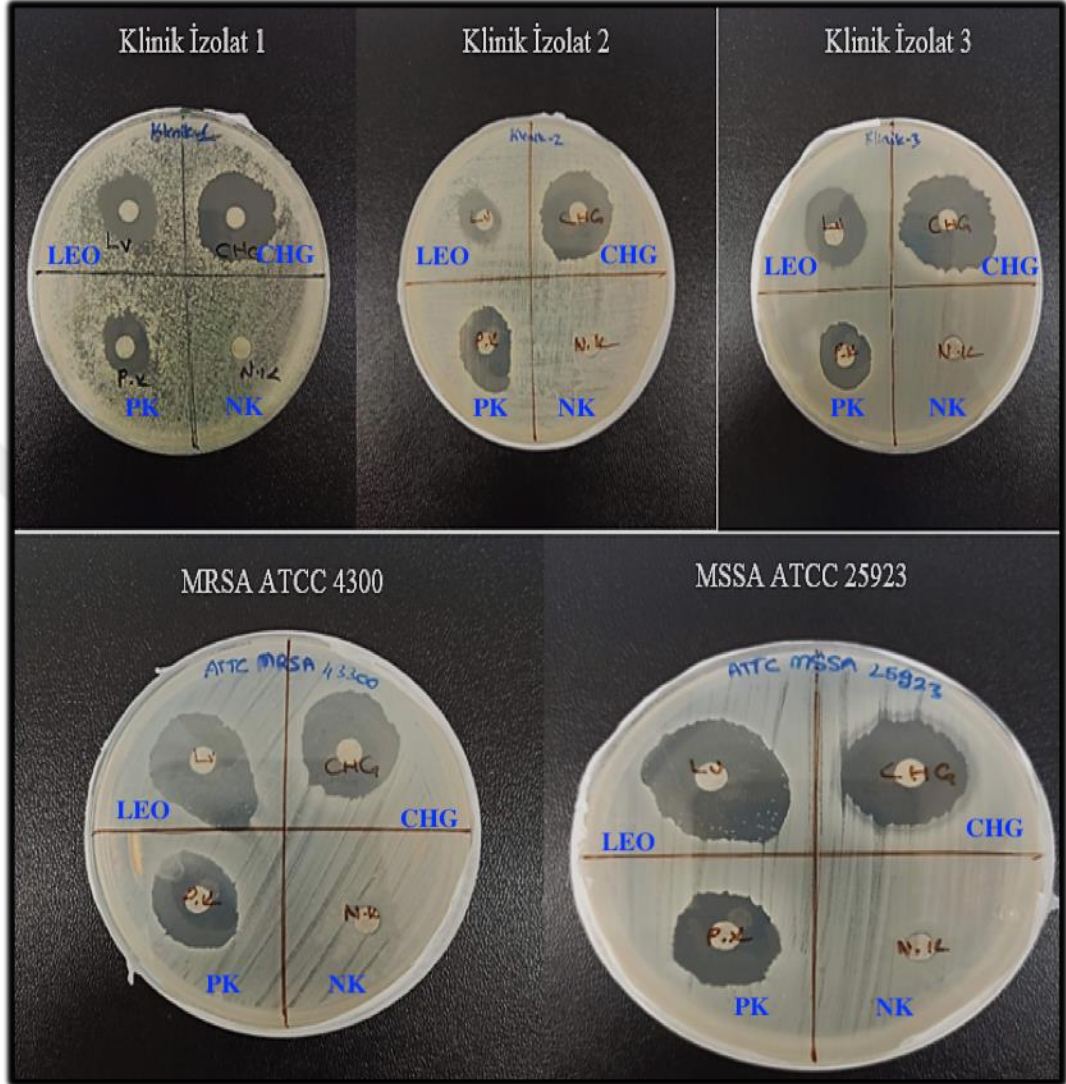
4.3. Antibakteriyel Aktivite Sonuçları

4.3.1. Disk difüzyon testi sonuçları

Tez çalışmasında LEO, CHG ve kombinasyonlarının test edilen izolatlar karşı duyarlılıklarını belirlemek amacıyla disk difüzyon testi yapıldı ve test sonunda zon çapları ölçülerek kaydedildi (Şekil 4.3., Çizelge 4.2.). Şekil 4.3. ve Çizelge 4.2.'de de görüldüğü üzere antimikrobiyal maddeler arasında en yüksek aktivite CHG uygulamasında gözlenmiştir. Kontroller ile kıyaslandığında LEO'nun da tüm izolatlar karşı oldukça yüksek düzeyde aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Literatürde LEO ile yapılan çalışmalarda da MRSA ve MSSA izolatlarına karşı ortalama 0,8-3 cm arasında değişen oranlarda inhibisyon zonu oluşturduğu çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Chao et al. 2008; Roller et al. 2009; Khadir et al. 2016). Yapılan çalışmada da disk difüzyon testleri sonucunda LEO'nun klinik ve kültür MRSA izolatlarında 1,7- 2,5

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

cm arasında zon çapı ile inhibisyon etkisinin olduğu ve literatürdeki çalışmalarla kıyaslandığında paralel olduğunu söylemek mümkündür.



Şekil 4.3. Disk difüzyon test sonuçları (LEO: Lavanta esansiyel yağı, CHG: Klorheksidin Glukonat, PK: Pozitif Kontrol (Ampisilin), NK: Negatif Kontrol (DMSO)).

Çizelge 4.2. Disk difüzyon analiz sonuçları*

Bakteriyel izolatlar	LEO	CHG	Pozitif Kontrol	Negatif Kontrol
MRSA ATCC 43300	2	2,2	1,9	0,1
MSSA ATCC 25923	2,5	2,3	1,9	0,1
Klinik İzolat 1	1,5	2,3	1,7	0
Klinik İzolat 2	1,3	2,2	1,8	0
Klinik İzolat 3	1,7	2,5	1,7	0,1

*LEO: Lavanta Esansiyel Yağı, CHG: Klorheksidin Glukonat, Pozitif Kontrol: Ampisilin, Negatif Kontrol: DMSO (Tüm değerler cm cinsinden verilmiştir.)

Disk difüzyon testi laboratuvar ortamlarında mikroorganizmaların antibiyotik duyarlılıklarını belirlemek amacıyla ön basamak olarak kullanılan bir testir. Kirby-Bauer tarafından geliştirilen bu test kullanılan ekipman maliyetlerinin düşük olması ve kolay uygulanabilir olmasından dolayı sıklıkla tercih edilmektedir (Lee and Komarmy 1976). Literatürde CHG için disk difüzyon çalışmaları yapılsa da agar ortamında yüksek veya düşük oranlarda difüze olması ve bulunan sonuçların MİK değerleriyle farklılık göstermesi nedeniyle standart bir yöntem olarak tercih edilmemekte, sadece diğer testler için bir ön basamak olarak değerlendirilmektedir (Suller and Russell 1999). Nitekim literatürde klorheksidinin çeşitli mikroorganizmaların oluşturdukları biyofilm üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmaların yanı sıra antimikrobiyal aktivitesinin de değerlendirildiği çalışmalar yer almaktadır. Çalışmada elde edilen disk difüzyon testi sonuçlarına göre LEO ve CHG bileşiklerinin, izolatların tümüne karşı bakterisidal bir aktivite gösterdiği ve belirlenen sonuçların literatürdeki sonuçlarla uyumlu olduğu görülmektedir (Bonez et al. 2013).

