

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**METİSİLİN DİRENÇLİ STAFİLOKOKLAR'DA
SINIF 1 İNTEGRON VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI VE
ANTİBAKTERİYEL DİRENÇ İLE İLİŞKİSİNİN
BELİRLENMESİ**

UZMANLIK TEZİ
Dr. AKİF KORAY GÜNEY

SAMSUN - 2012

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**METİSİLİN DİRENÇLİ STAFİLOKOKLAR'DA
SINIF 1 İNTEGRON VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI VE
ANTİBAKTERİYEL DİRENÇ İLE İLİŞKİSİNİN
BELİRLENMESİ**

UZMANLIK TEZİ
Dr. AKİF KORAY GÜNEY

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. BELMA DURUPINAR

Bu tez, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Yönetim Birimi tarafından
PYO.TIP.1904.10.016 proje numarası ile desteklenmiştir.

SAMSUN - 2012

TEŞEKKÜR

Tıpta uzmanlık eğitimim ve tezim boyunca bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan tez danışmanım değerli hocam Prof. Dr. Belma DURUPINAR'a teşekkür ve saygılarımı sunuyorum. Uzmanlık eğitimimde desteklerini esirgemeyen Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Murat GÜNAYDIN'a ve başta tezim boyunca bilgi birikimini benimle paylaşan Prof. Dr. Cafer EROĞLU olmak üzere değerli hocalarım Prof. Dr. Asuman BİRİNCİ'ye, Doç. Dr. Ahmet Yılmaz ÇOBAN'a, Yrd. Doç. Dr. Adil KARADAĞ'a ve Yrd. Doç. Dr. Keramettin YANIK'a şükranlarımı sunuyorum. Tezimin başlangıcında bölümümüzde olan, fakat tezimin sonunda bölümümüzden ayrılmış olan, bilimsel anlamda kendilerinden çok istifade ettiğim değerli hocalarım Prof. Dr. Murat HÖKELEK ve Yrd. Doç. Dr. İ.Çağatay ACUNER'i de şükranla anmadan geçmek istemiyorum.

Ayrıca tezimde çok önemli bir yere sahip, tezimin inşasında en az benim kadar vakit harcayan çok kıymetli hocam Amasya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Tuba YILDIRIM'a teşekkürlerimi sunmayı bir borç biliyorum.

Tezimde kullandığım standart suşu yollamakla yetinmeyip, bilgi birikimini de büyük bir bilimsel özveri ile benimle paylaşan değerli hocam Rize Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Osman Birol ÖZGÜMÜŞ'e de sonsuz şükranlarımı sunuyorum.

Başta asistan arkadaşlarım olmak üzere Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı çalışanlarına da teşekkürlerimi sunuyorum. Eğitim hayatım boyunca desteklerini esirgemeyen anneme ve babama da şükranlarımı sunuyorum.

Ayrıca, uzmanlık eğitimim boyunca benimle sevinen ve dertlenen, tezimde beni yalnız bırakmayan pek kıymetli eşim Mehtap GÜNEY'e ve bu süre içerisinde şirin oyunları ile beni neşelendiren minik yavrumuz Yusuf Ömer GÜNEY'e de sevgilerimi gönderiyorum.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
TABLO LİSTESİ	V
ŞEKİL LİSTESİ	VI
KISALTMALAR	VIII
ÖZET	X
ABSTRACT	XI
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Stafilokoklar	3
2.1.1 Taksonomi	3
2.1.2 Morfoloji ve boyanma özellikleri	3
2.1.3 Kültür ve biyokimyasal özellikler	4
2.1.4 Virülans ve patogenezi	5
2.1.4.1 Antijenik yapı	5
2.1.4.2 Toksin ve enzimler	6
2.1.5 Stafilokok kaynaklı enfeksiyonlar	7
2.1.6 Epidemiyoloji ve kontrol	8
2.1.7 Antibiyotik direnci	8
2.1.7.1 Beta-laktam direnci	8
2.1.7.2 Aminoglikozid direnci	10
2.1.7.3 Kinolon direnci	11
2.1.7.4 Glikopeptid direnci	12
2.1.7.5 Lipopeptid direnci	12
2.1.7.6 Makrolid, linkozamid ve streptogramin direnci	13
2.2. Mobil Genetik Elementler	14
2.2.1 İnsersiyon sekansları	15
2.2.2 Transpozonlar	16
2.2.3 Plazmidler	17
2.2.4 Bakteriyofajlar	18

2.2.5 Patojenisite adaları	18
2.2.6 Genomik adalar	19
2.2.7 Gen kasetleri	19
2.2.8 İntegronlar	21
2.2.8.1 Mobil integronlar	23
2.2.8.2 Kromozomal integronlar	25
2.3. Stafilokoklarda İntegron	29
2.3.1 Stafilokoklarda integron varlığının gösterilmesi	29
2.3.2 Sınıf 1 integron pozitif MRS izolatlarının epidemiyolojisi	29
2.3.3 Sınıf 1 integron pozitif MRS izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları	30
2.3.4 Stafilokoklarda tespit edilen sınıf 1 integronların orjinleri ve dağılımı	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM	31
3.1. Stafilokok izolatlarının toplanması	31
3.2. Metisilin Dirençli Stafilokok İzolatlarından DNA ekstraksiyonu	31
3.3. Metisilin Dirençli Stafilokokların Tanımlanması	31
3.3.1. Fenotipik yöntemler	31
3.3.2. Metisilin Dirençli Stafilokokların Multipleks PZR İle Doğrulanması	32
3.3.2.1 16S rRNA, <i>nuc</i> ve <i>mecA</i> Gen Bölgelerinin Amplifikasyonu	32
3.4. Metisilin Dirençli Stafilokokların Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi	34
3.4.1 Disk difüzyon	34
3.5. Metisilin Dirençli Stafilokoklarda Sınıf 1 İntegron Varlığının Araştırılması	35
3.5.1 <i>IntI 1</i> Gen Bölgesinin PZR İle Araştırılması	35
4. BULGULAR	37
4.1. Metisilin Dirençli Stafilokok İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıkları	37
4.2. Metisilin Dirençli Stafilokok İzolatlarının Multipleks PZR’de	41

16S rRNA, <i>nuc</i> ve <i>mecA</i> Gen Bölgelerinin Amplifikasyonu	
4.3. Metisilin Dirençli Stafilokoklarda PZR ile <i>int1</i> 1 Gen Bölgesinin Araştırılması	45
4.4. MRS İzolatlarının Fenotipik ve Genotipik Özellikleri	46
5. TARTIŞMA	49
6. SONUÇLAR	55
7. KAYNAKLAR	56

TABLO LİSTESİ

	Sayfa
Tablo I : Çeşitli SCC <i>mec</i> kaset tipleri	10
Tablo II : Stafilocoklarda aminoglikozid-modifiye edici enzimler	11
Tablo III : Birleşik Krallık'da major EMRSA suşlarının antibiyogramları	11
Tablo IV : Makrolidler, linkozamidler ve streptograminler	13
Tablo V : Stafilocoklarda temel MLS direnç fenotipleri	14
Tablo VI : Kromozomal integronları içeren bazı bakteriyel türler ve ilişkili kasetlerin yapısal özellikleri	26
Tablo VII : Metisilin dirençli stafilocok izolatlarının multipleks PZR ile doğrulanması için kullanılan primer dizileri	33
Tablo VIII : 16S rRNA, <i>nuc</i> ve <i>mecA</i> gen bölgelerinin multipleks PZR'de çoğaltılması için kullanılan 25 µL reaksiyon karışımı	33
Tablo IX : Sınıf 1 integronun tespitinde <i>intI</i> 1 gen bölgesinin amplifikasyonu için kullanılan oligonükleotid primer dizeleri	35
Tablo X : <i>IntI</i> 1 gen bölgesinin çoğaltılması için kullanılan 25 µL PZR reaksiyon karışımı.	36
Tablo XI : MRS izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları	37
Tablo XII : MRS izolatlarının fenotipik ve genotipik özellikleri	46

ŞEKİL LİSTESİ

	sayfa
Şekil I : Tipik kümeler oluşturan stafilokokların gram boyaması	4
Şekil II : Klasik IS ve kompozit transpozon	15
Şekil III : <i>ISEcp1</i>	15
Şekil IV : <i>ISCR</i>	16
Şekil V : Tn3- ve Tn21- alt grubu transpozonlar	17
Şekil VI : <i>S. aureus</i> tarafından mobil genetik elementlerin kazanılması	17
Şekil VII : Gen kasetleri	20
Şekil VIII : <i>SCCmec</i> tipleri	21
Şekil IX : Kaset sokulması veya çıkarılmasında integron-aracılı model	22
Şekil X : Sınıf 1 integronlar; a) Tn402-benzeri sınıf 1 integron, b) 3'-CS'li sınıf 1 integron Tn402 deriveleri	24
Şekil XI : Sınıf 2 integron (Tn7)	24
Şekil XII : Sınıf 3 integron	24
Şekil XIII : İntegron integraz genlerinin filogenetik ilişkisi	28
Şekil XIV : 1-17 No'lu MRSA izolatlarının multipleks PZR sonrası 16S rRNA, <i>nuc</i> ve <i>mecA</i> jel görüntüsü	42
Şekil XV : 18-34 No'lu MRSA izolatlarının multipleks PZR sonrası 16S rRNA, <i>nuc</i> ve <i>mecA</i> jel görüntüsü	42
Şekil XVI : 35-50 No'lu MRSA izolatlarının multipleks PZR sonrası 16S rRNA, <i>nuc</i> ve <i>mecA</i> jel görüntüsü	43
Şekil XVII : 51-59 No'lu MRKNS izolatlarının multipleks PZR sonrası 16S rRNA ve <i>mecA</i> jel görüntüsü	43
Şekil XVIII : 60-76 No'lu MRKNS izolatlarının multipleks PZR sonrası 16S rRNA ve <i>mecA</i> jel görüntüsü	44
Şekil XIX : 77-93 No'lu MRKNS izolatlarının multipleks PZR sonrası 16S rRNA ve <i>mecA</i> jel görüntüsü	44
Şekil XX : 94-100 No'lu MRKNS izolatlarının multipleks PZR	45

sonrası 16S rRNA ve *mecA* jel görüntüsü
Şekil XXI : *IntI 1* varlığı tespit edilemeyen 1-17 No'lu MRSA 45
izolatlarının PZR jel görüntüsü

KISALTMALAR

MRS	: Metisilin dirençli stafilokok
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SCC	: Stafilokokal Kaset Kromozomu
CLSI	: Clinical and Laboratory Standarts Institute
DNA	: Deoksiribonkleik asit
MLS	: Makrolid-linkozamid-streptogramin
Mİ	: Mobil integron
Kİ	: Kromozomal integron
IL-1	: İnterlökin-1
IgG	: İmmüoglobülinG
ETA	: Eksfoliyatif toksin A
ETB	: Eksfoliyatif toksin B
MRSA	: Metisiline Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
MRKNS	: Metisiline Dirençli Koagülaz Negatif Stafilokok
µg	: Mikrogram
MHA	: Mueller Hinton Agar
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
PBP	: Penisilin bağlayan protein
EMRSA	: Epidemik metisilin dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
MODSA	: Modifiye PBP <i>S. aureus</i>
PBP	: Penisilin Bağlayan Protein
mL	: Mililitre
MİK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyon
BORSA	: Borderline <i>S. aureus</i>
GİSA	: Glikopeptid ara duyarlı <i>S. aureus</i>
VİSA	: Vankomisin ara duyarlı <i>S. aureus</i>
VRE	: Vankomisin dirençli enterokok
IS	: İnsersiyon sekansı
IR	: İntert tekrar
DR	: Direkt tekrar

Tn	: Transpozon
ORF	: Açık okuma çerçevesi
SaPi	: Stafilokokal patojenisite adası
NCBI	: Ulusal biyoteknoloji bilgi merkezi
OMÜ-SUVAM TPL	: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Tıp Laboratuvarları
BD	: Becton Dickinson
NaCl	: Sodyum Klorür
V	: Volt
U.V	: Ultra viyole
EARSS	: European Antimicrobial Resistance Surveillance System
PK	: Pozitif kontrol
NK	: Negatif kontrol
M	: Marker
RAPD	: Rastgele Amplifiye edilen Polimorfik DNA

ÖZET

Metisilin dirençli stafilokoklar'da sınıf 1 integron varlığının araştırılması ve antibakteriyel direnç ile ilişkisinin belirlenmesi

Metisilin dirençli stafilokoklar (MRS) hastanelerde izole edilen en yaygın patojenlerdendir. *S. aureus* nozokomiyal enfeksiyon etkeni olarak sıklıkla karşımıza çıkan klasik bir patojen iken, koagülaz negatif stafilokokların nozokomiyal enfeksiyonu etkeni olarak önemi giderek artmaktadır. Metisilin direnci ve diğer ek antibiyotik dirençleri klinik stafilokok izolatlarında tedavi seçeneklerini kısıtlamaktadır.

İntegronlar antibiyotik direnç yayılımında rol alan mobil genetik elementlerdir. Özellikle sınıf 1 integronların gram negatif bakterilerde antibiyotik direnci ile olan ilişkisi irdelenmesine rağmen, stafilokoların da içinde bulunduğu gram pozitif bakteriler ile ilgili yeterli veri bulunmamaktadır.

Bu çalışmada klinik örneklerden izole edilen 100 MRS izolatında sınıf 1 integron varlığının araştırılması amaçlandı. İzolatların identifikasyonu ve metisilin direnci fenotipik olarak tespit edildikten sonra, izolatların identifikasyonu ve metisilin direnci 16S rRNA, *nuc* ve *mecA* gen bölgelerine özgü primerlerin kullandığı multipleks PZR ile genotipik olarak doğrulandı.

Çalışmaya dahil edilen 100 MRS izolatında sınıf 1 integron varlığı *intI 1* gen bölgesine özgü primerlerin kullandığı PZR yöntemi ile araştırıldı. Pozitif kontrol suşunda *intI 1* gen bölgesini temsil eden 923 bp'lik bant tespit edilmesine rağmen, hiçbir klinik izolatta integron 1 varlığı tespit edilmedi. Yaptığımız çalışma stafilokoklarda ve gram pozitif bakterilerde integron varlığının araştırıldığı ilk çalışma olması nedeniyle ülkemiz açısından önemlidir.

Anahtar kelimeler: Metisilin dirençli stafilokok, Antibiyotik direnci, İntegron

ABSTRACT

Investigation of the presence of class 1 integron in methicillin-resistant staphylococci and determination of its relationship with antibacterial resistance

Methicillin-resistant staphylococci (MRS) are frequent pathogens isolated in hospitals. While *S. aureus* is classical pathogen encountered as a common nosocomial infection agent, the importance of coagulase negative staphylococci as nosocomial infection agent has become increasingly important. Methicillin resistance and other additional resistances restrict the therapeutic options in clinical staphylococci strains.

Integrans are mobile genetic elements that play a role in the spread of antibiotic resistance. Although the relationship between class 1 integrons and antibiotic resistance in gram negative bacteria has been well established, there is no sufficient data about gram positive bacteria.

In this study, it was aimed to investigate the presence of class 1 integron in 100 MRS strains isolated from clinical samples. After phenotypic identification of the strains and phenotypic detection of methicillin resistance, identification and methicillin resistance were confirmed by PCR in which specific primers to 16S rRNA, *nuc* ve *mecA* genes were used.

The presence of class 1 integron was investigated in 100 MRS strains by PCR method in which specific primers to *intI 1* were used. Although 923 bp band, the representative of the *intI 1* gene, was detected in the positive control strain, no class 1 integron was detected in clinical strains. Our study is the first study investigating the integron existence in staphylococci in our country.

Key Words: Methicillin resistant staphylococci, Antibiotic resistance, Integron

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Staphylococcus aureus, hafif deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarından, hayatı tehdit eden sepsis, pnömoni ve toksik şok sendromuna kadar geniş aralıkta hastalık oluşturabilen önemli bir patojendir (Waldvogel, 1995). *Staphylococcus aureus*'un hastane enfeksiyonlarında önemi her geçen gün biraz daha artmaktadır (Reacher ve ark., 2000). Koagülaz negatif stafilokoklar ise genelde normal deri kommensali olmalarına rağmen, immün sistemi zayıflamış hastalarda ciddi enfeksiyonlara neden olabilmektedirler (Oppenheim, 1998).

Son yıllarda stafilokoklar da çoğul antibiyotik direncinden kaynaklanan tedavi güçlüğü özellikle hastane ile ilişkili enfeksiyonlarda önemli bir sorun olarak görülmektedir (Livermore, 2000). Bu sorunun çözümlenmesi için antibakteriyel direnç mekanizmalarının iyi bilinmesi gerekmektedir. Stafilokoklarda, SCC mec elementi ile kazanılan metisilin direnci en önemli antibakteriyel direnç olarak karşımıza çıkmaktadır (Cattoir ve Leclercq, 2010). Metisilin direnci, metisilin kullanıma girmesinden kısa bir süre sonra, ilk olarak *Staphylococcus aureus*' da görülmüş, ardından koagülaz negatif stafilokoklara yayılmıştır (Wu ve ark., 1996). Fakat stafilokoklarda metisilin direncinin nasıl kazanıldığı ve nasıl yayıldığı, hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Metisilin direnci stafilokoklarda, diğer β -laktamlarında kullanımını engellemekte ve tedavi seçeneklerini kısıtlamaktadır. Metisilin direncine ek olarak, kinolon, aminoglikozid ve makrolid-linkozamid-streptogramin (MLS) dirençleri de stafilokoklarda problem olmaya devam etmektedir (Livermore, 2000).

Bakterilerde direnç problemleri türlerin seleksiyonu, mutasyon ve DNA transferiyle ortaya çıkmaktadır (Livermore, 2003). DNA transferi önceden duyarlı olan türlerde direnç gelişimine neden olmaktadır. DNA transferi, transdüksiyon, transmisyon ve konjugasyon gibi fiziksel yollarla veya plazmidler, transpozonlar, gen kasetleri ve integronlar gibi mobil genetik elementlerin neden olduğu DNA eklenmesi sayesinde olmaktadır (Partridge, 2011).

İntegronlar, integraz (*intI*) geni, *attI* bölgesi ve integraz geni ve entegre gen kasetleri için güçlü promotörleri içeren ve bakterilerde gen kasetlerinin yakalanması, mobilizasyonu ve bölgeye özgül rekombinasyonundan sorumlu gen birimleridir (Stokes ve Hall, 1989). Günümüzde integronlar iki ana gruba ayrılmaktadır; mobil integronlar (Mİ) ve kromozomal integronlar (Kİ) (Mazel, 2006). Mİ'ler, fiziksel olarak konjugatif plazmidler tarafından taşınabilen mobil DNA elementleri (transpozon) ile ilişkili integronlardır (Cambray ve ark., 2010). Bugüne kadar 5 farklı Mİ sınıfı tanımlanmıştır. İlk üç integron sınıfı çoğul direnç fenotiplerinin dağılımı ile daha çok ilişkilendirilmiştir (Cambray ve ark., 2010). Sınıf 1

integronlar ise ilk üç sınıf içerisinde en yaygın olanı ve klinik olarak en önemli olanıdır (Partridge ve ark., 2009).

Sınıf 1 integronların β -laktamlar, aminoglikozidler, trimetoprim, kloramfenikol, kuarterner bileşikler, rifampin ve eritromisin direncine neden olan gen kasetlerini taşıdıkları gösterilmiştir (Fluit ve Schmitz, 1999). Sınıf 1 integronların gram negatif bakterilerde antibiyotik direnç genlerinin yayılımındaki rolü yeteri kadar irdelenmiş ve kabul edilmiş ise de (Partridge, 2011), sınıf 1 integronların gram pozitif bakterilerdeki prevalansı hakkında çok az bilgi ve çalışma bulunmaktadır.

