

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**HASTANE ENFEKSİYONU ETKENİ OLARAK
METİSİLİNE DİRENÇLİ *Staphylococcus aureus*
EPİDEMİYOLOJİSİNİN Rep-PZR İLE ARAŞTIRILMASI**

İsmet GÜLBÜKEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Candan ÖZTÜRK

MERSİN - 2013

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**HASTANE ENFEKSİYONU ETKENİ OLARAK
METİSİLİNE DİRENÇLİ *Staphylococcus aureus*
EPİDEMİYOLOJİSİNİN Rep-PZR İLE ARAŞTIRILMASI**

İsmet GÜLBÜKEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Candan ÖZTÜRK

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
BAP-SBE TM (İG) 2011-7 YL nolu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No: 239

MERSİN - 2013

Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

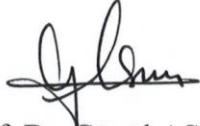
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan “*Hastane Enfeksiyonu Etkeni Olarak Metisiline Dirençli Staphylococcus aureus Epidemiyolojisinin Rep-PZR ile Araştırılması*” başlıklı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi

09.04.2013


Prof. Dr. Candan ÖZTÜRK

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Jüri Başkanı/Danışman



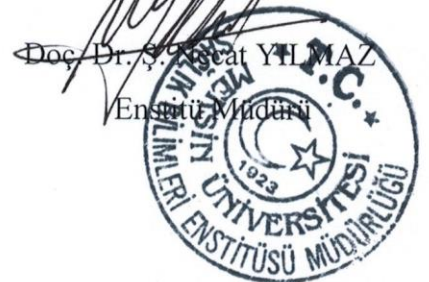
Prof. Dr. Gönül ASLAN
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Jüri Üyesi



Prof. Dr. Özlem KANDEMİR
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı
Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun 17.04.2013... tarih ve 2013/82... sayılı kararı ile kabul edilmiştir.


Doç. Dr. Ş. Feriye YILMAZ
Enstitü Müdürü



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimime başladığım andan itibaren her konuda yardımlarını ve desteğini gördüğüm, anlayışlı tavrı ile bilimsel çalışma disiplini ve tecrübelerini örnek aldığım Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı hocam Sayın Prof. Dr. Gürol EMEKDAŞ'a, tez çalışmam süresince ilgili ve hoşgörülü yaklaşımları ile klinik tecrübelerini esirgemeyen, bilgileri ışığında beni yönlendiren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Candan ÖZTÜRK'e, değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Gönül ASLAN, Sayın Prof. Dr. Nuran DELİALİOĞLU, Sayın Doç. Dr. Feza OTAĞ, Sayın Yrd. Doç. Dr. Seda TEZCAN, Sayın Yrd. Doç. Dr. Mahmut ÜLGER'e teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince bana her konuda yardımcı olan Uzm. Sebahat ASLAN, Yük. Lis. Öğr. Efdal OKTAY, Dok. Öğr. Harun GÜLBUDAK ve çalışma arkadaşlarıma, her konudaki destek ve katkılarından dolayı tüm anabilim dalı çalışanlarına teşekkür ederim.

Eğitim yaşamım boyunca beni tarifsiz sabır ve umutla destekleyen, maddi ve manevi açıdan sürekli yanımda olan, bugünlere gelmem de başrolü oynayan, başta annem ve rahmetli babam olmak üzere tüm aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ÖZET	viii
ABSTRACT	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe.....	3
2.2. Genel Özellikler.....	3
2.2.1. Morfoloji, Üreme ve Biyokimyasal Özellikler.....	4
2.2.2. Hücre Yapısı.....	5
2.2.3. Genom Yapısı.....	6
2.3. Virulans Faktörleri.....	6
2.3.1. Toksinler.....	6
2.3.1.1. Sitolitik Toksinler.....	6
2.3.1.2. Enterotoksin.....	8
2.3.1.3. Toksik şok sendromu toksini-1(TSST-1).....	9
2.3.1.4. Eksfoliatif toksin.....	9
2.3.2. Enzimler.....	9
2.4. Patogenez.....	11
2.5. Epidemiyoloji.....	12
2.6. Hastane enfeksiyonu etkeni olarak <i>S.aureus</i>	12
2.7. Yaptığı hastalıklar.....	14
2.8. Antibiyotik direnci.....	20
2.9. Metisilin direnci.....	20

2.10. Metisiline direnç mekanizması.....	21
2.10.1. Kromozomal (intrinsik) Metisilin Direnci.....	21
2.10.2. “Borderline” metisilin direnci.....	22
2.10.3. “Intermediate” metisilin direnci.....	22
2.11. Epidemiyolojik tiplendirme.....	22
2.11.1. Geleneksel (Fenotipik) Tiplendirme Yöntemleri.....	23
2.11.2. Moleküler (Genotipik) Tiplendirme Yöntemleri.....	24
2.11.2.1. Plazmid Analizi.....	24
2.11.2.2. “Pulsed-Field Gel Electrophoresis” Yöntemiyle Tiplendirme.....	25
2.11.2.3. Polimeraz Zincir Tepkimesine Dayalı Tiplendirme Yöntemleri.....	25
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	29
3.1. Çalışma Grubunu Oluşturan Örnekler.....	29
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	29
3.2.1. Kullanılan Cihazlar.....	29
3.2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	30
3.2.3. Kullanılan Besiyerleri.....	30
3.2.4. Kullanılan Diversilab Kitleri.....	31
3.3. Örneklerin Ekilmesi ve İdentifikasyonu.....	31
3.3.1. İdentifikasyonda Kullanılan Yöntemler.....	32
3.3.2. Moleküler Yöntemler.....	34
3.3.2.1. Rep-PZR.....	34
4. BULGULAR.....	40
4.1. Moleküler Analiz Sonuçları.....	43
4.1.1. Rep-PZR Sonuçları.....	43
5. TARTIŞMA.....	49
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	53
7. KAYNAKLAR.....	54
ÖZGEÇMİŞ.....	61

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. MRSA izole edilen örneklerin dağılım oranları.....	41
Şekil 4.2. MRSA izolatlarının kliniklere göre dağılım oranları.....	42
Şekil 4.3. A ana klonuna ait dendogram.....	44
Şekil 4.4. A ana klonuna ait benzerlik matrisi.....	45
Şekil 4.5. B ana klonuna ait dendogram.....	45
Şekil 4.6. B ana klonuna ait benzerlik matrisi.....	46
Şekil 4.7. Diğer klonlara ait dendogram.....	46
Şekil 4.8. Diğer klonlara ait benzerlik matrisi.....	47

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Rep-PZR amplifikasyonunda bir örnek için hazırlanan reaksiyon karışımı.....	36
Çizelge 3.2. Rep-PZR amplifikasyon koşulları.....	37
Çizelge 4.1. MRSA suşlarının izole edildiği klinik materyaller.....	40
Çizelge 4.2. MRSA izole edilen hastaların yaş grupları.....	41
Çizelge 4.3. MRSA izolatlarının kliniklere göre dağılımı.....	42
Çizelge 4.4. Rep-PZR sonuçlarına göre 67 MRSA izolatının klonlara ve servislere göre dağılımı.....	47
Çizelge 4.5. Rep-PZR sonuçlarına göre 67 MRSA izolatına ait sekiz farklı klonun klinik materyallere göre dağılımı.....	48

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

MRSA	Metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	Metisiline duyarlı <i>Staphylococcus aureus</i>
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Rep-PZR	Repetitive Extragenic Palindromic Element PZR
PFGE	Pulsed-Field Gel Electrophoresis
ORF	Open Reading Frame
KNS	Koagülaz Negatif Stafilokok
PVL	Panton-Valentine Lökosidini
TSST	Toksik Şok Sendromu Toksini
MİK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
SCC	Staphylococcal Cassette Chromosome
LPS	Lipopolisakkarit
TNF	Tümör Nekrozis Faktör
PBP	Penisilin Bağlayan Protein
IL	İnterlökin
BORSA	Borderline Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

ÖZET

Hastane Enfeksiyonu Etkeni Olarak Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* Epidemiyolojisinin Rep-PZR ile Araştırılması

Stafilokoklar tekli ya da ikili görülen, kısa zincir veya üzüm salkımı şeklinde koloniler oluşturabilen Gram pozitif koklardır. Stafilokoklar nozokomiyal enfeksiyonların en önemli etkenlerindedir. Stafilokokların deri, yumuşak doku enfeksiyonları, bakteriyemi, endokardit, menenjit, perikardit, pulmoner enfeksiyonlar, osteomyelit ve piyomyozite neden oldukları gösterilmiştir. Özellikle metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşlarının neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde güçlükler yaşanmaktadır. Bu nedenle, hastanemizin çeşitli servislerinde ve yoğun bakımlarında yatan hastaların klinik örneklerinden izole edilen stafilokok izolatlarının, Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile sefoksitin duyarlılığına bakılarak 67 metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşu tespit edildi ve bu suşlar arasında klonal ilişki olup olmadığı Rep-PZR ile araştırıldı. Bu analizler sonucu çalışmaya dahil edilen 67 MRSA izolatının 2'si ana klon (A ve B) olmak üzere toplamda 15 farklı klona (A-O) ayrıldığı belirlendi. A ana klonu MRSA'ların 37 (%55)'sinin toplandığı en büyük klon olarak tespit edildi. B ana klonu 11 suş (%16.5) ile ikinci büyük klondur. Diğer klonlar; C, D, E, F, G, H 2 (%3)'şer suş; I, J, K, L, M, N, O klonları ise 1 (%1.5)'er suş içermekteydi. Sonuç olarak; Değerlendirilen hastane enfeksiyonu ve kolonizasyonu ile ilişkili MRSA izolatları arasında yakın klonal ilişkinin olduğu görüldü. Rep-PZR yönteminin ayırım gücüne sahip ve stabil sonuçlar üreten bir yöntem olduğu belirlendi.

Anahtar Kelimeler: MRSA, Genotiplendirme, Rep-PZR, Enfeksiyon, Stafilokok, Suş.

ABSTRACT

Investigation of Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* as Nosocomial Infection Factor by Rep-PCR

Staphylococci are seen in single or double and they are Gram-positive cocci which can create colonies in the form of a short chain or cluster of grapes. Staphylococci are the most important causes of nosocomial infections. Staphylococci are shown to cause skin and soft tissue infections, bacteremia, endocarditis, meningitis, pericarditis, pulmonary infections, osteomyelitis and pyomyositis. Especially difficulties are experienced in the treatment of infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. For this reason, 67 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain were detected by observing cefoxitin sensitivity of staphylococci isolates those are isolated from clinical specimens of hospitalized patients from a variety of hospital wards and intensive care units by Kirby-Bauer disk diffusion method and whether or not clonal relationship between these strains by Rep-PCR investigated and whether clonal relationship exists or not between these strains were investigated by Rep-PCR. As a result of this analysis, 2 of 67 MRSA isolates which were included in the study were detected as main clones (A and B) with a total of 15 different clones (A-O) separation. A main clone was found to be the largest clone in which 37 of MRSA's (55%) were collected. B main clone was the second largest clone with 11 strains (16.5%). Other clones as C, D, E, F, G, H and I, J, K, L, M, N, O included 2 strains (3%) and 1 strain (1.5%) respectively. As a result it was seen that the evaluated isolates associated with hospital-acquired infection and colonization were dominated by MRSA and there are close clonal relationship between isolates. Rep-PCR method was determined to be a method capable of separation and producing stable results.

Keywords: MRSA, Genotyping, Rep-PCR, Infection, *Staphylococcus*, Strain.

1. GİRİŞ

Stafilokoklar, nozokomiyal ve toplumdaki kazanılmış enfeksiyonların en önemli etkenlerindendir. Bazı stafilokok enfeksiyonları, yaşamı tehdit eden komplikasyonlara sebep olması nedeniyle günümüzde halen önemli bir sorun olmaya devam etmektedir. Özellikle metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşlarının neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde büyük sıkıntılar yaşanabilmektedir (1). *Staphylococcus aureus* hastane ve toplum kaynaklı ciddi enfeksiyonların önemli bir nedenidir. Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, bakteriyemi, endokardit, menenjit, perikardit, pulmoner enfeksiyonlar, osteomyelit/septik artrit, piyomyozitin en önemli etkenlerindendir (2). Epidemiyoloji özellikleri de bulunduğundan stafilokoklar, halk sağlığı yönünden büyük önem taşımaktadırlar (3). Yakın geçmişte dek özellikle hastane kaynaklı enfeksiyon etkenleri içinde yerini alan metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), günümüzde toplum kaynaklı enfeksiyon etkenleri arasında da giderek artan oranda görülmekte, ciddi morbidite ve mortaliteye neden olmakta, yüksek bir ekonomik yük oluşturmaktadır (4). Enfeksiyon kaynağını saptama ve ortadan kaldırmaya yönelik epidemiyolojik çalışmalar, MRSA yayılımını önlemede ilk basamağı oluşturmaktadır (5). MRSA izolatları arasındaki klonal ilişkinin tespiti, hem hastane enfeksiyonlarının kaynağının ortaya çıkmasını sağlayacak hem de hastane enfeksiyonlarına bağlı olarak ortaya çıkan ekonomik kayıpların en aza indirilmesi açısından son derece faydalı olacaktır (6). Moleküler tiplendirme yöntemlerindeki gelişmeler MRSA epidemiyolojisi ile ilgili yeni bilgilerin elde edilmesinde, toplum ve hastane kökenli MRSA izolatları arasındaki genetik farklılıkların ortaya çıkarılmasında önemli rol oynamıştır (7). Moleküler tiplendirme yöntemleri olarak günümüzde çoğunlukla DNA'ya dayalı genotipik yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar arasında polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) önemli yer tutmaktadır. PZR metisilin direncinin tespitinde, MRSA suşlarının genotiplendirilmesinde ve virulans faktörlerinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (8). REP (Repetitive Extragenic Palindromic Element) PZR tiplendirme metodu ise otomatize ve kullanışlı ticari bir sistemdir. Moleküler parmak izi

oluşturarak suşların tiplendirilmesini sağlamaktadır. Bakteriyel ve fungal genomların kodlanmayan tekrarlayan sekanslarında Rep-PZR hedef primerleri kullanılmaktadır. Elektroforezle ayrılmış DNA fragmentleri, bakterilerin ve mantarların tür ve alttür ayrımı için genomik parmakizi oluşturmaktadır (9).

Bu çalışmada amaç, hastanemizin çeşitli servislerinde ve yoğun bakımlarında yatan hastaların klinik örneklerinden izole edilen stafilokok suşlarının son yıllarda hızlı ve kullanım kolaylığı ile ön plana çıkan Rep-PZR yöntemiyle genotiplendirilmesi ve aralarında klonal ilişki olup olmadığının belirlenmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

İlk kez 1878'de Robert Koch tarafından tanımlanan stafilokoklar, 1880'de Pasteur tarafından sıvı besiyerinde üretilmiştir. 1881'de Alexander Ogston insan abse materyalinden elde ettiği bakteriyi üzüm benzeri küme yapması nedeniyle *Staphylococcus* olarak adlandırmıştır. Daha sonrasında ise fare ve kobaylar için stafilokokların patojen olduklarını vurgulamıştır. Rosenbach 1884'de besiyerindeki beyaz renkli kolonileri *Staphylococcus albus*, sarı-portakal rengi kolonileri ise *Staphylococcus aureus* olarak isimlendirmiştir (3). *S. aureus* antimikrobiyal ajanlara karşı geliştirdiği direnç mekanizmalarıyla önem kazanmıştır (2). Alexander Fleming'in 1928 yılında penisilini bulması ile stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde önemli bir aşama kaydedilmiştir. Ancak penisilin klinikte yaygın olarak kullanılmaya başlanması ile birlikte penisilini parçalayan stafilokok suşları da ortaya çıkmıştır. Stafilokokların penisilinaz salgıladığı ilk kez 1944'te Kirby tarafından gösterilmiştir (10). 1961 yılında ise metisilin kullanılmaya başlanmasından kısa süre sonra bu antibiyotiğe de direnç gelişmiştir. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşları 1970'li yıllardan beri yaygın olarak tespit edilmeye başlanmıştır (11).

2.2. Genel Özellikler

Önemli bir enfeksiyon etkeni olan *Staphylococcus* cinsi bakteriler *Micrococcaceae* ailesine aittir. *Micrococcaceae* ailesi 4 genus içerir; *Planococcus*, *Micrococcus*, *Stomatococcus* ve *Staphylococcus*. *Staphylococcus*, *Micrococcaceae* ailesinin klinik açıdan en önemli grubudur. Bu genus içinde insanda en sık enfeksiyon etkeni olarak izole edilen Stafilokoklar; *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* ve *Staphylococcus saprophyticus*'dur. Bu türler içerisinde *Staphylococcus aureus* günümüzde kullanılan bir çok antibiyotiğe hızla direnç kazanması ve bu sebeple

eskiye oranla oluşturduğu enfeksiyonlara daha sık rastlanması nedeniyle insan enfeksiyonlarında öncelikli patojen olarak yer alır (12, 13). Stafilokoklar gerek toplum kökenli gerekse hastane enfeksiyonlarında önemli etkenlerden biridir. En sık deri enfeksiyonlarına neden olmakla beraber solunum sistemi enfeksiyonları, endokardit, osteomyelit gibi değişik enfeksiyonlardan da etken olarak soyutlanmaktadır (14). *S. aureus*, normal insanların %10-40'ının, burun mukozasında kolonize olabilir. *S. aureus*'un burunda bulunmaması durumunda *S. epidermidis*, burun mukozasından soyutlanan stafilokokların %90-100'ünü oluşturur. Ayrıca; aksiller, inguinal, perineal bölgeler ile ayak parmaklarında ve daha az olarak derinin diğer kısımlarında da kolonize olur. *S. hominis* ve *S. haemolyticus* aksiller, inguinal ve perineal bölgede yerleşme eğilimindedir. *S. saprophyticus* deriden çok ürogenital mukoza epiteline yapışma özelliği gösterdiğinden daha çok bu bölgelerde kolonize olmaktadır (15).