4.3.2. Mikrodilüsyon testi sonuçları

Disk diffüzyon testi sonuçlarına göre antibakteriyel aktivitesi gözlenen LEO ve CHG bileşiklerinin etkili olduğu en düşük minimal inhibisyon konsantrasyonunu (MIC) belirlemek amacıyla mikrodilüsyon testi yapıldı ve sonuçlar kaydedildi (Çizelge 4.3.). Çalışmanın bir sonraki aşamasında yapılacak olan Time Kill (zamana bağlı öldürme testi) testi için de LEO ve CHG nin yarı (1/2) MIC değerleri hesaplanarak çizelgeye dâhil edildi. Mikrodilüsyon testi sonuçlarına göre LEO'nun klinik 3 izolatına karşı MIC değeri 7,812 µg/ml, diğer tüm izolatlara karşı ise 15,625 µg/ml olduğu tespit edildi. Çalışmanın bulguları literatürdeki verilerle uyumlu olarak değerlendirildi (Kwiatkowski et al. 2019). Çalışmada test edilen bir diğer bileşik olan CHG (2%, v/v)'nin ise düşük konsantrasyonlarda kullanılmasına rağmen MIC değerlerinin oldukça düşük olduğu tespit edildi. Literatürde yapılan çalışmalarda da genel olarak CHG'nin %0,5 ile %2 konsantrasyonlarda kullanıldığı ve test edilen izolatlara karşı etkili olduğu bilinmektedir. Her ne kadar uygulanacak konsantrasyonlar, kombinasyonda kullanılacak maddelere ve mikroorganizmalara göre değişkenlik gösterse de çalışmanın sonucunda elde edilen verilerin antibakteriyel aktivite sonuçları bakımından CHG'nin literatürde bulunan MIC değerleri ile uyumlu olduğu tespit edildi (Şimşek and Duman 2017).

Çizelge 4.3. LEO ve CHG kombinasyonlarının MIC ve ½ MIC değerleri

Bakteriyel izolatlar	MIC değerleri		½ MIC değerleri		Pozitif Kontrol
	LEO	CHG	LEO	CHG	
MRSA ATCC 43300	15,625	0,12	31,25	0,24	1.000
MSSA ATCC 25923	15,625	0,03	31,25	0,06	1.000
Klinik İzolat 1	15,625	0,03	31,25	0,06	1.000
Klinik İzolat 2	15,625	0,03	31,25	0,06	1.000
Klinik İzolat 3	7,812	0,06	15,625	0,12	1.000

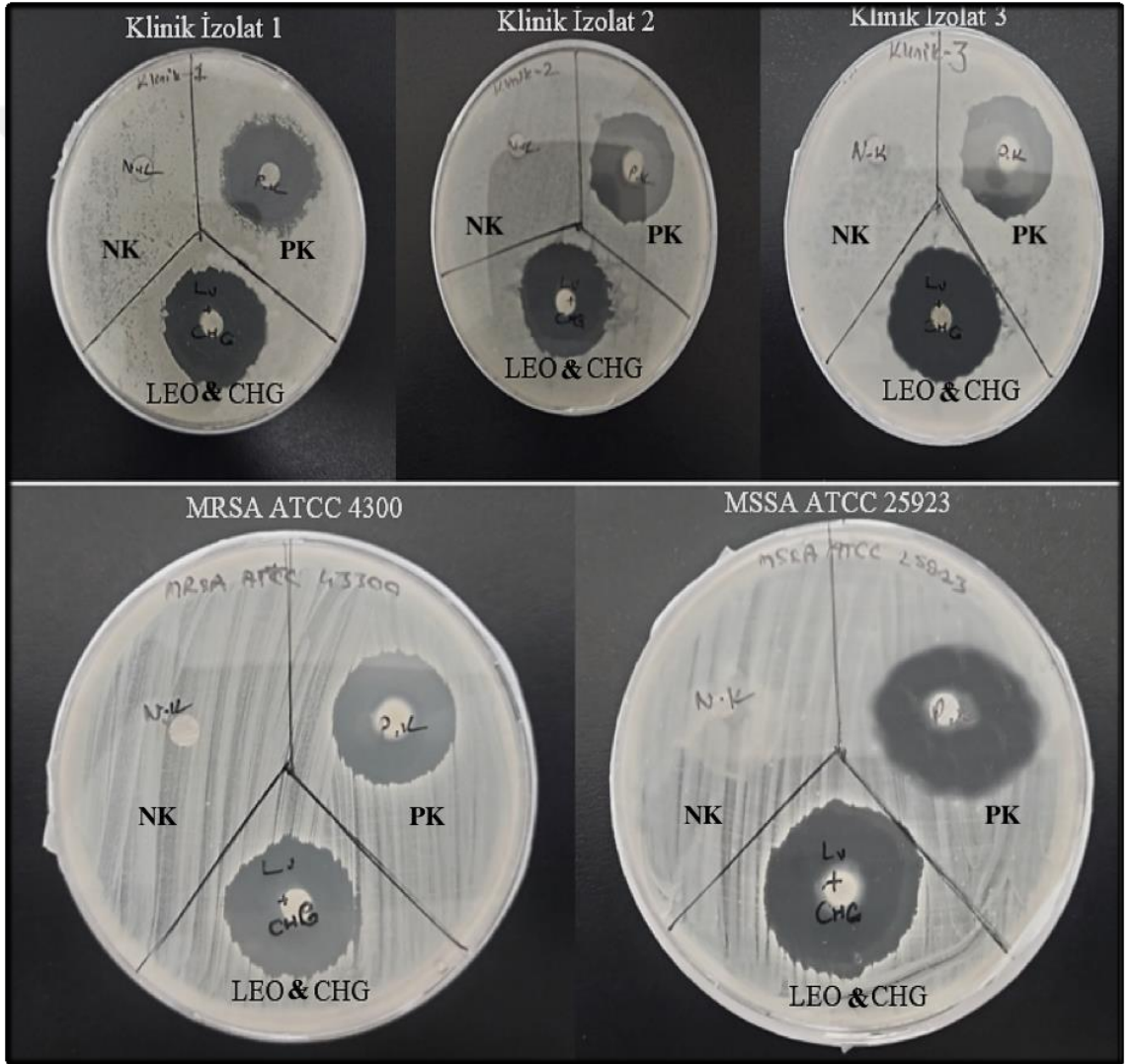
* MIC konsantrasyon değeri µg/ml olarak hesaplanmıştır.