İlk kez Nandi ve ark. kümes ortamından izole edilen klinik olmayan stafilokok suşlarında sınıf 1 integron varlığını göstermişlerdir (Nandi ve ark., 2004). Fakat stafilokoklarda sınıf 1 integron varlığıyla ilgili geniş kapsamlı ilk klinik çalışma Shi ve ark tarafından Çin'de gerçekleştirilmiş ve klinik MRSA izolatlarında sınıf 1 integron varlığı gösterilmiştir (Shi, 2006). Ardından, Xu ve ark. klinik hem MRSA hem de MRKNS izolatlarında sınıf 1 integron varlığını göstermişlerdir (Xu ve ark., 2007a, 2008a). Ülkemizde ise gram negatif bakterilerde sınıf 1 integron varlığı ile ilgili birkaç çalışma bulunmasına rağmen (Eraç ve Gülay, 2007; Özgümüş ve ark., 2007; Sandallı ve ark., 2010), stafilokoklar ve gram pozitif bakteriler ile ilgili veri bulunmamaktadır.

Biz de bu çalışmada hastanemizde yaygın olarak görülen metisilin dirençli stafilokoklarda (MRS) sınıf 1 integron varlığını araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Stafilocoklar

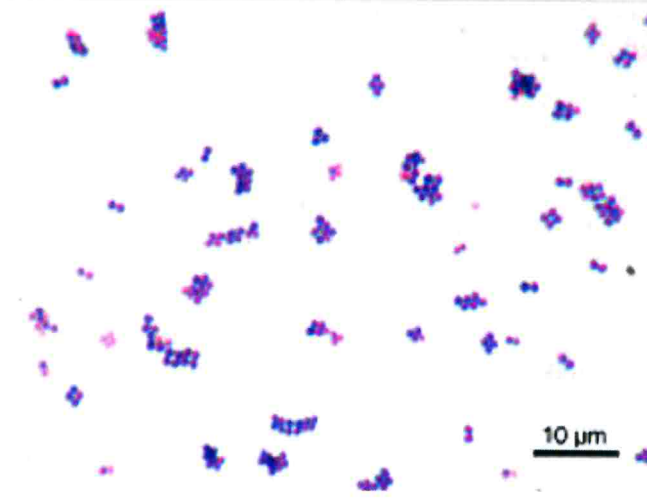
Stafilocoklar bir çoğu ile insan klinik örneklerinde karşılaşılabilen çeşitli türlerden oluşmaktadır. Stafilocokların birincil doğal habitatları memeli derisidir. İnsan deri mikroflorasında kommensal olarak bol miktarda bulunurlar (Willett, 1984). İnsanlardaki stafilocok enfeksiyonlarında öncelikli patojen olarak *S. aureus* yer alır. Bundan başka fırsatçı patojenler olarak *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus* sıklıkla enfeksiyonlar oluştururlar. Daha nadir olarak *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S.warneri*, *S. saccharolyticus*, *S. cohnii* ve *S. simulans*'ın fırsatçı enfeksiyonlarına rastlanılmaktadır (Bilgehan, 1993).

2.1.1. Taksonomi

Staphylococcus cinsi bakteriler, mikrokoklar ile birlikte *Micrococcaceae* ailesi içinde yer almaktaydı (Schleifer, 1986). Sonraki genetik çalışmalarda stafilocokların ve mikrokokların yakın bir şekilde ilişkili olmadığı tespit edilmiştir. Stafilocoklar en yakın olarak yeni tanımlanan *Macrococcus* genusu ile ilişkilidir, fakat ayrıca *Bacillus*, *Brochothrix*, *Gemella*, *Listeria* ve *Planococcus* genuslarıyla da nispeten yakın bir ilişki içindedirler (Bannerman ve Peacock, 2007).

2.1.2. Morfoloji ve Boyanma Özellikleri

Stafilocoklar hareketsiz, spor üretemeyen, katalaz pozitif gram pozitif koklardır. 1 µm çapında küresel bakterilerdir. Stafilocoklar tekli hücreler, çiftler, tetradlar ve kısa zincirler şeklinde bulunabilir, fakat genelde üzüm salkımı benzeri kümeler halinde görülmektedirler (Winn ve ark.,2006). Gram boyama taze kültürlerden uygulanmalıdır çünkü çok eski kültürler kristal viyoleyi tutma özelliklerini kaybederek gram değişken ya da gram negatif görülebilirler (Forbes ve ark., 2007).



Şekil I. Tipik kümeler oluşturan stafilocokların gram boyaması (http://en.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_aureus).

2.1.3. Kültür ve Biyokimyasal Özellikler

Stafilokoklar fakültatif anaerob olarak, tüm sıradan besiyerlerinde bol miktarda ürerler. %5 koyun kanlı agarda ve çikolatamsı agarda iyi ürerler fakat MacConkey agar ve EMB agarda üremezler. Ayrıca kan kültürü sıvı besiyerleri ve tiyoglikolatlı buyyon gibi zengin sıvı besiyerlerinde de iyi ürerler (Forbes ve ark., 2007). 37°C’de 18-24 saat inkübasyon sonrası 2-4 mm çapında, altın renkli veya beyaz pigmentasyon gösteren düzgün kenarlı konveks koloniler oluştururlar (Gillies, 1984). *S. aureus* suşlarında sarı pigment ve β hemoliz görülür. *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus*’un bazı suşlarında da sarı veya turuncu pigment ve hemoliz görülür. Koagülaz negatif stafilocokların çoğu suşu non-hemolitik olabilmektedir (Bilgehan, 2004). Klinik materyalden stafilocokları izole etmek için seçici besiyerleri kullanılabilir. Mannitol tuz agar bu amaç için yaygın olarak kullanılan besiyeridir. *S.aureus* mannitolu parçalayarak sarı renk oluşturur (Hart ve Shears, 2001).

Nadir izolatlar dışında stafilocoklar katalaz pozitifdir. *S. sciuri*, *S. lentus* ve *S. vitulus* izolatları dışında tüm diğer stafilocok türlerinin modifiye oksidaz testi negatifdir. Ayrıca stafilocoklar basitrasin direnci ve flurazolidon ve lizostafin duyarlılığı gösterirler. Bu bahsedilen üç test stafilocoklar ve mikrokokların ayırımında kullanılmaktadır. *S. aureus*, *S. lugdunensis* ve *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* lam koagülaz testi pozitif olabilirken, *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. delphini* ve *S. schleiferi* subsp. *coagulans* tüp koagülaz testi pozitif olabilir (Winn ve ark.,2006).

Stafilokoklar başta glikoz olmak üzere birçok karbonhidratları parçalarlar ve son ürün olarak laktik asit oluştururlar. Fakat gaz oluşturmazlar. Nitratları nitritlere indirgerler

(Bilgehan, 1993). *S. aureus* DNAaz ve termostabil endonükleaz oluşturmaktadır. Bu iki test koagülaz test sonuçlarını destekleyici olarak *S. aureus*'un *S. epidermidis*'den ayırımında kullanılır (Bilgehan, 2004).

Stafilokokların ayırt edilmelerinde bazı antibiyotik duyarlılık deneyleri kullanılmaktadır. *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. hyicus* ve *S. chromogenes* polimiksin B direnci göstermektedir. *S. saprophyticus* intrinsek olarak novobiosin direnci göstermektedir (Forbes ve ark., 2007).

2.1.4. Virülans ve Patogenez

Stafilokoklar normal olarak, insan derisinde ve müköz membranlarda bulunurlar. Fakat bazı stafilokok türleri basit, yüzeysel, kütanöz enfeksiyonlardan, hayatı tehdit eden ciddi sistemik enfeksiyonlara kadar geniş spektrumda hastalık oluşturabilmektedir (Gökırmak, 1994). Enfeksiyon oluşması, mikroorganizmanın virülansı ile konak savunma sisteminin oluşturacakları dengeye bağlıdır (Dündar ve ark., 2008).

2.1.4.1. Antijenik Yapı

Stafilokoklar hücre duvar yapısında önemli diğer maddeler gibi antijenik polisakkaritler ve proteinler de içermektedir. Bağlı alt üniteler içeren bir polisakkarit polimeri olan peptidoglikan hücre duvarının sert dış iskeletinden sorumludur. Peptidoglikan güçlü asitler tarafından ve lizozim etkisiyle parçalanır. Bu durum enfeksiyon patogenezinde önemlidir. IL-1 ve opsonik antikorların üretilmesini tetikler. Ayrıca, polimorfonükleer lökositler için iyi bir kemoatraktan olabilmekte, endotoksin benzeri aktivite gösterebilmekte ve komplemanı aktive edebilmektedir (Jawetz ve ark., 1987).

Gliserol ve ribitol fosfat polimeri olan teikoik asitler bir taraftan peptidoglikan tabakasına, diğer taraftan sitoplazmik membrana bağlanmaktadır. Zayıf immünojendirler ve spesifik antikor cevabını stimüle edebilirler (Gökırmak, 1994).

Protein A birçok stafilokok türünün hücre duvar bileşenidir. IgG3 hariç tüm insan IgG alt sınıflarının Fc bölgesine bağlanma yeteneğindedir. Protein A immünojeniktir ve ona karşı antikorlar ciddi *S. aureus* enfeksiyonlu bireylerde bulunur (Winn ve ark., 2006).

Bazı stafilokok suşları kapsüllüdür. *S. aureus* suşlarında % 90'dan fazla bir oran bildirilmiştir. Bakteriyi komplemanın, antikorların ve fagositik hücrelerin olumsuz etkilerinden korur (Moreillon ve ark., 2005; Gökırmak, 1994).

2.1.4.2. Toksinler ve Enzimler

Katalaz: Bütün stafilokoklar katalaz meydana getirirler. Hidrojen peroksidi su ve oksijene katalize eder. Katalaz mikroorganizmayı hidrojen peroksitin toksik etkisinden korur (Gökırmak, 1994).

Koagülaz: Bazı stafilokoklar insan veya tavşan plazmasını pıhtılaştırırlar. Bu tip stafilokoklar girdikleri organizmada koagülazları sayesinde fibrin bir zırh ile kaplanarak fagositozdan korunurlar. Laboratuvarda iki şekilde tespit edilir. Lam deneyinde bağlı koagülaz (Clumping factor), tüp deneyinde serbest koagülaz araştırılır (Bilgehan, 1993).

Diğer enzimler: Salgıladıkları fibrinolizin, hiyalüronidaz, lipaz ve nükleaz gibi enzimler dokularda yayılmayı kolaylaştırır. β -laktamazlar ise antibiyotik direncini neden olur (Jawetz ve ark., 1987).

Eksotoksinler: Stafilokoklar eritrositleri ve trombositleri parçalayan, vasküler düz kas hücreleri üzerine güçlü bir etkiye sahip, koyun kanlı agarda üreyen bazı *S. aureus* suşlarının kolonileri etrafında eritrositlerin hemolizi sonucu gözlenen zonun oluşumundan sorumlu alfa hemolizin ve sfingomiyelini parçalayan β -hemolizin üretirler. Ayrıca, stafilokoklar hücreler ve dokular üzerine litik etkiye sahip gama ve delta toksin üretirler (Winn ve ark., 2006; Bilgehan, 1993).

Lökosidin: Bu toksinin F ve S bileşenleri vardır. İkisinin bir arada hücre membranını zararlandırmada ve permeabilitesini arttırmada önemli rolleri vardır (Gökırmak, 1994).

Eksfoliyatif toksin: Stafilokokal haşlanmış deri sendromuna neden olan en az iki protein içermektedir (ETA ve ETB). Spesifik antikorlar toksinin eksfoliyatif etkisine karşı koruma sağlarlar (Jawetz ve ark., 1987; Bilgehan, 1993).

Toksik Şok Sendromu Toksini: Bazı *S. aureus* suşları tarafından üretilen enterotoksin-benzeri bir maddedir. Özellikle adet görme sırasında tampon kullanan kadınlarda veya yara infeksiyonu bulunan kişilerde toksik şoka neden olur (Kingsbury ve ark., 1985; Özgünen, 2008).

Enterotoksinler: A-E, H ve I enterotoksinleri üretirler. Bu toksinler besin zehirlenmelerinin klinik özelliklerinden sorumlu tutulan ısıya dayanıklı moleküllerdir (Winn ve ark., 2006). En sık besin zehirlenmesine neden olan tip enterotoksin A'dır. Enterotoksin B ise daha nadir görülen stafilokoksik psödomembranöz enterokolit tablosundan sorumlu tutulmaktadır (Tünger, 2004).

2.1.5. Stafilokok Kaynaklı Enfeksiyonlar

S. aureus stafilokok türleri içerisinde en yaygın olan insan patojenidir. Koagülaz negatif stafilokoklar ise daha çok kültürlerde kontaminan olarak buldukları halde, bazı durumlarda patojen olarak değerlendirilmektedirler (Winn ve ark., 2006).

***S. aureus* ilişkili enfeksiyonlar:** *S.aureus* normal olarak deri ve mukozolar üzerinde bulunabilmektedir. Bunların veya dış kaynaklı stafilokokların deri bütünlüğünün bozulmasıyla içeri girmeleri sonucunda kıl foliküllerini, yüzeysel deriyi, ter bezlerini ve meme dokusunu tutan follikülit, fronkül, karbonkül, impetigo, hidradenit ve mastit gibi enfeksiyonlar meydana gelmektedir (Winn ve ark., 2006).

Lokalize bir enfeksiyona sekonder olarak bakteriyemiler gelişebilmekte, bunun sonucunda da hasarlı kalp dokuları tutularak endokardit tablosuyla karşılaşılabilir (Bilgehan, 1993). Yine bakteriyemi komplikasyonu olarak veya lokal kafa travmalarından sonra *S. aureus* kaynaklı menenjitler gelişebilmektedir. Hematojen yolla veya penetran göğüs travması kaynaklı lokal enfeksiyona sekonder olarak perikardit görülebilmektedir. *S. aureus* kaynaklı akciğer enfeksiyonları ise aspirasyondan dolayı ya da bir başka bölgeden hematojen yayılım yoluyla meydana gelebilmektedir (Winn ve ark., 2006). Osteomyelitlerde stafilokok üreme odağı uzun kemiklerin metafiz terminal damarlarında bulunur. Kemik nekrozlarına ve kronik süpürasyonlara yol açar (Gökırmak, 1994).

Toksin aracılı hastalıklar tipik olarak stafilokokal besin zehirlenmesi, stafilokokal toksik şok sendromu ve stafilokokal haşlanmış deri sendromunu içerir. Bu hastalıklarda süperantijen özelliği taşıyan çeşitli toksinler aracılık etmektedir. Toksin kaynaklı olduğu için çoğu zaman bakteri kültürden izole edilemez (Moreillon ve ark., 2005).

Koagülaz negatif stafilokoklarla ilişkili enfeksiyonlar: *S. saprophyticus*, özellikle genç kadınlarda üriner sistem enfeksiyonlarına neden olabilen önemli bir patojendir. Çeşitli çalışmalarda *E.coli*'den sonra üriner sistem enfeksiyonlarının en sık ikinci patojeni olarak gösterilmiştir. Diğer koagülaz negatif stafilokoklardan ise *S. epidermidis* en çok üriner sistem enfeksiyonlarına neden olan patojendir. Üriner sistem enfeksiyonları dışında koagülaz negatif stafilokoklar nadiren de olsa osteomyelit, prostatik-kapak endokarditi, intravenöz katater enfeksiyonları, beyin omurilik sıvısı (BOS) şant enfeksiyonları, vasküler greft enfeksiyonları, bakteriyemiler ve oküler enfeksiyonlara neden olmaktadır (Winn ve ark., 2006).

2.1.6. Epidemiyoloji ve Kontrol

Stafilokoklar doğumdan itibaren deride kolonize olmaya başlarlar. Ayrıca hastane personeli ve hastaların büyük bir kısmında burun ve deride antibiyotik-dirençli stafilokok taşıyıcılığı bulunmaktadır. Bu da dirençli bakterilerin hastanede yayılmasında önem arz etmektedir (Moreillon ve ark., 2005). Temizlik, hijyen ve antiseptik önlemler lezyonlardan stafilokokların yayılımını önlese de, taşıyıcılardan stafilokok yayılımının önlenmesinde birkaç metot mevcuttur. Aktif stafilokokal lezyonlu ve taşıyıcılı personel yenidoğan servisleri, yoğun bakım üniteleri ve ameliyathaneler gibi yüksek riskli alanlardan uzaklaştırılabilirler (Jawetz ve ark., 1987). Yine nazal taşıyıcılığın giderilmesinde topikal ajanlar denenebilir (Moreillon ve ark., 2005).

2.1.7. Antibiyotik Direnci

Stafilokoklar, saf anti-gram-negatif etkinlik gösterenler dışında, çoğu antibiyotiğe doğal olarak duyarlıdır. Ancak, hem mutasyon hem de DNA transferiyle, üstün direnç geliştirme becerileri ile morbidite ve mortalitenin önemli bir nedeni olmaya devam etmektedirler (Livermore, 2000).

2.1.7.1. Beta -Laktam (β -Laktam) Direnci

1940'lı yılların başında Penisilin G'nin klinik kullanımının başlamasını takiben, ilk dirençli suşlar ortaya çıkmaya başlamıştır. β -laktamaz dirençli penisilin-M'in 1959'da klinik kullanıma girmesinden sadece iki yıl sonra, metisilin-dirençli *S.aureus* suşları (MRSA) izole edilmeye başlanmıştır (Cattoir ve Leclercq, 2010).

β -laktamların etki mekanizması: β -laktamlar, bakterilere üreme fazında etki gösteren zaman-bağımlı bakterisidal antibiyotiklerdir. Transpeptidasyonun son basamakları sırasında bakteriyel hücre duvarının temel bileşeni olan peptidoglikanın metabolizmasını bozarlar. Penisilin bağlayıcı proteinler (PBP) olarak bilinen, peptidoglikan biyosentezi ve modifikasyonunda görev alan enzimleri inhibe ederek etki gösterirler (Waxman ve Strominger, 1983).

Direnç Mekanizmaları: Stafikoklarda β -laktamlara direnç iki mekanizmayla gerçekleşmektedir: β -laktamaz üretimi ve daha sık olarak eksojen bir PBP edinilmesi ile veya daha nadir olarak endojen bir PBP'in değişimi ile hedef modifikasyonu (Cattoir ve Leclercq, 2010).

Penisilinaz üretimi: B-laktamaz enzimleri β -laktam siklusuna kovalan bağlanarak penisilin inaktivasyonunu kataliz ederler. Bu reaksiyonun penisilin ve PBP'ler arasındaki

reaksiyondan farkı reversibl olmasıdır (Zapun ve ark., 2008). Stafilokoklar tarafından üretilen β -laktamazlar Ambler klasifikasyonuna göre Sınıf A enzimlerdir (Cattoir ve Leclercq, 2010). Stafilokokların çoğu β -laktamaz üretip, penisilin direnci göstermektedir.

Oksasiline düşük duyarlılık gösteren (MİK=2 μ g/mL) bazı suşlarda ayrıca penisilinaz aşırı üretimi gösterilmiştir. Bu suşlara BORSA (Borderline *S. aureus*) denilmektedir (Cattoir ve Leclercq, 2010).

PBP2a kazanılması (Hedef modifikasyonu): Bu direnç ayrıca metisilin direnci olarak da ifade edilmektedir ve PBP2a (veya PBP2') olarak bilinen ek indüklenabilir bir PBP'e bağlıdır. Bu protein penisilin M'lere ve diğer β -laktamlara zayıf afinite göstermektedir (Chambers, 1997). *S. aureus* ve koagülaz negatif stafilokoklardaki bu ek PBP, "stafilokokal kaset kromozomu" (SCC*mec*) olarak adlandırılan mobil genetik elementin parçası olan 2.1 kb'lık çok korunmuş bir gen *mecA* tarafından kodlanmaktadır (Cattoir ve Leclercq, 2010). SCC*mec*'ler bakteri kromozomu içerisinde entegredir. Bu DNA fragmanı tüm MRSA suşlarında mevcuttur ve 20.9 kb ile 66.9 kb ebatları arasında olup sekiz tip tanımlanmıştır (Zhang, 2009). SCC*mec* tip I, IV, V, VI, VII sadece β -laktamlara karşı direnç kodlarken, SCC*mec* tip II ve III plazmidlerden ve transpozonlardan köken alan ek direnç genlerini de içermektedir (Tablo I).

SCC*mec* elementleri, kromozom replikasyon orjininin yanında yer alan (*orfX* geninin 3' ucunda) kromozomal *attB_{scc}* bölgesinde spesifik entegrasyon ve eksizyondan sorumlu rekombinazları (kaset kromozom rekombinaz anlamına gelen *ccr*) kodlayan genleri içermektedirler (Cattoir ve Leclercq, 2010).