2.2.1. Morfoloji, Üreme ve Biyokimyasal Özellikler

Stafilokoklar isimlerini eski Yunancada 'bir salkım üzüm' anlamına gelen 'staphilé' sözcüğünden almışlardır. Stafilokoklar; Gram pozitif, sporsuz, hareketsiz, oksidaz negatif, katalaz pozitif, çapları 0.5-1.5 µm arasında değişen bakterilerdir. Genellikle kapsülsüz olmakla birlikte nadiren kısıtlı bir kapsül formasyonu oluşturabilirler. Birden fazla düzlemde bölündükleri için üzüm salkımı şeklinde koloniler oluştururlar. Stafilokok genusunda 32 tür ve 8 alttür bulunmaktadır. Bunların pek çoğu insan vücudunda kolonize olur. Fakat bunlar arasında *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus epidermidis* en karakteristik ve en çok çalışılan suşlardır (16). Stafilokokların hücre duvarının ince yapısı ve kimyasal bileşimi diğer Gram pozitif bakterilerin hücre duvarına benzemektedir. Hücre duvarları; peptidoglikan, teikoikasit ve proteinden oluşmuştur (17). Koagülaz deneyi, *S. aureus*'u diğer stafilokoklardan ayırt etmede bir tanı kriteri olarak kullanılmaktadır. *S. aureus* koagülaz pozitifdir ve plazmayı pıhtılaştırma özelliği gösterir. Ekstraselüler bir proenzim olan koagülaz, plazmada 'coagulasereleasing factor' ile birleşerek aktifleşir ve plazmanın pıhtılaşmasına yol açar. Bu şekilde mikroorganizmanın çevresini saran kalın fibrin tabakası oluşur ve bu tabaka yardımıyla bakteri konak savunma sisteminin

fagositozundan korunmuş olur. İnvazif patojenitenin bir göstergesi olan, serbest ve bağlı (clumping faktör, kümeleştirici faktör) olmak üzere iki çeşit koagülaz bulunmaktadır. Bu koagülazların sonuçları aynı olmakla birlikte antijenik yapı, etki mekanizmaları ve saptanma yöntemleri farklıdır (3). Şekerlerden mannitol üzerine olan etkileri, koagülaz testiyle beraber *S. aureus*'u ayırt etmede kullanılan en önemli testlerden biridir. *S. aureus* mannitolü parçalayarak asit oluşturur. Karbonhidratlardan trehaloz, mannoz, maltoz, sükroz ve laktozu parçalarken, ksiloz, sellobioz, arabinoz ve rafinozu parçalamaz. Nitratları nitritlere indirger (18).

2.2.2. Hücre Yapısı

Staphylococcus aureus'un hücre duvarı peptidoglikan, teikoik asit ve protein-A şeklinde üç temel komponentten oluşmaktadır. Bir çok stafilokok'un hücre duvarının en dış tabakası polisakkarit kapsül ile kaplanmıştır. Kapsül bakteriye fagositoza karşı koruma sağlar. Hücre duvarının ağırlığının yarısını peptidoglikan oluşturur. Peptidoglikan stafilokokların yüksek iç basınca dayanabilen çok katmanlı hücre duvar yapısının ayrılmaz bir parçasıdır. Peptidoglikan tabakası glikan zincir tabakalarından oluşur (13, 16). Teikoik asit hücre duvarının bir diğer bileşenidir ve teikoik asit türlere özgüdür. Hücre duvarının ağırlığının %40'lık kısmını teikoik asit oluşturur. Teikoikasit ve peptidoglikan birlikte bakteri hücre duvarının %90'lık ağırlığını oluştururlar. Hücre duvarı teikoik asidi ve hücre membranı ile ilişkili lipoteikoikasit olarak iki tip teikoik asit vardır. Lipoteikoikasit bakteri membranına kovalent bağlıdır. Teikoik asit zayıf immünojen olmasına rağmen peptidoglikana bağlandığında spesifik bir antikor cevabı uyarılır. Bu spesifik antikor cevabı sistemik stafilokokal hastalığı belirlemede kullanılıyor olmasına rağmen, diğer tesbit yöntemlerine göre daha az duyarlılığa sahip olduğu için artık kullanılmamaktadır (13, 16). Protein-A, peptidoglikan yapının en dışındaki hücre duvarı komponentidir ve bu yapı sadece *S. aureus*'ta bulunmaktadır. Yüzey proteinlerinin bir prototipi olan protein-A, hücre duvarının yaklaşık %7'sini oluşturur. En önemli özelliği, IgG3 dışındaki tüm IgG ve IgA2 ile bazı IgM'lerin Fc reseptörleri ile birleşebilmesidir. Bu şekilde mikrorganizmayı fagositoza karşı

korumaktadır. Ayrıca hücre dışına salgılanan protein-A aynı reseptörlere bağlanarak komplemanın aktive olmasına neden olmaktadır (3).

2.2.3. Genom Yapısı

Gen çalışmalarında en çok kullanılan mikroorganizma *S. aureus*'tur. 1975 yılında NCTC 8325 suşunda yapılan çalışmalarla *S. aureus*'un kromozomal haritası ortaya çıkarılmaya başlamıştır (19). Sonraki çalışmalarda Pulsed Field Gel Elektroferez (PFGE) ve sekans hibridizasyon dizi analizi tekniklerinin gelişmesiyle *S. aureus* genomunun fiziksel haritası ortaya çıkarılmıştır. *S. aureus*'un genomunun uzunluğu yaklaşık olarak 2.8 mega baz çiftidir (bç). Genomun %84.5'ini oluşturan 2600 Open Reading Frame (*ORF*) bölgesi bulunmaktadır. G+C oranı %33'tür. Antibakteriyel direnç ve virülans faktörleri plazmidler, fajlar ve SCC (Staphylococcal Cassette Chromosome) genleri tarafından kodlanmaktadır (20).

2.3. Virülans Faktörleri

Virülansı en yüksek olan stafilokok türü *S. aureus*'tur. Fakat enfeksiyonun olup olmaması mikroorganizmanın virülansı ile konak savunma sisteminin arasındaki dengeye bağlıdır. Stafilokokların virülansında rol oynayan başlıca faktörler; kapsül, hücre duvar yapıları, yüzey proteinleri, toksinler ve enzimlerdir (3).

2.3.1. Toksinler

2.3.1.1. Sitolitik Toksinler

Stafilokoklar, konak hücre morfolojisini ve/veya fonksiyonunu etkileyen çok sayıda ekstrasellüler toksin üretebilmektedirler. Bu toksinler vasıtasıyla stafilokoklar yoğun inflamatuvar yanıt olan bölgelerde üremelerini sürdürebilirler. Bu toksinlerden en iyi bilinenleri hemolizinler ve lökositindir.

A- Hemolizinler

Antijenik özellik bakımından *S. aureus* dört farklı hemolizin üretmektedir. Bu hemolizinler; α (alfa), β (beta), δ (delta), γ (gama) olarak isimlendirilirler (3).

- **Alfa Hemolizin (Alfa Toksin)**

α -toksin memeli hücrelerinde por oluşumuna neden olarak inflamatuvar yanıtı indükler. Subkutan verildiğinde nekroza yol açar ve potansiyel nörotoksin etkisi de vardır. Kanlı agarda oluşan β -hemolizden bu toksin sorumludur. Ayrıca α -hemolizinin deneysel endokardit oluşumunda önemli olduğu saptanmıştır (21). Alfa hemolizin *S. aureus*'un birçok suşu tarafından üretilir. Bu toksin, kan damarlarındaki düz kasları parçalar. Eritrosit, lökosit, hepatosit, trombosit ve hücre kültürlerini de içeren birçok hücreye toksik etki gösterir (13).

- **Beta Hemolizin (Beta Toksin)**

β -toksin sfingomyelinaz özelliğiyle membranları lipid komponentlerini bozarak hasara uğratar. Sıcak-soğuk hemolizin olarak da bilinir. Ayrıca B grubu streptokoklar ve *Listeria monositogenes* tarafından üretilen ve *S. aureus*'un hemolizini arttırıcı etkiye sahip olan Christie, Atkins, MuncPeterson (CAMP) faktörle etkileşen ve sinerjik hemolize neden olan yapıdır (22). Makrofaj, lökosit, eritrositleri içeren birçok hücreye toksik etki göstermektedir. Hücre yüzeyindeki sfingomyelin konsantrasyonu ile orantılı lize neden olur. Duyarlı hücrelerde membran fosfolipitlerinin hidrolizini katalize eder. Stafilokokal enfeksiyonlarda doku harabiyeti ve abse oluşumunda alfa ve beta toksin birlikte rol oynar (13).

- **Gama Hemolizin (Gama Toksin)**

γ -hemolizin diğer hücrelere ek olarak lökositleri de eritebilir ve bazen lökosidin olarak da adlandırılır (22). *S. aureus* suşlarının %97'sinden fazlasında, koagülaz negatif stafilocokların %50-70 kadarında bulunmaktadır. Deterjan benzeri bir etkiye sahip küçük moleküllerin agregatıdır. Hücre membranında zamanla genişleyen kanallar açarak sitoplazma içeriğinin dışarı sızmasına neden olur (3).

- **Delta Hemolizin (Delta Toksin)**

δ -toksin deterjan benzeri etki ile membran biyolojik membranlarında hasar oluşturur. Kolera enzimine de benzer etki ile CAMP salınımına neden olur. Bu enzimatik aktivitenin toksik şok sendromu ve stafilocoksik besin zehirlenmesi gibi hastalıklarda görülen diyarenin oluşumunda rol oynadığı düşünülmektedir (23).

B- Panton-Valentine Lökositin (PVL)

İnsan ve tavşan lökositleri ile makrofajları etkiler. Toksin elektroforetik olarak birbirinden ayrı F (Fast: Hızlı) ve S (Slow: Yavaş) iki protein komponentinden oluşmuştur. Her iki komponent de antijeniktir. Lökositin lökositleri harap ettiğinden ve fagositozu engellediğinden, virulansta rolü olan bir elemandır (3).

2.3.1.2. Enterotoksin

Serolojik olarak sekiz farklı stafilocokal enterotoksin (A-E, G-I) ve enterotoksin C'nin üç subtipi tanımlanmıştır. Enterotoksinler 100°C'de 30 dakika ısıtmaya ve gastrik-jejunal enzimlerle hidrolize dirençlidir. Bu nedenle besin maddesi bir kere enterotoksin üreten stafilocoklarla kontamine olduktan sonra, yiyeceğın tekrar ısıtılması

ya da sindirim süreci, önleyici olmayacaktır. Bütün *S. aureus* suşlarının %30-50'si bu toksinleri üretmektedir (13).

2.3.1.3. Toksik Şok Sendromu Toksini-1 (TSST-1)

Stafilokokal süperantijenler olarak bilinen toksin grubunun bir parçasıdır. 22 kDA molekül ağırlığındadır. Isı ve tripsin gibi proteazlara dirençlidir. Süperantijenite özelliği, antijenik özgüllüğe gerek olmaksızın direkt olarak T lenfositlerin proliferasyonunu ve sitokinlerin salınımını stimüle etme özelliğine sahiptir. Bu toksinlerin hepsi de MHC class II molekülü yoluyla poliklonal T lenfositlerin proliferasyonuna neden olmaktadır (24).

2.3.1.4. Eksfoliatif Toksin

Stafilokok enfeksiyonlarının dermatolojik belirtilerinden sorumlu eksfoliatin, *S. aureus*'un buyyon kültüründe meydana gelir. Eksfoliatin haşlanmış deri sendromuna neden olur. Eksfoliatin ekzotoksin niteliğinde bir proteindir. A ve B tipi bulunmuştur. Bu toksine karşı nötralizan ve presipitan antikorlar meydana gelir (3).

2.3.2. Enzimler

- **Katalaz**

Bütün stafilokoklar miyeloperoksidaz sistemince düzenlenen toksik hidrojen peroksidin su ve oksijene dönüşümünü katalize eden katalaz enzimi üretirler. Hidrojen peroksid bakteriyel metabolizma sırasında veya fagositoz sonrası birikebilir (13). Katalaz, fagosite edilmiş bakterinin oksijen radikalleri ile öldürülmesini engelleyerek konak savunma mekanizmalarını bozar (25)

- **Koagülaz**

S. aureus suşları bağlı ve serbest olmak üzere iki formda koagülaza sahiptirler. Stafilokokal hücre duvarındaki bağlı koagülaz, direkt olarak fibrinojeni çözünmeyen fibrine çevirir ve stafilokokların kümelenmesine neden olur (12). Serbest koagülaz da globulin plazma faktör (koagülaz reacting faktör) ile reaksiyona girerek, fibrinojeni çözünmeyen fibrine dönüştürür ve stafilotrombin formunu oluşturur (13). Bu faktörlerin enzimatik aktivitesi sayesinde bakteri fibrinle kaplanarak, opsonizasyon ve fagositoza daha dirençli hale gelir (12, 13).

- **Hyaluronidaz**

Hyaluronik asiti hidrolize eder. Bu enzim *S. aureus*'un dokuda yayılımını kolaylaştırır. *S. aureus* suşlarının %90'dan fazlası bu enzimi üretirler (12).

- **Fibrinolizin**

Aynı zamanda stafilokinaz olarak da isimlendirilir. Hemen hemen tüm *S. aureus* türlerince üretilen fibrinolizin, fibrin kılıfını eriterek infeksiyonun yayılımını kolaylaştırır (12). Stafilokokal fibrinolizin, ısıya dirençlidir (3).

- **Lipaz**

S. aureus'un tüm suşları ve KNS (koagülaz negatif stafilokok)'lerin %30'dan fazlası birkaç farklı lipaz üretirler. Bu enzim lipitleri hidrolize eder ve vücutta yağca zengin deri bölgelerinde bulunan stafilokokların canlılığını devam ettirmesini sağlayan bir faktördür. Ayrıca kutanöz ve subkutanöz dokularda yüzeysel cilt enfeksiyonlarının gelişiminde rol oynar (3, 13).

- **Fosfolipaz C (Phosphatidyinositol-specific Phospholipase C, Lesitinaz)**

Hücrelerin kompleman ve onun biyoaktif ürünlerine karşı duyarlılığını arttırmaktadır ve bunun sonucu olarak hücreler daha çabuk parçalanır. Özellikle erişkin tip solunum zorluğu sendromu ve dissemine intravasküler koagülasyon tanısı bulunan hastalardan izole edilen suşlarda saptanan bir enzim çeşididir. Bu suşlar antimikrobiyal ajanlara özellikle de penisiline dirençlidir (26).

- **Beta-laktamaz (Penisilinaz)**

S. aureus en az 3 farklı tip β -laktamaz üretmektedir. β -laktamazlar, β -laktam halkasındaki amid bağına parçalayarak β -laktam antibiyotiklerin etkilerini inhibe ederler. Penisilin, ampisilin ve diğer β -laktam antibiyotiklere karşı gelişen direncin büyük kısmı bu yolla ortaya çıkmaktadır. Bu direnç geni esas olarak plazmidlerle taşınmaktadır (27).

2.4. Patogenez

S. aureus yaygın insan patojenidir. Deri ve yumuşak dokudan, pnömoni, osteomyelit ve endokardit gibi enfeksiyonlara neden olur. Deri enfeksiyonlarında stafilokok, yağ ve ter bezleri ile kıl diplerinden organizmaya girer. İnsanın savunma mekanizması, mikroorganizmanın sayısı, virulansı, deri ve mukoza bütünlüğünün bozulması enfeksiyon oluşumunu etkileyen faktörlerdir. Deri yanıkları, travmatik ve dekübitik yaralar hazırlayıcı faktörlerdir. Damar içi protez ve plastik katater uygulamaları ile bakteriyemi gelişebilir. Burunda stafilokok taşıyanlar önemli enfeksiyon kaynağıdır. Bakteri hava yoluyla ve temasla bulaşır, yayılır (28). *S. aureus*, enfekte ettiği bölgede hızla kolonize olabilen bir bakteridir. *S. aureus*, yüksek virulansı, çevresel koşullara üstün adaptasyon yeteneği ve antibiyotiklere çok çabuk direnç geliştirebilmesi ile stafilokok türleri arasında özel bir yere sahiptir. Yeni geliştirilen antibiyotiklere bile oldukça hızlı ve etkin direnç mekanizmaları geliştirerek hastane enfeksiyonlarının en başta gelen etkenlerinden biri olmaktadır (18). Toksinler (alfa-

hemolizin, panton-valentin lökosidin), süper antijenler (enterotoksinler, toksik  ok sendrom toksini-1), fagositoz inhibitörleri (polisakkarit kapsül, protein-A) ve immün sistemden kaçış molekülleri (stafilokinaz, aerolizin) *S. aureus*'un patogenezinde önemli katkıda bulunurlar (28). İnsanlardaki stafilokok enfeksiyonlarında *S. aureus*  ncelikli patojen olarak yer alır. Bundan başka deri ve mukozaların normal flora bakterileri olarak kabul edilen *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus* gibi koagülaz negatif stafilokoklar da enfeksiyon tablosu oluştururlar (12).

2.5. Epidemiyoloji

Stafilokoklar çok yaygındırlar. Tüm insanlarda deri üzerinde koagülaz negatif stafilokoklar bulunur ve *S. aureus*'un geçici kolonizasyonu nemli deri bölgelerinde sık olarak görülür (13). İnsanların burun, boğaz ve deri gibi dışa açık bölgelerinde var olan bakterilerin bir bölümü daimi, bir bölümü de geçici flora olmak üzere, iki gruba ayrılmaktadırlar. Bu bölgelerdeki bakterilerin sayı ve çeşitliliği yaş, cinsiyet, ırk, ısı, nem, kişinin sağlık, beslenme, kişisel hijyen, sosyo-ekonomik ve kültürel durumu gibi faktörlerle yakından ilgilidir (3). Stafilokoklar yüksek sıcaklığa, dezenfektanlara ve antiseptik solüsyonlara duyarlı olmakla birlikte kuru yüzeylerde uzun süre canlı kalabilme özelliğindedir (13). Stafilokok enfeksiyonunun kaynağı stafilokokal lezyonu olan bir hasta veya hastane personelidir. Bulaş kişiden kişiye olmaktadır. Atopik dermatiti olanların %85 kadarında deri taşıyıcılığı bildirilmektedir. Ancak *S. aureus* enfeksiyonlarında burun taşıyıcılığı daha önemlidir (3). MRSA suşları 1980'li yılların başlarında hızla hastanede yatan duyarlı bireyler arasında yayılmaya başlamış ve buna bağlı olarak stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde ve bu enfeksiyonlardan korunmada önemli gelişmeler yaşanmıştır (13).