4.3.3. LEO&CHG kombinasyonlarının disk difüzyon testi sonuçları

LEO&CHG kombinasyonlarının etkisinin incelendiği bu aşamada ilk yapılan disk difüzyon testinden farklı olarak Çizelge 4.3. de verilen MIC değerlerinden yararlanılarak bileşiklerin kombinasyon halinde izolatlar karşı aktiviteleri tespit edildi. Yapılan kombinasyonlar sonucunda bu maddelerin birlikte oluşturdukları etkileşimlerin MRSA izolatları üzerinde tek başına uygulanan bileşiklere nazaran daha yüksek aktivite gösterdiği tespit edildi ve sonuçlar hesaplanarak kaydedildi (Şekil 4.4., Çizelge 4.4.). Kombine edilen bileşiklerin izolatlar karşı oluşturdukları inhibisyon zon çaplarındaki artış tek olarak kullanımları ile kıyaslandığında sonuçların oldukça etkili olduğu görülmüştür (Çizelge 4.3, Çizelge 4.4). Bu durumun literatürde de belirtildiği üzere temelde bu iki maddenin MRSA izolatları üzerinde benzer yollarla aktivite gösterdiklerini destekler niteliktedir. Literatürde yapılan çalışmalarda klorheksidinin sahip olduğu hidrofilik ve hidrofobik yapıları sayesinde negatif yüklü bakteri duvarına yapışarak hücre duvarındaki geçirgenliği artırdığı ve bundan dolayı bakteri hücresinde ozmotik dengeyi bozarak etki gösterdiği bildirilmiştir (Hugo and Longworth 1964). Benzer bir çalışmada da klorheksidin moleküllerinin sahip oldukları biguanid gruplarının bakterilerde hücre zarı ile etkileşime girdiği, bu etkileşim sonucunda anyonik bölgelere sıkıca bağlanarak fosfolipid bağları arasına girip zar yapısında bulunan Mg^{2+} ve Ca^{2+} gibi divalen katyonların yerine geçerek hücre zarı yapısını etkilediği ve böylelikle potasyum iyonları ve protonlarının da hücre içerisine geçerek bakterilerde ozmotik dengeyi bozduğu bildirilmiştir (Gilbert and Moore 2005). Klorheksidine benzer bir yol izleyen LEO'nun da sahip olduğu etken maddelerin bakterilerde hücre zarıyla etkileşime girdiği, hücre

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

zarlarının geçirgenliğini bozduğu ve bundan dolayı hücre geçirgenliği ortadan kalkan bakterilerin hücre yapısında osmotik basınç dengesinin bozularak hücreyi ölüme götürdüğü çeşitli araştırmacılar tarafından tespit edilmiştir (Yang et al. 2020; Leong et al. 2021). Literatürde yer alan verilerden de anlaşılacağı üzere CHG ve LEO'nun benzer yollarla mikroorganizmalar üzerinde etki gösterdiği görülmekte ve yapılan bu çalışmada CHG ve LEO'nun birlikte uygulandığında aktivitelerini artırdığı göz önünde bulundurulduğunda da test edilen kombinasyonların muhtemelen bu bulguları desteklediği düşünülmektedir.



Şekil 4.4. LEO&CHG Kombinasyonlarıyla oluşturulan disk difüzyon sonuçları (**LEO&CHG**: (Lavanta Esansiyel Yağı ve Klorheksidin Glukonat Kombinasyonu), **PK**: Pozitif Kontrol (Ampisilin), **NK**: Negatif Kontrol (DMSO)).

Çizelge 4.4. LEO&CHG kombinasyonları ile oluşturulan disk difüzyon analiz sonuçları*

Bakteriyel izolatlar	LEO&CHG Kombinasyonu	Pozitif Kontrol	Negatif Kontrol
MRSA ATCC 43300	2,3	2,1	-
MSSA ATCC 25923	3	2,2	-
Klinik İzolat 1	3,5	2,5	-
Klinik İzolat 2	2,8	2,4	-
Klinik İzolat 3	2,6	2,3	-

* LEO: Lavanta Esansiyel Yağı, CHG: Klorheksidin Glukonat, Pozitif Kontrol: Ampisilin, Negatif Kontrol: DMSO (Tüm değerler cm cinsinden verilmiştir.)

4.4. Checkerboard (Dama Tahtası) Testi Sonuçları

Dama tahtası, iki antimikrobiyal ajanın birbirleri ile kombinasyon halinde uygulandığında *in vitro* ortamda oluşturdukları etkileri gözlemlemek için kullanılan bir yöntemdir. 96 kuyucuklu well platelerde yapılan bu test, uygulanması ve kullanımının kolay olması nedeniyle kombinasyonel analizler için laboratuvar ortamında sıklıkla tercih edilmektedir. Bu amaçla uygulanan test sonucunda LEO&CHG kombinasyonlarının izolatlar üzerindeki etkileri FICI değerleri hesaplanarak belirlenmiş ve bulunan indekslere göre bu bileşiklerin izolatlar üzerindeki etkileri ve sinerjistik durumları tespit edilmiştir (Çizelge 4.5.).

Çizelge 4.5. LEO ve CHG FIC değerleri ve sinerji durumları*

Bakteriyel izolatlar	FIC değerleri		Σ FICI	Etki Durumu
	LEO	CHG		
MRSA ATCC 43300	0,12	0,06	0,18	Sinerjistik etki
MSSA ATCC 25923	0,25	0,25	0,5	Sinerjistik etki
Klinik İzolat 1	0,25	0,12	0,37	Sinerjistik etki
Klinik İzolat 2	0,25	0,12	0,37	Sinerjistik etki
Klinik İzolat 3	0,25	0,06	0,31	Sinerjistik etki

* FIC: Fraksiyonel inhibisyon konsantrasyonu, Σ FICI=((FIC LEO)+(FIC CHG)); LEO: Lavanta Esansiyel Yağı, CHG: Klorheksidin Glukonat.

Dama tahtası testi sonucunda hesaplanan FICI değerlerine göre LEO&CHG kombinasyonlarının tüm izolatlara karşı sinerjistik etki (Σ FIC<0,5) gösterdiği belirlenmiştir. LEO&CHG bileşiklerinin MIC değerleri ile oluşturulan kombinasyonları

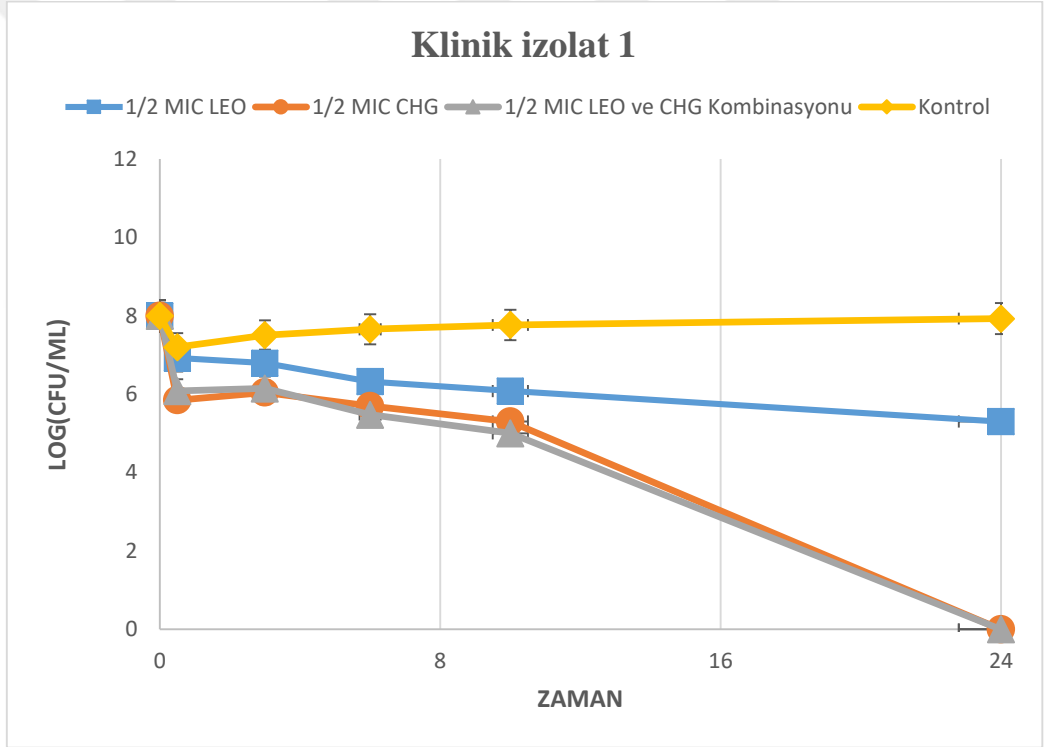
literatür ile karşılaştırıldığında birbirleri ile sinerjistik etki göstereceğine dair ipuçları sunduğu tespit edilmişti, nihayetinde yapılan bu yöntem sonucunda da disk difüzyon sonuçları ile paralel olduğu tespit edilmiştir. Literatürde yapılan çalışmalarda da çeşitli izolatlarla karşı farklı esansiyel yağlar ya da onların bileşenleri ile CHG'nin kombine edildiği çalışmalar gerçekleştirilmiş ve sinerjistik etki gözlemlendiği bildirilmiştir (Alabdullatif et al. 2017; Şimşek and Duman 2017; Kwiatkowski et al. 2019). Bu etkinin izolatlarda hücre zarlarındaki yapıları hedef almalarından kaynaklı olduğu söylenmektedir (Yang et al. 2020; Leong et al. 2021). Çeşitli araştırmacılar tarafından 1,8-sineol&CHG, LEO&OCT kombinasyonları ile yapılan çalışmalarda da MRSA izolatlarına karşı sinerjistik etki gözlemlendiği rapor edilmiş olup sonuçları çalışmamızı destekler nitelikte değerlendirilmiştir (Şimşek and Duman 2017; Kwiatkowski et al. 2019).