Direnç nadiren endojen PBP'lerin modifikasyonundan kaynaklanmaktadır. Bu suşlar MODSA (Modifiye PBP *S. aureus*) olarak adlandırılmaktadır (Tomasz ve ark, 1989).

Tablo I. Çeşitli SCC*mec* kaset tipleri (Cattoir ve Leclercq, 2010)

SSC <i>mec</i> tipi	<i>mec</i> kompleksi	ccr genleri	Boyut (kb)	Metisilin-direnci ile ilişkili direnç (ler)
I	B	A1/B1	34.3	—
II	A	A2/B2	53	Kan, Tob (pUB110 üzerinde <i>ant(4')</i>) Ery (Tn554 üzerinde <i>ermA</i>) Spc (Tn554 üzerinde <i>aad(9)</i>)
III	A	A3/B3	66.9	Pen (pI258 üzerinde <i>blaZ</i>) Ery (Tn554 üzerinde <i>ermA</i>) Spc (Tn554 üzerinde <i>aad(9)</i>) Tet (pT181 üzerinde <i>tet(K)</i>)
IV	B	A2/B2	20.9- 24.3	—
V	C	C	28	—
VI	B	A4/B4	20.9	—
VII	C2	C2/C8	35.9	—
VIII	A	A4/B4	32.2	Ery (Tn554 üzerinde <i>ermA</i>) Spc (Tn554 üzerinde <i>aad(9)</i>)

Not: Ery,Eritromisin; Kan,Kanamisin; Pen,Penisilin; Spc,Spektinomisin; Tet,Tetrasiklin; Tob,Tobramisin

2.1.7.2. Aminoglikozid Direnci

Aminoglikozidler bir aminosiklitole bağlı çeşitli halkalardan oluşmaktadır. Aminoglikozidler geniş antimikrobiyal spektrumlu ve hızlı bakterisidal etkili oldukça stabil, katyonik, hidrofilik antibiyotiklerdir (Bismuth ve Courvalin, 2010).

Stafikoklarda aminoglikozid direnci enzimatik modifikasyon ile gerçekleşmektedir. Plazmidler veya transpozonlar üzerinde kodlanan aminoglikozid-modifiye edici enzimlerin sentezi housekeeping genler tarafından yönetilmektedir (Shaw ve ark., 1993). Stafilokoklarda 3 çeşit aminoglikozid-modifiye edici enzim bulunmaktadır (Tablo 2).

Tablo II. Stafilokoklarda aminoglikozid-modifiye edici enzimler (Bismuth ve Courvalin, 2010).

Enzim	Gen	Direnç Fenotipi
APH(3')-III	<i>aph(3')</i> IIIa	Km,Nm (Ak,Is)
ANT(4')-I	<i>ant(4')</i> Ia	Km,Tm (Nm,Ak,Is)
AAC(6')-APH(2'')	<i>aac(6')</i> Ie <i>aph(2'')</i> Ia	Km,Gm,Tm (Ak,Is,Nt)

Km,kanamisin;Nm,netilmisin;Ak,amikasin;Is,isepamisin;Tm,tobramisin;Gm,gentamisin; Nt,netilmisin;APH,aminoglikozid fosfotranferaz;ANT,aminoglikozid nükleotidiltransferaz; AAC,aminoglikozid asetiltransferaz

1970'lerin sonunda ve 80'lerin başında MRSA'da dahil olmak üzere *S. aureus*'da gentamisin direnci ortaya çıkmaya başladı ve çoğunlukla da AAC(6')-APH(2'')'ın plazmid-aracılı üretimi ile ilişkiliydi. Bu enzim streptomisin hariç tüm aminoglikozidleri inaktive etmektedir. Gentamisin-dirençli MRSA 1980'lerin ortalarında önemli bir problem haline geldi ve epidemik MRSA 1 (EMRSA 1) olarak tanımlanan bir klon çeşitli ülkelerde yayıldı. Bu suş geniş spektrumlu bir dirence sahipti. Ardından yıllar içerisinde çeşitli 'epidemik' MRSA suşları tanımlandı. Özellikle EMRSA 16 ve 17 geniş yayılım kazandı ve bu iki epidemik klon ciddi enfeksiyonlar ile ilişkili bulundu (Livermore, 2000).

Tablo III. Birleşik Krallık'da major EMRSA suşlarının antibiyogramları (Livermore, 2000)

EMRSA 1	Pen,Tc,Ery,(Km),(Gm),Sm
EMRSA 3	Pen,Ery,(Gm),(Km),(Neo),Sm,Cip
EMRSA 15	Pen,(Ery),Cip
EMRSA 16	Pen,Ery,Km,Neo,(Gm),Cip

Pen,penisilin;Tc,tetrasiklin;Ery,eritromisin;Km,kanamisin;Gm,gentamisin;Sm,streptomisin; Neo,neomisin;Cip,siprofloksasin

2.1.7.3. Kinolon Direnci

Kinolonlar topoizomeraz II (GyrA ve GyrB alt üniteleri) ve topoizomeraz IV (ParC ve ParE alt üniteleri) enzimlerini hedefleyerek etki gösterirler. Bu şekilde replikasyona olanak sağlayan DNA topolojisi bozulmuş olur. Florokinolonlara direnç hedef enzimlerdeki nokta mutasyonlardan veya aktif eflüksten kaynaklanmaktadır. Gram pozitif bakterilerde, direnç kromozomal düzeyde belirlenir (Varon, 2010).

S. aureus'da, birinci basamakta tek bir hedefin modifikasyonu olur, bu da düşük düzeyde bir dirence neden olur ve çeşitli florokinolonların aktivitesini etkiler. Sonraki basamakta, ikinci hedefin modifikasyonu olur ve yüksek düzey bir direnç ortaya çıkar. Mutasyonlar genelde QRDR (Kinolon Direnç-Belirleyici Bölge) olarak adlandırılan sınırlı bir alanda bulunmaktadır (Janior ve ark., 1996).

Ayrıca, *S. aureus*'da *norA* gen promoter'indeki bir mutasyon Çoğul-İlaç Direnç ailesinin indüklenabilir bir pompasının aşırı ekspresyonuna yol açmaktadır. Bu da siprofloksasin ve norfloksasinin de içinde olduğu çeşitli bileşenlerin dışarı atılmasına neden olmaktadır (Truong-Bolduc ve ark., 2003).

2.1.7.4. Glikopeptid Direnci

Stafilokoklarda glikopetidlere karşı ilk duyarlılık azalması 1980'lerin ortalarında teikoplanin ara duyarlı veya dirençli, vankomisin duyarlı bir koagülaz negatif stafilokokun tanımlanmasıyla ortaya çıkmıştır (Arioli ve Pallanza, 1987). Ardından vankomisin ara duyarlı koagülaz negatif stafilokok ve teikoplanin ara duyarlı *S. aureus* tanımlanmıştır (Kaatz ve ark., 1990; Schwalbe ve ark., 1987). 1990'ların ortalarında ise çeşitli ülkelerde, düşük prevalanslı olmasına rağmen, azalmış glikopeptid duyarlılıklı *S. aureus* (GISA) suşları izole edilmiştir (Hiramatsu, 2001; Hiramatsu ve ark., 1997; Mainardi ve ark., 1995). Bu suşların keşfi, tanımlanmaları ve tespit metotları hakkında hala devam eden bir tartışmaya yol açmıştır. Ardından A.B.D'nde kazanılmış *vanA* direnç operonuna sahip vankomisin- ve teikoplanin-dirençli *S. aureus* izolatları raporlanmıştır (Bozdoğan, 2003). Bunu ardından Hindistan'da, vankomisin dirençli fakat *van* geni içermeyen *S. aureus* raporlanmıştır (Tware ve Sen, 2006). Yine Hindistan'da, hem *vanA* geni içeren hem de içermeyen vankomisin dirençli *S. aureus* izolatları raporlanmıştır (Thati, 2011). Fakat bu suşların da tespit metotları tartışmalıdır.

2.1.7.5. Lipopeptid Direnci

Daptomisin10-halkalı siklik lipopeptid antibiyotikler ailesinin bir üyesidir ve *Streptomyces roseosporus*'un doğal bir ürününün yarı-sentetik bir türevidir Gram pozitif bakterilere karşı geniş *in vitro* bir aktiviteye sahiptir. MSSA, MRSA, VISA ve VRE suşlarına karşı etkilidir. Etki mekanizmasının sitoplazmik membrana bağlanarak zarı depolarizasyona ve dolayısıyla hücre ölümüne neden olduğu düşünülmektedir. Günümüzde stafilokoklarda daptomisin direnci sınırlı olsa da, direnç mekanizması olarak şu üç gendeki mutasyonlar sorumlu tutulmaktadır; *mprF*, *yyfG* ve *rpoB* ve *rpoC* (Fraimow, 2010).

2.1.7.6. Makrolid, Linkozamid ve Streptogramin direnci

Makrolidler, linkozamidler ve streptograminler (MLS) kimyasal olarak farklı antibiyotiklerdir fakat aynı grup içinde sınıflandırılırlar (Tablo IV). MLS bakteriyel ribozoma bağlanarak protein sentezini inhibe eder. Stafilokoklarda MLS direncinde 3 temel mekanizma söz konusudur (Tablo V).

Tablo IV. Makrolidler, linkozamidler ve streptograminler (Leclercq, 2010)

Antibiyotik sınıfı	Antibiyotik
Makrolid	
14-üyelı halka	Klaritromisin, eritromisin
14-üyelı halka, ketolid alt grubu	Telitromisin
15-üyelı halka	Azitromisin
16-üyelı halka	Josamisin, spiramisin
Linkozamid	Linkomisin, klindamisin
Streptogramin	
Streptogramin A	Dalfopristin
Streptogramin B	Quinopristin
Streptogramin A+B	Dalfopristin-quinopristin

Tablo V. Stafilokoklarda temel MLS direnç fenotipleri (Leclercq, 2010)

Mekanizma	Gen sınıfı	Fenotip	Direnç fenotipi			
			14-,15-Ü	16-Ü	L	S
Ribozomal metilasyon	<i>erm(A),erm(C)</i>	İndüklenebilir MLS _B	R	S	S	S
		Yapısal MSL _B	R	R	R	S
Eflüks	<i>msr(A)</i>	MS _B	R	S	S	S
Enzimatik modifikasyon	<i>Inu(A)</i>	L	S	S	R ^a	S
Eflüks ?	<i>vga(A),vga(Av),Isa(B),</i> bilinmeyen bileşenler	LS _A	S	S	I	S/I
Faktor A ve B'lerin enzimatik modifikasyonu +/- faktör A'nın eflüksü	Çeşitli kombinasyonlarda <i>vat(A),vat(B),vat(C),</i> <i>vga(A),vga(Av),vga(B),</i> <i>vgb(A),vgb(B)</i>	S veya LS	S	S	S ve ya I	R

^a Linkomisine direnç klindamisine duyarlılık

2.2. Mobil genetik elementler

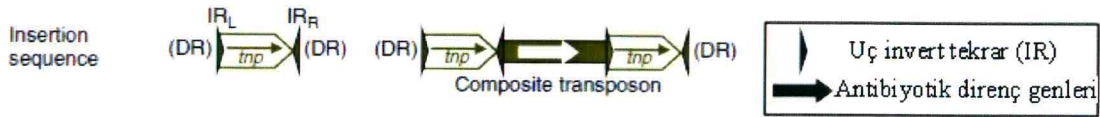
Mobil genetik elementler ilk 1940'lı yıllarda tanımlanmıştır ve prokaryotlar arasında genetik bilgi transferinin önemli bir yoludurlar. Mobil genetik elementler tipik olarak, kendi transfer ve yeni konak DNA'sına entegrasyonuna aracılık eden enzimlerin yanında çeşitli virülans ve direnç bileşenlerini kodlayan DNA fragmanları olarak tanımlanmaktadır. Mobil genetik elementler hücre içi ve hücreler arası hareketlilik gösterirler. Hücreler arası mobil genetik elementlerin transferi lateral veya horizontal gen transferi olarak bilinmektedir (Malachowa ve De Loe, 2010).

Bakterilerde bulunan antibiyotik direnç genlerinin yakalanmasında ve mobilizasyonunda görev aldığı bilinen temel mobil genetik elementler, DNA molekülleri arasında gen transferi sağlayabilen insersiyon sekansları (IS), gen kasetleri/ integronlar ve transpozonlar ve hücreler arasında transferi sağlayabilen plazmidlerdir (Partridge, 2011). Ayrıca bakteriyofajlar ve patojenisite adaları da stafilokoklarda yer alan mobil genetik elementlerdir (Malachowa ve De Loe, 2010).

2.2.1. İnsersiyon sekansları (IS)

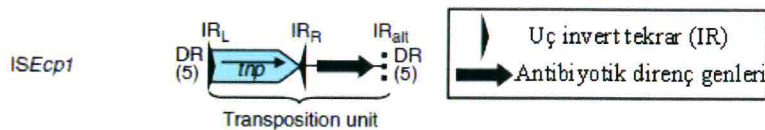
Klasik IS ve kompozit transpozonlar: Klasik IS genellikle kısa, eşlenik veya kusurlu invert tekrarlar (IR) ile bağlı kompakt mobil elementlerdir. Transpozaz proteinlerini kodlayan bir veya iki gen neredeyse bu IR'ler arasındaki tüm alanı kaplamaktadır. IR'in transpozaz proteini tarafından tanınması IS'nin yeni bir bölgeye, bir 'kes ve yapıştır' ve/veya 'kopyala ve yapıştır' işlemi ile hareketine olanak sağlar (Chandler ve Mahillon, 2002). Çoğu IS'nin yer değiştirmesi genellikle karakteristik 2-14 bç uzunluğunda direkt tekrarların (DR) oluşmasına neden olur. Klasik IS içerisinde direnç genleri taşımadıkları şeklinde tanımlansalar da, bir genin herhangi bir tarafına sokulan aynı IS'nin (veya iki yakın ilişkili IS) iki kopyası, bu geni, bir birim olarak hareket edebilen kompozit bir transpozonun parçası olarak yakalayabilir (Partridge, 2011).

Şekil II. Klasik IS ve kompozit transpozon (Partridge, 2011)



ISEcp1 ve ilişkili elementler: *ISEcp1*, 14-bç'lik IR ile sınırlandırılmıştır, fakat sağdaki IR'yi (IR_R) tanımda başarısız olarak ve yerine 3' ucundaki zayıf ilişkili bir sekansı kullanarak komşu bölgeleri hareket ettirdiği düşünülmektedir (Poirel, 2003; Lartigue, 2006). Çeşitli diğer elementlerin de (*ISEncal*, *ISSm2*, *IS1247*), *ISEcp1*'e benzer şekilde, antibiyotik direnç genlerini de içeren komşu bölgeleri mobilize ettiği düşünülmektedir (Van der Ploeg, 1995).

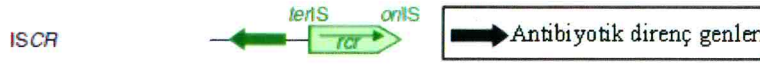
Şekil III. *ISEcp1* (Partridge, 2011)



ISCR elementleri: ISCR elementleri, yuvarlanan çember replikasyonu ile hareket eden, *IS91*, *IS801* ve *IS1294*'leri de içeren özgün bir IS ailesine benzemektedir. ISCR'nin de aynı şekilde hareket ettiği düşünülmektedir (Toleman, 2006) ve 'transpozazlar'ı için *rcr*

(yuvarlanan çember replikası) ismi önerilmiştir (Levings, 2008). ISCR elementleri, IR yerine, genin 3' ucunda bir orjin (*oriIS*) ve 5' ucunda bir son (*terIS*) ile bağlıdır ve DR oluşturmazlar. ISCR elementlerinin *terIS*'ı tanımada başarısız olarak genleri hareket ettirdiği ve komşu sekansın içine replikasyonun devam ettirildiği düşünülür (Toleman, 2006).

Şekil IV. ISCR (Partridge, 2011)



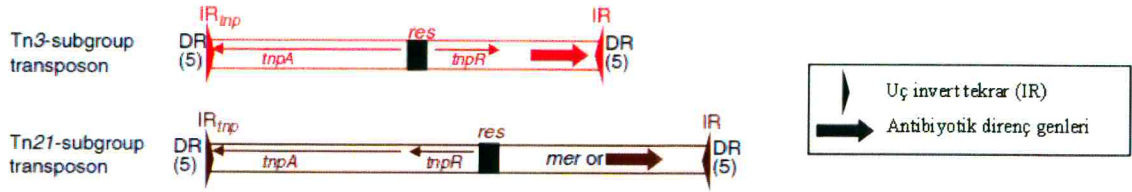
2.2.2. Transpozonlar

Transpozonlar, hücreler içerisinde ve arasında kendilerine bir replikondan diğerine hareket imkanı veren fonksiyonları kodlayan genetik segmentlerdir. Çoğu transpozonun karakteristiği transpozisyona aracılık eden enzimler ve transpozisyon sırasında transpozazlara bağlanan spesifik uçlardır (invert veya direkt tekrarlar). Transpozonların replikasyon genleri yoktur bu yüzden hayatlarını sürdürmek için bir replikatif yapıya (genelde bir plazmid veya kromozom) entegre olmalıdırlar. Transpozisyon konservatif veya replikatif olabilir (Rice, 2010).

En küçük transpozonlar IS'dir. Sadece kendi transpozisyon fonksiyonlarını kodlayabilirler. IS elementleri direnç veya diğer genler tarafından sınırlandırılabilir, bunlar kompozit transpozon olarak adlandırılmaktadır. Kompozit transpozonlar hareketliliklerini tandem IS elementlerine borçludurlar. Stafilocoklarda gentamisin direnci çoğunlukla *aac(6')*-*aph(2'')* aminoglikozid-modifiye edici enzim geni tarafından kodlanmaktadır. Bu gen birçok suşta IS256'nın invert kopyaları ile sınırlandırılmıştır. Stafilocoklarda bu transpozon Tn4001 olarak adlandırılmaktadır (Rice, 2010).

Tn3-ailesi: Basit kompozit transpozonlara nazaran daha kompleks bir ailedir. Transpozaz geninin (*tnpA*) yanında bir rezolvaz geni (*tnpR*) ve bir rezolüsyon bölgesi (*res*) içermektedirler (Partridge, 2011). Bu transpozonlar replikatif bir süreç ile hareket etmektedirler. Gram pozitif bakterilerde, Tn917, ErmB eritromisin ribozomal metilazın ekspresyonu vasıtasıyla makrolidlere, linkozamidlere ve streptogramin B'ye direnç kodlayan bir Tn3-aile transpozonudur. Tn3-ailesi, Tn21-benzeri transpozonları da içermektedir. İntegronlar ilk bu transpozonlardan tanımlanmıştır (Rice, 2010).

Şekil V. Tn3- ve Tn21- alt grubu transpozonlar (Partridge, 2011)

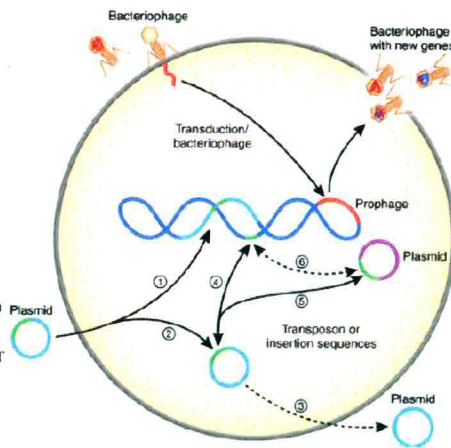


2.2.3. Plazmidler

Plazmidler kendilerini replike edebilen DNA molekülleridir. Stafilocoklar tipik olarak hücre başına bir veya daha fazla plazmid taşırlar ve bu plazmidler gen içeriğinde varyasyon gösterirler (Malachowa ve De Loe, 2010). Stafilocokal plazmidler üç grup içerisinde sınıflandırılabilir: (1) kriptik veya tek bir direnç bileşenini taşıyan küçük çok kopyalı plazmidler; (2) daha büyük (15-30kb) düşük kopyalı (4-6/hücre) plazmidler, genellikle çeşitli direnç bileşenlerini taşımaktadırlar; ve (3) konjugatif çoğul dirençli plazmidler (Berg, 1998). Büyük plazmidler teta replikasyonuna (Yunanca teta harfine benzeyen bir DNA replikasyon mekanizması) uğrar, küçük plazmidler ise genellikle yuvarlanan-çember mekanizması ile replike olurlar (Khan, 2005; Lindsay, 2010). *S. aureus*'un, *E. coli* veya *B. subtilis* gibi bakterilere kıyasla çevreden DNA elde etme becerisinin sınırlı olmasından ötürü, stafilocokal plazmidlerin hücreler arası transferinin çoğu transdüksiyon veya konjügasyon ile gerçekleşir (Morikawa, 2003). Bakteriyel konağa girdikten sonra, stafilocokal plazmidler serbest çembersel DNA olarak kalır veya açılıp kromozoma entegre olurlar (Şekil VI).