2.6. Hastane Enfeksiyonu Etkeni Olarak *S. aureus*

Staphylococcus aureus toplum ve hastane kaynaklı ciddi enfeksiyonların önemli bir nedeni olarak bilinmektedir. Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, bakteriyemi,

endokardit, menenjit, pulmoner enfeksiyonlar, perikardit, osteomyelit/septik artrit, piyomyozitin en önemli etkenlerindendir. Ayrıca *S. aureus* antimikrobiyal ajanlara karşı geliştirdiği direnç mekanizmalarıyla da oldukça önem taşımaktadır (2). 1945 yılından itibaren penisilin tedavisiyle birlikte *S. aureus* suşlarında beta-laktamaza bağlı penisilin direnci hızla artmıştır. 1960 yılında penisilina dayanıklı semisentetik bir penisilin olan metisilin kullanıma girmesiyle birlikte bir yıl içinde metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) suşları Avrupa’da görülmeye başlamıştır. 1980’de İngiltere’de ilk “epidemik MRSA” suşu tanımlanmış ve ardından farklı coğrafik bölgelerden de dirençli suşlar bildirilmeye başlamıştır. Günümüzde MRSA tüm dünyada hastane enfeksiyonu etkenleri arasında önemli bir sorun olarak bilinmektedir (29). 1980’li yıllardan itibaren metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), hastanelerde majör klinik ve epidemiyolojik bir problem olarak bilinmektedir. MRSA, *S. aureus*’un bir suşu olup, müköz membranların ve derinin normal florasında bulunmaktadır. Majör kolonizasyon yeri burun içidir. Genel populasyonun yaklaşık %40’ı nazal taşıyıcıdır. Hastane personelinde bu oran, %70’e kadar çıkabilmektedir. Hastalar ve hastane personelinde MRSA nazal taşıyıcılığı, hastanede MRSA’nın yayılmasına neden olmaktadır (30). Nozokomiyal MRSA yayılımının yollarını tanımlamak ve MRSA salgınlarının epidemiyolojisini incelemek için bireysel MRSA kökenlerinin ayırt edilebilmesi gerekir. Hastane içinde *S. aureus*’un klonal yayılma eğilimi klinik izolatlarda özgül tiplendirme yöntemlerinin geliştirilmesine yol açmıştır. Ancak MRSA kökenleri arasında yüksek derecedeki genetik yakınlık nedeniyle özellikle rutin bakteriyolojik yöntemleri kullanan pek çok hastane laboratuvarı için bu ayırım güç olabilir (31). Hastanelerde MRSA salgınları durumunda enfeksiyon kontrol ekibi birçok problemle karşı karşıya kalabilmektedir. Bu problemler; salgın kaynağını tanımlamada zorluk, izolasyon imkanlarının sınırlı olması sebebiyle vakaların artan sayısı ile başa çıkamamak, servis kapatmanın karışıklığa yol açması, personel taramasından etkili sonuç alınmaması gibi güçlükler MRSA kontrolüne daha fazla önem verilmesi gerekliliğini ortaya çıkarmaktadır. MRSA kolonizasyonu ve enfeksiyonları için risk altındaki hastalar; immün yetmezliği olan hastalar, çoğul antibiyotik tedavisi uygulanan hastalar, steroid ve kemoterapi alan hastalar, hemodiyaliz hastaları, cerrahi ve yoğun bakım ünitesi hastaları, yaşlı ve malnütrisyonu olan hastalar ve diyabet hastalarıdır. MRSA nazal taşıyıcısı olan hastane personeli, bu bakteriyi diğer

personeler ve hastalara direkt el teması veya hava yolu ile bulaştırılabilmektedir. MRSA bir aydan daha uzun süre çevre koşullarında canlı kalabilmektedir ve hava yolu ile uzak mesafelere yayılabilmektedir. İndirekt temas (bilgisayar klavyeleri vb.) yolu ile de bulaşabilir. En yaygın bulaş yolu sağlık personelinin kontamine elleridir (31).

2.7. Yaptığı Hastalıklar

S. aureus, ya toksinleriyle ya da dokulara yayılıp zarar vererek hastalık yapmaktadır. Stafilocok enfeksiyonlarının ana bulgusu süpürasyondur. İrin dolu apse oluştururlar. Bazı stafilocok hastalıkları sadece toksin etkisinin bir sonucu olarak (stafilocoklara bağlı haşlanmış deri sendromu, stafilocoklara bağlı besin zehirlenmeleri ve toksik şok sendromu gibi), diğer bazıları ise bakterilerin çoğalmasını takiben abse gelişimi ve doku yıkımına bağlı olarak (deri enfeksiyonları, endokardit, pnömoni, ampiyem, osteomyelit, septik artrit gibi) ortaya çıkmaktadır (3, 13).

• Deri Enfeksiyonları

İnsanlarda en çok görülen enfeksiyon tipidir. Kıl folikülü enfeksiyonu (follikülit)'nin deri altı dokuya yayılmasıyla fronkül ve karbonkül meydana gelir. Fronkül kabarcık şeklinde, lokal bir lezyon görünümündedir. Enfeksiyon deri altına penetre olduktan bir kaç saat sonra ödem, kırmızılık ve ağrı oluşturur. Ödemli bölgenin üzerindeki deri parlak ve incedir. Kısa bir süre sonra delinir. Karbonkülde ise daha fazla odak ve fibröz dokunun derin tabakalarına yayılım vardır. Yüz boyun ve sırt bölgesinde sıklıkla görülür. İmpetigo, derinin yüzeysel tabakalarında kabuklu püstüllerin oluşumu ile karakterizedir. Çok bulaşıcıdır. Bebeklerde haşlanmış deri sendromuna neden olur. Lokal lezyonu, deri kavlaması izler. Yenidoğanda jeneralize eksfoliyatif dermatit (Ritter's hastalığı) yapar (3). Bu hastalık tipik olarak *S. aureus*'ta bulunan *eta* ve *etb* genlerinin kodladığı eksfoliyatif toksin A veya B'den (ETA-ETB) biri ile meydana gelmektedir. Bu genler faj veya plazmid üzerinde bulunmaktadır (8). Hidradenitis

süpürativa; aksilla, perine ve genital bölgelerde görülen, ter bezlerinin piyojenik enfeksiyonudur. Lezyonlar fronkül benzeri gruplar halinde görülür. Birden fazla drenaj açıklığı olabilir. İyileştiğinde skar bırakır (18).

- **Mastit**

Puerperal dönemin genellikle ikinci veya üçüncü haftasında olmak üzere emziren kadınların %1-3'ünde *S. aureus* ile ilişkili mastit gelişebilmektedir (25).

- **Solunum Sistemi Enfeksiyonları**

Stafilokoklar nazofarenjit ve akut sinüzitin en çok görülen nedenleri arasında yer almaktadır. Lober, interstisyel pnömoni ve lokal septik emboli yapabilir. Stafilocokal pnömonide, abse oluşumuna eğilim vardır. Akciğer parankim harabiyetiyle bronkopnömoni, fulminan hemorajik pnömoni tabloları gelişebilir. Hastalarda yüksek ateş, sarı-kanlı balgam çıkarma ve öksürük mevcuttur. Bakteri, ampiyem sıvısı, balgam ve akciğer iğne biyopsisi materyalinden ve kan kültüründen izole edilebilmektedir (3).

- **Pnömoni**

S. aureus pnömonisi önceleri daha az sıklıkta tanımlanmıştır ve ilk olarak influenza'nın bir komplikasyonu olarak görülmüştür. 1918'lerde genç bireylerdeki influenza pandemilerinden elde edilen kayıtlarda ölümlerin çoğu ile *S. aureus*'un yol açtığı bakteriyel süper enfeksiyonlar arasında ilişki kurulmuştur. Son yıllarda, PVL toksini üreten *S. aureus* izolatları sağlıklı genç bireylerdeki pnömoni gibi deri ve yumuşak doku enfeksiyonları ile ilişkili bulunmuştur (32).

- **Süpüratif Hidraadenit**

Apokrin ter bezlerinin süpüratif enfeksiyonudur. Aksilla, perine ve genital bölgede çok sayıda fronküle benzer lezyonlar görülür. Lezyonlar kendiliğinden direne olur. Hipertrofik skar dokusu ile iyileşir (25).

- **Septik Artrit**

S. aureus, erişkinlerdeki non-gonokokal artrit ve çocuklardaki septik artrite neden olan en sık etkidir. Septik artrit, lokal travma gibi durumlardan sonra hematogen veya iyatrojenik olarak meydana gelebilir. Semptomlar akut ağrı ve eklem şişmesi olarak görülmektedir. Birkaç gün içinde bireylerdeki bakteriyel enfeksiyonlardan dolayı eklem yıkımı gerçekleşir. Bu durumlardan dolayı hastalara hemen kültür, kan ve biyokimyasal testler uygulanır (33).

- **Septik Bursit**

Septik bursit çoğunlukla dirsek ve diz kapağı gibi bölgelerde görülmektedir. Hastalık eklemlerdeki akut bir enfeksiyon olarak tanımlanmaktadır. Eklem üzerindeki deri genellikle iltihaplanmıştır. Artrit ve osteomyelitin aksine septik bursitte eklem üzerini örten deride hareket veya baskı durumlarında ağrı oluşmamaktadır. Septik bursit olgularının %80'inden çoğuna *S. aureus* enfeksiyonları neden olur (33).

- **Pyomiyozit**

İskelet kasının sık rastlanmayan piyojenik enfeksiyonu olan piyomiyozit, çocuklarda nadir görülen, fakat ciddi seyredebilen bir hastalıktır. Piyomiyozit benign hastalıklarla kolaylıkla karıştırılabileceği için, kompartman sendromu, komşu eklemden

osteomyelit, bitişik eklemin ekstansiyonu ve yıkımı, sepsis ve ölüme yol açabilmektedir (34).

- **Bakteriyemi ve Endokardit**

Toplumdan kazanılmış stafilokoklara bağlı bakteriyemi genellikle sellülit, osteomyelit ve pnömoni gibi bir odaktan kaynaklanırken; hastane kökenli stafilokok bakteriyemileri daha çok intravenöz kateterlerden kaynaklanmaktadır. Hastalık genellikle ürperme ve titremelerle başlamaktadır. Fizik muayenede ateş ve subkonjonktival hemoraji yanında ileri olgularda nekrotik deri lezyonları ve ekstremitelerde gangren görülebilmektedir (12, 25). *Staphylococcus aureus*, akut bakteriyel endokarditis'in en sık etkenidir. Hastane ya da toplum kaynaklı olabilmektedir. Bunlar arasında birçok vakanın hastane çalışanlarından kazanıldığı bildirilmiştir (35).

- **Menenjit**

S. aureus menenjiti bakteriyemi, travma veya intratekal implant kolonizasyonu sonucu görülür. Klinik özellikleri diğer bakteriyel menenjitlerle aynıdır (25).

- **Osteomyelit**

Yara ve fronkül gibi primer bir odaktan hematogen yayılım sonucu, *S. aureus* tarafından daha çok çocuklarda meydana gelen osteomyelit, uzun kemiklerin diafizinde görülmektedir (12, 3). Osteomyelit çok eskiden beri bilinmektedir. Vakaların %50-70'ine *S. aureus* enfeksiyonları neden olmaktadır. Bakterinin kemikte meydana getirdiği enfeksiyonlar sonucu bu hastalık meydana gelmektedir. Antibakteriyel tedavilerin uygulanmasından sonra hem ölüm hemde osteomyelit yaygınlığında önemli bir azalma olmuştur (36).

- **Besin Zehirlenmesi**

Genellikle yiyecek hazırlayıcılarının ellerinde kolonize olmuş *S. aureus* suşlarının yiyeceklere bulaşması ve bu yiyecekler üzerine sağladıkları ısıya dirençli enterotoksinlerin yiyeceklerle birlikte tüketilmesi ile ortaya çıkmaktadır. Genellikle bol karbonhidratlı ve sütlü tatlılar, patates salataları, tavuk eti ve dondurma gibi yiyeceklerle bulaşmaktadır. Besinler genel olarak normal görünüşe ve kokuya sahiptirler (18). Bakteriyel besin zehirlenmelerinin en fazla görüleni, stafilokokal besin zehirlenmeleridir. Hastalık enterotoksin oluşturan suşlar tarafından açığa çıkarılan toksini bulduran besinlerin yenilmesinden birkaç saat sonra meydana gelmektedir. Hastalığın belirtileri besinin tüketilmesinden 6-8 saat sonra başlayan bulantı, kusma, diyare, karın ağrısı, ağır kramplar, baş ağrısı, terleme ve şoktur. Ateş görülmez. 6-8 saat içinde, tam iyileşme gözlenir (3).

- **Toksik Şok Sendromu (TSS)**

1980'lerin başlarında menstrüasyon sürecinde yüksek emici tamponların kullanımının artması ile birlikte genç kadınlarda çok sayıda olgu bildirilmiştir. Menstrüel TSS (Toksik şok sendromu), TSST-1 (Toksik şok sendromu toksini-1) adı verilen toksin ile oluşmaktadır. Toksik şok suşları lokal olarak toksini salgırlar. TSST-1 mukozaları geçer ve tüm vücuda yayılır (18). TSS, primer olarak (TSST-1) üreten *S. aureus*' un lokal enfeksiyonu sonucu oluşan, septik şoka benzer bir klinik tablodur. Bu sendrom ateş, bulantı, kusma, diyare, yaygın döküntüler (skarlatino form), el ve ayak tabanlarında ekfoliasyon ile kızılın yüzeysel formlarına benzemektedir. TSST-1 ekzotoksini, aerobik koşullarda en fazla üretilmektedir. TSS, 20-40 yaşındaki kadınlarda daha sık görülmekte ve menstrüasyon sırasında kullanılan tamponların, vajinada *S. aureus* kolonizasyonuna yol açmasıyla ortaya çıkmaktadır (3).

TSST-1'in şok ve çok sayıda organ-sistem yetmezliği oluşturmasında, çeşitli mekanizmalar etkin olmaktadır.

- 1- İnterlökin-1 (IL-1) ve tümör nekrozis faktör-alfa (TNF-alfa) gibi sitokinlerin salınımını tetikler. Gram negatif bakterilerin lipopolisakkarit (LPS)'leri gibi aynı yoldan etki ederek, şok nedeni olur. T hücre proliferasyonu ve yüksek düzeylerde IL-2 üretimi gözlenir. Sekonder etki IL-1 ve TNF-alfa üretiminin artması gibi gözükmemektedir.
- 2- TSST-1, LPS ile sinerjik etki gösterir ve organizmanın LPS duyarlılığını artırır.
- 3- TSST-1 doğrudan endotel hücrelerini etkileyebilir. Bu yolla dolaşım sistemi fonksiyonlarında bozulma, kapillerden sıvı sızması ve hipotansiyon gelişir (3).

- **Haşlanmış Deri Sendromu**

Haşlanmış deri sendromu yüzeysel bir deri enfeksiyonudur. İlk kez Alman Doktor Baron Gotfried Ritter von Rittershain tarafından 1878 yılında tanımlanmıştır. Bazen "Ritter'in hastalığı" olarakta anılmaktadır (8). Yenidoğanda nazofarenks, göbük veya üriner sistemde enfeksiyon oluşturan, epidermolitik toksin üreten *S. aureus* suşları, enfeksiyonun 24-48. saatinde deride yaygın büller oluşturmaktadır. Sağlam görünen deri hafif bir sürtünme ile soyulur hale gelir. Daha sonra içleri steril duru sıvı ile dolu büller oluşur. Sonra büller parçalanır, yerlerinde yaygın kırmızı nemli çıplak bölgeler kalır. 3-5 gün içinde soyulan yerler kurur ve 10 günde yeni epidermis ile kaplanarak çoğu kez iyileşir. Fakat ciddi sıvı ve elektrolit kaybı sonucu hipovolemi ve sepsis oluşabilmektedir (12, 25). Tutulan deri bölgesinde mikroorganizma yoktur. Toksin yüzeysel olarak tüm vücuda yayılır ve haşlanmış bir deri görünümünü meydana getirir. Deriye dokunulduğunda hemen dökülme gerçekleşir. Meydana gelen kabarcıklar içindeki sıvı temizdir. Hastalık 4-7 gün içinde kendiliğinden düzelir. Tedavide spesifik antibiyotikler de kullanılabilir (37, 38).

2.8. Antibiyotik Direnci

Hem hastane hem de toplum kaynaklı enfeksiyonlara neden olan *S. aureus*'un antibiyotiklere hızla uyum sağlama yeteneği dikkat çekicidir. Özellikle MRSA'nın, tüm β -laktam antibiyotiklere intrinsek direnci ve ayrıca diğer antibiyotiklere de direnç geliştirme eğilimi vardır (39).

2.9. Metisilin Direnci

S. aureus suşları önceden beta-laktamaz üretimi ile sadece penisilin ve türevlerine direnç gösterirken, penisilin bağlayan protein 2 (PBP2)'nin değişimi sonucunda tüm beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç geliştirmiştir. Beta-laktamazlara dayanıklı penisilin türevlerine de direnç geliştirmiş olan suşlar metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) olarak adlandırılmaktadır (40). Stafilocoklarda metisilin direnci, *Staphylococcal Cassette Chromosome (SCC)* adı verilen genetik yapının üzerinde bulunan *mecA* (*SSCmec*) geni tarafından düşük afiniteli bir penisilin bağlayan protein (PBP) olan PBP2a'nın sentezlenmesi sonucu ortaya çıkmıştır (41). Metisilin direnci ilk kez antibiyotiğin klinik kullanıma girmesinden çok kısa bir süre sonra, 1961 yılında İngiltereden *S. aureus* suşunda bildirilmiştir. 1970'lerde Avrupa ülkelerinde 1980'lerde de Amerika Birleşik Devletlerinde yayılmıştır. 1990 yılında Center for Diseases Control ABD'de hastane enfeksiyonlarından izole edilen stafilocok suşlarının % 15'inin (yoğun bakım ünitelerinde %22) metisiline dirençli olduğu bildirilmiştir (42). Diğer gelişmiş ülkelerdeki oran da yaklaşık olarak bu civardadır. MRSA'ların tüm β -laktam antibiyotiklere dirençli oldukları kabul edilmektedir. *S. aureus* suşlarında tedaviden sonra aynı suşların hastalardan tekrar elde edildiği gözlenmiştir. Metisiline dirençli stafilocoklar metisiline duyarlı stafilocoklardan farklı olarak *mecA* geni bulunduran ve beta laktamaz enzimi salgılayan bir yapıya sahiptir. β -laktamazlar, β -laktam antibiyotiklere bağlanarak onları hidrolize eden ve bu yolla bakteriyel dirence neden olan enzimlerdir (43).