4.5. Zamana Bağlı Öldürme Testi (Time Kill Assay) Sonuçları

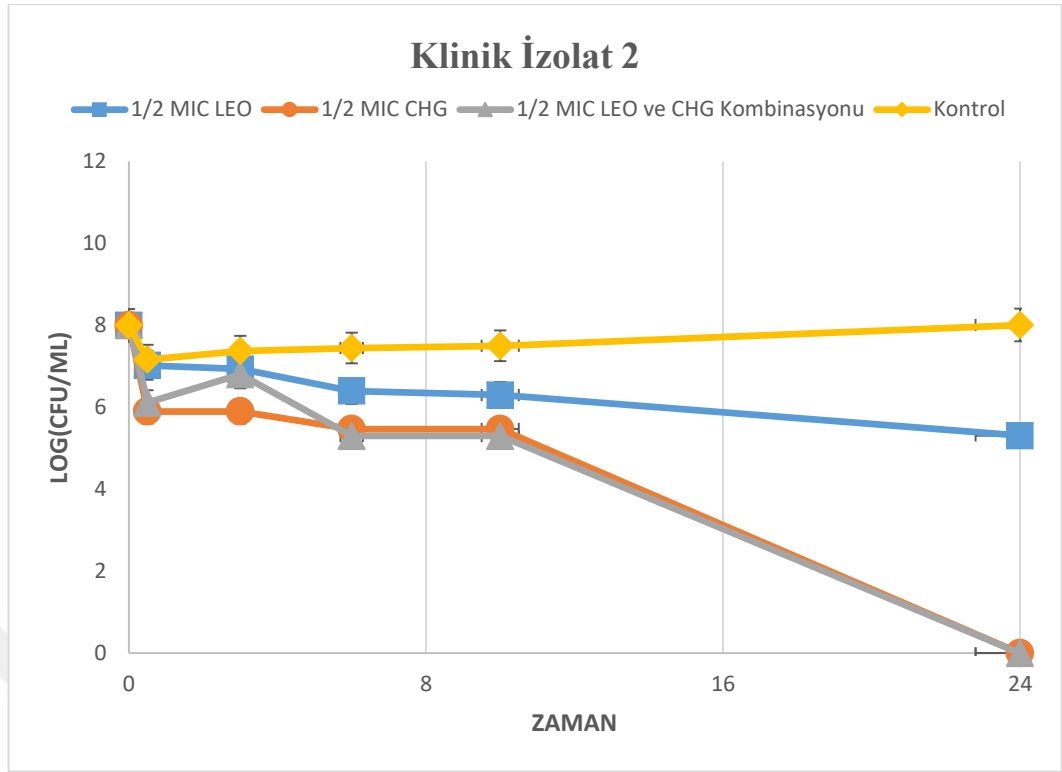
Çalışmada test edilen LEO ve CHG bileşiklerinin ayrı ayrı ve kombinasyon halinde zamana bağlı olarak öldürme eğrisini belirlemek amacıyla gerçekleştirilen deneyler sonucunda izolatların logaritmik olarak azalışları tespit edilerek hesaplanmış ve sonuçlar grafiklerle gösterilmiştir (Şekil 4.5, 4.6., 4.7., 4.8. ve 4.9). Grafiklerden de görüleceği üzere en yüksek aktivite LEO&CHG kombinasyonlarında gözlenmiş ve kombine edilen bileşiklerin özellikle MSSA izolatının gelişimini yaklaşık 3 saat içerisinde tamamen inhibe ederek bakterisidal bir etki gösterdiği tespit edilmiştir. Yine aynı kombinasyonun MRSA kültür izolatı ile Klinik 3 izolatını yaklaşık 10. saat içerisinde tamamen inhibe ederek bakterisidal etki gösterdiği, Klinik izolat 1 ve 2'yi ise diğerlerinden farklı olarak 24. saat sonunda tamamen inhibe ettiği tespit edilmiştir. LEO&CHG kombinasyonlarından sonra en yüksek aktivitenin CHG uygulamasında olduğu ve tek başına CHG'nin en yüksek aktiviteyi MSSA kültür izolatına karşı 6. saat de, MRSA izolatına karşı 10. saat içerisinde, klinik izolatlarla karşı da 24. saat içerisinde gösterdiği ve izolatları tamamen inhibe ederek bakterisidal etki gösterdiği belirlenmiştir. LEO'nun tek başına kullanıldığı uygulamalarda ise bakterisidal etkinin sadece MSSA kültür izolatına karşı 24. saat sonunda gözlemlendiği diğer izolatlarla karşı ise koloni sayılarında azalmalar görülse de bakterisidal etki yerine bakteriyostatik etki gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.9.). CLSI tarafından belirtilen standartlara göre, *S. aureus*