Şekil VI. *S. aureus* tarafından mobil genetik elementlerin kazanılması (Malachowa ve De Loe, 2010).

1. Genomik DNA içine plazmidlerin veya plazmid elementlerin inkorporasyonu.
2. Plazmidler serbest çembersel DNA olarak devam edilebilir.
3. İntihar plazmid.
4. Plazmid ve genomik DNA arasında bir transpozon veya bir IS'nin transferi.
5. Hücre içerisindeki plazmidler arasında bir transpozon veya bir IS'nin transferi.
6. Genomik DNA'dan diğer bir plazmide bir transpozon veya bir IS'nin transferi.



S. aureus'da β -laktamaz *blaZ* geni tarafından kodlanmaktadır ve *blaI* ve *blaR* düzenleyici genleri ile yakından ilişkilidir. Plazmid ile kodlanan β -laktamazların dışında, bla genleri transpozonlarda veya kromozal DNA içerisinde lokalize olabilir (Olsen, 2006). Güncel olarak, enterokoklardan vankomisin direnci kazanan *S. aureus* suşları raporlanmaktadır. Mekanizma olarak VISA suşlarından farklı oldukları düşünülmektedir (Weigel, 2003). Tn1546 konjugatif bir plazmid içerisinde vankomisin direnç gen kümesini kodlamaktadır. Bu elementin ko-enfeksiyon esnasında bir VRE suşundan MRSA'ya transfer edildiği düşünülmektedir (Lindsay, 2010).

2.2.4. Bakteriyofajlar

Bakteriyofajların stafilokokal çeşitlilik ve evrim üzerine fazlaca etkisi olduğu düşünülmektedir. Fajlar 3 farklı grup içerisinde sınıflandırılmaktadır; litik, ılımlı ve kronik. Litik fajlar faj terapisinde kullanılmaktadır, çünkü bakteriler projeni fajların salınımı esnasında tamamen parçalanmaktadırlar. Kronik fajlar bakterileri öldürmeden projenin hücre dışı çevreye salınmasına bu şekilde bakterinin üremesine ve bölünmesine olanak sağlar. İlımlı fajlar enfeksiyon sonrası bakterileri parçalama yeteneğine sahip olmakla birlikte, tipik olarak konak hücresi ile uzun-dönem bir ilişki oluştururlar, bu şekilde faj DNA'sı bir profaj olarak stafilokokal genoma entegre olur (Goerke, 2009). Fajlar pozitif ve negatif lizojeni ile virülans artışı veya kaybına neden olabilmektedirler. Panton-Valentine lökositin *S. aureus*'da profajlar tarafından kodlanan virülans moleküllerindedir (Szmigielski, 1990).

Profajlar ve profajların kodladığı moleküller ayrıca stafilokoklarda diğer mobil genetik elementler ile ilgili işler görmektedir. Örneğin, profajlar bazı stafilokokal patojenisite adaları için hareket oluşturmaktadır. Ayrıca bazı fajlar, kromozomal DNA'ya önceden girmiş plazmidlerin veya plazmid elementlerinin transdüksiyon ile antibiyotik direnci transfer etme yeteneğine sahiptir. Kloramfenikol direnç bileşeni içeren pS194 ve eritromisin direnci içeren pI258 sırasıyla ϕ 11 ve ϕ 11de fajları tarafından transdükte edilmektedir (Malachowa ve De Loe, 2010).

2.2.5. Patojenisite adaları

Stafilokokal patojenisite adaları (SaPi) 14-17 kb büyüklüğündeki mobil genetik elementlerdir. Bugüne kadar, en az 16 SaPi sekanslanmıştır (Novick ve Subedi, 2007). SaPi'ler iyi korunan çekirdek genleri ile ahenkli bir aile oluşturmaktadırlar. Çekirdek genleri transkripsiyonel düzenleyici proteinleri kodlayan iki açık okuma çerçeveleri (ORF) ve integraz, Rep proteini ve terminaz kodlayan bir bölge içermektedir. Çekirdek genlerine ek

olarak, neredeyse tüm SaPi'ler enterotoksinler veya toksik şok sendrom toksini kodlamaktadır (Yarwood, 2002).

SaPi'ler kromozom (*att_s*) üzerindeki altı farklı spesifik bölgenin biri içerisinde entegre haldedir ve her biri daima aynı oryantasyondadır. SaPi'ler enfeksiyonu takiben belirli stafilokokal bakteriyofajlar tarafından veya endojen profajların indüksiyonu ile hareketlendirilebilirler. Örnek olarak, SaPi'nin diğer stafilokoklara eksizyonu ve transferine aracılık etmek için yardımcı faj 80α'nın becerisi verilebilir (Malachowa ve De Loe, 2010). SaPi'lerin orijini ve evrimini açıklamak için çeşitli hipotezler öne sürülmüştür. Örneğin, Yarwood tüm SaPi'ler için ortak atasal genetik bir elementin (muhtemelen bir profaj) varlığını ve sonradan modüler rekombinasyon olayları ile adaların çeşitliliğinin oluştuğunu öne sürmüştür (Yarwood, 2002).

2.2.6. Genomik adalar

S. aureus suşlarında genomları sekanslanan 3 genomik ada ailesi mevcuttur. Bu genomik adalar *vSAα*, *vSAβ* ve *vSAγ* olarak isimlendirilmektedir ve 5' ucunda bir transpozaz geni ile ve 3' ucunda kısmi restriksiyon-modifikasyon (RM) sistemi tip I ile sınırlandırılmaktadır (Malachowa ve De Loe, 2010). Genomik adaların kompozisyonu göz önüne alındığında, genomik adaların horizontal gen transferi ile kazanılmış mobil elementler olduğu düşünülmektedir (Dobrindt, 2004). Bir lipoprotein gen kümesi (*lpl*) ve stafilokokal süperantijen-benzeri genler (*ssl*) *vSAα* üzerinde lokalizedir. *vSAβ* bakteriyosin, enterotoksinler, hiyaluronat liyaz ve bir serin proteaz gen kümesini kodlamaktadır. *vSAγ* ise β-tipi fenol-çözünbilir modüllerini kodlayan genleri ve *vSAα*'dakine benzer *ssl* genlerinin bir kümesini içermektedir (Gill, 2005).

2.2.7. Gen kasetleri

Gen kasetleri antibiyotik direnci ile ilişkili en küçük mobil elementlerdir ve genelde bir gen (genelde bir ribozom-bağlama bölgesinin önünde gelir) ve bir *attC* rekombinasyon bölgesinden (veya 59-bazlık element) oluşmaktadırlar. Farklı kasetlerin *attC* bölgeleri uzunluk ve sekansta varyasyon gösterirler, fakat uçlarında korunmuş bölgeler içermektedirler. Gen kasetleri geçici olarak çembersel moleküller olarak var olabilir fakat kendi hareketleri için gerekli mekanizmayı kodlamazlar ve genelde integronlara veya nadiren ikincil bölgelerde entegre halde bulunurlar (Partridge, 2011).

Şekil VII. Gen kasetleri (Partridge, 2011)

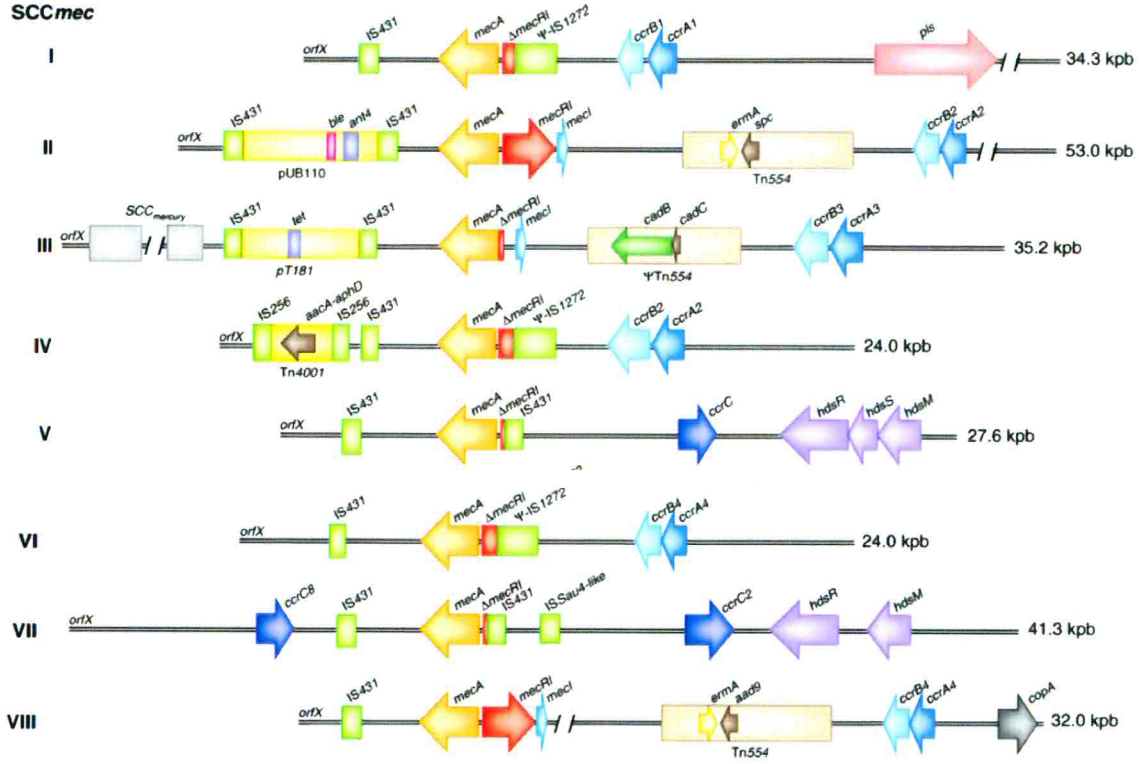
Gene
cassettes



Stafilokokal kaset kromozomu: Stafilokokal kaset kromozomları (SCC), daima *S. aureus* kromozomu üzerindeki *orfX* genine sokulan nispeten büyük DNA fragmanlarıdır. SCC antibiyotik direnci ve/ veya virülans bileşenlerini kodlayabilir. Bir çok SCC'nin metisilin direnç genini (*mecA*) kodladığını düşünürsek, SCC'ler *SCCmec* veya non-*SCCmec* şeklinde iki grupta tasnif edilebilir (Malachowa ve De Loe, 2010). *MecA* genine ek olarak, *SCCmec* ek antibiyotik direncini kodlayabilen represör *MecI*, transmembran β -laktam sinyal transdüktörü *MecR1*, rekombinazlar *CcrAB* ve *CcrC* ve birleştirme bölgeleri *J*'yi kodlamaktadır (Şekil II). *SCCmec*'in rekombinazlar tarafından entegrasyon ve eksizyonu *orfX*'in 3' ucundaki *S. aureus* kromozomu üzerindeki spesifik bir bağlanma bölgesi (*attB_{sc}*) içerisinde meydana gelmektedir (Ito, 2003).

SCCmec kompleksi içerisindeki *mec* ve ilişkili genlerin organizasyonuna dayalı olarak, beş farklı (A-E) *SCCmec* sınıfı tanımlanmıştır, üçü (A-C) *S. aureus*'da en yaygın olanlardır (IWG-SCC, 2009). Sadece sınıf A *SCCmec* komplet *mecA* regülonunu (*mecI-mecR1-mecA*) içermektedir, sınıf B ve C'de düzenleyici genler IS'ler ile bölünmüştür; sınıf B'de IS1272- Δ *mecR1-mecA* ve sınıf C'de IS431- Δ *mecR1-mecA* (Malachowa ve De Loe, 2010). Mevcut sekiz *SCCmec* tipinde tanımlanmış 3 *mec* kompleks sınıfı ve dört farklı *ccr* allotipi vardır. Ancak, *SCCmec* tipleri *J* bölgelerindeki varyasyonlara dayalı olarak daha ileri alt tiplere ayrılabilir. İlginç olarak, toplum-kökenli MRSA suşları tipik olarak *SCCmecIV*, V veya VII elementlerini taşıırken, hastane-kökenli MRSA tipik olarak *mecA*'ya ek olarak direnç elementlerini kodlayabilen daha büyük *SCCmec* I, II, III, VI veya VIII'i içermektedir (Chambers, 2009). Bu ek direnç gen bileşenleri genellikle *SCCmec*'in *J* bölgelerine sokulmuş plazmidler, transpozonlar veya IS'ler tarafından kodlanmaktadır (Şekil VIII)

Şekil VIII. SCCmec tipleri (Malachowa ve De Loe, 2010)

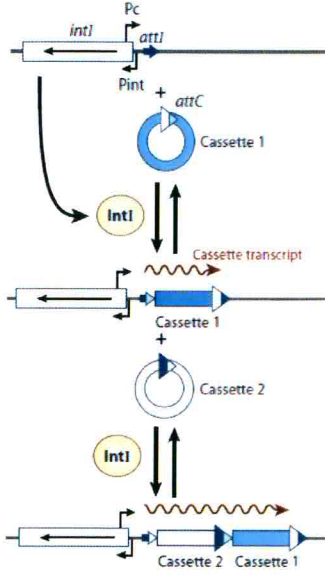


Non-SCCmec: SCC'ler kompleks olabilir ve bu yüzden metisilin direncini kodlamaya sınırlandırılmaz. SCC₄₇₆ fusidik asit direncini kodlamaktadır. SCC_{mercury} civa kloride karşı direnci kodlamaktadır. Fagositozdan koruyan kapsüler polisakarit 1'in sentezini kodlayan genler SCC_{cap1} olarak isimlendirilen özel bir SCC elementinin üzerine lokalizedir.

2.2.8. İntegronlar

İntegronlar eksojen açık okuma çerçevelerini (ORF), bölgeye-spesifik rekombinasyon ile yapıya dahil eden ve bunları doğru ekspresyonlarını sağlayarak fonksiyonel genler haline dönüştüren toplanma platformlarıdır. Bir integron genelde bir integrasyonu kodlayan bir *intI* geni, bir *attI* rekombinasyon bölgesi ve dışa-oryante bir promoterin varlığı ile tanımlanmaktadır (Mazel, 2006). *AttI* ve/ veya *attC* bölgeleri arasındaki *intI*'nin katalizlediği rekombinasyon kasetlerin sokulması veya çıkarılması ile sonuçlanmaktadır (Partidge, 2009).

Şekil IX. Kaset sokulması veya çıkarılmasında integron-aracılı model (Cambray ve ark., 2010)



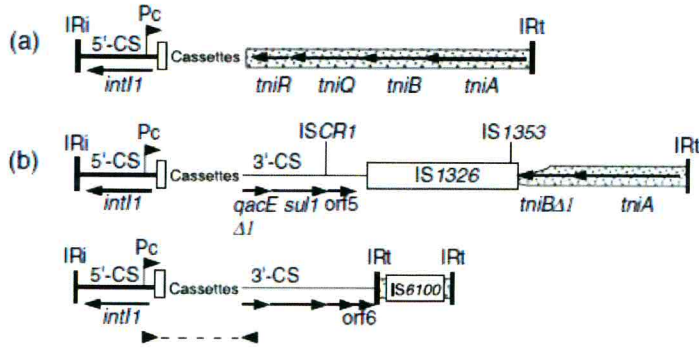
Çeşitli kasetler ardışık olarak aynı integronda, kasetler daima aynı oryantasyonda yerleşecek şekilde, bir dizi oluşturmak için sokulabilir. İntegronlar ilk defa antibiyotik direnç genleri ve mobil elementler ile olan ilişkilerinin bir sonucu olarak tanımlanmışlardır (Stokes ve Hall, 1989). Fakat şu anda, integronların birçok türün kromozumunda bulunduğu ve genetik elementlerin önemli bir sınıfını teşkil ettiği açıktır (Mazel, 2006). İntegronlar ilk tanımlandığında, integron tanımı integronların kendilerinin mobil bir DNA elementi olduğunu öngörmekteydi (Stokes ve Hall, 1989). Bu öngörü karakterize edilen ilk integronların transpozonlarda lokalize olmasına dayanmaktaydı. Bu örneklerde integronların transpozisyonu, sadece integron içindeki gen kasetlerini mobilize eden, integronun kodladığı integrazın aktivitesine dayanmamaktaydı. Ancak hem transpozonlar tarafından taşınan hem de bakteriyel genomların hareketsiz komponentleri olarak mevcut olan diğer integron tiplerinin keşfi ile, tüm integronlar iki alt grup içerisinde sınıflandırılabilir: mobil integronlar (Mİ), mobil genetik elementlere bağlı ve antibiyotik direnç genlerinin yayılmasında yer alan integronlar; süper (kromozomal) integronlar (Kİ) (Mazel, 2006).

2.2.8.1. Mobil İntegronlar (Mİ)

Mİ'lar, konjugatif plazmidler tarafından taşınabilen, fiziksel olarak mobil DNA elementleri ile ilişkili (transpozonlar) fonksiyonel platformlardır. Bu elementler, aynı veya farklı türlerin bakteriyel bireyleri arasında etkin genetik bilgi aktarımına olanak sağlayan, doğal genetik aygıtlar olarak görev görmektedirler. Mİ'ler heterojen kökenli sadece birkaç kaset içermektedir ve muhtemelen farklı genomik zeminlerde ardışık olarak toplanmışlardır. Tanımlanan en uzun dizi sekiz kasetten oluşmaktadır (Naas, 2001). Kasetlerin heterojenitesi, kodlanan ORF'lerinin tutarsız kodon kullanımı ve *attC* bölgelerindeki sekans ve boyut çeşitliliği ile belirlenir. Aşık heterojen orjinleri ile çelişerek, bir Mİ ile ilişkili kasetler çarpıcı bir fonksiyonel homojenite gösterirler. Çoğunlukla antibiyotik direncinde görev almaktadırlar. Çeşitli antibiyotik direnç genlerini taşıyan 130'dan fazla farklı kasetlik bir havuz Mİ'lerde tanımlanmıştır (% 98'lik bir nükleotid özdeşlik eşiğine dayalı) (Fluit, 2004). Birlikte, bu kasetler, β -laktamları, tüm aminoglikozidleri, kloramfenikölü, trimetoprimi, streptotrisini, rifampini, eirtormisini, fosfomisini, linkomisini, kinolonları ve kuarterner amonyum-bileşen ailesini içeren çoğu antibiyotik sınıfına direnç sağlamaktadır (Cambay ve ark., 2010). Klinik izolatlardan elde edilen Mİ'lerde sadece birkaç kaset bilinmeyen fonksiyonlu ORF'leri taşımaktadır.

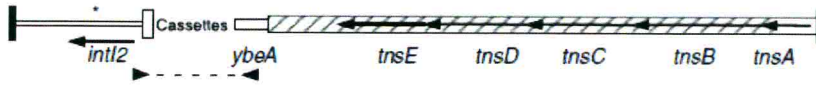
Bugüne kadar, kodlanan integrazların sekansına dayalı olarak, 5 farklı Mİ sınıfı tanımlanmıştır. Sadece ilk üçü tarihsel olarak çoğul direnç fenotiplerinin dağılımında yer alsa da, tüm 5 sınıfta antibiyotik direnç determinanları ile ilişkilendirilmiştir (Mazel, 2006). Sınıf 1 integronlar en yaygın olanı ve klinik olarak en önemli olanıdır. Gram negatif klinik izolatların %22'si ila % 59'unda tespit edilmektedirler (Labbate, 2009). Ayrıca nadiren gram pozitif bakterilerde de tanımlanmışlardır (Nandi, 2004; Nesvera, 1998; Shi, 2006). Bu itibarla, sınıf 1 integronlar major deneysel integron modelini oluşturmaktadırlar. Sınıf 1 integronlar Tn402'den köken alan, sonradan Tn21 gibi daha büyük transpozonlarda da gömülü olabilen, fonksiyonel ve non-fonksiyonel transpozonlar ile ilişkilidirler.