2.10. Metisiline Direnç Mekanizması

2.10.1. Kromozomal (İntrinsik) Metisilin Direnci

En sık karşımıza çıkan mekanizmadır. Metisilin direncinden sorumlu *mecA* genini taşıyan plazmid ve transpozonların bulunduğu gen kaseti, bakteri kromozomuna entegre olmaktadır. *mecA* geninin etkisi ile MRSA suşlarında PBP2 ya da PBP2a denilen yeni bir PBP sentezlenmektedir. PBP2a 78 kDa ağırlığındadır ve β -laktam antibiyotiklere karşı PBP'den daha düşük afinite göstermektedir. Buna bağlı olarak β -laktam antibiyotikler PBP2a'ya bağlanmamakta, böylece bakteri hücre duvarı için gerekli olan peptidoglikan sentezi devam etmektedir (18). MRSA suşlarındaki dirençlilik; bu bakterilerin normal PBP'den farklı olarak beta-laktam antibiyotiklere daha düşük afinitesi olan PBP2a veya PBP2 denilen PBP'leri nedeniyledir. MRSA'da PBP2a oluşturulması kromozomal kontroledir; çoğu zaman penisilin veya diğer β -laktamların varlığında indüklenebilir bazen de yapısaldır. Yapısal oluşturulan PBP2a içeren MRSA'ların direnç fenotipi homojendir, yani bakteri topluluğundaki tüm bireyler dirençlidir. İndüklenebilir PBP2a içeren MRSA'larda ise direnç tipi heterojendir; yani aynı bakteri topluluğundaki dirençli suş oranı değişir. Yapılan genetik çalışmalarda PBP2a'nın *mecA* denilen bir kromozomal genin 2.1 kilobaselik bir kısmı ile kodlandığı gösterilmiştir (44).

MRSA'larda *mec* geninin ekspresyonunu etkileyen, fenotipi belirleyen en az 3 regülasyon mekanizması vardır.

- 1- PBP2a oluşumunun bakteride hem *mecA* geni hem de β -laktamaz plazmidini varsa, β -laktamlar tarafından indüklendiği gözlemine dayanmaktadır. Bu nedenle β -laktamaz geninin kontrolü ile PBP2a geninin benzer olduğu düşünülmektedir.
- 2- *Mec* geni içindeki bir kısmın PBP2a yapımını regüle ettiği ve bunun da fenotipi etkilediği düşünülmektedir.
- 3- *MecA* dışında bir yerde lokalize olan *femA* geni tarafından ekspresyonun belirlendiğidir.

2.10.2. “Borderline” Metisilin Direnci

Buna kazanılmış metisilin direnci de denmektedir. *S. aureus*'lardaki borderline metisilin direnci bakterinin aşırı β -laktamaz salgılamasıyla ortaya çıkmaktadır. β -laktamaz enzimi salgılanması esas olarak penisilin direncine neden olur, metisilin bu enzime dayanıklıdır. Ancak 1984'de Tornsberry ve arkadaşları *S. aureus*'larda metisiline direnç gelişiminde bir diğer mekanizma olarak aşırı β -laktamaz üretimini göstermişlerdir. Bu suşlar metisiline sınırda direnç gösterdikleri için bunlara BORSA (borderline resistant *S. aureus*) denilmiştir. BORSA suşları PBP2a oluşturmamaları ve direnç kontrolünün plazmide bağımlı olmasıyla MRSA'lerden farklıdır (45).

2.10.3. “Intermediate” Metisilin Direnci

Stafilokoklarda modifiye PBP'lere bağlı metisiline duyarlılık azalmasıdır. Bu tip dirençli suşlara MODSA denmektedir. MODSA suşları normal yapıda PBP1 ve PBP2 içerirler ancak bu PBP'lerin β -laktam antibiyotiklere affinitesi düşüktür. Ayrıca MODSA suşlarında normalden fazla PBP4 vardır (44).

2.11. Epidemiyolojik Tiplendirme

Hastalardaki epidemiyolojik ilişkilerin ortaya konulması, salgın araştırmalarında epidemik suşların kaynağının ve yayılım yolunun belirlenmesi, hastane ve toplumsal kaynaklı enfeksiyonların belirlenmesi, dirençli suşların tanımlanması, yaygınlığının belirlenmesi ve enfeksiyon etkenlerinin yayılımının belirlenmesi gibi amaçlarla kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan birçok fenotipik ve genotipik tiplendirme yöntemleri bulunmaktadır (46).

2.11.1. Geleneksel (Fenotipik) Tiplendirme Yöntemleri

- **Biyotiplendirme**

Biyotiplendirme ile bir izolatın biyokimyasal özellikleri, koloni morfolojisi ve çevresel şartlara toleransı (bazı besiyerlerinde, ekstrem pH ve sıcaklıklarda üreme vb.) gibi özgül metabolik aktivite paterni ortaya çıkarılır. Biyotipik özelliklerden klasik olarak sınıflandırmada (taksonomi) ve çoğu klinik mikrobiyoloji laboratuvarında rutin olarak türlerin identifikasyonunda yararlanılmaktadır. Güvenilir, otomatize veya modüler paneller ticari olarak bulunmaktadır. Ancak, bazı mikroorganizmaların ayırımında biyokimyasal reaksiyonların kullanımı yetersiz olmaktadır (47).

- **Faj Tiplendirme**

Bakteriyofajlar, bakteri hücrelerini enfekte ederek çoğu kez bakteri hücrelerinin erimesine neden olan virüsler olarak tanımlanmaktadır. Epidemiyolojik çalışmalarda bakteriler değişik bakteriyofajlara olan duyarlılık ve dirençlerine göre tiplendirilmektedirler. Stafilokoklarla ilgili tiplendirme sistemleri arasında sadece faj tiplendirilmesi standardize edilmiştir. “International Subcommittee on Phage Typing of Staphylococci” tarafından günümüzde kullanımı önerilen 23 adet standart faj vardır. *S. aureus*'un epidemiyolojik analizinde bakteriyofaj tiplendirilmesinin yaygın kullanımı 1940'lı yıllarda olmuştur. Faj tiplendirme yönteminin dezavantajları stok fajların ve kontrol suşlarının ancak referans laboratuvarlarında bulunması, yöntemin zayıf tekrarlanabilirliği ve ayırım gücüdür (48).

- **Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri**

İzolatları antibiyotik duyarlılık benzerliklerine göre gruplandırmak ve direnç gelişimini tespit etmek amacıyla kullanılmaktadır. Genellikle MİK (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu), breakpoint ve disk difüzyon zon değerleri kullanılmaktadır (49). Tiplendirme için antibiyogram sonuçlarının diğer yöntemlerle ve epidemiyolojik verilerle birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir. Bazen benzer olmayan suşlar aynı antibiyogram profilini gösterirken, bazen de enfeksiyon atakları sırasında duyarlılık profilleri değişmektedir (50).

- **Kapsüler Serotiplendirme**

Kapsüler polisakkarit tiplendirmesini *S. aureus*'lar için ilk kez Karakawa ve Vann geliştirmişlerdir. Yapılan bir çalışmada 11 kapsüler tip tanımlanmış olup, *S. aureus* klinik izolatlarının %85-90'ı tip 5 ve 8 olarak bulunmuştur. Yapılan bazı çalışmalara göre diğer bakteriyel özelliklerle kapsüler tipler arasında güçlü bir korelasyon bulunmuştur. Özellikle bazı faj tipleri aynı kapsüler tipi göstermektedirler. MRSA'lar tipik olarak kapsüler tip 5'tir (51).

2.11.2. Moleküler (Genotipik) Tiplendirme Yöntemleri

2.11.2.1. Plazmid Analizi

Bakteriyel plazmidler kendini eşletme yeteneğinde olan ekstrasözomal genetik elementlerdir. Plazmidler değişik mekanizmalarla kazanılırlar ve genellikle proliferen olan türler arasında kalıtsal olarak aktarılırlar. Sıklıkla yapılarında mobil genetik elementler (transpozonlar) bulunan antibiyotik direnç determinantları taşırlar. Yoğun bir antibiyotik kullanımı olduğunda, plazmidler farklı suşlar arasında kolayca

yayırlılar. Plazmid DNA'sının kompozisyonu transpozonların kolayca kaybedilip kazanılması nedeniyle değişir. Plazmid profil analizi teknik olarak basittir ve *S. aureus*'larda uygulanan ilk DNA'ya dayalı tiplendirme yöntemidir. Bu yöntemde öncelikle plazmid DNA'sı ekstrakte edilir ve daha sonra rutin agaroz jel elektroforeziyle bakterinin taşıdığı plazmidlerin sayısı ve büyüklükleri belirlenir. MRSA suşlarının %90'ından fazlasında plazmid bulunmaktadır (52).

2.11.2.2. “Pulsed-Field Gel Electrophoresis” Yöntemiyle Tiplendirme

Pulsed-Field Jel Elektroforezi (PFGE), *S. aureus* ve diğer birçok patojen bakterilerin genetik farklılıklarını araştırmak için moleküler epidemiyolojide kullanılan önemli bir genetik tiplendirme metodudur. 1990 yılından beri PFGE, birçok bakteri için etkili ve çok yönlü genetik tiplendirme metodudur. PFGE temel olarak bozulmamış bakteri hücrelerinin yumuşak agaroz jele gömülmesini daha sonra hücre duvarı lizisini ve kromozomun kesilmesini içermektedir. Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile genomun kesilmesinden sonra agaroz jel elektroforez yöntemi ile ayırma işlemi gerçekleştirilir. Meydana gelen fragmentlerin konvansiyonel elektroforez sistemlerle ayrılması çok zordur. PFGE sistemlerinde bu fragmentleri ayırmak mümkün olabilmektedir. Sistemlerde başlangıç vuruşları kısadır ve elektroforez devam ettiği sürece artar. Bant paternleri bir görüntüleme sistemi aracılığı ile değerlendirilir (47, 53).

2.11.2.3. Polimeraz Zincir Tepkimesine Dayalı Tiplendirme Yöntemleri

Multilokus sekans tiplendirmesi (MLST), DNA dizi analizi, PZR ribotyping, restriction fragment length polymorphism çalışmaları (RFLP), amplified fragment length polymorphism (AFLP), Infrequentrestriction site PZR, integras gen PZR, Amplifiye ribozomal DNA restriksiyon analizi (ARDRA), Arbitrarily-primed PZR (AP-PZR), tekrarlayan sekans-temelli PZR (repetitive sequence- based PZR [rep-PZR])'yi içermektedir (54, 55).

- **Arbitrary-Primed PZR (AP-PZR)**

Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD-PZR) olarak da adlandırılan Arbitrary-primed PZR, rastgele seçilmiş primerler kullanılarak yapılan polimeraz zincir reaksiyonu olup, nükleotit dizi bilgisine sahip olmaksızın polimorfizmin belirlenmesini sağlar. Polimorfizmin belirlenmesi genetik işaretlerin (marker) elde edilmesinde ve genetik harita yapımında kullanılır. Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA'nın temeli yaklaşık 10 nükleotidlik ve nükleotit dizilimi rastgele seçilmiş bir veya birkaç primer ile çoğaltılması esasına dayanır. Kullanılan primerler G-C bakımından zengindir. PZR ile elde edilen ürünlerin jel elektroforezi ile analizi sonucu meydana gelen bantların profillerinin benzerlik/benzemezlik dereceleri belirlenerek polimorfizm hakkında bilgi edinilir (56).

- **Multilokus Sekans Tiplendirme (MLST)**

MLST yöntemi, prensip olarak multilokus enzim elektroforez (MLEE) sistemi ile benzerlik göstermektedir. MLEE den farklı olarak, temel metabolik fonksiyonu kodlayan "housekeeping" genlerdeki değişiklik araştırılmaktadır. Yöntemde; "housekeeping" genlerin arasında kalan bölgelerin PZR ile çoğaltılması yapılmakta olup, oluşan PZR ürünlerinin dizi analizi çıkarılmaktadır. Her bir lokus için, her farklı dizilim farklı bir alel numarası ile gösterilmekte olup böylece suşa ait bir alellik profil tanımlaması yapılmaktadır (57). Her bir alellik profili, dizi tipi (diploid sequence type=DST) olarak belirtilmektedir. Belirlenen alellik profilleri, MLST veri bankasındaki (<http://www.mlst.net>) bilinen alellerle karşılaştırılarak, saptanan alel profilinin diğer ülkelerdeki yaygınlık derecesi konusunda bilgi edinilebilmektedir. "Multilocus sequence typing"deki lokusların her birinde çok sayıda alel bulunmakta ve bu alellerin sayısı MLEE'dekinden daha fazladır. Bu şekilde MLST'de kullanılan altı-yedi lokusla, MLEE'dekine benzer oranda ayırım gücü elde edilmektedir. "Multilocus sequence typing" sonuçlarının kolayca saklanabilmesi, elektronik ortama aktarılabilmesi ve tiplendirilen herhangi bir suşun sonucunu daha önceden var olanlarla karşılaştırma olanağının bulunması, bu yöntemin MLEE yöntemine göre daha üstün

gelen taraflarıdır (58, 59). “Multilocus sequence typing”, hızlı ve uygulaması kolay olan bir yöntemdir. Bu tekniğin en önemli avantajlarından birisi, genomun tamamının dizi analizinin yapılmasına gerek duyulmadan yapılmasıdır. Laboratuvarlar arası tekrarlanabilir sonuçlar alınabilme olasılığı oldukça yüksek bir yöntemdir. Diğer PZR tekniklerinde olduğu gibi MLST yönteminde de, izolatin elde olmadığı durumlarda, doğrudan klinik örnekler üzerinden yapılabilmektedir (57, 59).

- **Rep-PZR**

Rep-PZR yönteminde bakteriyel genom boyunca serpiştirilmiş non-coding (kodlama yapmayan) tekrarlayan sekansları hedefleyen primerler kullanılmaktadır. Bu tekrar elementlerin amplifikasyondaki en önemli avantajı oldukça ayırıcı genomik parmakizi oluşturmalarıdır (60). Bu parmakizi boyutları her bir bakteri suşuna spesifiktir bu sebeple de amplifiye olan fragmanların büyüklüğü farklı suşlar arasında değişkenlik göstermektedir. Amplikonların büyüklük ayrımı ise standart agaroz jel elektroforezi ile yapılabilmektedir. Ortaya çıkan bant paternleri çok çeşitli prokaryotik ve ökaryotik organizmaların DNA parmakizlerinin (fingerprinting) ortaya çıkarılmasında kullanılabilir (61). Bakteri suşlarının alt türlere kadar sınıflandırılmasında ve filogenetik olarak değerlendirilmesinde onaylanmış bir yaklaşım olarak kabul görmektedir (54). Standardize bir kit olup, ticari olarak temin edilebilen tek moleküler suş tiplendirme sistemi olan otomatize DiversiLab sistemi (Spectral Genomics, Inc., Houston, Tex.), Rep-PZR tekniği ile çalışmakta olup, bakteriyel ve fungal izolatların tür düzeyinde ayrımını yapabilmektedir (62). Öncelikle izolatlara DNA ekstraksiyonu yapılmaktadır, daha sonra kullanılan primerler bakteriyel genom boyunca serpiştirilmiş multiple non-coding tekrarlayan sekansları (genellikle 30-500 bp) hedeflemektedir. Dış taraftan bağlanan primerler genellikle tekrarlayan elementler arasını amplifiye etmektedir, diğer taraftan iç kısımdan bağlanan primerler tekrarlayan elementleri (değişken sayıda tandem repeat [arda arda tekrarlar]) amplifiye etmektedir. PZR sırasında farklı büyüklükte ve değişik miktarda (yoğunlukta) birçok DNA amplikonu elde edilmektedir. Manuel bir yöntem olan Rep-PZR, bakterilerin alt tür sınıflandırılmasında ve suş delineasyonunu ortaya çıkarmada kullanılmaktadır. Bununla

birlikte otomatize Rep-PZR yöntemleri de bulunmaktadır. Bunlar: (a) Agilent 2100 bioanalyzer; amplifiye fragmentleri mikrofluidik bir çip üzerinde ayırır ve floresans yoğunluğu ve göç süresine göre tespit eder, (b) Rep-PZR reaktif kitleri ve (c) web tabanlı DiversiLab software (versiyon 2.1.66)'dir. Software analiz sonuçları, test edilen bütün örnekler arasında pair-wise benzerliği hesaplamak için Pearson correlation'u kullanarak proximity matrix'ini oluşturmaktadır. DiversiLab sistemi tarafından oluşturulan sonuçlar, dendogram (izolatlar arasında hiyerarşik olarak ilişkiyi göstermektedir) ve scatterplot (grafiksel çizim, ilişkinin spatial (boyutsal), non-hiyerarşik görüntüsünü sağlamaktadır); jel-benzeri görüntü ve/veya elektroferogramdır. Ticari olarak temin edilebilen bu bileşenlerin, otomasyon, teknik kolaylık, hızlilik ve yoğun mikrobiyoloji laboratuvarlarında çalışanlar için kullanışlı olduğu bildirilmektedir (62, 63).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Grubunu Oluşturan Örnekler

Bu çalışmada Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına Ocak 2011-Ekim 2012 tarihleri arasında 67 hastanın farklı kliniklerden gönderilen çeşitli klinik örneklerinden izole edilen *Staphylococcus spp.* izolatları çalışmaya dahil edildi. Bu izolatlar direnç durumları, klonal ilişkilerinin tespiti ve hastane enfeksiyonu salgınına örnek teşkil etmek üzere, hızlı tanı ve tedavide yol gösterici olması amacı ile değerlendirildi.