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

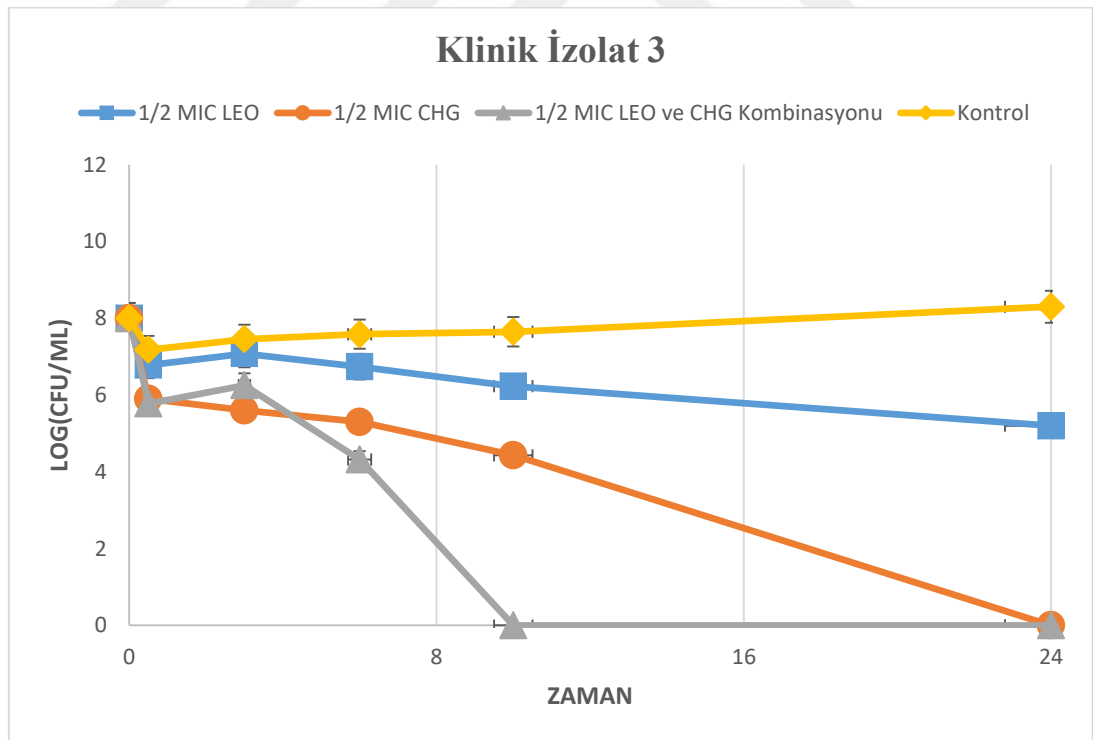
hücrelerine karşı bakterisidal aktiviteye sahip antimikrobiyal ajanların kullanımının enfeksiyonların kontrolünde daha etkili olacağı bildirilmiştir. Antimikrobiyal bir maddenin farmokodinamik özellikleri hakkında bilgi veren zamana bağlı öldürme testlerinde, etkili bir ajanın mikroorganizmalar üzerinde bakterisidal bir aktivite oluşturabilmesi için verilen madde miktarında başlangıçtaki mikroorganizma miktarından >3 log (CFU/ml) kadar koloni sayısının azalması gerektiği bilinmektedir. Belirtilen konsantrasyonlar dışında daha az sayıda mikroorganizma azalması durumunda bakteriyostatik bir etki gösterdiği belirtilmektedir (Woronuk et al. 2011; Foerster et al. 2016). Bu tez kapsamında yapılan çalışmanın sonuçları incelendiğinde LEO&CHG kombinasyonlarının yarı MIC konsantrasyonlarda kullanıldığında MRSA izolatlarına karşı bakterisidal bir aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.



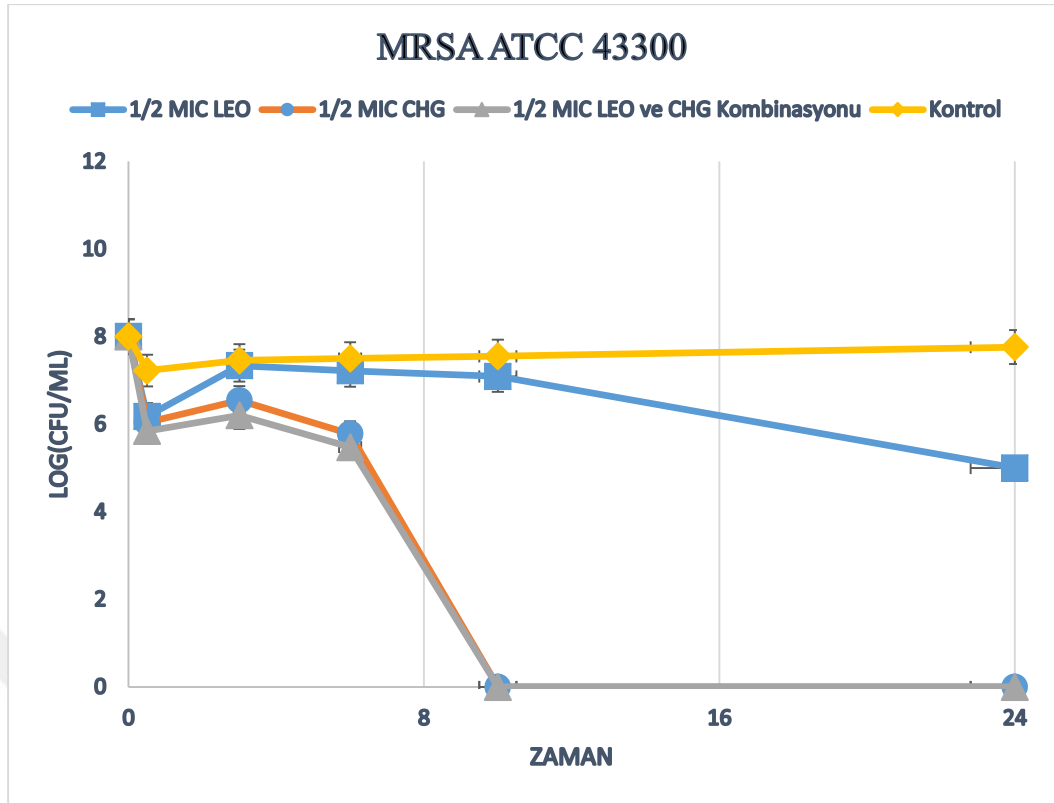
Şekil 4.5. Klinik izolat 1'in zamana bağlı ölüm grafiği



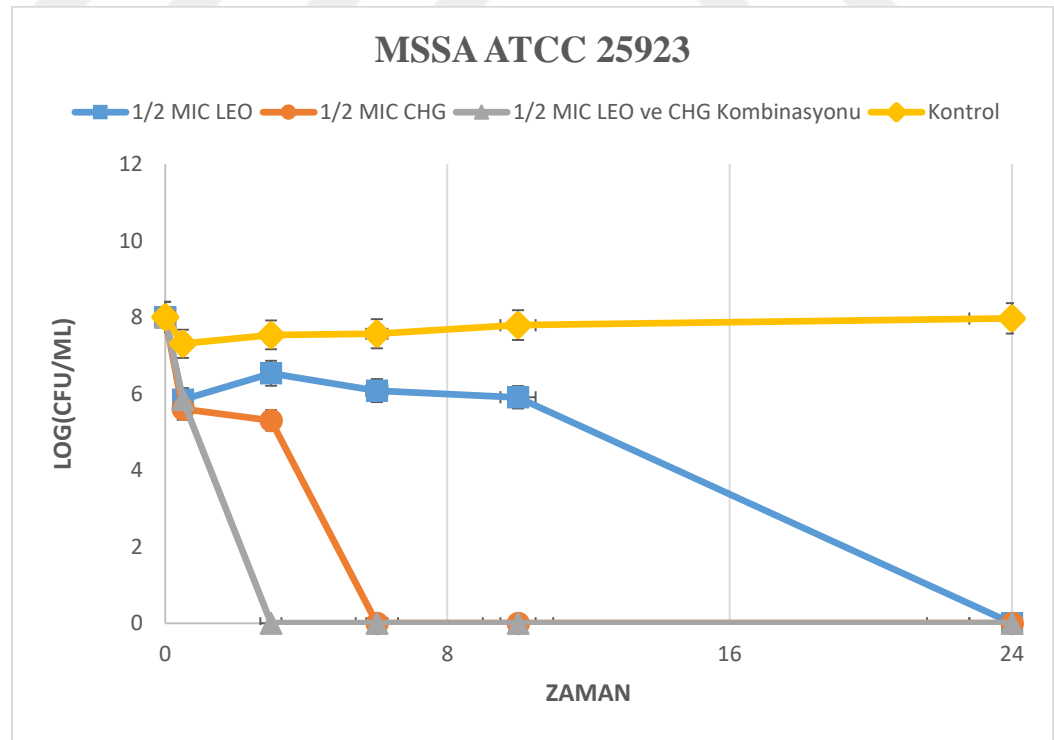
Şekil 4.6. Klinik izolat 2'nin zamana bağlı ölüm grafiği