Şekil X. Sınıf 1 integronlar; a) Tn402-benzeri sınıf 1 integron, b) 3'-CS'li sınıf 1 integron Tn402 deriveleri (Partidge, 2009)



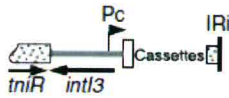
Sınıf 2 integronlar, iki istisna ile, çoğunlukla Tn7 deriveleri ile ilişkilidir ve bir dizi farklı kaset dizileri göstermektedirler (Biskri, 2003; Ramirez, 2010).

Şekil XI. Sınıf 2 integron (Tn7) (Partidge, 2009)



Sınıf 3 integronların da ayrıca bir transpozon içinde lokalize olduğu düşünülür ve sınıf 2'den daha az yaygındır (Arakawa, 1995; Collis, 2002).

Şekil XII. Sınıf 3 integron (Partidge, 2009)



Diğer iki Mİ sınıfı, *Vibrio* türlerindeki trimetoprim direnç gelişimindeki rolleri vasıtasıyla tanımlanmışlardır. Sınıf 4 integron *Vibrio cholerae*'da bulunan integratif ve konjüгатif element SXT'nin bir alt kümesinde gömülüdür (Hochhut, 2001). Sınıf 5 integron *Alivibrio salmonicida*'nın pRSV1 plazmidi üzerinde taşınan bir bileşik transpozonda lokalizedir (Sorum, 1992).

Direnç genleri ile ilişkili olmayan sınıf 1 ve 3 integronlar çevresel bakterilerde elde edilmiştir (Xu ve ark., 2007b; Gillings ve ark., 2008). Bu durumlarda, integronlar fonksiyonları bilinmeyen kasetler taşımaktaydılar. Ek olarak, fonksiyonel bir integras kodlayan sınıf 2 integronlar iki occasion üzerinde izole edilmiştir (Barlow, 2006; Marquez, 2008). Birincisinde, integron non-antibiyotik-direnç gen kasetleri ile ilişkiliydi (Barlow,

2006) Bu veri Mİ'ların spesifik olarak antibiyotik direnci için var olmadığına fakat muhtemelen bakteriyel adaptasyona aracılık etmede genişçe yer aldıklarına işaret etmektedir. Direnç fonksiyonlarının prevalansı muhtemelen klinik olarak ilişkili çevre üzerine odaklanan yanlı örneklemeden kaynaklanmaktadır ve bu ortamlardaki integronların evrimsel başarısını yansıtmaktadır.

2.2.8.2. Kromozomal İntegronlar

1990'ların sonlarında, Mİ gen kaset dizileri ve *V. cholerae* genomunda tanımlanan tekrarlanan DNA sekanslarının bir kümesi arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalar *V. cholerae* serotip O1 biotip El Tor suş N16961 genomunun kromozomu üzerinde farklı bir integron tipinin keşfine yol açtı (Mazel, 1998). Bu integron, Mİ'ların integrazları ile ilişkili spesifik bir integraza sahipti (VchIntA) ve mobil gibi de gözüküyordu. Aslında, kromozomda lokalizeydi ve mobil DNA elementleri ile ilişkili değildi (Hiedelberg, 2000).

Kİ'ler çeşitli bakteriyel türlerde bulunmaktadır (Tablo VI). 2007 yılında tam olarak veya kısmen sekanslanan mevcut 603 genomun kapsamlı bir analizi bunların % 9'unun bir integron integrası taşıdığını göstermiştir (Boucher, 2007). Daha fazla genom ile Mart 2010'da yürütülen benzer bir araştırmada, genomların yaklaşık % 17'sinin bir integron integrası taşıdığı gösterilmiştir (NCBI'da mevcut 1189 komplet bakteriyel genomda 207'si). Bu integrazların bir temsilci örneğinden çıkarılan filogenetik ilişki üç major gruba farklılaşmaya olanak sağlar: (a) toprak-doğal su protobakteri integron grubu, çoğunlukla doğal su ve toprak çevresinden elde edilen protobakterilerden oluşmaktadır; (b) deniz γ -proteobakteri grubu; ve (c) ters integraz grubu, kaset dizisi bakımından integrazın eş doğrusal oryantasyonu tarafından karakterize edilir, böylece *attI* bölgesi integrazın 3' ucunda bulunur. İlk ikisi ekolojik olarak ilişkili taksonlardandır, oysa üçüncüsü taksonomik olarak farklı organizmaları yeniden gruplandırmakta fakat yapısal bir hususiyet ile korele etmektedir (Cambay ve ark., 2010).

Görünen şu ki, Kİ'lerin dağılımı çeşitli bakteriyel şubelere yol açmıştır ve integrazların dallanma paternleri organizmal filogeni ile iyi bir uyum içindedir. Bu açık bir şekilde integronların antik ve genelde stabil genomik yapılar olduğunu göstermektedir (Cambay ve ark., 2010). Çeşitli filogenetik uyumsuzluklar -lateral transfer olayının az olduğunu söyleyen fark edilebiliyor olmasına rağmen, Kİ'ler konak genomlarının sedanter sakinleridir (Boucher, 2007).

Tablo VI. Kromozomal integronları içeren bazı bakteriyel türler ve ilişkili kasetlerin yapısal özellikleri (Cambray ve ark., 2010).

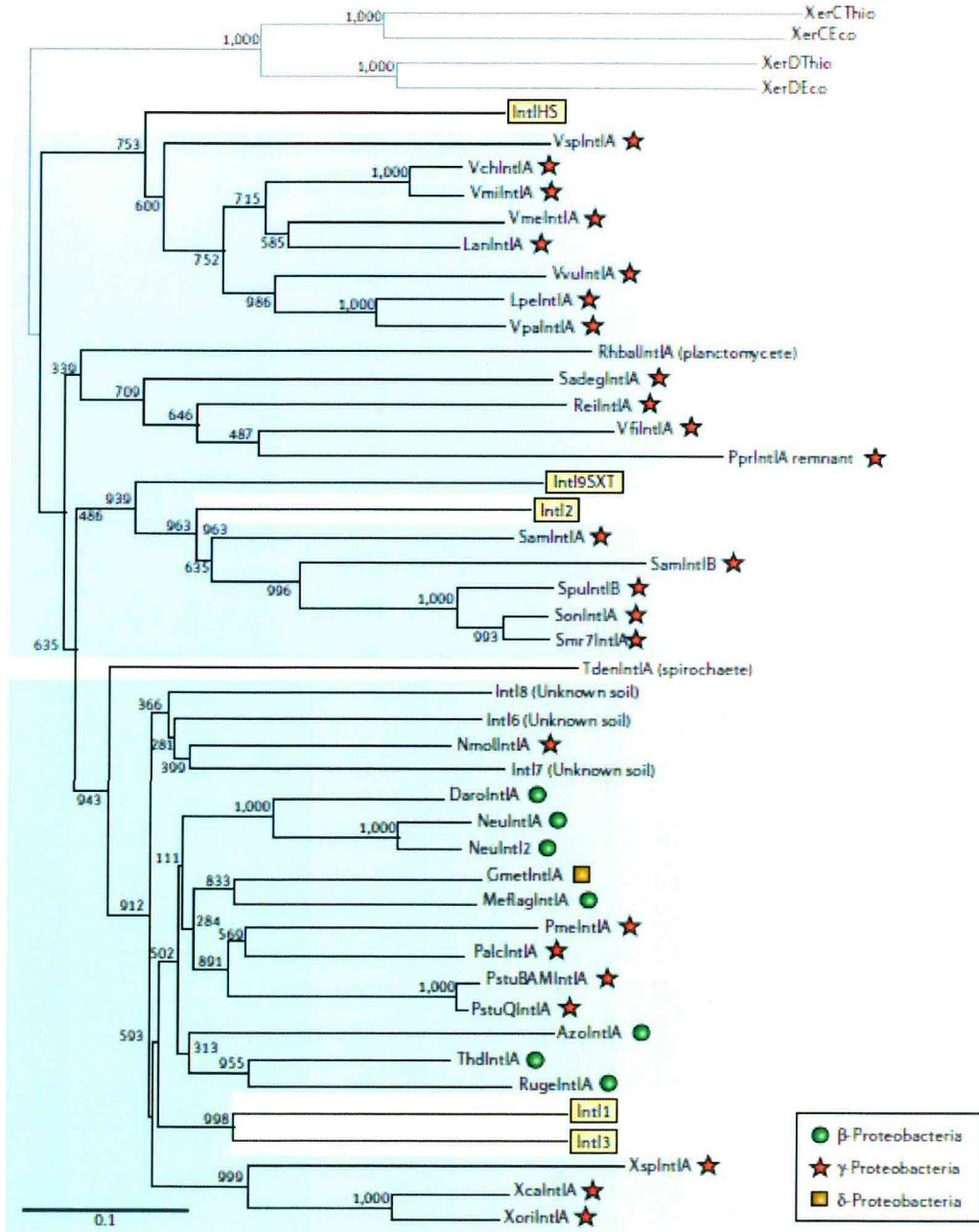
Bakteriyel grup	Bakteriyel suş	Gen kasetlerinin Sayısı	Tipik attC Uzunluğu
γ-proteobacteria			
Vibrionaceae	<i>Vibrio vulnificus</i> CMCP6	217	126–129
	<i>Vibrio cholerae</i> N16961	179	126–129
	<i>Vibrio</i> sp. DAT722	116	126–128
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> RIMD2210633	69	125–128
	<i>Vibrio alginolyticus</i> 12G1	51	126–129
	<i>Vibrio fischeri</i> ES114	38	125–127
	<i>Vibrio splendidus</i> LGP32	25	126–129
Pseudoalteromonas	<i>Pseudoalteromonas tunicata</i> D2	7	78–129
	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> TAC125	5	98–102
Xanthomonadaceae	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> ATCC 33913	22	60
	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	3	79–94
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas stutzeri</i> Q	>7	76–77
	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	32	76–90
Shewanellaceae	<i>Shewanella</i> sp. MR-7	2	90–92
	<i>Shewanella denitrificans</i> OS217	0	NA
Alteromonadaceae	<i>Saccharophagus degradans</i> 2–40	73	111–140
β-proteobacteria			
	<i>Nitrosomonas europaea</i> ATCC19718	0	NA
	<i>Nitrosomonas eutropha</i> C71	3	60–120
	<i>Azoarcus</i> sp. EbN1	3	59–73
	<i>Rubrivivax gelatinosus</i> PM1	2	70–126

δ-proteobacteria			
	<i>Geobacter metallireducens</i> GS-15	3	59-63
Planctomycetes	<i>Rhodopirellula baltica</i> SH1	0 NA	NA
Spirochaetales	<i>Treponema denticola</i> ATCC35405	45	63-68

Kİ'lerin kaset dizisi çok sayıda kaset içerebilir (*Vibrio vulnificus*'da 217'ye kadar), gerçi bazıları sadece çok az hatta hiç kaset içermemektedir. Kİ'ler arasında, süperintegronlar olarak adlandırılan bir alt grup spesifik karakteristikleri tarafından tanımlanmaktadır. İlişkili *attC* bölgelerinin yüksek dereceli özdeşliği ile (>80%), büyük bir kaset dizisi gösterirler (>20). *Vibrio* türlerinin genomunda bulunan çoğu Kİ'ler böyledir (Cambray ve ark., 2010). Homolog *attC* bölgeleri gerçekte spesifik türlerdir ve genetik olarak ilgili bir topolojiyi tanımlarlar. Kİ integrazlar ile karşılaştırıldıklarında, Mİ'lerin integrazları birlikte gruplandırılmazlar fakat aksine ağaçta dağılırlar (Rowe-Magnus, 2001). IntI1 ve IntI3 yakın olarak ilişkilidir ve toprak-doğal su proteobakteri grubuna aittirler. IntI2 ve *Vibrio*'da raporlanan diğer iki Mİ'un integrazları deniz γ -proteobakteri grubu içerisinde çeşitli noktalara dallanırlar (Mazel, 2006). Dolayısıyla, antibiyotik direnç fenotiplerine ortak fonksiyonel katkılarına rağmen, Mİ'ler evrimsel olarak tutarlı bir grup oluşturmamaktadırlar. Aksine, muhtemelen diğer mobil elementler tarafından rastlantısal olarak mobilize edilen Kİ'lardan, çeşitli zamanlarda bağımsız olarak köken almışlardır (Rowe, 2001). Klinik ortamdaki sınıf 1 integronların başarılı bir şekilde yayılımına yol açan mobilizasyon süreçleri nispeten iyi anlaşılmıştır ve varsayımsal olarak sınıf 1 integronların en yaygın formlarını oluşturan evrimsel geçmişin yapılanması ile ilgili bir model önerilmektedir (Cambray, 2010). Kısaca, herhangi bir direnç kasetinden mahrum sınıf 1 integronlar çevresel bakteriler *Azoarcus communis* MUL2G9 ve *Acidovorax* sp. MUL2G8A'nın kromozomlarında raporlanmıştır. Bu integronlar mobil elementler ile ilişkili değildir ve mobil sınıf 1 integronların ataları olarak kabul edilebilir. Böyle bir Kİ, akabinde, iki akraba invert tekrar ile ilişkili transpozisyon genlerinin eklenmesi sayesinde fonksiyonel bir transpozonun içine gömülür. Bu yapı sonra atasal Tn402'ye öncülük eden bir *qacE* kaseti edinir (kuarternar amonyum bileşiklerine direnç). Bu transpozon sonra, *qacE*'nin 5'ucunda delesyon ile sonuçlanan alışılmadık bir mekanizma ve ilişkili *attC* bölgesi sayesinde *sulI* genini alır (sülfonamidlere direnç). Bu majör direnç bileşeninin kazanılması muhtemelen bu Tn402 derivativesinin yayılımını, geniş bir genetik zemin aralığında arttırmaktadır. Sonra bu Mİ, potansiyel direnç kasetlerini de içeren muazzam bir kaset repertuarına erişim sağlar. Muhtelif yapısal değişiklikler ve diğer İS'ler ile

ilişkiler bu yayılıma eşlik eder, bu da sınıf bir integronlarda görülen güncel çeşitliliğe yol açmaktadır (Cambray ve ark., 2010).

Şekil XIII. İntegron integraz genlerinin filogenetik ilişkisi (Mazel, 2006)



2.3. Stafilokoklarda integron

2.3.1. Stafilokoklarda integron varlığının gösterilmesi

Sınıf 1 integron antimikrobiyal direnç genlerinin primer bir kaynağı olarak tanımlandığı ve mikrobiyal popülasyonlar içerisinde direnç genlerinin rezervuarı ve değiş-tokuş platformları olarak hizmet ettiğinden şüphelenildiği için, çeşitli gram negatif bakterilerde antibiyotik direnç genlerinin dağılım ve yayılımındaki rolü iyi bir şekilde araştırılmış ve gram negatif organizmalar arasında dağılımı %22-59 olarak kaydedilmiştir (Martinez-Freijo ve ark., 1998). Ancak gram pozitif bakterilerde sınıf 1 integron varlığı hakkında bilinenler çok azdır. Gram pozitiflerde ilk olarak, 1998 yılında, streptomisin/ spektinomisin direnç bileşeni ile ilgili tipik bir sınıf 1 integron *Corynebacterium glutamicum*'dan elde edilen 29-kb'lık bir plazmid pCG4 üzerinde tespit edildi (Nesvera ve ark., 1998). 2002 yılında, streptomisin, spektinomisin ve tetrasiklin direncini kodlayan yeni bir aminoglikozid adenil transferaz gen kaseti *aadA9* ile birlikte *intI1* benzeri bir gen *C. glutamicum*'dan elde edilen 27.8-kb'lık bir R-plazmid pTET3 üzerinde gözlenmiştir (Tauch ve ark., 2002). Nandi ve ark. kümes kumluğundan izole edilen gram pozitif mikroorganizmalarda sınıf 1 integron varlığını incelemişlerdir ve *Corynebacterium* spp. (*C. ammoniagenes*, *C. casei* ve *C. glutamicum*), *Aerococcus* spp., *Brevibacterium thiogenitalis* ve *Staphylococcus* spp. (*S. lentus*, *S. nepalensis* and *S. xylosus*) gibi çeşitli gram pozitif bakteri türlerinde sınıf 1 integron bulmuşlardır (Nandi ve ark., 2007). Yine iki çalışmada enterokoklarda sınıf 1 ve sınıf 2 integron varlığı gösterilmiştir (Clark ve ark., 1999; Xu ve ark., 2010). Fakat stafilokoklarda geniş çapta ilk klinik çalışma Shi ve ark. tarafından yapılmıştır (Shi ve ark., 2006). Ardından aynı ekipte yer alan Xu ve ark. tarafından 2001-2006 yılları arasında Güney Çin'de bir hastaneden izole edilen metisilin dirençli *S. aureus* ve koagülaz stafilokoklarda sınıf 1 integron varlığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Xu ve ark., 2007a, 2008a, 2008b).

2.3.2. Sınıf 1 integron pozitif MRS izolatlarının epidemiyolojisi

2001-2006 yılları arasında Güney Çin'de izole edilen 262 MRS izolatu sınıf 1 integron varlığı açısından çeşitli çalışmalarda Xu ve ark. tarafından araştırılmıştır (Xu ve ark., 2011). Ayrıca SCCmec tiplemesi yapılan bu 262 MRS izolatında baskın olan tiplerin klasik nozokomiyal tipler olan SCCmec tip I, II ve III olduğu tespit edilmiştir. Test edilen 262 MRS izolatınının, 122'sinde PZR ile *intI1* tespit edilerek sınıf 1 integron varlığı gösterilmiştir (Xu ve ark., 2011). Hiçbir izolatta sınıf 2 ve 3 integron varlığı gösterilememiştir. İntegraz geninin tespit edilmesinden sonra suşların değişken bölgeleri ve 3' korunmuş bölgeleri de

araştırılmıştır. Çoğu izolatın (%94.3) $\Delta qacE$ ve bir *sull* geni ve ORF5 içeren klasik 3' korunmuş segmentine sahip olduğu gösterilmiştir.

Yapılan değişken bölge analizinde de, suşların 4 farklı gen kaset dizisine sahip olduğu gösterilmiştir. 61 izolatta trimetoprim ve aminoglikozid direncine neden olan *dfrA12-orfF-aadA2* gen kaseti dizisi, 53 izolatta sadece *aadA2* gen kaseti, 5 izolatta aminoglikozid ve kloramfenikol direncine neden olan *aacA4-cmIA1* gen kaseti dizisi ve 3 izolatta da trimetoprim ve aminoglikozid direncine neden olan *dfrA17-aadA5* gen kaset dizisi varlığı gösterilmiştir (Xu ve ark., 2011). Sınıf 1 integronun yerinin belirlendiği Southern blot hibridizasyon çalışmalarında tespit edilen sınıf 1 integronların plazmidik değil kromozomal olduğu gösterilmiştir (Xu ve ark., 2011).

2.3.3. Sınıf 1 integron pozitif MRS izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları

Xu ve ark. yapmış olduğu çalışmaya göre 2001-2006 yıllarında Güney Çin'den izole edilen integron pozitif MRS izolatları eritromisin, gentamisin, tetrasiklin ve trimetoprim-sülfametoksazol direnci ile istatistiksel olarak ilişkili bulunmuştur (Xu ve ark., 2011).