Klinik örnekleri kan, yara, idrar, trakeal aspirat kültürü, periton sıvısı, katater, santral venöz katater, doku, burun sürüntüsü, abse oluşturmaktadır. Bu örneklerden herhangi birinde üreme gözlemlendiğinde Gram boyama yöntemiyle boyanarak Gram pozitif olan örnekler tanımlama işlemleri uygulanarak tanıya gidildi. Stafilocok olarak tanımlanan izolatların *S. aureus* ve KNS (koagülaz negatif stafilocok) ayrımı plazma koagülaz, DNase ve mannitollü tuzlu agar testleri ile yapıldı. *S. aureus* olduğu belirlenen suşların Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile sefoksitin duyarlılığına bakıldı. Bu yöntem sonucu 67 izolatın MRSA olduğu belirlendi.

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

3.2.1. Kullanılan Cihazlar

- PZR Cihazı (Thermal Cycler, Eppendorf Mastercycler personal)
- Diversilab Sistemi ve yazılımı (BioMerieux, Fransa)
- Elektroforez Güç Kaynağı (Biometra P30)
- Elektroforez Tankı (Agagel Mini Biometra)

- Derin dondurucu (Uğur, Türkiye)
- Etüv (Memmert, İngiltere)
- Otoklav (Hirayama HV-L Series 50L)
- Nanodrop (NANODROP 2000, Thermo scientific)
- Hassas Terazı (Scaltec)
- Mikropipet seti (HTL LAB, Discovery comfort, 1000µl, 200µl, 100µl, 10µl)
- Buzdolabı (Ariston)
- Distile su cihazı (GFL-2104, Almanya)
- Vortex (Vortex Genie 2)
- Vortex başlığı (MO BIO Vortex Adapter)
- Isı Döngü cihazı (Eppendorf, Mastercycler Gradient 22331, Almanya)
- Agilant chip yükleme istasyonu
- Chip vorteksi (IKA MS 3 Vortexer)
- Agilent 2100 Bioanalyzer

3.2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- dNTP (Fermantes, Almanya)
- Buffer B (Fermantes, Almanya)
- Taq DNA Polimeraz (250 U/ml) (Fermantes, Almanya)

3.2.3. Kullanılan Besiyerleri

- Blood Agar Base (Titan Media, lot: M3G0CG01, Hindistan)
- Mueller Hinton agar (MHA)(OXOID, lot: 654362, İngiltere)
- DNase Test Agar (Merck, Almanya)
- Mannitol Salt Phenol-Red Agar (Merck, Almanya)

3.2.4. Kullanılan Diversilab Kitleri

- DiversiLab DNA Ekstraksiyon Kiti (UltraClean Microbial DNA isolation Kit 50 Purifications) (Catalog: BMX12224-50, LOT: BX11H15, MO BIO Laboratories, BioMerieux SA, Fransa)
- DiversiLab *Staphylococcus* Kiti (Rep-PCR Reagents for DNA Fingerprinting, Lot: SC101101, BioMerieux SA, Fransa)
Kit içeriği: Primer MixA, Rep-PCR MM1, Pozitif kontrol C3, Negatif kontrol
AmpliTaq DNA polymerase, 10X PCR Buffer (Applied Biosystems, Lot: N13173, Roche)
- DNA Reagent ve Supplies
DiversiLab System 25 Chip Kits (Lot: NM06RK01, BioMerieux SA, Fransa)
Kit içeriği: DNA Dye Concentrate, DNA gel matrix, DNA ladder, DNA marker
DiversiLab System labchip (Lot No: ND12BK02, BioMerieux SA, Fransa)

3.3. Örneklerin Ekilmesi ve İdentifikasyonu

Hasta örnekleri %5 kanlı agar besiyerine ekildi ve 35-37°C'de, 18-24 saat inkübe edildi. Kan kültür örnekleri BACTEC kan kültürü şişelerine alınarak, BACTEC 9240 (Becton-Dickinson, USA) otomatize kan kültürü cihazına konuldu. Klinik örneklerden herhangi birinde bakteri üremesi saptandığında, Gram boyası yapılarak Gram pozitif kok olanlara öncelikle katalaz testi yapıldı. Katalaz testi pozitif olan

izolatların *S. aureus* ve KNS ayrımı plazma koagülaz, DNase ve mannitollü tuzlu agar testleri ile yapıldı.

3.3.1. İdentifikasyonda Kullanılan Yöntemler

- **Gram Boyama**

Gram boyamada koloniden bir öze yardımıyla alındı ve lam üzerindeki steril serum fizyolojik ile süspanse edildi. Daha sonra alevde ya da havada tespit edildikten sonra kristal viole boyası ile 1 dakika boyandı ve süre sonunda boyanın fazlası çeşme suyu ile yıkandı. Daha sonra lugol boyasıyla 1 dakika boyandı ve yine boyanın fazlası çeşme suyu ile yıkandı. Üçüncü aşamada alkolde 30 saniye bekletildi ve yıkandıktan sonra en son aşama olarak sulu fuksin boyasıyla 15-20 saniye boyanıp boyanın fazlası çeşme suyu ile yıkandı. Hazırlanan preperatın kuruması beklendikten sonra mikroskopisinde kümeler halinde koloni oluşturan örnekler çalışmaya alındı.

- **Katalaz Testi**

Stafilokok olduğu düşünülen koloniden lam üzerine alınarak üzerine %3'lük H₂O₂ (hidrojen peroksit) damlatıldı. Damlatır damlatmaz hava kabarcığının oluşması pozitif test olarak kabul edildi. Katalaz testi pozitif olan suşlar çalışmaya alındı.

- **Plazma Koagülaz Testi**

Gram pozitif kok olarak boyanan ve katalaz testi pozitif olan tüm izolatlara plazma koagülaz testi uygulandı. Plazma koagülaz testi tüp yöntemi ile yapıldı. Bu testte steril insan plazması kullanıldı. Besiyerinden öze ile alınan birkaç koloni, steril bir

tüpte bulunan 1 ml steril insan plazması içinde karıştırıldı. Daha sonra bu tüp etüvde 37°C’de inkübe edildi. Koagülasyon oluşup oluşmadığı kontrol edildi. Bu süre içinde koagülasyon oluşturan suşlar çalışmaya dahil edildi.

- **DNase Testi**

İzolatlar DNase test agara (Merck, Almanya) ekildikten sonra 35°C’de 18-24 saat inkübe edildi. Ertesi gün koloniler üzerine 1 normal HCl döküldü. Kolonilerin etrafında şeffaf zon meydana getiren izolatlar DNase testi pozitif olarak değerlendirildi.

- **Mannitollü Tuzlu Agar Testi**

DNase pozitif izolatların mannitollü tuzlu agara da ekimleri yapıldı ve etüvde bir gece süreyle inkübe edildi. Ertesi gün mannitollü tuzlu agara ekimleri yapılan tüm örneklerde üreme ve spesifik sarı renk oluşumu gözlemlendi.

- **Metisilin Direncinin Saptanması**

Metisilin direnci, CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) önerileri doğrultusunda Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile belirlendi. Test tüplerinde 0.5 McFarland yoğunluğunda bakteri süspansiyonları hazırlandıktan sonra Mueller-Hinton agar besiyerine yaygın bir şekilde ekildi. Besiyerine sefoksitin (Oxoid) diski konulup bir gece 34°C’deki etüvde inkübe edildikten sonra, sefoksitin için zon çapları 21 mm ve daha küçük olan izolatlar metisiline dirençli olarak kabul edildi.

3.3.2. Moleküler Yöntemler

3.3.2.1. Rep-PZR

Çalışmaya dahil edilen hasta örneklerinden izole edilen 67 MRSA suşu arasındaki klonal ilişkinin varlığı Rep-PZR Diversilab sistemi ile araştırıldı.

- **Rep-PZR Diversilab Sistemi ile Moleküler Tiplendirme**

REP (Repetitive Extragenic Palindromic Element) PZR yönteminde, epidemiyolojisi araştırılan mikroorganizmaların kromozomları üzerinde bulunan, kısa, tekrarlayan ve konservatif yapıları hedef alan kısa primerler kullanılır. Bu bölgelerin birbirlerine yakınlığına bağlı olarak iki ekstrasjenik bölge arasında kalan kısım amplifiye edilir ve elde edilen PZR ürünleri agaroz jel elektroforezinde değerlendirilir. Diversilab sistemine bağlı Rep-PZR uygulaması aşamaları; DNA ekstraksiyonu, Diversilab parmak izi kitleri ile Rep-PZR; Diversilab çipleri ile mikroakışkan elektroforez ve internet tabanlı yazılım programı ile sonuçların değerlendirilmesini takip eden aşamalardan oluşur.

- **DNA İzolasyonu**

DNA izolasyonu UltraClean Microbial DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, ABD) ile üretici firmanın önerdiği DNA izolasyon protokolüne göre yapıldı. DNA ekstraksiyonu yapılacak örnekler kanlı agara tek koloni ekimi yapılarak 35°C’de 18-24 inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda örnekler ikinci kez pasajlanarak elde edilen kültürlerden DNA ekstraksiyonu yapıldı.

• DNA Ekstraksiyonunun Yapılışı

- 300 µl MicroBead çözeltisi, çalışılacak örnek sayısı kadar çıkarılan MicroBead tüplerine dağıtıldı.
- Besiyerindeki bakterilerden 1 µL'lik steril öze ile 2 öze dolusu örnek MicroBead tüpü içerisine alınarak tüp içerisinde bulunan kum taneleri ile karışması sağlandı.
- MicroBead tüpüne 50 µl MD1 çözeltisi eklendi.
- İçerisinde bakteri süspansiyonu bulunan MicroBead tüpleri, MOBIO vorteks adaptörüne takılarak 10 dakika boyunca maksimum hızda vortekslendi.
- Vorteksleme işleminden sonra tüpler 10.000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi.
- Temiz tüplere 100 µl MD2 çözeltisi kondu.
- Santrifüj işlemi sonunda elde edilen tüm süpernatant 100 µl MD2 çözeltisine aktarıldı. Bu aşamada süpernatant ile birlikte MicroBead tüplerindeki kum tanelerinin transfer edilmemesine dikkat edildi.
- Örnekler kısa bir süre vortekslendi ve 15 dakika veya yeterli soğukluğa ulaşıncaya kadar buzdolabına bırakıldı.
- Buzdolabından çıkarılan örnekler 1 dakika 10.000 rpm'de santrifüj edildi.
- Temiz tüplere 450 µl MD3 çözeltisi eklendi.
- Santrifüj sonunda örneklerden 200 µl süpernatant 450 µl MD3 çözeltisine aktarıldı.
- Tüpler kısa bir süre vortekslendi ve santrifüj edildi.
- Süpernatant (yaklaşık 650 µl) temiz bir spin filtreye transfer edildi.
- Spin filtreli tüpler 30 saniye boyunca 10.000 rpm'de santrifüj edildi. Toplama tüpüne akan sıvı atıldı.
- 300 µl MD4 çözeltisi spin filtreye boşaltıldı.
- Spin filtreli tüpler 30 saniye boyunca 10.000 rpm'de santrifüj edildi ve toplama tüpüne akan sıvı atıldı.
- Tüpler, 1 dakika 10.000 rpm'de kuru olarak santrifüj edildi.

- Spin filtreler temiz bir tüpe aktarıldı.
- 35 µl MD5 çözeltisi spin filtrenin ortasına gelecek şekilde boşaltıldı ve 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda spin filtre içeren tüpler 30 saniye 10.000 rpm’de santrifüj edildi.
- Santrifüj işleminden sonra DNA’lar toplama tüpüne aktarıldı ve spin filtre atıldı.
- Toplama tüpünde elde edilen DNA’lar Rep-PZR uygulamasına kadar - 20°C’de bekletildi.

• DNA Miktarlarının Ölçülmesi

Ekstrakte edilen DNA’ların miktarları nanodrop cihazı (NANODROP 2000, Thermo scientific) ile ölçüldü. Miktarı fazla olan örneklerin DNA’ları, Diversilab dilüsyon hesaplama (dilution calculator) programı ile dilüsyon için gereken DNA ve su miktarları hesaplanarak, nükleaz içermeyen steril distile su ile 35 ng/µL olacak şekilde seyreltildi.

• Rep-PZR Uygulaması

Rep-PZR uygulaması Diversilab *Staphylococcus* DNA fingerprinting kit (Biomerieux SA, FRANCE) ile yapıldı. Reaksiyon bileşenlerinin hazırlanması ve termal döngü programının oluşturulması Diversilab sistemi Rep-PZR worksheet programında belirtildiği gibi uygulandı (Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2).

Çizelge 3.1. Rep-PZR amplifikasyonunda bir örnek için hazırlanan reaksiyon karışımı

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar
Rep-PZR MM1	18 µL
GeneAmp 10X PCR Buffer	2,5 µL
Primer Mix	2 µL
AmpliTaq DNA polimeraz	0,5 µL
Ekstraksiyon ürünü 35ng/µL	2 µL
Toplam	25 µL

Çizelge 3.2. Rep-PZR amplifikasyon koşulları

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre (saniye)	Döngü Sayısı
Ön ısıtma (Başlangıç denatürasyonu)	94	120	1
Denatürasyon	94	30	35
Primer bağlanması (annealing)	50	30	
Zincir uzaması (extension)	70	90	
Son uzama (Final extension)	70	180	1
Muhafaza	4	∞	∞

• Jel-Boya Matriks Hazırlanması

- Diversilab DNA chip kiti ile birlikte kullanılan ve buzdolabında muhafaza edilen DNA Reagent & Supplies kiti jel matriksi hazırlamak için buzdolabından çıkartıldı ve oda ısısına gelinceye kadar beklendi.
- Jel ve boya vortekslendi ve kısaca spin yapıldı.
- 1.5 ml'lik bir tüpe 200 µl jel yavaşça pipetlendi ve üzerine 10 µl boya eklendi.
- Karışım homojen olana kadar vortekslendi.
- Karışım kit içinde bulunan spin filtreye transfer edildi.
- Spin filtre 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj işleminden sonra filtre atılarak toplama tüpündeki jel-boya çip yükleme aşamasında kullanıldı.

- **Çip Yükleme**

- DNA Reagent & Supplies kiti oda ısısına gelinceye kadar bekletildi.
- Kit içerisinde bulunan DNA marker ve ladder kısaca vortekslendi, jel boya karışımı vortekslenmeden kullanıldı.
- 9 µl jel boya karışımı çipin üzerindeki siyah daireye alınmış G yükleme kuyusuna pipetlendi.
- Çip yükleme istasyonu şırıngası 1 ml'de iken çip istasyona yerleştirildi ve çipe 30 saniye basınç uygulandı.
- Kalan G kuyularına 9 µl jel boya karışımı pipetlendi.
- Her bir numune kuyusuna 5 µl DNA marker pipetlendi.
- İlgili numune kuyularına 1 µl PCR ürünü eklendi.
- Örnekler çipe yüklendikten sonra çip 1 dakika vortekslendi.

- **Diversilab DNA Labchip Uygulaması**

Diversilab labchip kiti vorteks işleminden sonra Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA) cihazına yerleştirildi ve cihazın programına çip numarası girilerek mikroakışkan çip elektroforezi başlatıldı. Çip elektroforezi sonucunda Rep-PZR parmak izi grafikleri ve bant kalıpları internet tabanlı yazılım programı (DiversiLab, version 2.1.66, bioMerieux, Fransa) ile elde edildi. Örneklerin Rep-PZR profil benzerliklerinin hesaplanması, DiversiLab yazılımı üzerinde Pearson korelasyon katsayısı ve UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) yöntemi kullanılarak yapıldı. Verilerin analizinde, her bir izolat için jel profil görüntüsü, yüzde benzerlik oranları ve dendrogram raporu oluşturuldu.

Rep-PZR parmak izi profil benzerliklerinin yorumlanması Diversilab rehberinde verilen kriterler referans alınarak yapıldı.

- **İzolatların Rep-PZR Parmak İzi İlişkilerinin Değerlendirilmesi**

- 1- Ayırt edilemez örneklerin benzerlik yüzdeleri (benzerlik >97) yüksektir. Bu grupta yer alan örnekler genellikle 97 'nin üzerinde benzerlik gösterirler ve bant farklılığı yoktur. Çalışmada bu grupta yer alan örnekler ana klonun alt tipi olarak (alt klon) olarak değerlendirildi.
- 2- Benzer örneklerin benzerlik oranları (benzerlik $95-97$ arasında, 1-2 bant farkı) biraz düşüktür. Genellikle 95 'in üzerinde benzerlik gösterirler ve 1-2 bant farklılığı vardır. Çalışmada bu özelliğe sahip örnekler ana klon olarak değerlendirildi.
- 3- Farklı örnekler düşük benzerlik oranına (benzerlik <95 ve >2 bant farkı) sahiptir. Benzerlik oranı genellikle 95 'in altındadır ve bant farklılığı fazladır. Bu grupta yer alan örnekler çalışmada farklı klon olarak değerlendirildi.