Şekil 4.7. Klinik izolat 3'ün zamana bağlı ölüm grafiği



Şekil 4.8. MRSA ATCC 43300'ün zamana bağlı ölüm grafiği



Şekil 4.9. MSSA ATCC 25923'ün zamana bağlı ölüm grafiği

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Tez çalışması kapsamında LEO, CHG ve LEO&CHG kombinasyonlarının *S. aureus* izolatları üzerindeki etkileri araştırılmış ve aşağıdaki sonuçlar tespit edilmiştir.

1. Hastane kaynaklı MRSA izolatları ve kültür izolatlarının genomik DNA'larında antibiyotik direncinden sorumlu *mecA* ve antiseptik direncinden sorumlu olduğu düşünülen *qacA/B* ve *qacC* genlerinin varlığı tespit edilmiştir.
2. Antibakteriyel aktivite çalışmalarına göre; disk difüzyon testinde LEO ve CHG bileşiklerinin MRSA izolatları üzerinde etkili oldukları tespit edilmiş ve inhibisyon zon çapları ölçülerek aktiviteleri belirlenmiştir. Mikrodilüsyon testi sonuçlarına göre de MIC değerleri belirlenmiş ve güçlü antibakteriyel aktivite sergiledikleri gözlenmiştir.
3. LEO&CHG kombinasyonlarının test edildiği çalışmalarda; bileşiklerin tek başına göstermiş olduğu MIC değerlerine nazaran çok daha yüksek aktivite gösterdikleri tespit edilmiş ve izolatlara karşı oluşturdukları inhibisyon zon çapları belirlenmiştir.
4. LEO&CHG kombinasyonlarının test edildiği çalışmalarda; Dama tahtası yöntemi (Cheeckboard test) ile bu iki madde arasında sinerjistik etki olduğu tespit edilmiştir.
5. Zamana bağlı öldürme testi (Time Kill Assay) ile yarı MIC değerlerinde LEO ve CHG bileşikleri ile bunların kombinasyonlarına maruz kalan izolatlarda belirli zaman aralıklarında hücre sayılarındaki azalmalar belirlenmiş ve çoğunlukla bakteriyosidal etki gözlenmiştir.

Öneriler

Yapılan çalışmalar göz önüne alındığında, çalışmanın bundan sonraki aşamasında;

- Lavanta esansiyel yağının içerisindeki etken maddelerin belirlenerek test edilen izolatlar üzerinde ki etkilerinin ortaya çıkarılması ve aynı zamanda bu bileşenlerle

zengin farklı esansiyal yağların da kullanılarak güçlü aktivite gösteren bileşiklerin belirlenmesi,

- LEO&CHG kombinasyonlarının izolatlar üzerindeki etki mekanizmalarının detaylı bir şekilde araştırılması,
- LEO ile CHG arasındaki etkileşimlerin ve biyokimyasal özelliklerin araştırılması, farmakodinamik özelliklerinin ortaya çıkarılması,
- LEO ile LEO&CHG kombinasyonlarının toksisite çalışmalarının yapılarak *in vitro* ve *in vivo* ortamlarda canlılar üzerindeki etkilerinin tespit edilmesi ve bu bağlamda hijyen amaçlı kullanıma uygun olup olmadığının belirlenmesi,
- LEO&CHG kombinasyonlarının direnç genleri üzerindeki etkilerinin belirlenmesi ve bu maddelerin etki mekanizmalarının aydınlatılması,
- LEO&CHG kombinasyonlarının farklı izolatlar, özellikle de çoklu ilaç dirençli izolatlar üzerinde ki etkilerinin araştırılması ve etki spektrumlarının belirlenmesi çalışmalarının gerçekleştirilebileceği öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abu-Shanab, B., Adwan, G., Abu-Safiya, D., Jarrar, N., Adwan, K. 2004. Antibacterial activities of some plant extracts utilized in popular medicine in palestine. *Turkish Journal of Biology*, 28(2), 99-102.
- Adaszyńska-Skwirzyńska, M., Szczerbińska, D., Zych, S. 2019. Antibacterial activity of lavender essential oil and linalool combined with gentamicin on selected bacterial strains. *Med Weter*, 75(05), 6279.
- Alabdullatif, M., Boujezza, I., Mekni, M., Taha, M., Kumaran, D., Yi, Q.-L., Ramirez-Arcos, S. 2017. Enhancing blood donor skin disinfection using natural oils. *Transfusion*, 57(12), 2920-2927.
- Alam, M. M., Kobayashi, N., Uehara, N., Watanabe, N. 2003. Analysis on distribution and genomic diversity of high-level antiseptic resistance genes *qacA* and *qacB* in human clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, 9(2), 109-121.
- Alboy, S. 2012. *Staphylococcus aureus*'un vankomisin ve metisiline karşı stres yanıtı. Yüksek lisans tezi, Trakya Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 81, Edirne.
- Anthonisen, I.-L., Sunde, M., Steinum, T., Sidhu, M., Sørum, H. 2002. Organization of the antiseptic resistance gene *qacA* and *tn552*-related β -lactamase genes in multidrug- resistant *staphylococcus haemolyticus* strains of animal and human origins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(11), 3606-3612.
- Aprotosoie, A. C., Gille, E., Trifan, A., Luca, V. S., Miron, A. 2017. Essential oils of *Lavandula* genus: a systematic review of their chemistry. *Phytochemistry Reviews*, 16(4), 761-799.
- Aslan, N. 2005. Kekik tarımı ve kullanım alanları. Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Ana Bilim Dalı, 65, Diyarbakır.
- Aslan, R., Taskin, A., Hasbek, M., Çelik, C. 2021. Evaluation of in vitro antimicrobial effect of different essential oils. *Turkish Bulletin of Hygiene and Experimental Biology*, 78, 525-534.
- Bannerman, T. L., Peacock, S. J. 2006. *Staphylococcus*, *micrococcus*, and other catalase-positive cocci. *Manual of Clinical Microbiology*, 1(9), 390-411.
- Bayraktar, H.S. 2019. Klinik örneklerden izole edilen *staphylococcus aureus* ve koagülaz negatif stafilokoklarda dezenfektan/antiseptikler ve antibiyotik direncinin moleküler mekanizmalarının tespiti ve suşlar arasındaki filogenetik ve klonal ilişkinin spa gen sekans tipleme ve pulse field gel electrophoresis yöntemleri ile araştırılması. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 76, Adana.