2.3.4. Stafilokoklarda tespit edilen sınıf 1 integronların orjinleri ve dağılımı

Stafilokoklarda bugüne kadar tespit edilen sınıf 1 integronların gram negatif bakterilerde tespit edilen integronlar ile büyük bir homoloji göstermektedir (Xu ve ark., 2011). Bu da hastane ortamında gen kasetlerin filogenetik olarak farklı bakteriler arasında horizontal transferini akla getirirse de, integronların gram pozitif ve negatif organizmalar arasında horizontal transferi ve yayılımı hala net değildir ve ileri düzeyde araştırmalara gerek vardır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Stafilokok İzolatlarının Toplanması

2010 yılı Nisan-Haziran ayları arasında OMÜ-SUVAM TPL Bakteriyoloji Subdisiplin Laboratuvarına gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen 50 metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) ve 50 koagülaz negatif stafilokok (MRKNS) olmak üzere toplam 100 stafilokok izolatu çalışmaya dahil edildi. Pozitif kontrol şuşları olarak, *S. aureus* ATCC 43300 ve *E.coli* K8 şuşları kullanıldı.

3.2. Metisilin Dirençli Stafilokok İzolatlarından DNA ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu yapılacak klinik ve pozitif kontrol şuşları bir gün öncesinden saklama stoklarından MHA plaklarına pasajlandı. Üreyen saf kolonilerden İnvitrogen PureLink Genomic DNA Kit'i kullanılarak üretici firmanın önerileri dorultusunda DNA ekstraksiyonu yapıldı (Invitrogen User Manual, 2007).

3.3. Metisilin Dirençli Stafilokokların Tanımlanması

3.3.1. Fenotipik Yöntemler

2010 yılı Nisan-Haziran ayları arasında OMÜ-SUVAM TPL Bakteriyoloji Subdisiplin Laboratuvarına çeşitli servis ve polikliniklerden gelen hasta örneklerinden elde edilen stafilokok şüpheli kültürlerle aşağıdaki fenotipik yöntemler uygulanmıştır.

Koloni morfolojisi: Besiyerinde morfolojik olarak stafilokok ile uyumlu koloniler değerlendirmeye alındı.

Mikroskopik muayene: Bu amaçla gram boyama yapılacak ve gram pozitif, kümeler oluşturan koloniler değerlendirmeye alındı.

Katalaz test: % 3 hidrojen peroksit kullanılarak yapılacak test sonucunda pozitif koloniler değerlendirmeye alındı.

Phoenix BD Otomatize Mikrobiyoloji Sistemi: Yukarıdaki inceleme ve testler sonucunda stafilokok şüpheli izolatların identifikasyonu amacıyla, BD Phoenix gram pozitif identifikasyon ve antibiyotik duyarlılık kartuşu (PMIC/ID-33) kullanıldı. Cihazdan metisilin dirençli stafilokok (MRS) olarak tanımlanan izolatlar çalışma tarihine kadar %25 gliserol içeren brain heart infusion broth içerisinde -80 °C'de saklandı.

Stafilokoklarda metisilin direncinin belirlenmesinde disk difüzyon yöntemi:

S. aureus ve koagulaz negatif stafilokoklarda metisilin direnci ek olarak CLSI M2-A9'da önerildiği şekilde disk difüzyon yöntemi ile belirlendi (CLSI, 2006). Mueller Hinton Agar (MHA) ve 30 µg sefoksitin içeren diskler kullanıldı.

- Buzdolabında +4 °C'de saklanan diskler kullanımdan önce potans kaybını önlemek için 10-15 dakika oda ısısında bekletildi.
- İnokulum direkt koloni süspansiyonu yöntemiyle hazırlandı. %5 koyun kanlı agara pasajlanarak elde edilecek bakteri kolonileri %0.9 NaCl içinde süspansiyon edildi.
- Bakteri yoğunluğu spektrofotometrik olarak 0.5 McFarland bulanıklık derecesine eşdeğer olacak şekilde ayarlandı.
- İnokulum süspansiyonu hazırlandıktan sonra steril eküvyon ile MHA plağına inoküle edildi.
- Ortalama 3-5 dakika beklendikten sonra sefoksitin diski yerleştirildi. Diskler steril bir pens yardımıyla yerleştirildi ve üzerlerine pensle hafifçe bastırılarak besi yeriyle tamamen temas etmesi sağlandı.

Plaklar diskler yerleştirildikten sonra 15 dakika içinde etüve yerleştirildi. 35±2°C'de 24 saatlik inkübasyondan sonra inhibisyon zon çapları CLSI M100-S21'e göre değerlendirildi (CLSI, 2011). *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus lugdunensis* için zon çapı ≥ 22 mm, diğer koagulaz negatif stafilokoklar için zon çapı ≥ 25mm olan izolatlar metisilin dirençli kabul edildi.

3.3.2. Metisilin Dirençli Stafilokokların Multipleks PZR Yöntemiyle Doğrulanması

3.3.2.1. 16S rRNA, *nuc* ve *mecA* Gen Bölgelerinin Amplifikasyonu

Çeşitli klinik örneklerden izole edilen ve geleneksel yöntemler ile MRS olduğu belirlenen izolatların genotipik olarak doğrulanması için multipleks PZR yöntemi ile stafilokok cinsine özgü 16S rRNA, *S. aureus* türüne özgü *nuc* ve metisilin direncine özgü *mecA* genlerinin amplifikasyonları yapıldı. Amplifikasyonlar için Tablo VII'de belirtilen primer çiftleri kullanıldı.

Tablo VII. Metisilin dirençli stafilokok izolatlarının multipleks PZR yöntemiyle doğrulanması için kullanılan primer dizileri (Louie, 2002)

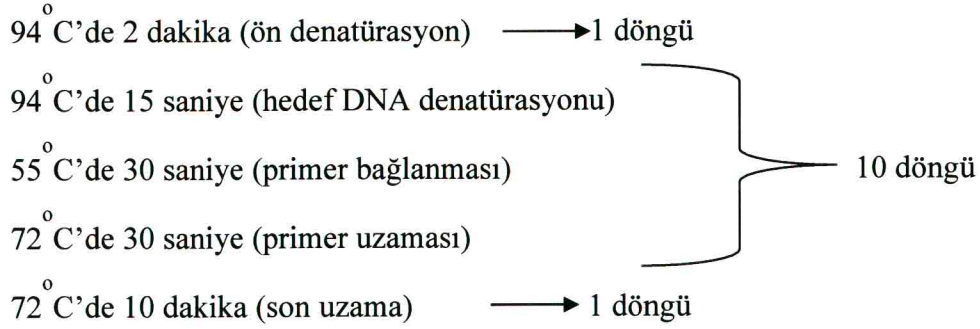
Primer adı	Primer dizisi (5'→3')	Baz Çifti (bp)
<i>MecA</i> -1 <i>MecA</i> -2	5'-AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C-3' 5'-AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C-3'	533
Nuc-1 Nuc-2	5'-GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT-3' 5'-AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC-3'	270
Staph756F Staph756R	5'-AAC TCT GTT ATT AGG GAA GAA CA-3' 5'-CCA CCT TCC TCC GGT TTG TCA CC-3'	756

Multipleks PZR'de 16S rRNA, *nuc* ve *mecA* gen bölgelerinin çoğaltılması için gerekli reaksiyon karışımı (master mix) Tablo VIII'de sunulmuştur. Her reaksiyona pozitif kontrol olarak standart *S. aureus* ATCC 43300 suşu eklendi. Ayrıca her reaksiyona, kalıp DNA yerine steril distile suyun kullanıldığı, bir negatif kontrol de eklendi.

Tablo VIII. 16S rRNA, *nuc* ve *mecA* gen bölgelerinin multipleks PZR'de çoğaltılması için kullanılan 25 µL reaksiyon karışımı.

Kalıp DNA	1 µl
10X PZR tamponu	2.5 µl
Staph 756 F (10 pmol/µL)	0.5 µl
Staph 750 R (10 pmol/µL)	0.5 µl
Nuc -1 (10 pmol/µL)	0.5 µl
Nuc -2 (10 pmol/µL)	0.5 µl
<i>MecA</i> -1 (10 pmol/µL)	1.25 µl
<i>MecA</i> -2 (10 pmol/µL)	1.25 µl
25 mM MgCl ₂	3 µl
10mM dNTP karışımı	0.5 µl
taq DNA polimeraz (5 U)	0,5 µl
distile su	13 µl

Hazırlanan reaksiyon karışımı SANYO DNA AMPLIFIER MIR-D40 cihazına yüklendi ve amplifikasyon için aşağıdaki program kullanıldı.



PZR ürünü DNA'ların (amplikonların) tespiti için DNA jel elektroforezi kullanıldı. Agaroz konsantrasyonu %1 olacak şekilde 1X TBE tamponu ile agaroz jel hazırlandı. Mikrodalga fırında eritilen agaroz, yatay elektroforez jel kabına döküldü ve soğumaya bırakıldı. İlk agaroz jel kuyucuğuna "Promega 100 bp DNA Ladder Plus" veya "Promega 100 bp DNA Ladder" belirteçlerinden 10 µl eklendi. İkinci kuyucuğa pozitif kontrol suşu *S. aureus* ATCC 43300'ün amplikonu, geri kalan kuyucuklara ise sırasıyla klinik izolatların amplikonlarından 10 µl, 2 µl 6X yükleme tamponu ile karıştırılarak uygulandı. 1 saat süresince 120 V elektrik akımı altında moleküler boyutlarına göre DNA bantları ayrıştırıldı. 5 µg/ml etidyum bromid içeren distile suda 20 dakika jel boyandı. Jel U.V. ışığı altında Bio-Rad Gel Doc XR cihazı ile görüntülendi ve Quantity One yazılımı kullanılarak görüntüler kaydedildi.

3.4. Metisilin Dirençli Stafilkokların Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

3.4.1. Disk Difüzyon Yöntemi

MRS izolatlarının eritromisin, klindamisin, trimetoprim-sülfametaksazol, teikoplanin, tetrasiklin, linezolid, gentamisin, siprofloksasin, quinupristin-dalfopristin ve kloramfenikol antibiyotikleri için duyarlılık testleri CLSI M2-A9'da önerildiği şekilde disk difüzyon yöntemi ile yapıldı (CLSI, 2006).

- Buzdolabında +4 °C'de saklanan diskler kullanımdan önce potens kaybını önlemek için 10-15 dakika oda ısısında bekletildi.
- İnokulum direkt koloni süspansiyonu yöntemiyle ile hazırlandı. Bir gün öncesinden saklama stoğundan %5 koyun kanlı agar plağına pasajlanarak elde edilen bakteri kolonileri %0,9 NaCl içinde süspanse edilerek hazırlandı.

- Bakteri yoğunluğu spektrofotometrik olarak 0.5 McFarland bulanıklık derecesine eşdeğer olacak şekilde ayarlandı.
- İnokulum süspansiyonu hazırlandıktan sonra steril eküvyon ile 150 mm' lik MHA plağına inoküle edildi.
- Ortalama 3-5 dakika beklendikten sonra antibiyotik diskleri, merkezleri aralarında en az 24 mm olacak şekilde 150 mm' lik MHA plağına yerleştirildi ve hafifçe bastırılarak besi yeriyle tamamen temas etmesi sağlandı.

Plaklar diskler yerleştirildikten sonra 15 dakika içinde etüve yerleştirildi. 35±2°C'de 24 saatlik inkübasyondan sonra disklerin inhibisyon zon çapları CLSI M100-S21'e göre değerlendirildi (CLSI, 2011).

3.5. Metisilin Dirençli Stafilokoklarda Sınıf 1 İntegron Varlığının Araştırılması

3.5.1. *intI 1* Gen Bölgesinin PZR Yöntemi ile Araştırılması

Fenotipik ve ardından genotipik olarak MRS olduğu tespit edilen izolatlarda sınıf 1 integron varlığı PZR yöntemi ile araştırıldı. Sınıf 1 integron varlığını tespit etmek için, integrasyonu kodlayan *intI 1* gen bölgesine özgü primerler kullanıldı (Tablo IX).

Tablo IX: Sınıf 1 integronun tespitinde *intI 1* gen bölgesinin amplifikasyonu için kullanılan oligonükleotid primer dizileri (Zhang, 2004)

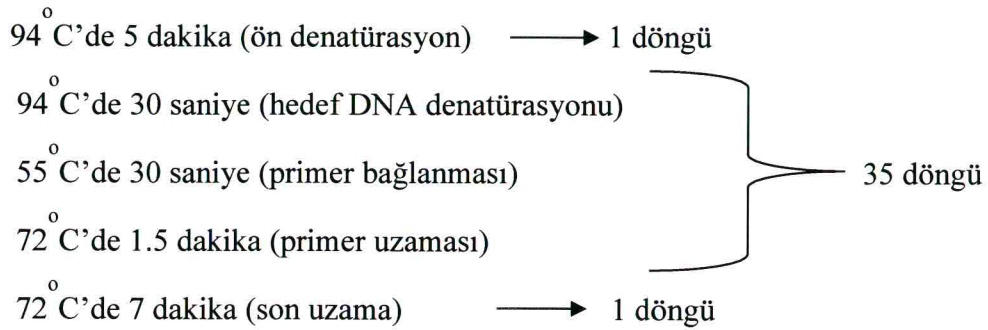
Primer adı	Primer dizisi	Baz Çifti (Bp)
intI-1U	5'-GTTCGGTCAAGGTTCTG-3'	923
intI-1D	5'-GCCAACTTTCAGCACATG-3'	

PZR'de *intI 1* gen bölgesinin çoğaltılması için gerekli reaksiyon karışımı (master mix) Tablo X'da sunulmuştur. Her reaksiyona pozitif kontrol olarak *E. coli* K8 suşu eklendi (Özgümüş, 2009). Ayrıca her reaksiyona, kalıp DNA yerine steril distile suyun kullanıldığı bir negatif kontrol de eklendi.

Tablo X. *IntI* 1 gen bölgesinin çoğaltılması için kullanılan 25 µL PZR reaksiyon karışımı.

Kalıp DNA	2 µl
10X PZR tamponu	2.5 µl
Int-1U (10 pmol/µL)	1.25 µl
Int-1D (10 pmol/µL)	1.25 µl
25 mM MgCl ₂	1.5 µl
10mM dNTP karışımı	0.5 µl
taq DNA polimeraz (5 U)	0,125 µl
distile su	15.875 µl

Hazırlanan reaksiyon karışımı SANYO DNA AMPLIFIER MIR-D40 cihazına yüklendi ve amplifikasyon için aşağıdaki program kullanıldı.



PZR ürünü DNA'ların (amplikonların) tespiti için DNA jel elektroforezi kullanıldı. Agaroz konsantrasyonu %1.5 olacak şekilde 1X TBE tamponu ile agaroz jel hazırlandı. Mikrodalga fırında eritilen agaroz, yatay elektroforez jel kabına döküldü ve soğumaya bırakıldı. İlk agaroz jel kuyucuğuna "Promega 100 bp DNA Ladder" belirtecinden 10 µl eklendi. İkinci kuyucuğa pozitif kontrol suşu *E.coli* K8'in amplikonu, geri kalan kuyucuklara ise sırasıyla klinik izolatların amplikonlarından 10 µl, 2 µl 6X yükleme tamponu karıştırılarak uygulandı. 1.5 saat süresince 120 V elektrik akımı altında moleküler boyutlarına göre DNA bantları ayrıştırıldı. 5 µg/ml etidyum bromid içeren distile suda 20 dakika jel boyandı. Jel U.V. ışığı altında Bio-Rad Gel Doc XR cihazı ile görüntülendi ve Quantity One yazılımı kullanılarak görüntüler kaydedildi.

4. BULGULAR

OMÜ-SUVAM TPL Bakteriyoloji Subdisiplin Laboratuvarı'na, Nisan-Haziran 2010 tarihleri arasında gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen ve disk difüzyon yöntemi ile metisilin direnci doğrulanmış 50 MRSA ve 50 MRKNS olmak üzere toplam 100 MRS izolatu çalışmaya dahil edildi.

4.1. Metisilin Dirençli Stafilokok İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıkları

Çalışmaya dahil edilen 100 MRS izolatının disk difüzyon ile çalışılan eritromisin, klindamisin, trimetoprim-sülfametaksazol, teikoplanin, tetrasiklin, linezolid, gentamisin, siprofloksasin, quinupristin-dalfopristin ve kloramfenikol duyarlılıkları Tablo XI'de sunulmuştur. 100 MRS izolatının tümü linezolid, teikoplanin, quinopristin-dalfopristin ve kloramfenikole duyarlı bulunmuştur. MRSA izolatlarının tümü trimetoprim-sülfametaksazol'e duyarlı bulunurken, MRKNS izolatlarında trimetoprim-sülfametaksazol duyarlılığı % 36 bulunmuştur. MRSA izolatlarının tümü siprofloksasin, gentamisin ve tetrasikline dirençli bulunurken, MRKNS izolatlarında siprofloksasin, gentamisin ve tetrasiklin direnç oranları sırasıyla %96, %70 ve %40 olarak bulunmuştur. Eritromisin ve klindamisin duyarlılıkları MRSA için sırasıyla %14 ve %62, MRKNS için sırasıyla %6 ve %40 olarak bulunmuştur.

Tablo XI. MRS izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları

NO	İZOLAT	E	DA	CIP	GN	TE	C	SXT	LNZ	TEC	SYN
1	MRSA	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S
2	MRSA	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S
3	MRSA	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
4	MRSA	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S
5	MRSA	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
6	MRSA	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
7	MRSA	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S
8	MRSA	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
9	MRSA	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S
10	MRSA	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S

11	MRSA	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S
12	MRSA	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S
13	MRSA	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S
14	MRSA	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
15	MRSA	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
16	MRSA	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S
17	MRSA	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S
18	MRSA	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S
19	MRSA	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
20	MRSA	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S
21	MRSA	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
22	MRSA	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S
23	MRSA	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
24	MRSA	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
25	MRSA	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
26	MRSA	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S
27	MRSA	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
28	MRSA	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S
29	MRSA	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S
30	MRSA	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S
31	MRSA	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S
32	MRSA	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S
33	MRSA	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S
34	MRSA	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S
35	MRSA	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S

36	MRSA	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
37	MRSA	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
38	MRSA	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S
39	MRSA	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S
40	MRSA	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
41	MRSA	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S
42	MRSA	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S
43	MRSA	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S
44	MRSA	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
45	MRSA	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
46	MRSA	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S
47	MRSA	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
48	MRSA	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S
49	MRSA	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S
50	MRSA	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S
51	MRKNS	R	S	R	I	R	S	R	S	S	S
52	MRKNS	R	S	R	R	S	S	R	S	S	S
53	MRKNS	R	S	R	R	S	S	R	S	S	S
54	MRKNS	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S
55	MRKNS	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S
56	MRKNS	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S
57	MRKNS	R	R	R	I	S	S	S	S	S	S
58	MRKNS	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S
59	MRKNS	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S
60	MRKNS	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S

61	MRKNS	R	S	R	I	R	S	R	S	S	S
62	MRKNS	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
63	MRKNS	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S
64	MRKNS	R	S	I	R	S	S	R	S	S	S
65	MRKNS	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S
66	MRKNS	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
67	MRKNS	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S
68	MRKNS	R	R	R	I	S	S	S	S	S	S
69	MRKNS	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S
70	MRKNS	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S
71	MRKNS	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S
72	MRKNS	R	S	I	R	R	S	S	S	S	S
73	MRKNS	I	I	R	S	I	S	R	S	S	S
74	MRKNS	R	I	R	S	S	S	R	S	S	S
75	MRKNS	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
76	MRKNS	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S
77	MRKNS	R	I	R	R	R	S	R	S	S	S
78	MRKNS	R	R	R	I	S	S	I	S	S	S
79	MRKNS	R	S	R	I	R	S	S	S	S	S
80	MRKNS	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S
81	MRKNS	R	S	R	R	S	S	R	S	S	S
82	MRKNS	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S
83	MRKNS	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S
84	MRKNS	R	S	R	R	R	S	R	S	S	S
85	MRKNS	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S

86	MRKNS	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
87	MRKNS	R	R	R	I	S	S	I	S	S	S
88	MRKNS	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S
89	MRKNS	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S
90	MRKNS	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S
91	MRKNS	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S
92	MRKNS	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S
93	MRKNS	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S
94	MRKNS	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S
95	MRKNS	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S
96	MRKNS	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S
97	MRKNS	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S
98	MRKNS	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S
99	MRKNS	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S
100	MRKNS	R	S	R	S	S	S	R	S	S	S