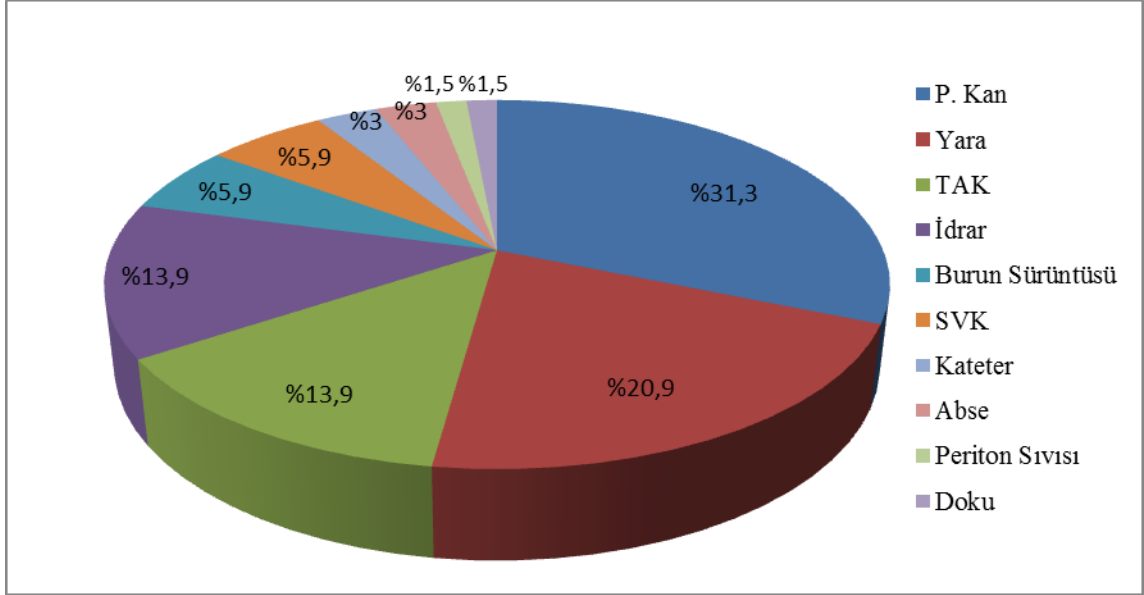
4. BULGULAR

Bu çalışmada, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nde, Ocak 2011-Ekim 2012 tarihleri arasında, 67 hastanın çeşitli klinik örneklerinden izole edilen ve Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile sefoksitin duyarlılığına bakılarak MRSA olduğu tespit edilen 67 MRSA suşu çalışmaya alındı. Bu 67 MRSA suşundan bir tanesinin hastanede çalışan asistan ve hemşirelerin (8 asistan ve 12 hemşire) burun sürüntüsü örneklerinde yapılan taramalar sonucunda MRSA olduğu saptanmıştır (Şekil 4.3' te 3 numaralı sa45 suşu).

Klinik materyalinde MRSA izole edilen 67 hastanın 40 (%59,7)'i erkek ve 27 (%40,3)'si kadındı. Bu hastaların yaş ortalaması 48,2 (minimum:2, maksimum:81) olarak belirlendi. Çizelge 4.1'de bu 67 hastanın MRSA üremesi saptanan klinik materyallerinin dağılımı verilmiştir.

Çizelge 4.1. MRSA suşlarının izole edildiği klinik materyaller

Örnek Türü	Sayı	Yüzde (%)
P.kan	21	31,3
Yara	14	20,9
Trakeal aspirat	9	13,5
İdrar	9	13,5
Burun sürüntüsü	4	5,9
Santral Venöz Katater	4	5,9
Kateter	2	3
Abse	2	3
Periton Sıvısı	1	1,5
Doku	1	1,5
Toplam	67	100



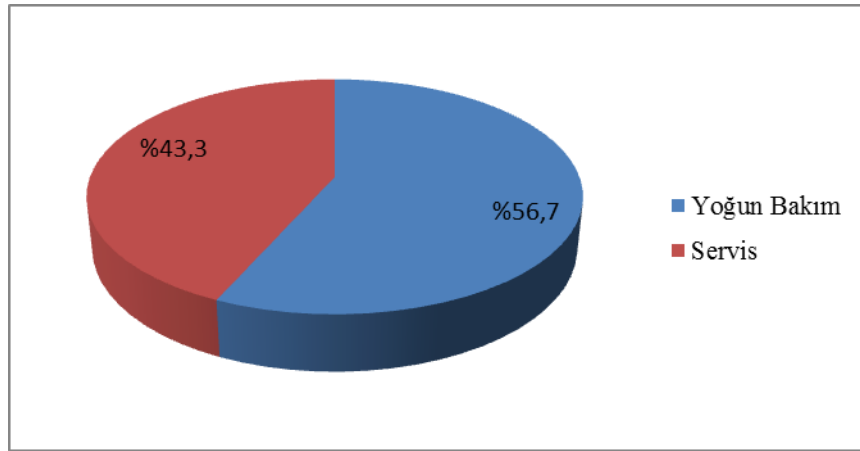
Şekil 4.1. MRSA izole edilen örneklerin dağılım oranları

Çizelge 4.2. MRSA izole edilen hastaların yaş grupları

	Yaş aralığı				
	0-20 yaş	21-40 yaş	41-60 yaş	61-80 yaş	80 yaş üzeri
Sayı	10	13	20	23	1
Yüzde (%)	15	19,4	29,8	34,3	1,5

Çizelge 4.3. MRSA izolatlarının kliniklere göre dağılımı

Bölmeler		Hasta Sayısı	Toplam
Yoğun Bakım	Reanimasyon	14	%56,7
	Genel yoğun bakım	24	
Servis	Genel cerrahi	6	%43,3
	Ortopedi	2	
	Plastik cerrahi	1	
	Hematoloji	2	
	Üroloji	1	
	Kardiyo vasküler cerrahi	1	
	Göğüs hastalıkları	1	
	Kardiyoloji	1	
	Enfeksiyon	3	
	Çocuk hastalıkları	5	
	Beyin cerrahi	4	
	Onkoloji	2	



Şekil 4.2. MRSA izolatlarının kliniklere göre dağılım oranları

4.1. Moleküler Analiz Sonuçları

4.1.1. Rep-PZR Sonuçları

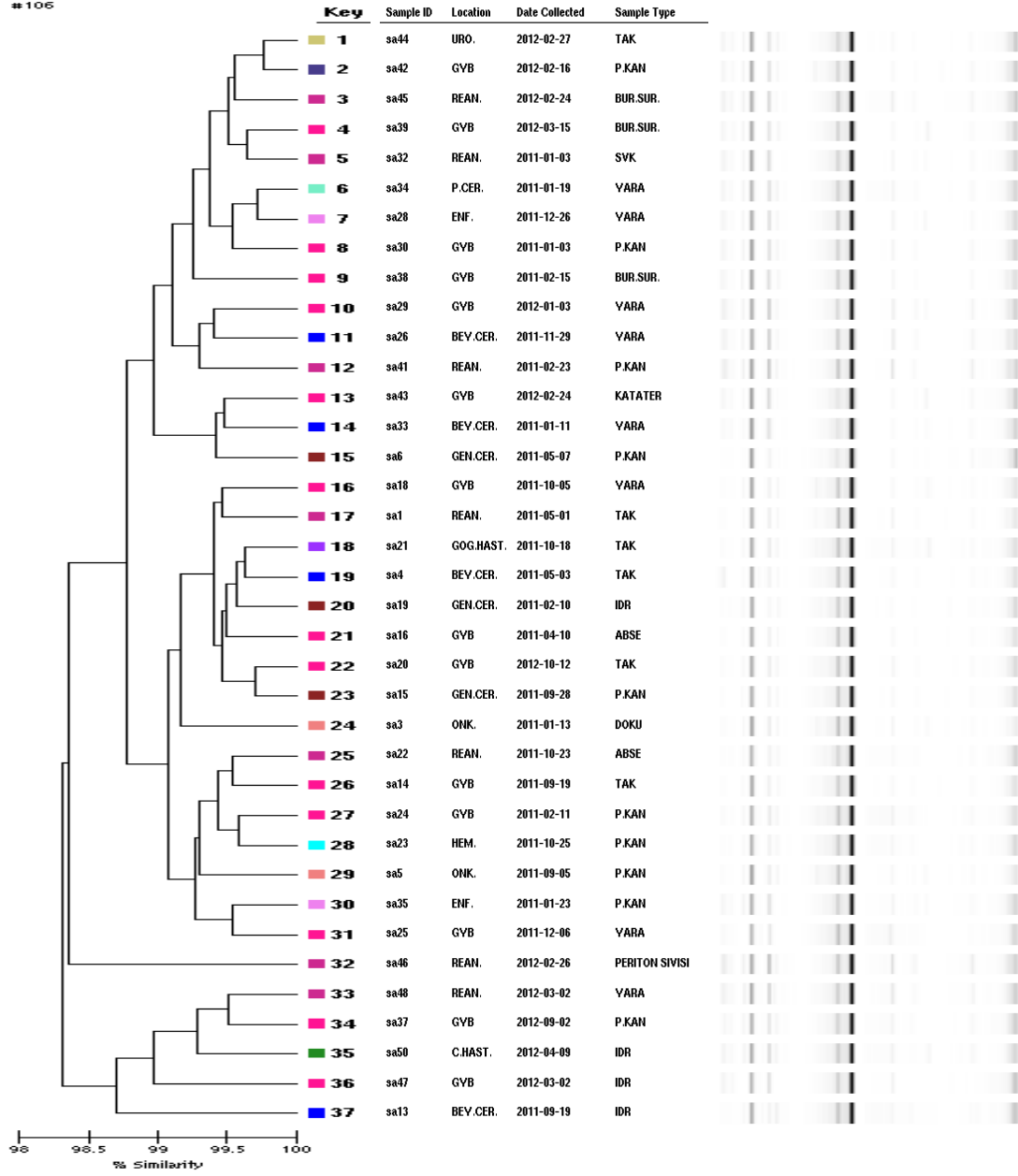
Çalışmada 67 hastadan izole edilen MRSA suşları arasındaki genetik yakınlığın belirlenmesi için Rep-PZR yöntemi kullanıldı. Tüm MRSA suşlarının Rep-PZR tabanlı parmak izi kalıpları, internet tabanlı yorumlama ve yazılım programı ile otomatik olarak elde edildi. Bu analizler sonucu çalışmaya dahil edilen 67 MRSA izolatının 2'si ana klon (A ve B) olmak üzere toplamda 15 farklı klona (A-O) ayrıldığı belirlendi.

A ana klonu MRSA'ların 37 (%55)'sinin toplandığı en büyük klon olarak tespit edildi. B ana klonu 11 suş (%16,5) ile ikinci büyük klondur. Diğer klonlar; C, D, E, F, G, H 2 (%3)'şer suş; I, J, K, L, M, N, O klonları ise 1 (%1,5)'er suş içermektedir. A ana klonuna ait dendrogram (Şekil 4.3) ve benzerlik matrisi (Şekil 4.4) gösterilmiştir.

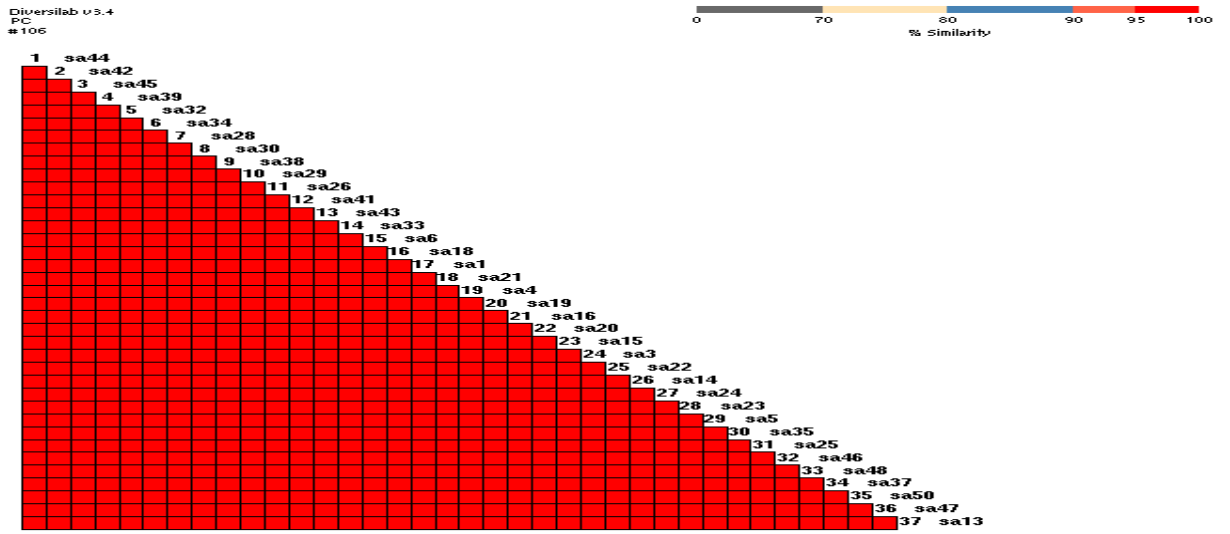
B ana klonuna ait dendrogram (Şekil 4.5) ve benzerlik matrisi (Şekil 4.6) gösterilmiştir. Diğer klonlara (C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O) ait dendrogram (Şekil 4.7) ve benzerlik matrisi (Şekil 4.8) gösterilmiştir.

Rep-PZR sonuçlarına göre 67 MRSA izolatının klonlara ve servislere göre dağılımı Çizelge 4.4'te, Rep-PZR sonuçlarına göre 67 MRSA izolatına ait sekiz farklı klonun klinik materyallere göre dağılımı Çizelge 4.5'te gösterilmiştir.

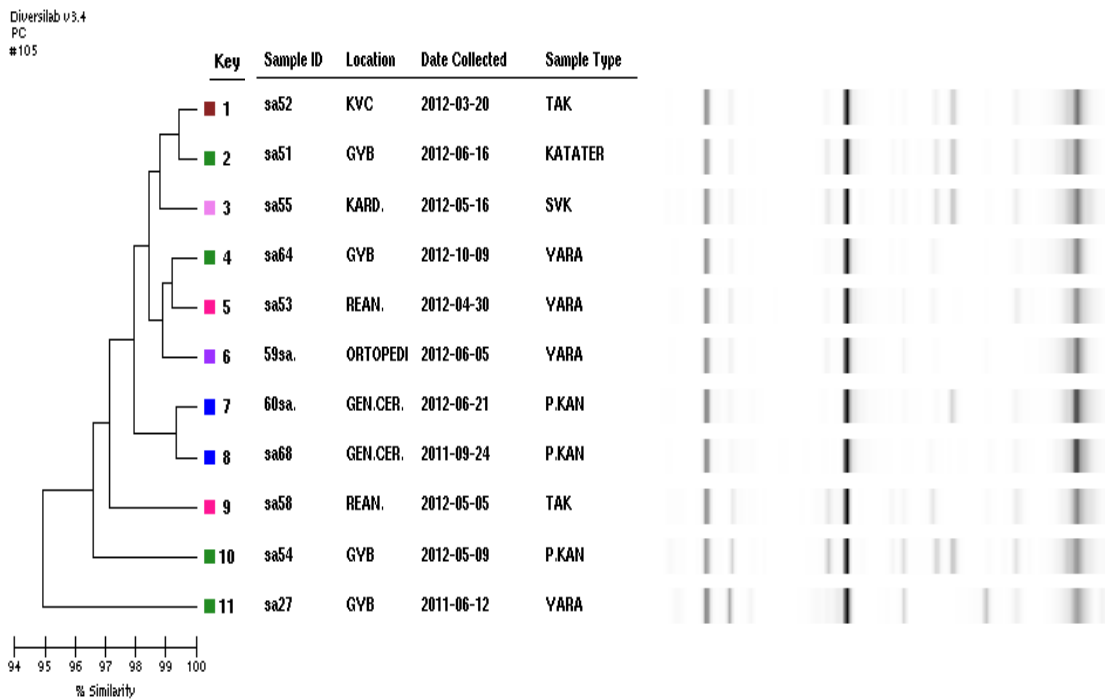
Diversilab v3.4
PC
#106



Şekil 4.3. A ana klonuna ait dendrogram

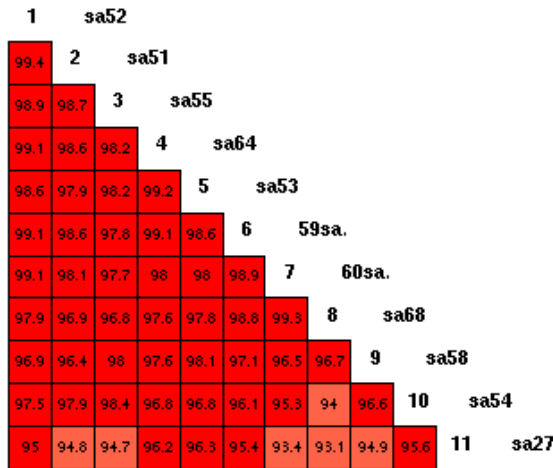
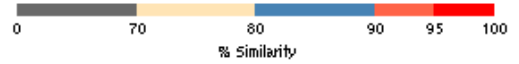