- Bonez, P. C., dos Santos Alves, C. F., Dalmolin, T. V., Agertt, V. A., Mizdal, C. R., Flores, V. da C., Anraku de Campos, M. M. 2013. Chlorhexidine activity against bacterial biofilms. *American Journal of Infection Control*, 41(12), 119-122.
- Cavanagh, H. M. A., Wilkinson, J. M. 2005. Lavender essential oil: a review. *Australian Infection Control*, 10(1), 35-37.
- Chanawanno, K., Thuptimdang, P., Chantrapromma, S., Fun, H.-K. 2022. New tunable pyridinium benzenesulfonate amphiphiles as anti-MRSA quaternary ammonium compounds (QACs). *Journal of Molecular Structure*, 1254, 132389.
- Chao, S., Young, G., Oberg, C., Nakaoka, K. 2008. Inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 23(6), 444-449.
- Cheung, G. Y. C., Bae, J. S., Otto, M. 2021. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*, 12(1), 547-569.
- Cho, Y.-S., Oh, J. J., Oh, K.-H. 2011. Synergistic anti-bacterial and proteomic effects of epigallocatechin gallate on clinical isolates of imipenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Phytomedicine*, 18(11), 941-946.
- Chovanová, R., Mikulášová, M., Vaverková, Š. 2016. Modulation of *mecA* gene expression by essential oil from *salvia sclarea* and synergism with oxacillin in methicillin resistant *staphylococcus epidermidis* carrying different types of staphylococcal chromosomal cassette *mec*. *International Journal of Microbiology*. e6475837. doi: 10.1155/2016/6475837.
- Çelik, E., Çelik, G. Y. 2007. Bitki uçucu yağlarının antimikrobiyal özellikleri. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 5(2), 1-6.
- Dagli, N., Dagli, R., Mahmoud, R. S., Baroudi, K. 2015. Essential oils, their therapeutic properties, and implication in dentistry: A review. *Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry*, 5(5), 335-340.
- Dağcı, E. K., İzmirli, M., Dığrak, M. 2002. Kahramanmaraş ilinde yetişen bazı ağaç türlerinin antimikrobiyal aktivitelerinin araştırılması. *KSU Fen ve Mühendislik Dergisi*, 5(1), 38-46.
- Davies, G. E., Francis, J., Martin, A. R., Rose, F. L., Swain, G. 1954. 1:6-di-4'-chlorophenyldiguanidohexane (hibitane). Laboratory investigation of a new antibacterial agent of high potency. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*, 9(2), 192-196.
- De Rapper, S., Viljoen, A., van Vuuren, S. 2016. The *in vitro* antimicrobial effects of *lavandula angustifolia* essential oil in combination with conventional antimicrobial agents. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, e2752739.
- Dorman, H. J. D., Deans, S. G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 308-316.

- Dündar, V., Dündar, D. Ö. 2008. Stafilokok enfeksiyonları. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, 3, 2065-2080.
- Dicle, Y. 2018. Klinik örneklerden izole edilen metisilin dirençli *staphylococcus aureus* (mrsa) suşlarında siprofloksasin'in yeşil çay ile sinerjik etkisinin dama tahtası yöntemiyle araştırılması. Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 118, Erzurum.
- Eloff, J. N. 1998. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants. Journal of Ethnopharmacology, 60(1), 1-8.
- El-Shazly, A., Dorai, G., Wink, M. 2002. Composition and antimicrobial activity of essential oil and hexane-ether extract of *tanacetum santolinoides* (DC.) Feinbr. and Fertig. Zeitschrift Für Naturforschung C, 57(7-8), 620-623.
- Ertürk, Ö., Demirbag, Z. 2003. *Scorzonare mollis* bieb (Compositae) bitkisinin antimikrobiyal aktivitesi. Ekoloji Çevre Dergisi, 12(47), 27-31.
- Filoche, S. K., Soma, K., Sissons, C. H. 2005. Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. Oral Microbiology and Immunology, 20(4), 221-225.
- Foerster, S., Unemo, M., Hathaway, L. J., Low, N., Althaus, C. L. 2016. Time-kill curve analysis and pharmacodynamic modelling for in vitro evaluation of antimicrobials against *Neisseria gonorrhoeae*. BMC Microbiology, 16(1), 216.
- Fyfe, L., Armstrong, F., Stewart, J. 1998. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis* by combinations of plant oils and derivatives of benzoic acid: the development of synergistic antimicrobial combinations. International Journal of Antimicrobial Agents, 9(3), 195-199.
- Garrity, G. M., Holt, J. G. 2000. An overview of the road map to the manual. Bergey's manual of systematic bacteriology, 2nd edn. Springer Verlag, New York, 1-19.
- Gilbert, P., Moore, L. E. 2005. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. Journal of Applied Microbiology, 99(4), 703-715.
- Görmez, A. 2011. Erzurum ilinde kayısı ağaçlarından izole edilen *Pseudomonas* türlerinin tanısı, karakterizasyonu ve çeşit reksiyonları. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, 28-30.
- Hammer, K. A., Carson, C. F., Riley, T. V. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. Journal of Applied Microbiology, 86(6), 985-990.
- Harris, L. G., Richards, R. G. 2006. Staphylococci and implant surfaces: a review. Injury, 37(2), 3-14.
- Hendry, E. R., Worthington, T., Conway, B. R., Lambert, P. A. 2009. Antimicrobial efficacy of eucalyptus oil and 1,8-cineole alone and in combination with

- chlorhexidine digluconate against microorganisms grown in planktonic and biofilm cultures. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64(6), 1219-1225.
- Hugo, W. B., Longworth, A. R. 1964. Some aspects of the mode of action of chlorhexidine. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 16(10), 655-662.
- Ibrahim, M. N., Sharif, S. A., El-Tajory, A. N., Elamari, A. A. 2011. Synthesis and antibacterial activities of some schiff bases. *E-journal of Chemistry*, 8(1), 212-216.
- Jahan, M., Rahman, M., Parvej, M. S., Chowdhury, S. M. Z. H., Haque, M. E., Talukder, M. A. K., Ahmed, S. 2015. Isolation and characterization of *Staphylococcus aureus* from raw cow milk in Bangladesh. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 2(1), 49-55.
- Janssen, A. M., Scheffer, J. J. C., Svendsen, A. B. 1987. Antimicrobial activity of essential oils: A 1976-1986 Literature Review. *Aspects of the Test Methods. Planta Medica*, 53(5), 395-398.
- Kaito, C., Sekimizu, K. 2007. Colony spreading in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 189(6), 2553-2557.
- Kandavel, S. S. and D. 2010. Interaction of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and endophytes with medicinal plants new avenues for phytochemicals. *Journal of Phytology*, 3(2), 43-49.
- Karpanen, T. J., Worthington, T., Hendry, E. R., Conway, B. R., Lambert, P. A. 2008. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine digluconate alone and in combination with eucalyptus oil, tea tree oil and thymol against planktonic and biofilm cultures of *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62(5), 1031-1036.
- Khadir, A., Bendahou, M., Benbelaid, F., Abdoune, M. A., Bellahcene, C., Zenati, F., Costa, J. 2016. Chemical composition and anti-mrsa activity of essential oil and ethanol extract of *lavandula multifida* l. from algeria. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 19(3), 712-718.
- Kumar, L. R. G., Kasim, A. K., Lekshmi, M., Nayak, B. B., Kumar, S. 2016. Incidence of methicillin-resistant staphylococci in fresh seafood. *Advances in Microbiology*, 6(6), 399-406.
- Kwiatkowski, P., Łopusiewicz, Ł., Kostek, M., Drozłowska, E., Pruss, A., Wojciuk, B., Dołęgowska, B. 2019. The antibacterial activity of lavender essential oil alone and in combination with octenidine dihydrochloride against mrsa strains. *Molecules*, 25(1), 95.
- Lahlou, M. 2004. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research: PTR*, 18(6), 435-448.