E: Eritromisin, DA: Klindamisin, CIP: Siprofloksasin, GN: Gentamisin, TE: Tetrasiklin, C: Kloramfenikol, SXT: Trimetoprim-sülfametoksazol, LNZ: Linezolid, TEC: Teikoplanin, SYN: Quinopristin-dalfopristin

4.2. Metisilin Dirençli Stafilokok İzolatlarının Multipleks PZR Yöntemiyle 16S rRNA, *nuc* ve *mecA* Gen Bölgelerinin Amplifikasyonu

Çalışmaya dahil edilen 100 MRS izolatına uygulanan multipleks PZR yöntemiyle 50 MRSA izolatlarının tümünde stafilokok cinsine özgü 16S rRNA, *S. aureus* türüne özgü *nuc* ve metisilin direncine özgü *mecA* genlerinin 756, 270 ve 533 bp'lik bant profilleri tespit edilmiştir. 50 MRKNS izolatlarının tümünde stafilokok cinsine özgü 16S rRNA ve metisilin direncine özgü *mecA* genlerinin 756 ve 533 bp'lik bant profilleri tespit edilirken, hiçbir MRKNS izolatlarının *S. aureus* türüne özgü *nuc* geninin 270 bp'lik bant profili tespit edilmemiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan *S. aureus* ATCC 43300 suşunda, her reaksiyon sonrası 756, 270 ve 533 bp'lik bantlar tespit edilebilmiştir. Her reaksiyon sonrası jelin son kuyucuklarına eklenen negatif kontrollerin hiçbirinde bant gözlenmemiştir. 100 MRS

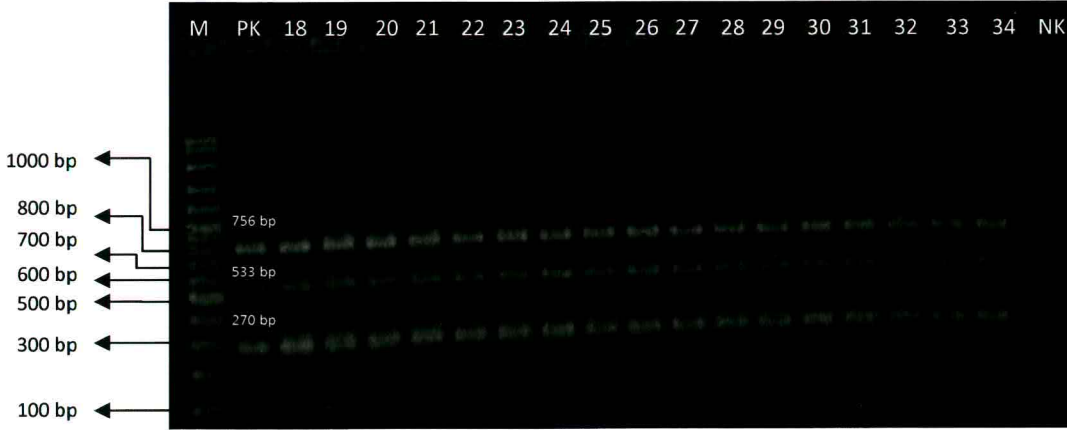
izolatının multipleks PZR’de 16S rRNA, *nuc* ve *mecA* gen bölgelerinin tespit edildiği jel görüntüleri Şekil IX- XV’de sunulmuştur.

Şekil XIV. 1-17 No’lu MRSA izolatlarının multipleks PZR sonrası 16S rRNA, *nuc* ve *mecA* gen bölgelerinin jel görüntüsü



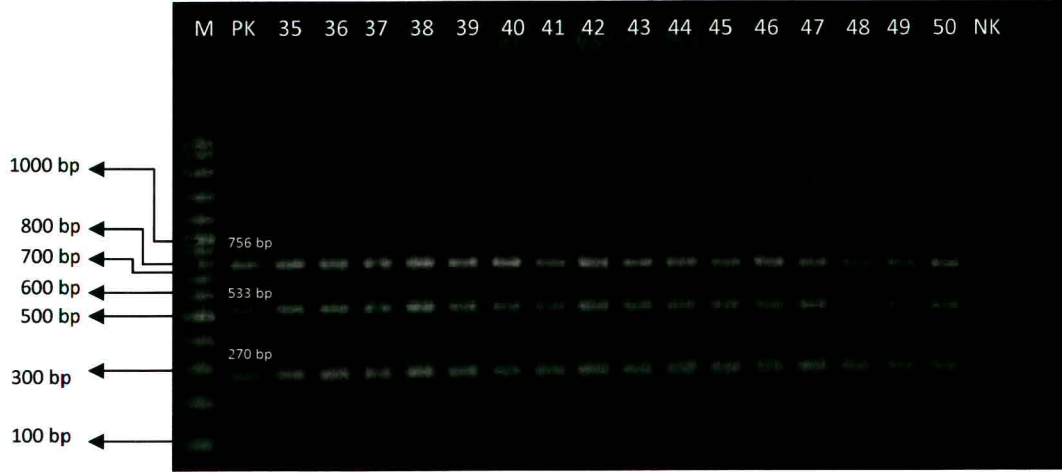
M: Promega 100 bp DNA Ladder Plus, PK: *S. aureus* ATCC 43300

Şekil XV. 18-34 No’lu MRSA izolatlarının multipleks PZR sonrası 16S rRNA, *nuc* ve *mecA* jel görüntüsü



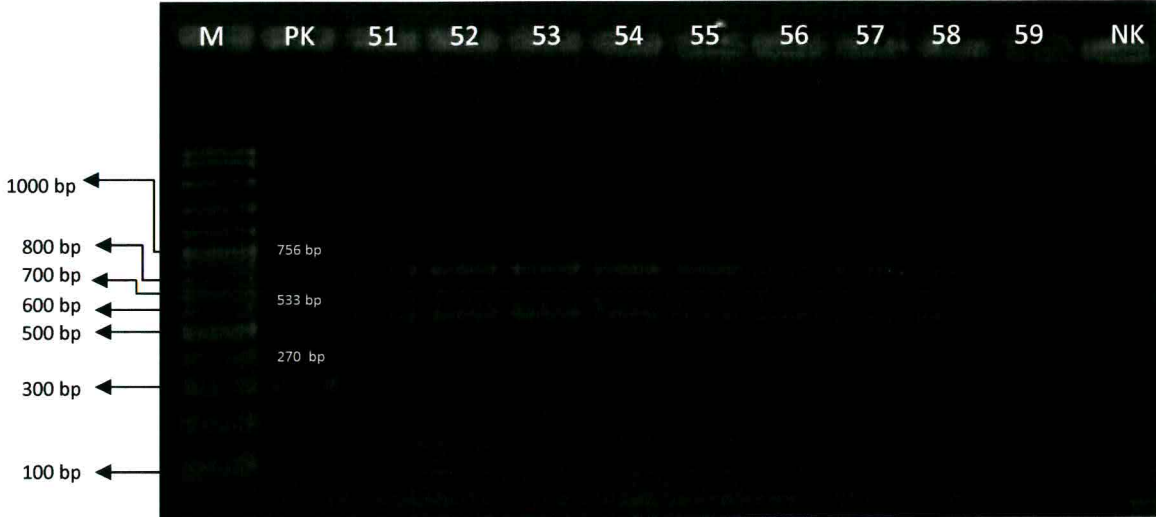
M: Promega 100 bp DNA Ladder Plus, PK: *S. aureus* ATCC 43300

Şekil XVI. 35-50 No'lu MRSA izolatlarının multipleks PZR sonrası 16S rRNA, *nuc* ve *mecA* jel görüntüsü



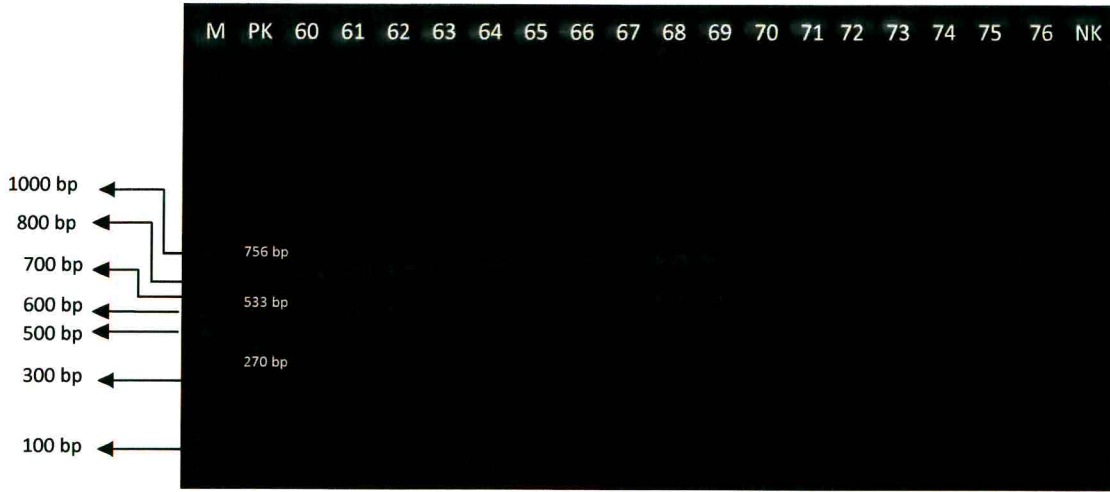
M: Promega 100 bp DNA Ladder Plus, PK: *S. aureus* ATCC 43300

Şekil XVII. 51-59 No'lu MRKNS izolatlarının multipleks PZR sonrası 16S rRNA ve *mecA* jel görüntüsü

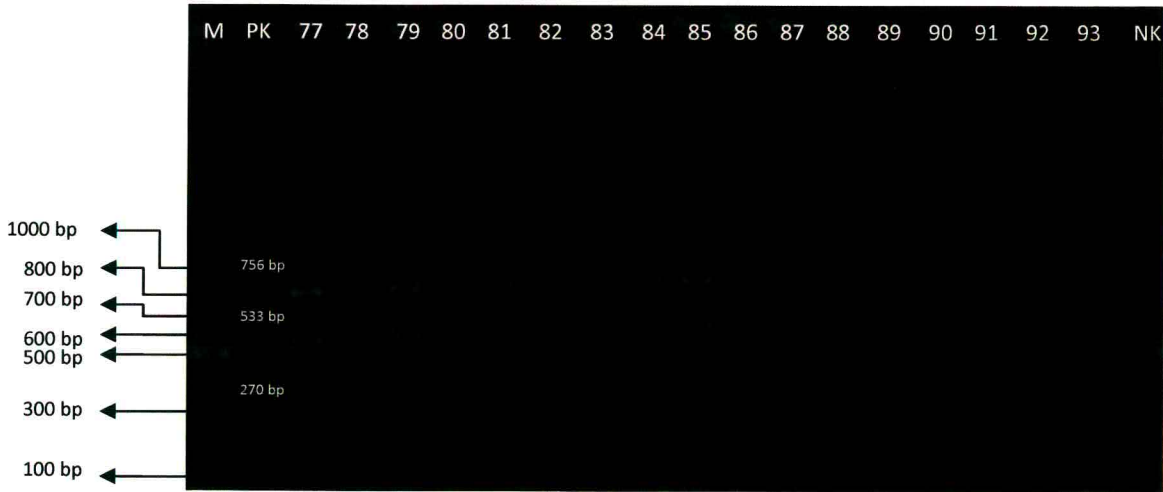


M: Promega 100 bp DNA Ladder Plus, PK: *S. aureus* ATCC 43300

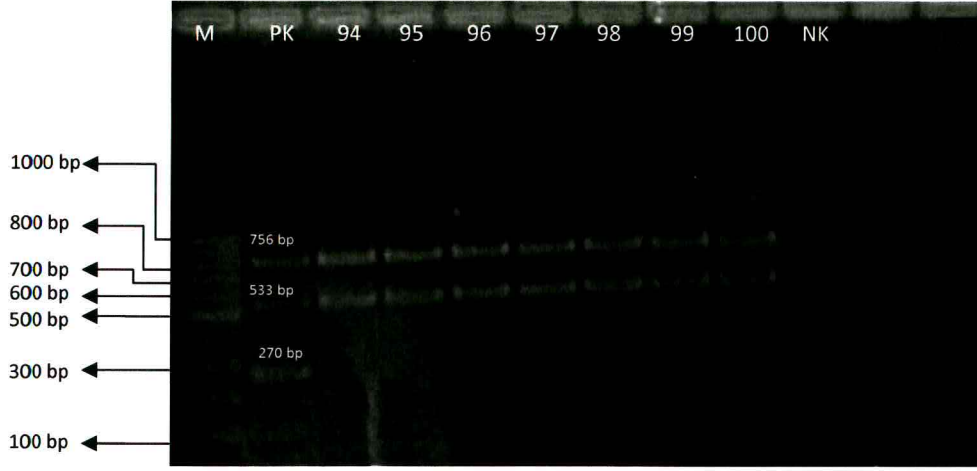
Şekil XVIII. 60-76 No'lu MRKNS izolatlarının multipleks PZR sonrası 16S rRNA ve *mecA* jel görüntüsü



Şekil XIX. 77-93 No'lu MRKNS izolatlarının multipleks PZR sonrası 16S rRNA ve *mecA* jel görüntüsü



Şekil XX. 94-100 No'lu MRKNS izolatlarının multipleks PZR sonrası 16S rRNA ve *mecA* jel görüntüsü

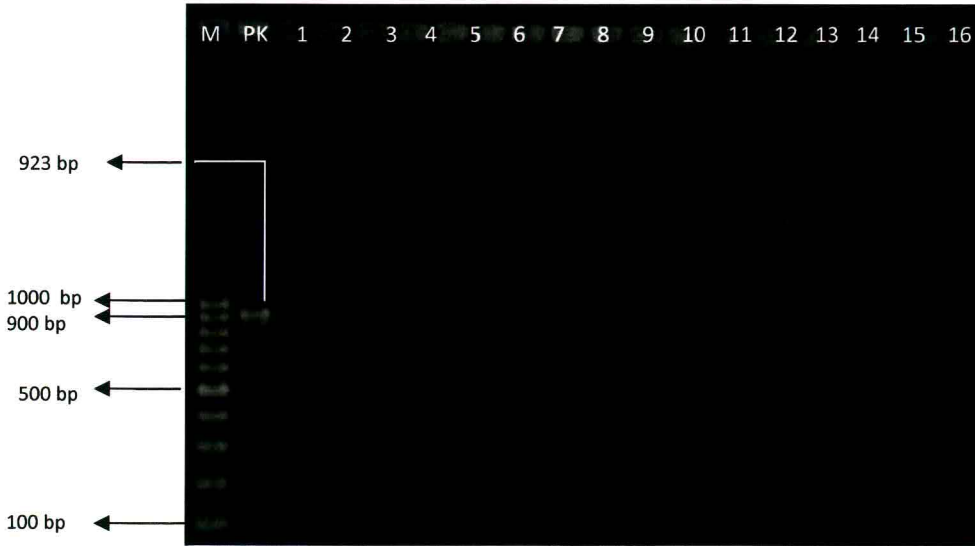


M: Promega 100 bp DNA Ladder Plus, PK: *S. aureus* ATCC 43300

4.3. Metisilin Dirençli Stafilokoklarda PZR Yöntemi ile *intI* 1 Gen Bölgesinin Araştırılması

100 MRS izolatında *intI* 1 varlığı PZR yöntemiyle belirlendi. Bu yöntemle tüm reaksiyonlarda pozitif kontrol olarak kullanılan *E. coli* K8 suşunun ekstraktında 923 bp'lik bant belirlenmesine rağmen, klinik 100 MRS izolatının hiçbirinde *intI* 1 gen varlığı tespit edilmedi (Şekil XVI).

Şekil XXI. *IntI* 1 varlığı tespit edilemeyen 1-16 No'lu MRSA izolatlarının PZR jel görüntüsü



M: Promega 100 bp DNA Ladder Plus, PK: *E. coli* K8

4.4 MRS İzolatlarının Fenotipik ve Genotipik Özellikleri

Çalışmaya dahil edilen 100 MRS izolatının fenotipik ve genotipik özellikleri Tablo XII'de sunulmuştur.

Tablo XII. MRS İzolatlarının Fenotipik ve Genotipik Özellikleri

No	İzolat	Katalaz	Koagülaz	Metisilin direnci (Disk difüzyon)	16S rRNA	Nuc	MecA	Int1
1	MRSA	+	+	+	+	+	+	-
2	MRSA	+	+	+	+	+	+	-
3	MRSA	+	+	+	+	+	+	-
4	MRSA	+	+	+	+	+	+	-
5	MRSA	+	+	+	+	+	+	-
6	MRSA	+	+	+	+	+	+	-
7	MRSA	+	+	+	+	+	+	-
8	MRSA	+	+	+	+	+	+	-
9	MRSA	+	+	+	+	+	+	-
10	MRSA	+	+	+	+	+	+	-
11	MRSA	+	+	+	+	+	+	-
12	MRSA	+	+	+	+	+	+	-
13	MRSA	+	+	+	+	+	+	-
14	MRSA	+	+	+	+	+	+	-
15	MRSA	+	+	+	+	+	+	-
16	MRSA	+	+	+	+	+	+	-
17	MRSA	+	+	+	+	+	+	-
18	MRSA	+	+	+	+	+	+	-
19	MRSA	+	+	+	+	+	+	-
20	MRSA	+	+	+	+	+	+	-
21	MRSA	+	+	+	+	+	+	-

22	MRSA	+	+	+	+	+	+	-
23	MRSA	+	+	+	+	+	+	-
24	MRSA	+	+	+	+	+	+	-
25	MRSA	+	+	+	+	+	+	-
26	MRSA	+	+	+	+	+	+	-
27	MRSA	+	+	+	+	+	+	-
28	MRSA	+	+	+	+	+	+	-
29	MRSA	+	+	+	+	+	+	-
30	MRSA	+	+	+	+	+	+	-
31	MRSA	+	+	+	+	+	+	-
32	MRSA	+	+	+	+	+	+	-
33	MRSA	+	+	+	+	+	+	-
34	MRSA	+	+	+	+	+	+	-
35	MRSA	+	+	+	+	+	+	-
36	MRSA	+	+	+	+	+	+	-
37	MRSA	+	+	+	+	+	+	-
38	MRSA	+	+	+	+	+	+	-
39	MRSA	+	+	+	+	+	+	-
40	MRSA	+	+	+	+	+	+	-
41	MRSA	+	+	+	+	+	+	-
42	MRSA	+	+	+	+	+	+	-
43	MRSA	+	+	+	+	+	+	-
44	MRSA	+	+	+	+	+	+	-
45	MRSA	+	+	+	+	+	+	-
46	MRSA	+	+	+	+	+	+	-
47	MRSA	+	+	+	+	+	+	-
48	MRSA	+	+	+	+	+	+	-
49	MRSA	+	+	+	+	+	+	-
50	MRSA	+	+	+	+	+	+	-

51	MRKNS	+	-	+	+	-	+	-
52	MRKNS	+	-	+	+	-	+	-
53	MRKNS	+	-	+	+	-	+	-
54	MRKNS	+	-	+	+	-	+	-
55	MRKNS	+	-	+	+	-	+	-
56	MRKNS	+	-	+	+	-	+	-
57	MRKNS	+	-	+	+	-	+	-
58	MRKNS	+	-	+	+	-	+	-
59	MRKNS	+	-	+	+	-	+	-
60	MRKNS	+	-	+	+	-	+	-
61	MRKNS	+	-	+	+	-	+	-
62	MRKNS	+	-	+	+	-	+	-
63	MRKNS	+	-	+	+	-	+	-
64	MRKNS	+	-	+	+	-	+	-
65	MRKNS	+	-	+	+	-	+	-
66	MRKNS	+	-	+	+	-	+	-
67	MRKNS	+	-	+	+	-	+	-
68	MRKNS	+	-	+	+	-	+	-
69	MRKNS	+	-	+	+	-	+	-
70	MRKNS	+	-	+	+	-	+	-
71	MRKNS	+	-	+	+	-	+	-
72	MRKNS	+	-	+	+	-	+	-
73	MRKNS	+	-	+	+	-	+	-
74	MRKNS	+	-	+	+	-	+	-
75	MRKNS	+	-	+	+	-	+	-
76	MRKNS	+	-	+	+	-	+	-
77	MRKNS	+	-	+	+	-	+	-
78	MRKNS	+	-	+	+	-	+	-
79	MRKNS	+	-	+	+	-	+	-

80	MRKNS	+	-	+	+	-	+	-
81	MRKNS	+	-	+	+	-	+	-
82	MRKNS	+	-	+	+	-	+	-
83	MRKNS	+	-	+	+	-	+	-
84	MRKNS	+	-	+	+	-	+	-
85	MRKNS	+	-	+	+	-	+	-
86	MRKNS	+	-	+	+	-	+	-
87	MRKNS	+	-	+	+	-	+	-
88	MRKNS	+	-	+	+	-	+	-
89	MRKNS	+	-	+	+	-	+	-
90	MRKNS	+	-	+	+	-	+	-
91	MRKNS	+	-	+	+	-	+	-
92	MRKNS	+	-	+	+	-	+	-
93	MRKNS	+	-	+	+	-	+	-
94	MRKNS	+	-	+	+	-	+	-
95	MRKNS	+	-	+	+	-	+	-
96	MRKNS	+	-	+	+	-	+	-
97	MRKNS	+	-	+	+	-	+	-
98	MRKNS	+	-	+	+	-	+	-
99	MRKNS	+	-	+	+	-	+	-
100	MRKNS	+	-	+	+	-	+	-

5. TARTIŞMA

Stafilokoklar tamamen anti-Gram-negatif etkinlik gösterenler dışında çoğu antibiyotiğe doğal olarak duyarlıdır (Livermore, 2000). Ancak, stafilokoklar hem mutasyon hem de DNA transferi ile antibiyotiklere direnç geliştirerek morbidite ve mortalitenin sık nedenleri olmaya devam etmektedirler. *S. aureus* bir çok vücut bölgesinde enfeksiyonlara neden olabilen klasik bir patojendir. Neden olduğu enfeksiyonlar arasında deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, kemik ve eklem enfeksiyonları, cerrahi alan enfeksiyonları, prostetik kapak endokarditi, pnömoni ve besin zehirlenmesi sayılabilir (Waldvogel, 1995). Koagülaz negatif stafilokoklar, özellikle *S. saprophyticus*, toplumsal idrar yolu enfeksiyonlarına neden olabilmektedir. Ayrıca koagülaz negatif stafilokoklar, özellikle kalıcı medikal aleti olan hastalarda nozokomiyal enfeksiyon ve bakteriyemilerin önemli bir nedenidir (Ben-Ami, 2003).