Şekil 4.4. A ana klonuna ait benzerlik matrisi



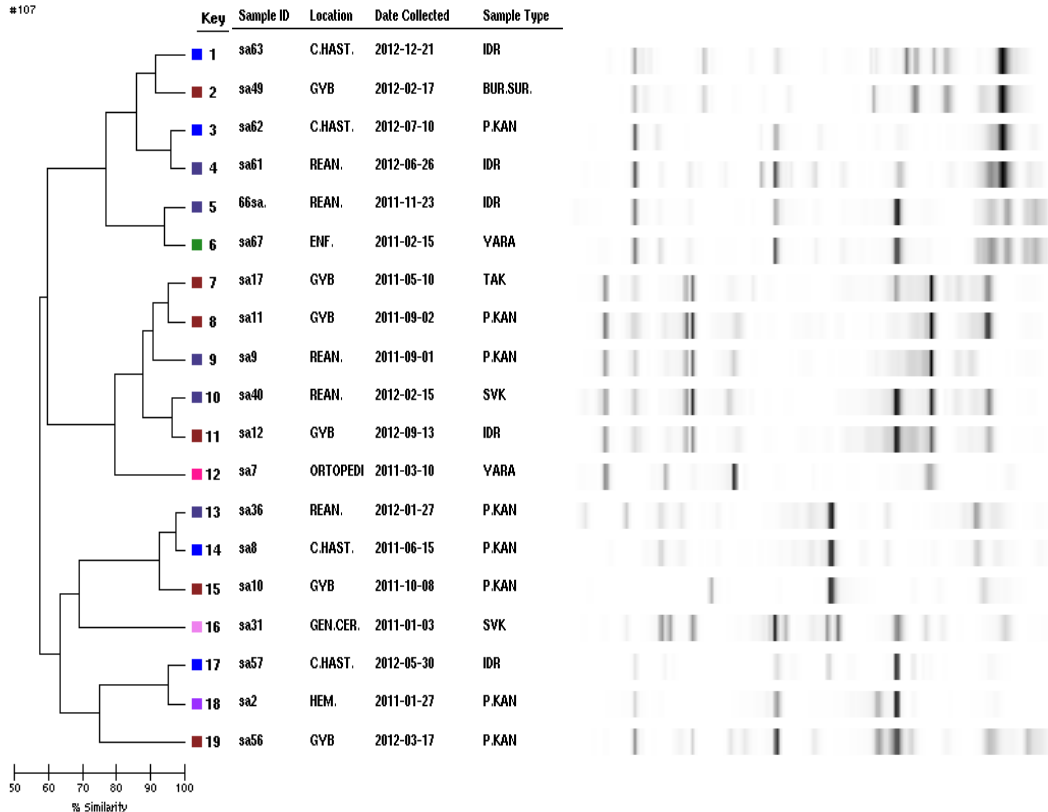
Şekil 4.5. B ana klonuna ait dendogram

Diversilab v3.4
PC
#105

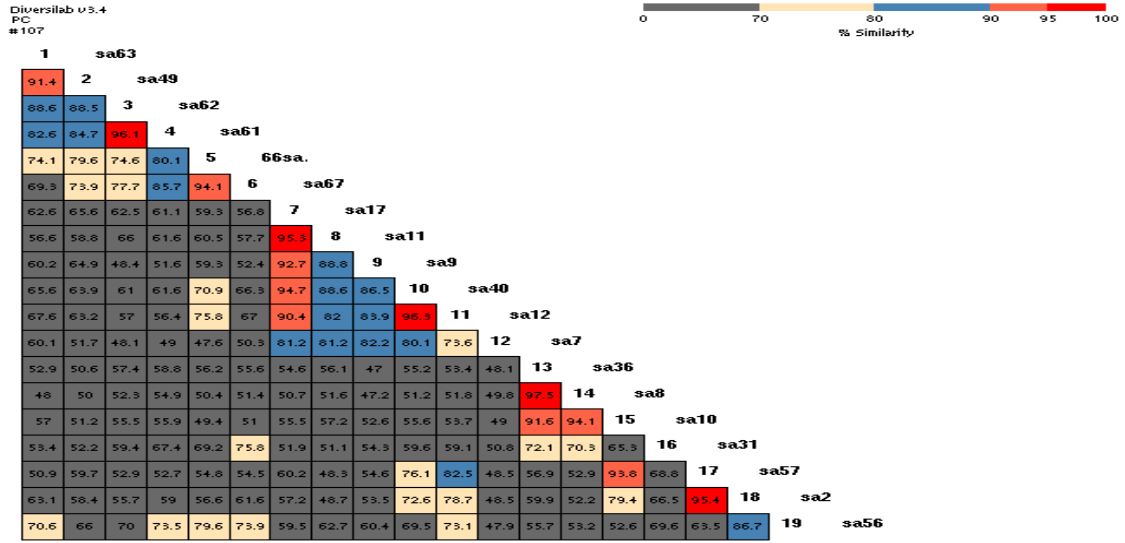


Şekil 4.6. B klonuna ait benzerlik matriksi

Diversilab v3.4
PC
#107



Şekil 4.7. Diğer klonlara ait dendogram



Şekil 4.8. Diğer klonlara ait benzerlik matrisi

Çizelge 4.4. Rep-PZR sonuçlarına göre 67 MRSA izolatının klonlara ve servislere göre dağılımı

SERVİSLER	KLONLAR														
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
GYB	14	4				1			1	2		1			1
KVC		1													
G.CER.	3	2	1												
ÜRO.	1														
B.CER.	4														
Ç.HAST.	1				1		1	1						1	
REAN.	7	2		1			1				1	1		1	
KARD.		1													
ENF.	2			1											
HEM.	1							1							
ORT.		1											1		
P.CER.	1														
ONK.	2														
G.HAST.	1														

GYB: Genel yoğun bakım, KVC: Kardiyovasküler cerrahi, G.CER.: Genel cerrahi, ÜRO: Üroloji
B.CER: Beyin cerrahi, Ç.HAST.: Çocuk hastalıkları, REAN.: Reanimasyon, KARD.: Kardiyoloji
ENF.: Enfeksiyon, HEM: Hemaoloji, ORT.: Ortopedi, P.CER.: Plastik cerrahi, ONK...: Onkoloji
G.HAST.: Göğüs hastalıkları

Çizelge 4. 5. Rep-PZR sonuçlarına göre 67 MRSA izolatına ait sekiz farklı klonun klinik materyallere göre dağılımı

KLİNİK MATERYALLER	KLONLAR														
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
P.kan	10	3					1	1	1	1	1			2	1
Yara	8	4		1									1		
TAK	6	2								1					
İdrar	4			1	1		1	1				1			
Bur.sür.	3					1									
SVK	1	1	1									1			
Kateter	1	1													
Abse	2														
P.sıvısı	1														
Doku	1														

P.kan: Periferik kan, TAK:Trakeal aspirat kültürü, Bur.sür:Burun sürüntüsü, SVK:Santral venöz katater, P.sıvısı:Periton sıvısı

5. TARTIŞMA

Hastane enfeksiyon etkeni olarak önemli bir yere sahip *Staphylococcus* cinsi bakteriler *Micrococcaceae* ailesi içerisinde yer alırlar. *Staphylococcus*, *Micrococcaceae* ailesinin klinik açıdan en önemli grubudur. İnsanda en sık enfeksiyon etkeni olarak izole edilen Stafilokoklar; *S. aureus*, *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus*'dur (12). Hastane ve toplum kaynaklı ciddi enfeksiyonların en önemli nedenlerinden biri olan *S. aureus*; deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, bakteriyemi, endokardit, menenjit, perikardit, pulmoner enfeksiyonlar gibi önemli sağlık problemlerine yol açar (2). *S. aureus* günümüzde kullanılan birçok antibiyotiğe hızla direnç kazanması ve bu sebeple eskiye oranla daha sık enfeksiyonlara sebep olması nedeniyle insan enfeksiyonlarında öncelikli patojen olarak yer almaktadır (13).

1960 yılında metisilin kullanıma girmesiyle birlikte bir yıl içerisinde metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) suşları saptanmaya başlamıştır. MRSA günümüzde tüm dünyada hastane enfeksiyonu etkenleri arasında önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır (29). Hastane enfeksiyonu etkeni olan MRSA suşları, enfekte hastalar ya da bu suşlarla kolonize olan hastane personeli aracılığıyla kolaylıkla yayılarak tedavisi güç enfeksiyonlara neden olmaktadır (6). MRSA bakteriyemilerinde, metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus* (MSSA) bakteriyemilerine göre ölüm riskinin 3 kat daha fazla olduğunu gösteren çalışmalar vardır. Yoğun bakım birimlerinde; MRSA bulaşan hastalar daha uzun süre yatar, mortalite daha yüksektir, daha fazla antibiyotiğe ihtiyaç duyarlar. Dünyanın birçok bölgesinde MRSA'nın artan prevalansı, nozokomiyal patojen olarak önemine yeniden dikkatleri çekmiştir (30). Stafilokoklar epidemiyeye neden olurlar ve halk sağlığı açısından büyük önem taşımaktadırlar (3). MRSA yayılımını önlemede öncelikli olarak stafilokoklara bağlı enfeksiyon kaynağını saptamak ve yok etme çabaları yer almaktadır (5). Moleküler tiplendirme yöntemleri ise MRSA epidemiyolojisi ile ilgili yeni bilgilerin elde edilmesinde, toplum ve hastane kökenli MRSA izolatları arasındaki genetik ayrımın ortaya çıkarılmasında önemli rol

oynamıştır (7). Bu genetik farklılıkların ortaya çıkarılmasıyla hastane enfeksiyon kaynağı tespit edilecek ve enfeksiyona bağlı ekonomik kayıplarda önemli derecede azalma olacaktır (6).

Sultan ve ark. (64)'nin 2008 yılında yapmış olduğu çalışmada çeşitli servislerden gönderilen hasta örneklerinden 66 MRSA suşu izole edilmiştir. İncelenen MRSA'ların %28,7'si yara, %19,6'sı kan, %18,1'i bronkoalveoler lavaj, %9'u balgam, %6'sı pü, %3'ü trakeal aspirat, %3'ü eklem sıvısı, %3'ü doku biyopsisi, %3'ü burun kültürü, %1,5'i periton sıvısı, %1,5'i plevra sıvısı, %1,5'i beyin-omurilik sıvısı, %1,5'i kateter kültürlerinden izole edilmiştir. Özel ve ark. (65)'nin yapmış olduğu çalışmada MRSA olarak tiplendirilen 30 suşun 15'i yara yeri, 5'i solunum yolu örnekleri (bronkoalveolar lavaj (BAL), trakeal aspirat) 4'ü idrar, 3'ü abse materyali, 3'ü kan kültürü örneklerinden izole edilmiştir. Namıduru ve ark. (66)'nin yapmış olduğu çalışmada MRSA'nın en sık izole edildiği klinik materyal yara ve trakeal aspirat olarak saptanmıştır. Kapuğası ve ark. (67)'nin yapmış olduğu çalışmada ise MRSA suşları %70 oranında yaradan ve kateterlerden izole edilmiştir. Bizim çalışmamızda MRSA'ların %31,3'ü kan, %20,9'u yara, %13,5'i trakeal aspirat, %13,5'i idrar ve %20,8'i de diğer çeşitli klinik örneklerle aittir. Sultan ve ark.'nin yapmış olduğu çalışma ile bizim çalışmamızda benzer oranlarda kan ve yara kültürlerinden MRSA izole edilmiştir.

Türkiye'de yapılan çalışmalarda yoğun bakım ünitelerinde enfeksiyon etkeni olan *S. aureus* suşlarında %68-90 oranlarında metisilin direnci bildirilmektedir (68). Duman ve ark. (69)'nin 173 *S. aureus* izolatından %63 oranında MRSA saptadıkları çalışmada örneklerin 44'ü (%25,4) yoğun bakım hastalarına, 45'i (%26) cerrahi bölüm hastalarına ait olduğu görülmüştür. Bizim çalışmamızda 67 MRSA suşunun %56,7'si GYB ve reanimasyon bölümlerinde yatan hastalardan izole edildi. Namıduru ve ark.'nin yapmış olduğu çalışmada MRSA suşlarının %76,5'i cerrahi yoğun bakım ünitesinden izole edilmiştir. Kapuğası ve ark.'nin yapmış olduğu çalışmada MRSA en çok reanimasyon kliniğinde saptanmıştır.

Hastane enfeksiyon etkeni olarak MRSA izolatları arasındaki klonal ilişkiyi tespit etmeye yönelik yapmış olduğumuz bu çalışmada, 67 MRSA suşu Rep-PZR yöntemi kullanılarak genotiplendirilmiş ve bu suşların birbirleriyle klonal ilişkileri karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda, Rep-PZR analizi ile 67 MRSA suşu iki ana klon [A (37 alt tip), B (11 alt tip)] ve 13 farklı klon (C-O) olmak üzere toplam 15 farklı klon

tespit edildi. MRSA'nın nozokomiyal enfeksiyonlarda karşılaşılan önemli bir patojen olduğu birçok çalışmada raporlanmış ve desteklenmiştir. Rep-PZR yöntemi son yıllarda Diversilab sistemi ile otomatik formata adapte edilmiştir. Bu sayede veri hazırlama, raporlama ve arşivleme kolaylığı sağlanmıştır.

A klonu, genel yoğun bakım (GYB) ünitesi örneklerinin %58 (14/24)'inden, reanimasyon örneklerinin %50 (7/14)'sinden, genel cerrahi servisinden gönderilen örneklerin %50 (3/6)'sinden, beyin cerrahi örneklerinin %100 (4/4)'ünden, üroloji servisinden gönderilen örneklerin %100 (1/1)'ünden, çocuk hastalıkları servisinden gönderilen örneklerin %20 (1/5)'sinden, enfeksiyon servisinden gönderilen örneklerin %66 (2/3)'sından, hematoloji servisinden gönderilen örneklerin %50 (1/2)'sinden, ortopedi servisinden gönderilen örneklerin %50(1/2) sinden, plastik cerrahi servisinden gönderilen örneklerin %100 (1/1)'ünden, onkoloji servisinden gönderilen örneklerin %100 (2/2)'ünden ve göğüs hastalıkları servisinden gönderilen örneklerin %100 (1/1)'ünden izole edilmiştir.

Güler ve ark. (6)'nın Rep-PZR analizi sonunda 3 ana klon [A (4 alt tip), B (2 alt tip) ve C (2 alt tip)] ve sekiz farklı klon (D-K) olmak üzere toplam 11 klon tespit etmiş; A klonunun baskın tip olduğu belirlenmiştir. Toplam 100 MRSA suşunun %78'inin A klonuna ait olduğu, B klonuna ait 11 suş, C klonuna ait 3 suş ve diğer klonlara (D, E, F, G, H, İ, J, K) ait ise birer suş saptanmıştır. A klonu, dahiliye yoğun bakım ünitesi örneklerinin %93,3 (14/15)'ünden, enfeksiyon hastalıkları servisinden gönderilen örneklerin %66,6 (10/15)'sından ve hematoloji-onkoloji servisinden toplanan örneklerin %91 (10/11)'inden izole edilmiştir. Bu suşların izolasyon tarihlerinin de birbirine yakın olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, çalışma sürecinde hastane genelinde A klonunun hakim olduğu ve MRSA suşlarının klonal yayılım gösterdiği ortaya konmuş ve Rep-PZR yönteminin epidemiyolojik çalışmalarda kullanılabilir, hızlı ve başarılı bir yöntem olduğu düşünülmüştür. Sonuç olarak, bizim çalışmamız da Güler ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmayı desteklemektedir.

2009 yılında Tenover ve ark. (70) tarafından Gürcistan'da, 105 MRSA izolatu Diversilab sistemi kullanılarak tiplendirilmiştir. Salgın oluşturmuş MRSA suşlarından 4 benzersiz MRSA izolatu kümesi daha önceden Diversilab sistemi tarafından tiplendirilmiştir. Diversilab sistemi 105 MRSA izolatını 11 kümeye ve 6 benzersiz bant

şeklinde ayırmıştır. Church ve ark. (71) tarafından 2010 yılında Kanada’da 54 MRSA izolatı çalışılmış ve %95 Rep-PZR benzerlik indeksi kullanılarak toplamda 54 izolatın 47 (%87)’sinin küme oluşturduğu belirtilmiştir. Ross ve ark. (72) 2005 yılında yaptıkları bir çalışmada benzerlik indeksini %85 olarak kullanılmışlar ve genel olarak salgın oluşturan izolat kümeleri ile salgın oluşturmayanları karşılaştırdıklarında 109 izolatın 91 tanesini salgın kümelerinin oluşturduğunu (%85) belirtmişlerdir. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada ise 67 MRSA izolatından 48 tanesinin salgın oluşturduğu ve bu 48 izolatından A ve B ana klonlarını oluşturduğu görülmüştür. Babouee ve ark. (73)’nin 2011 yılında isviçrede yapmış oldukları bir çalışmada, 1994-2006 yılları arasında izole edilen toplam 106 MRSA suşu analiz edilmiştir. Diversilab sistemi %95 benzerlik indeksiyle 106 MRSA suşunu 10 ayrı kümeye ve 8 benzersiz bant şeklinde ayırmıştır.

Türlerin ayrımı, salgının olup olmadığının tespitinde ve hastane enfeksiyonları kontrol araştırmaları için önemli bilgiler sağlamaktadır. Hastane enfeksiyonuna neden olan mikroorganizmanın kökeninin araştırılması gerekmektedir. Suşlar arasındaki klonal ilişkilerin belirlenmesiyle de, enfeksiyon kaynağı yayılma yolu tespit edilerek uygun korunma önlemleri alınabilir. Bu sayede önlem alınarak, hastane enfeksiyonlarının kontrolü sağlanır.

Sonuç olarak, çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz verilere göre hastanemizdeki MRSA enfeksiyonlarının yüksek oranlarda aynı klona ait suşlar tarafından oluşturulduğu ortaya konmuştur. Servisler arasında ya da servis ve yoğun bakım üniteleri arasında hasta transferlerinin sık olması MRSA klonlarının yayılmasını arttırmaktadır. A ve B klonuna ait izolatların hastanemizde yaygın olduğu ve özellikle yoğun bakım ünitelerinde bulunduğu tespit edilmiştir. Klonal ilişkiyi araştırmak için kullandığımız Rep-PZR Diversilab sisteminin epidemiyolojik çalışmalarda klonal ilişkili izolatların yakınlığını belirlemede; klonal olarak birbirinden uzak suşları ayırmada başarılı olduğu düşünülmüştür.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak, yaptığımız bu çalışma ile hastanemizdeki çeşitli servislerde ve yoğun bakım ünitelerinde yatan hastaların klinik materyallerinden izole edilen MRSA suşlarının Rep-PZR yöntemiyle genotiplendirilerek aralarında klonal ilişki olup olmadığı araştırıldı. Tüm MRSA suşlarının Rep-PZR tabanlı parmak izi kalıpları, internet tabanlı yorumlama ve yazılım programı ile otomatik olarak elde edildi. Bu analizler sonucu çalışmaya dahil edilen 67 MRSA izolatının 2'si ana klon (A ve B) olmak üzere toplamda 15 farklı klona (A-O) ayrıldığı belirlendi. A ana klonu MRSA'ların 37 (%55)'sinin toplandığı en büyük klon olarak tespit edildi. B ana klonu 11 suş (%16,5) ile ikinci büyük klondur. Diğer klonlar; C, D, E, F, G, H 2 (%3)'şer suş; I, J, K, L, M, N, O klonları ise 1 (%1,5)'er suş içermektedir. Belirgin olarak A ve B klonlarının yoğun bakım ve reanimasyon ünitelerinden izole edilen MRSA suşlarından elde edilmesi dikkat çekicidir. Ayrıca çalışmadaki 67 örneğin 48'inin %71,5 oranında A ve B klonuna ait olması da hastane enfeksiyonu ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir. Elde edilen klonlara göre hastalar arasında suşların bulaş derecesinin yüksek olduğu ve aynı klonun hastane ortamında uzun süre kalabildiği görülmektedir. Yaptığımız moleküler tiplendirme ile hastanemizde daha etkili bir korunma ve kontrol önlemlerinin alınması gerekliliği ortaya konulmuştur. Ayrıca benzer çalışmaların ülkemizde farklı hastanelerde gerçekleştirilerek geniş bir veri tabanı oluşturulması ve MRSA'ların saptanmasının yanı sıra yaygın olan klonların belirlenmesi gerekliliğini düşünmekteyiz.