- Leal-Cardoso, J. H., Fonteles, M. C. 1999. Pharmacological effects of essential oils of plants of the northeast of Brazil. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 71(2), 207-213.
- Lee, A. S., de Lencastre, H., Garau, J., Kluytmans, J., Malhotra-Kumar, S., Peschel, A., Harbarth, S. 2018. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1), 1-23.
- Lee, W. S., Komarmy, L. 1976. New method for detecting in vitro inactivation of penicillins by *Haemophilus influenzae* and *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 10(3), 564-566.
- Leong, W.-H., Lai, K.-S., Lim, S.-H. E. 2021. Combination therapy involving *lavandula angustifolia* and its derivatives in exhibiting antimicrobial properties and combatting antimicrobial resistance: current challenges and future prospects. *Processes*, 9(4), 609.
- Littlejohn, T. G., DiBerardino, D., Messerotti, L. J., Spiers, S. J., Skurray, R. A. 1991. Structure and evolution of a family of genes encoding antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. *Gene*, 101(1), 59-66.
- Maillard, J.-Y. 2007. Bacterial resistance to biocides in the healthcare environment: should it be of genuine concern. *Journal of Hospital Infection*, 65, 60-72.
- Maksimovic, Z. A., Dordevic, S., Mraovic, M. 2005. Antimicrobial activity of *Chenopodium botrys* essential oil. *Fitoterapia*, 76(1), 112-114.
- McDonnell, G., Russell, A. D. 1999. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(1), 147-179.
- Mitchell, B. A., Brown, M. H., Skurray, R. A. 1998. QacA multidrug efflux pump from *Staphylococcus aureus*: comparative analysis of resistance to diamidines, biguanidines, and guanylhyazones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(2), 475-477.
- Navarre, W. W., Schneewind, O. 1999. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(1), 174-229.
- Nostro, A., Germanò, M. p., D'Angelo, V., Marino, A., Cannatelli, M. a. 2000. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Letters in Applied Microbiology*, 30(5), 379-384.
- Özgeriş, F. B., Yildirim, M., Görmez, A., Özgeriş, B. 2021. A novel nicotinoyl thiourea manganese complex: synthesis, characterization, and biological activity studies. *International Journal of Chemistry and Technology*, 5(2), 83-90.
- Parisi, J. T. 1985. Coagulase-negative staphylococci and the epidemiological typing of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiological Reviews*, 49(2), 126-139.

- Paulsen, I. T., Brown, M. H., Skurray, R. A. 1996. Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiological Reviews*, 60(4), 575-608.
- Pollitt, E. J. G., Szkuta, P. T., Burns, N., Foster, S. J. 2018. *Staphylococcus aureus* infection dynamics. *PLOS Pathogens*, 14(6), e1007112.
- Ray, M. D., Boundy, S., Archer, G. L. 2016. Transfer of the methicillin resistance genomic island among staphylococci by conjugation. *Molecular Microbiology*, 100(4), 675-685.
- Roller, S., Ernest, N., Buckle, J. 2009. The Antimicrobial activity of high-necrodane and other lavender oils on methicillin-sensitive and -resistant *Staphylococcus aureus* (MSSA and MRSA). *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 15(3), 275-279.
- Russell, A. D. 2002. Introduction of biocides into clinical practice and the impact on antibiotic-resistant bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 121-135.
- Russell, A. D., Day, M. J. 1993. Antibacterial activity of chlorhexidine. *Journal of Hospital Infection*, 25(4), 229-238.
- Ryan, K. J., Ray, C. G. 2004. *Medical microbiology*. McGraw Hill, 4(370).
- Sancak, B. 2011. *Staphylococcus aureus* ve antibiyotik direnci. *Mikrobiyol Bul*, 45(3), 565-576.
- Schito, G. C. 2006. The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection*, 12(s1), 3-8.
- Shalaby, M.-A. W., Dokla, E. M. E., Serya, R. A. T., Abouzid, K. A. M. 2020. Penicillin binding protein 2a: An overview and a medicinal chemistry perspective. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 199, 11212.
- Sıtkı Doğa, E. 2018. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları ve pulsed field jel elektroforez yöntemi ile tiplendirilmeleri. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 42(2), 1-14.
- Suller, M. T., Russell, A. D. 1999. Antibiotic and biocide resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococcus. *The Journal of Hospital Infection*, 43(4), 281-291.
- Şimşek, M., Duman, R. 2017. Investigation of effect of 1,8-cineole on antimicrobial activity of chlorhexidine gluconate. *Pharmacognosy Research*, 9(3), 234-237.
- Taylor, T. A., Unakal, C. G. 2022. *Staphylococcus aureus*. *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 45(5),12-27.
- Tennent, J. M., Lyon, B. R., Midgley, M., Jones, I. G., Purewal, A. S., Skurray, R. A. 1989. Physical and biochemical characterization of the *qacA* gene encoding

- antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. Journal of General Microbiology, 135(1), 1-10.
- Tong, S., Davis, J., Eichenberger, E., Holland, T., Fowler, V. 2015. *Staphylococcus aureus* Infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. Clinical Microbiology Reviews, 28, 603-661.
- Tümay, H. C., Filazi, A. 2020. Antiseptics used in ear, nose and throat in veterinary medicine. Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology, 8(5), 1083-1089.
- Vaughn, J. M., Abdi, R. D., Gillespie, B. E., Kerro Dego, O. 2020. Genetic diversity and virulence characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis. Microbial Pathogenesis, 144, 104171.
- Weinstein, R. A., Milstone, A. M., Passaretti, C. L., Perl, T. M. 2008. Chlorhexidine: Expanding the Armamentarium for Infection Control and Prevention. Clinical Infectious Diseases, 46(2), 274-281.
- Woronuk, G., Demissie, Z., Rheault, M., Mahmoud, S. 2011. Biosynthesis and therapeutic properties of lavandula essential oil constituents. Planta Medica, 77(1), 7-15.
- Yang, S.-K., Yusoff, K., Thomas, W., Akseer, R., Alhosani, M. S., Abushelaibi, A., Lai, K.-S. 2020. Lavender essential oil induces oxidative stress which modifies the bacterial membrane permeability of carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae*. Scientific Reports, 10(1), 819.
- Yap, P. S. X., Lim, S. H. E., Hu, C. P., Yiap, B. C. 2013. Combination of essential oils and antibiotics reduce antibiotic resistance in plasmid-conferred multidrug resistant bacteria. Phytomedicine, 20(8), 710-713.
- Yap, P. S. X., Yusoff, K., Lim, S.-H. E., Chong, C.-M., Lai, K.-S. 2021. Membrane disruption properties of essential oils—a double-edged sword?. Processes, 9(4), 595.
- Yarnell, E., Abascal, K. 2004. Botanical treatment and prevention of malaria: part 2 selected botanicals. Alternative and Complementary Therapies, 10(5), 277-284.
- Yıldırım, M. 2022. MRSA izolatlarının direnç genleri üzerine sübstitüe fenetilaminlerden sentezlenen yeni β -laktam türevlerinin etkisinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, 97, Erzurum.
- Zuzarte, M., Vale-Silva, L., Gonçaves, M. J., Cavaleiro, C., Vaz, S., Canhoto, J., Salgueiro, L. 2012. Antifungal activity of phenolic-rich *Lavandula multifida* L. essential oil. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 31(7), 1359-1366.