Moleküler tiplendirme yöntemlerinin rutin uygulamada kullanımı, genellikle bu yöntemlerin uzun sürmesi, maliyetinin yüksek olması ve yoğun iş gücü gerektirmesinden dolayı pek yaygın değildir. Buna rağmen hastane salgınlarına yönelik epidemiyolojik çalışmalarda genotiplendirme ve klonal ilişki tespitinde Rep-PZR Diversilab yöntemi tercih edilecek yöntemlerden biri olabilir. Söz konusu yöntem gerek hızı gerekse uygulama kolaylığı ile epidemilerin erken dönemde saptanmasında faydalı olacaktır. Ayrıca elde edilecek verilerin toplanması epidemiden şüphelenilen durumlarda geriye dönük çalışma yapma imkanını da sağlayacaktır.

7. KAYNAKLAR

- 1- **Chambers HF.** Meticillin Resistance in Staphylococci. Molecular and Biochemical Basis and Clinical Implications. *Clin Microbio Rev*, **1997**; 10: 781-791.
- 2- **Randrianirina F, Soares JL, Ratsima E, Carod JF, Combe P, Grosjean P, Richard V, Talarmin A.** In vitro activities of 18 antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus* isolates from the Institute Pasteur of Madagascar. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, **2007**; 6:5.
- 3- **Cengiz AT.** Stafilokokklar. In: Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş kitabevi, **2003**: 339-348.
- 4- **Rubin RJ, Harrington CA, Poon A, Dietrich K, Greene JA, Moiduddin A.** The economic impact of *Staphylococcus aureus* infection in New York City hospitals. *Emerg Infect Dis*, **1999**; 5(1): 9-17.
- 5- **Deplano A, Vaneechoutte M, Verschraegen G, Struelens MJ.** Typing *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains by PCR analysis of inter-IS256 spacer length polymorphisms. *J Clin Microbiology*, **1997**; 35(10): 2580-2587.
- 6- **Guler İ, Kılıç H, Atalay MA, Percin D, Ercal BD.** Klinik Örneklerden İzole Edilen Hastane Kaynaklı Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* Suşlarının rep-PCR ile Genotiplendirilmesi. *Mikrobiyol Bul*, **2011**; 45(4): 581-591.
- 7- **Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG.** The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci USA*, **2002**; 99(11): 7687-7692.
- 8- **Baba T, Takeuchi F, Kuroda M, Yuzawa H, Aoki K, Ouchi A, Naqai Y, Iwama N, Asano K, Naimi T, Kuroda H, Cui L, Yamamoto K, Hiramatsu K.** Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet*, **2002**; 359(9320):1819–1827.
- 9- **te Witt R, Kanhai V, van Leeuwen WB.** Comparison of the DiversiLab system, Pulsed-FieldGel Electrophoresis and Multi-Locus Sequence Typing for the characterization of epidemic reference MRSA strains. *Journal of Microbiological Methods*, **2009**; 77: 130–133.
- 10- **Shopsin B, Kreiswirth BN.** Molecular epidemiology of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, *Emerg. Infect. Dis*, **2001**;7(2): 323-326.
- 11- **Ayliffe GAJ.** The progressive intercontinental spread of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis*, **1997**; 24 (1): 74–79.
- 12- **Bilgehan H.** Staphylococcus. Özel Bakterioloji ve Bakteri Enfeksiyonları. İzmir: Barış Yayınları, **2000**: 240-266.

- 13- **Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA.** Staphylococcus and Related Organisms. Medical Microbiology, Mosby, **1998**:175-188.
- 14- **Aydın N, Gültekin B, Eyigör M, Gürel M.** Klinik Örneklerimizden İzole Edilen Stafilocokların Antibiyotik Direnci. *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, **2001**; 2(3) : 21-26.
- 15- **Bilgehan H.** Klinik Mikrobiyolojik Tanı. 4. Baskı. İzmir: Barış Yayınları, **2004**:495-496.
- 16- **Harris LG, Foster Sj, Richards RG.** An Introduction to *Staphylococcus aureus*, and Techniques For Identifying And Quantifying *S.aureus* Adhesins In Relation To Adhesion To Biomaterials. *European Cells and Materials*, **2002**; (4): 39-60.
- 17- **Götz F, Bannerman T, Schleifer KH.** The Genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*. Prokaryotes. **2006**; 4: 5-75.
- 18- **Ulusoy S, Usluer G, Ünal S.** *Staphylococcus aureus*: Mikrobiyoloji, Patogenez ve Epidemiyoloji. In: Gram Pozitif Bakteri İnfeksiyonları. Bilimsel Tıp, Ankara; **2004**: 9-71.
- 19- **Pattee PA and Neveln DS.** Transformation analysis of three linkage groups in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, **1975**; 124: 201-211.
- 20- **Salmenlinna S.** Molekular Epidemiology of Meticillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Finland. Academic dissertation. Faculty of Medicine, University of Helsinki, Haartman Institute. Helsinki, **2002**:14-44.
- 21- **Bayer AS, Ramos MD, Menzies BE.** Hyperproduction of alpha-toxin by *Staphylococcus aureus* results in paradoxically reduced virulence in experimental endocarditis: A host defence role for platelet microbicidal proteins. *Infect Immun*, **1997**; 65: 4652-4660.
- 22- **Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM.** Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev*, **2000**; 13: 16-34.
- 23- **Tünger A.** *Staphylococcus aureus*: mikrobiyoloji, patogenez ve epidemiyoloji. Önemli ve sorunlu Gram-pozitif bakteri infeksiyonları. **2004**; 9-22.
- 24- **Lindsay JA, Ruzin A, Ross HF, Kurepina N, Novick RP.** The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*, **1998**; 29(2): 527-543.
- 25- **Dündar V, Öztürk Dündar D.** Stafilocok İnfeksiyonları. İn: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul; **2002**: 1507-1516.

- 26- **Marques MB, Weller PF, Parsonnet J, Ransil BJ, Nicholson-Weller A.** Phosphatidylinositol-specific phospholipase C, a possible virulence factor of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, **1989**; 27(11): 2451-2454.
- 27- **Peacock SJ.** *Staphylococcus*. In: Borriello SP, Murray PR, Funke G. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections 10th Ed. Hodder Arnold, London, United Kingdom, **2005**; 771-832.
- 28- **Allison H, Bartlett MD and. Hulten KG.** *Staphylococcus aureus* Pathogenesis. Secretion Systems, Adhesins, and Invasins, *Pediatr Infect Dis J*, **2010**; 29: 860–861.
- 29- **Şengöz G, Yıldırım F, Kart KY, Şengöz A, Nazlıcan Ö.** Stafilocok suşlarının fusidik asit ve çeşitli antibiyotiklere direnci, *Ankem Derg*, **2004**; 18(2): 105-108.
- 30- **Durmaz B.** Hastanede MRSA Kontrol Politikası, MRSA Kolonizasyonunun Eradikasyonu, Hastane İnfeksiyonları Dergisi, **1999**; 3: 196-201.
- 31- **Otkun M, Akata F, Kocagöz S, Tatman-Otkun M, Çetinkaya Y, Teker B, DüNDAR V, Ünal S.** Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus*'un Kantitatif Antibiyogram ve "Arbitrarily Primed" PCR (AP-PCR) Yöntemleriyle Epidemiyolojik Sürveyansı. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi*, **1997**; 1: 106-115.
- 32- **Francis JS, Doherty MC, Lopatin U, Johnston CP, Sinha G, Ross T, Cai M, Hansel NN, Perl T, Ticehurst JR, Carroll K, Thomas DL, Nuermberger E, Bartlett JG.** Severe community-onset pneumonia in healthy adults caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the Panton–Valentine leukocidin genes. *Clin Infect Dis*, **2005**; 40:(1)100–107.
- 33- **Shirliff ME, Mader JT.** Acute septic arthritis. *Clin Microbiol Rev*, **2002**; 15: 527–544.
- 34- **Kavukçu S, Koşay C, Çakmakçı H, Öztürk Y, Anal Ö.** Primary Pyomyositis Mimicking Transient Synovitis of the Hip in a Child: A Case Report, *Turk J Rheumatol*, **2012**; 27(2): 128-131.
- 35- **Fowler VG Jr, Miro JM, Hoen B, Cabell CH, Abrutyn E, Rubinstein E, Corey GR, Spelman D, Bradley SF, Barsic B, Pappas PA, Anstrom KJ, Wray D, Fortes CQ, Anquera I, Athan E, Jones P, Van der Meer JT, Elliott TS, Levine DP, Bayer AS.** *Staphylococcus aureus* endocarditis: a consequence of medical progress. *JAMA*, **2005**; 293(24): 3012–3021.
- 36- **Tice AD, Hoaglund PA, Shoultz DA.** Risk factors and treatment outcomes in osteomyelitis. *J Antimicrob Chemother*, **2003**; 51: 1261–1268.
- 37- **Becker K, Friedrich AW, Lubritz G, Weilert M, Peters G, Von Eiff C.** Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains of *Staphylococcus aureus* isolated from blood and nasal specimens. *J Clin Microbiol*, **2003**; 41: 1434–1439.

- 38- **Ladhani S, Joannou CL, Lochrie DP, Evans RW, Poston SM.** Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome. *Clin Microbiol Rev*, **1999**; 12: 224–242.
- 39- **Berger-Bachi B, Rohrer S.** Factor influencing methicillin resistance in Staphylococci. *Arch Microbiol*, **2002**; 178: 165-171.
- 40- **Çiftci İH, Altındış M, Çetinkaya Z, Aşık G, Aktepe OC.** Klinik Örneklerden İzole Edilen Stafilocoklarda *mecA* Varlığının Araştırılması. *Kocatepe Tıp Dergisi, The Medical Journal of Kocatepe*, **2009**; 10: 17-20.
- 41- **Katayama Y, Takeuchi F, Ito T, Ma XX, Ui-Mizutani Y, Kobayashi I, Hiramatsu K.** Identification in methicillin-susceptible *Staphylococcus hominis* of an active primordial mobile genetic element for the staphylococcal cassette chromosome *mec* of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **2003**; 185: 2711–2722.
- 42- **Kluytmans-Vandenbergh MF, Kluytmans JA.** Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: current perspectives. *Clin Mikrobiol Infect*, **2006**; 12(1): 9-15.
- 43- **Bayar S, Hocaoğlu Z, Dıġrak M.** Boğaz Kültürlerinden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarının Bazı Fizyolojik, Biyokimyasal Özellikleri ve Antibiyotik Duyarlılıklarının İncelenmesi. *KSU Journal of Science and Engineering*, **2008**; 1: 11.
- 44- **Willke A.** Stafilocoklarda metisiline direnç mekanizmaları ve belirlenmesi. *Ankem Derg*, **1992**; 6(2): 288-291.
- 45- **McDougal L, Thornsberry C.** The role of β -lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillins and cephalosporins. *J. Clin. Microbiol.* **1986**; 23: 832-839.
- 46- **Durmaz R.** Dirençli Bakteri Suşları Arasındaki Klonal İlişkinin Belirlenmesi. *Ankem Derg.* **2007**; 21(2): 178-183.
- 47- **Tenover FC, Arbeit RD, Archer G, Biddle J, Byrne S, Goering R, Hancock G, Hebert GA, Hill B, Hollis R, Jarvis WR, Kreiswirth B, Eisner W, Maslow J, McDougal LK, Miller JM, Mulligan M, Pfaller MA.** Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **1994**; 32: 407-415.
- 48- **Schlichting C, Branger C, Fournier JM, Witte W, Boutonnier A, Wolz C.** Typing of *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis, zymotyping, capsular typing, and phage typing: resolution of clonal relationships. *JCM.* **1993**; 31: 227-232.
- 49- **Weller TMA.** Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* typing methods: which should be the international standart?. *J. Hosp. Infect.* **2000**; 44: 160-172.
- 50- **Rossney AS, Coleman DC, and Keane CT.** Evaluation of an antibiogram-resistogram typing scheme for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.* **1994**; 41: 441-447.

- 51- **Branger C, Goulet P.** Correlation between esterase electrophoretic types and capsular polysaccharide types 5 and 8 among methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *JCM*, **1990**; 28: 150-151.
- 52- **Demirpek K.** Toplumda Genç Erişkin Yaş Grubu Erkek Bireylerde Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* Burun Taşıyıcılığı Prevalansının Saptanması ve Moleküler Tip Tayini. Uzmanlık Tezi. İstanbul, **2006**.
- 53- **Matushek MG, Bonten MJ, and Hayden MK.** Rapid preparation of bacterial DNA for pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol*, **1996**; 2598–2600.
- 54- **Healy M, Huong J, Bittner T, Lising M, Frye S, Raza S, Schrock R, Manry J, Renwick A, Nieto R, Woods C, Versalovic J, Lupski JR.** Microbial DNA typing by automated repetitive-sequence-based PCR. *J Clin Microbiol*, **2005**; 43(1): 199-207.
- 55- **Malachowa N, Sabat A, Gniadkowski M, Krzyszton-Russjan J, Empel J, Miedzobrodzki J, Kosowska-Schick K, Appelbaum PC and Hryniewicz W.** Comparison of multiple-locus variable tandem-repeat analysis with pulsed-field gel electrophoresis, spa typing, and multilocus sequence typing for clonal characterization of *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol*, **2005**; 43: 3095–3100.
- 56- **Bişkin Z, Yıldırım A, İnci A, Düzlü Ö.** Parazitolojide Teşhis Amaçlı Kullanılan Moleküler Biyolojik Teknikler. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg*, **2011**; 8(1): 43-51.
- 57- **Durmaz R.** Simpozyum: Mikozlar ve moleküler yöntemler, Mikozların Epidemiyolojik Analizinde Moleküler Yöntemlerin Yeri ve MLST Yöntemine Özet Bir Bakış. **2007**; 21: 173-179.
- 58- **Andrei A, Zervos MJ.** The application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Arch Pathol Lab Med*, **2006**; 130: 662-668.
- 59- **Taylor JW, Fisher MC.** Fungal multilocus sequence typing-it's not just for bacteria. *Curr Opin Microbiol*, **2003**; 6: 351-356.
- 60- **Cangelosi GA, Freeman RJ, Lewis KN, Livingston-Rosanoff D, Shah KS, Milan SJ, Goldberg SV.** Evaluation of a high-throughput repetitive-sequence-based PCR system for DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* complex strains. *J Clin Microbiol*, **2004**; 42(6): 2685-93.
- 61- **Ross TL, Merz WG, Farkosh M, Carroll KC.** Comparison of an automated repetitive sequence-based PCR microbial typing system to pulsed-field gel electrophoresis for analysis of outbreaks of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. **2005**; 43(11): 5642-5647.

- 62- **Shutt CK, Pounder JI, Page SR, Schaecher BJ, Woods GL.** Clinical evaluation of the DiversiLab microbial typing system using repetitive-sequence-based PCR for characterization of *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol*, **2005**; 43(3): 1187-1192.
- 63- **Fluit AC, Terlingen AM, Andriessen L, Ikawaty R, van Mansfeld R, Top J, Cohen Stuart JW, Leverstein-van Hall MA, Boel CH.** Evaluation of the DiversiLab system for detection of hospital outbreaks of infections by different bacterial species. *J Clin Microbiol*, **2010**; 48(11): 3979-3989.
- 64- **Çatar Kırca F.** *Staphylococcus aureus* Suşlarında Metisilin Direnci Tanısında Kullanılan Bazı Fenotipik Yöntemlerin Karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Ankara, **2008**.
- 65- **Özel E.** Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) Suşlarında *mecA* Geninin Tespitinde Evigene Testi, Latex Aglutinasyon Testi ve PZR Yönteminin Karşılaştırılması. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Isparta, **2011**.
- 66- **Namıduru M, Karaoğlan İ.** Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesinde Hastane İnfeksiyonu Etkeni Olan *Staphylococcus aureus* Suşlarının Antibiyotik Dirençleri. *Van Tıp Dergisi*, **2003**; 10 (3): 72-75.
- 67- **Kapuağası A, Ağalar C, Diri C, Apaydın N, Türkyılmaz R.** Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen Stafilokok Suşlarının Antibiyotik Direnç Oranlarının Değerlendirilmesi. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, **1997**; 50(2): 105-112.
- 68- **Zer Y, Bayram A, Balcı İ.** Yoğun Bakım Ünitesinde Yatan Hastalara Ait Trakeal Aspirasyon Örneklerinden En Sık İzole Edilen Bakteriler Ve Çeşitli Antibiyotiklere Direnç Durumları. *İnfeksiyon Dergisi*, **2001**; 15(3): 307-310.
- 69- **Duman Y, Serindağ A, Tekerekoğlu MS.** Klinik Örneklerden İzole Edilen *Staphylococcus aureus*'ların Antimikrobiyallere Direnç Durumu. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, **2009**; 16(3): 145-148.
- 70- **Tenover FC, Gay EA, Frye S, Eells SJ, Healy M, McGowan JE, Jr.** Comparison of Typing Results Obtained for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates with the DiversiLab System and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Journal Of Clinical Microbiology*, **2009**; 47(8): 2452–2457.
- 71- **Church DL, Chow BL, Lloyd T, Gregson DB.** Comparison of automated repetitive-sequence-based polymerase chain reaction and spa typing versus pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **2011**; 69: 30–37.
- 72- **Ross TL, Merz WG, Farkosh M and Carroll KC.** Comparison of an Automated Repetitive Sequence-Based PCR Microbial Typing System to Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Analysis of Outbreaks of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal Of Clinical Microbiology*, **2005**; 43 (11): 5642–5647.

- 73- **Babouee B, Frei R, Schultheiss E, Widmer AF and Goldenberger D.** Comparison of the DiversiLab Repetitive Element PCR System with *spa* Typing and Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Clonal Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal Of Clinical Microbiology*, **2011**; 49(4): 1549–1555.

ÖZGEÇMİŞ

15.02.1985 tarihinde Adana ilinde doğdu. Liseyi Adana'da tamamladı. 2005 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünde lisans eğitimine başladı ve 2009 yılında mezun oldu. Aynı yıl Çukurova Üniversitesi Eğitim Bilimleri Enstitüsü'nde tezsiz yüksek lisans eğitimine başladı ve 2010 yılında mezun oldu. 2010 yılında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Halen aynı Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrencisi olarak öğrenimine devam etmektedir.