1940'larda, *S. aureus* kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde penisilin kullanıma girmişse de, bu antibiyotiğe direnç çabuk gelişmiştir. 1946 yılı itibariyle, *S. aureus* suşlarının %6'sının penisilinaz ürettiği tespit edilmiştir (Barber ve Dowzenlo, 1948). Bu oran 1980'lerin başında %90'lara kadar çıkmıştır (Lacey, 1984). Bu penisilinaz üreten stafilokların tedavisi için metisilin gibi penisilinaz dayanıklı β -laktamlar 1960'lı yılların başlarında kullanılmaya başlanmıştır. Fakat daha piyasaya çıktığı yıllarda bu antibiyotiklere karşı dirençli *S. aureus* suşları izole edilmeye başlanmıştır (Jevons, 1961). Bu metisilin dirençli *S. aureus* suşlarında (MRSA), duyarlı suşlarda bulunmayan metisilin direncini eksprese eden *mecA* geni bulunmaktadır (Livermore, 2000). Bu gen "stafilokokal kaset kromozomu" (SCC*mec*) olarak adlandırılan mobil genetik elementin bir parçasıdır. Günümüzde mevcut sekiz SCC*mec* tipi vardır ve bunların bazıları plazmidlerden ve transpozonlardan köken alan ek direnç genlerini de içermektedir (Cattoir ve Leclercq, 2010). İlk 1960'ların başlarında görülmeye başlayan metisilin direncinin oranı 1970'lerin başında %10 ve %15 olarak raporlanmıştır (Ayliffe, 1997; Rosdahl ve Knudsen, 1991). Ardından, 1970'lerin sonunda ve 80'lerin başında bu direnç prevalansı neredeyse sıfıra düşmüştür. Bu düşüş suş yer değişimi, gentamisin kullanımını, daha iyi enfeksiyon kontrolü ve bu faktörlerin kombinasyonu gibi çeşitli nedenlere dayandırılmıştır (Rouch ve ark., 1987). Fakat bu düşüş devam ettirilememiştir. 80'lerin ilk yıllarından sonra tekrar ortaya çıkmaya başlamıştır. Bu yükselişte gentamisin-dirençli epidemik MRSA (EMRSA) suşlarının katkısı oldukça fazladır. 1998-1999 itibariyle, metisilin direnç oranı bazı ülkelerde %34-37'e yükselmiştir (Livermore, 2000).

2000'li yıllarda metisilin direnci hastane ve toplumda önemli bir sağlık problemi olmaya artarak devam etmiştir. EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System) raporlarına bakıldığında, tüm Avrupa genelinde 2006 yılının sonuna doğru metisilin direnç

oranı en üst noktaya gelmiş, ardından ertesi yıllarda tedrici bir düşüş göstermiştir. 2006 yılı içerisinde Avrupa genelinde *S. aureus*'da metisilin direnç oranı %41.9 olarak raporlanmıştır. Bu oran 2009 yılı itibariyle Avrupa genelinde %27.1'e, 2010 yılı itibariyle de surveyansın başlatıldığı 1999 yılından itibaren en düşük seviyesi %24.4'e gerilemiştir. 2011 yılı ilk üç çeyreği sonunda da Avrupa genelinde metisilin direnç oranı %24.5 olarak raporlanmıştır (EARSS Sürveyans Raporları, 2011). Direnç oranları çeşitli Avrupa ülkeleri arasında ciddi farklılıklar göstermektedir. 2010 yılında, direnç oranı Danimarka, Finlandiya, Avusturya, Polonya, Fransa, İtalya ve Yunanistan için sırasıyla %1.3, %2, % 7.4, % 13.1, %21.6, %36.5 ve % 39.2 olarak raporlanmıştır (EARSS Sürveyans Raporları, 2010). Yıllar içerisindeki bu düşüşün ve ülkeler arasındaki bu direnç farklılıklarının altında bakteri geçişini azaltacak önlemlerin alınması (kolonize ve enfekte hastaların izolasyonu, el yıkama, kolonizasyon açısından hastaların taranması, dekolonizasyon) ve antibiyotik reçete etmenin iyileştirilerek aşırı antibiyotik kullanımı ile ilişkili MRSA'nın ortaya çıkışı ve devamlılığı için selektif baskının azaltılması yatıyor olabilir (Charani, 2010). Türkiye ise EARSS'a 16 merkez ile 2003-2009 yılları arasında katılmıştır. Türkiye için MRSA oranları 2004-2008 yıllarında sırasıyla %43, %40.1, %35.4, %36.4, %34.4 olarak raporlanmıştır (EARSS Sürveyans Raporları, 2004-2008). Bizim hastanemizde MRSA önemli bir problemdir. Hastanemizin 2008-2010 yıllarında metisilin direnç oranları sırasıyla %33, %37, %22 olarak tespit edilmiştir.

Son 20 yılı aşkın bir zamandır, antibakteriyel terapideki ilerlemelere rağmen, MRSA'nın da içinde bulunduğu çoğul ilaç dirençli gram pozitif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlar artış göstermektedir (Jones ve Low, 1999; Linden, 1998). Çoğul ilaç dirençli gram negatif bakteriler uzun süredir önemli bir problem olmasına rağmen, son iki dekattır gram pozitif bakterilerin önemi giderek artmaktadır (Shi ve ark, 2006). Klinik izolatlar arasında plazmidler, transpozonlar ve integronların neden olduğu antibiyotik direnç genlerinin horizontal transferi çoğul dirençli suşların geniş bir şekilde dağılımı ile sonuçlanmıştır (Stokes ve Hall, 1989; Ploy ve ark., 2000).

İntegronlar direnç genlerinin yakalanmasında rol oynayan genetik elementlerdir. Özellikle gram negatiflerde, antibiyotik direncinin yayılmasında önemli bir rol oynamaktadırlar (Partridge, 2011). İntegronlar bugünkü tanımıyla ilk kez Collis ve Hall tarafından formüle edilmişlerdir (Collis ve Hall, 1995). Günümüzde integronlar iki temel sınıf içerisinde tasnif edilmektedirler; mobil integronlar (Mİ) ve kromozomal integronlar (Kİ). Mİ'lerde tanımlanan 5 integron sınıfı bulunmaktadır. İlk üç sınıf çoğul direnç fenotiplerinin dağılımında yer almakla birlikte, özellikle sınıf 1 integronlar en yaygın ve klinik olarak en

önemli olan integron sınıfıdır (Mazel, 2006). Sınıf 1 integronlar gram negatif bakterilerde yaygın olarak gösterilmişlerdir. Bu bakteriler arasında *Acinetobacter* (Petersen ve ark., 2000), *Aeromonas* (L'Abée-Lund ve Sorum, 2001), *Alcaligenes* (Nordmann ve Poirel, 2002), *Burkholderia* (Crowley ve ark., 2002), *Campylobacter* (Gibreel ve Skold, 2000), *Citrobacter* (Norskov-Lauritsen ve ark., 2001), *Enterobacter* (Van Belkum ve ark., 2001), *Escherichia* (Bass ve ark., 1999), *Klebsiella* (Girlich ve ark., 2000), *Pseudomonas* (Severino ve Magalhaes, 2002), *Salmonella* (Zhang ve ark., 2004), *Serratia* (Centron ve Roy, 2002), *Shigella* (Navia ve ark., 1999), *Stenotrophomonas* (Hu ve ark., 2011) and *Vibrio* (Dalsgaard ve ark., 1999) sayılabilir.

Ülkemizde de çeşitli gram negatif bakterilerde sınıf 1 integron varlığı gösterilmiştir. Eraç ve ark. *P. aeruginosa*'da *bla*(PER-1) ile ilişkili sınıf 1 integron varlığını göstermişlerdir (Eraç ve Gülay., 2007). Özgümüş ve ark. şebeke ve kaynak sularından, ve akarsulardan izole *Enterobacteriaceae* suşlarında sınıf 1 integron varlığını göstermişlerdir (Özgümüş ve ark., 2007, 2009). Sandallı ve ark. toplum-kökenli enfeksiyon etkeni *E. coli* suşlarında sınıf 1 integron varlığını göstermişlerdir (Sandallı ve ark., 2010). Yine Özgümüş ve ark. *IMP-1* metallo- β -laktamaz geni taşıyan klinik *P. aeruginosa* suşlarında sınıf 1 integron varlığını göstermişlerdir (Özgümüş ve ark., 2007). Gacar ve ark. VIM-5 üreten klinik bir *Enterobacter cloacae* suşunda sınıf 1 integron varlığını göstermişlerdir (Gacar ve ark., 2005). Casin ve ark. ise *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*'da *aac*(6')-*Ib*(11) ile ilişkili sınıf 1 integron varlığını göstermişlerdir (Casin ve ark., 2003). Bizim hastanemizde Öpüş yapmış olduğu uzmanlık tez çalışmasında *P. aeruginosa* klinik suşlarında sınıf 1 integron varlığını göstermiştir (Öpüş, 2009). Sınıf 1 integronun farklı gram negatif izolatlar arasında yaygın olmaları ve farklı kasetleri ekleme, çıkarma ve yer değiştirme kabiliyetleri, hastane ortamındaki çoğul ilaç direncinin yayılmasına sebep olmaktadır. Sınıf 1 integronlar içerisinde şimdiye kadar 60'dan fazla farklı antibiyotik direnç geni gösterilmiştir (Köseoğlu, 2004).

Sınıf 2 integronlar ise Tn7 transpozonu üzerinde yer almaktadırlar (Stokes ve Hall, 1989). Sınıf 2 integronlar *Acinetobacter*, *Shigella*, *Salmonella* ve *E. coli*'de gösterilmiştir (Radstrom ve ark., 1994; Goldstein ve ark., 2001; Roe ve ark., 2003). Ayrıca Xu ve ark. *E. faecalis*'de sınıf 2 integron varlığını raporlamışlardır (Xu ve ark., 2010). Ülkemizde, Özgümüş ve ark. yaptıkları çalışmada akarsulardan izole edilen *E. coli* suşlarında sınıf 2 integron varlığını göstermişlerdir (Özgümüş ve ark., 2009). Sınıf 3 integronlar ise *S. marcescens*, *K. Pneumoniae* ve *P. putida*'da gösterilmiştir (Arakawa ve ark., 1995; Collis ve ark., 2002; Shibata ve ark., 2003). Ülkemizde sınıf 3 integronlar ile ilgili henüz bir veri bulunmamaktadır.

Gram negatif bakterilerde antibiyotik direnç genlerinin yayılımında integronların rolü etkili bir şekilde irdelenmesine rağmen, gram pozitif bakterilerde bilinenler oldukça sınırlıdır. İlk olarak gram pozitif bakterilerde integron varlığı *Corynebacterium glutamicum*'da, *Enterococcus faecalis*'de ve kümes kumluğundan izole edilen çeşitli gram pozitif bakterilerde gösterilmiştir (Nesvera ve ark., 1998; Clark ve ark., 1999; Nandi ve ark., 2004). Fakat klinik suşlar ile geniş kapsamlı ilk çalışma Çin'de yapılmıştır. Shi ve ark. Güney Çin'in Guangzhou şehrinde yerel bir hastanede çeşitli klinik örneklerden izole edilen 46 gram pozitif suşu sınıf 1 integron varlığı açısından incelemiştir (Shi ve ark., 2006). Suşların hepsini sınıf 1 integron varlığı açısından pozitif bulmuşlardır. Pozitif bulunan suşlar *S. aureus*, koagülaz negatif stafilokoklar ve *E. faecalis*'den oluşmaktaydı. Araştırmacılar çalışmadaki sınıf 1 integronların, streptomisin ve spektinomisin direncine neden olan *aadA2*, trimetoprim direncine neden olan *dhfrXII* ve *orfF* gen kasetlerini içerdiklerini tespit etmişlerdir. Yine ortak araştırmacıların yer aldığı Çin'de yapılan diğer bir çalışmada, Xu ve ark. hastane kaynaklı 30 MRSA suşunda sınıf 1 integron varlığını araştırmışlardır (Xu ve ark., 2007a). Suşların %53'ünü sınıf 1 integron varlığı açısından pozitif bulmuşlardır. İntegronlar aminoglikozid direncine neden olan *aadA2* gen kasetini içermekteydi. Pozitif bulunan 16 MRSA suşu 2 farklı RAPD (Rastgele Amplifiye edilen Polimorfik DNA) tipi içerisinde yer almaktaydı. Aynı araştırmacılar başka bir çalışmada, bu sefer klinik 53 MRKNS suşunda sınıf 1 integron varlığını araştırmışlardır (Xu ve ark., 2008a). 30 suшта integron varlığını tespit etmişlerdir. İntegron varlığı tespit edilen 27 suшта aminoglikozid ve trimetoprim direncine neden olan *dfrA12-orfF-aadA2* veya *dfrA17-aadA5* gen kasetleri tespit edilmiştir. Geri kalan 3 suшта da aminoglikozid ve kloramfenikol direncine neden olan *aacA4-cmIA1* gen kaseti tespit edilmiştir. SCCmec tiplemesinde, suşların büyük bir kısmının klasik nozokomiyal SCCmec tipleri I, II ve III içinde yer aldığı tespit edilmiştir. Yapılan southern blot hibridizasyonu sonucunda da integron pozitif suşların plazmid aracılı değil kromozomal olduğu tespit edilmiştir. Yine aynı araştırmacılar bir önceki çalışmada sınıf 1 integron yönünden pozitif buldukları MRSA izolatlarını başka bir çalışmada moleküler olarak doğrulamışlardır (Xu ve ark., 2008b). Eski çalışmalarda olduğu gibi integron pozitif izolatların ek olarak streptomisin ve spektinomisin direnci içerdiklerini ve integronların önceki çalışmadaki MRKNS suşlarındaki gibi plazmid kökenli değil kromozomal olduklarını tespit etmişlerdir. Yapılan MRSA karakterizasyon çalışmaları sonucunda da sınıf 1 integron pozitif 6 suşun ST239-MRSA-III grubu içerisinde yer aldığı tespit edilmiştir.

Bizde çalışmamızda, fenotipik ve genotipik olarak MRSA ve MRKNS olduğunu tespit ettiğimiz 100 klinik stafilokok suşunda sınıf 1 integron varlığını araştırdık. Tüm PZR

sonuçlarımızda, pozitif kontrol suşu olarak kullandığımız *E. coli* K8 suşunda 923 bp'lik PZR ürününü tespit etmemize rağmen, klinik suşlarımızın hiçbirinde sınıf 1 integron varlığını tespit edemedik. Xu ve ark. integron içeren stafilokoklarda SCCmec tip I, II ve III daha sık bulurken, bu integron negatif suşlarla kıyaslandığında bir farklılık arz etmemiştir. Araştırmacılar metisilin direnci ve SCCmec tiplerini integron varlığı ile ilişkilendirememiş, ikisinin türler arasında gen değişiminde rolü olan ayrı genetik elementler olduklarını vurgulamışlardır (Xu ve ark, 2008a). Biz ise genotipik olarak *mecA* genini tespit ettiğimiz ama integron varlığını tespit edemediğimiz suşlarımıza SCCmec tiplemesi çalışmadık, ama Yılmaz'ın doktora tezi çalışmasında hastanemizden izole edilen klinik MRSA suşlarının tek sekans tipinde olduğu (ST239) ve seçilen temsilci suşların SCCmec tip III içerdikleri ifade edilmiştir (Yılmaz, 2010).

Çinli araştırmacılar gelişigüzel antibiyotik kullanımının selektif antibiyotik baskısı ve antibiyotik direnç proliferasyonu ile sonuçlandığını ve çalışmalarında bunun nozokomiyal SCCmec hakimiyeti ve integron prevalansı şeklinde yansıdığını ifade etmişlerdir (Xu ve ark, 2008a). Fakat yine çalışmalarında integron 1 pozitif stafilokoklar ile negatiflerin ek spektinomisin ve streptomisin direnci dışında aynı antibiyograma sahip olduklarını vurgulamışlardır (Xu ve ark., 2008b). Klinikte spektinomisin ve streptomisin bu derece selektif baskı yapacak kadar kullanıp kullanılmadığı sorgulanabilecek hususlardandır. Bir sonraki çalışmalarında ise integron pozitif MRS izolatlarının eritromisin, gentamisin, tetrasiklin ve trimetoprim-sülfametoksazol direnci ile istatistiksel olarak ilişkili olduğunu vurgulamışlardır (Xu ve ark., 2011). Fakat bu ilişkiyi MRSA ve MRKNS için ayrı olarak belirtmemişlerdir. Ayrıca, eritromisinin ve tetrasiklinin gen kasetleri ile olan bağlantısı gösterilememiş ve hem integron pozitif hem de negatif izolatlarda bu antibiyotiklere direnç mekanizmaları genotipik olarak irdelenmemiş ve bu mekanizmaların integronlar ile ilişkisi sorgulanmamıştır. Dolayısıyla bu antibiyotiklerin kullanılması ile ortaya çıkacak selektif baskının da gerçek kaynağının sorgulanması gerekmektedir. Ayrıca araştırmacılar Çin'de hem klinik ortamdaki hem de hayvanlardaki, gram negatif suşlarda da integronların yaygın olduğunu ve stafilokoklarda bulunan sınıf 1 integronun bazı gram negatif izolatlardakine eşlenik olsa da sınıf 1 integronların gram pozitif ve gram negatif bakteriler arasında yayılıp yayılmadığını belirlemek için ileri çalışmalara ihtiyaç olduğunu vurgulamışlardır (Shi ve ark., 2006).

Çalışmamız stafilokoklarda integron varlığının araştırıldığı ilk ulusal çalışma olup, dünya genelinde de Çinli araştırmacılardan sonra bu sayıda klinik suşun değerlendirildiği ilk çalışmadır. Çalışmamız, bu konu ile ilgili ileri çalışmalara hem bir zemin hem de veri

sağlamıştır. Fakat dünya genelinde gram pozitif bakterilerde integron varlığının yerinin ve öneminin belirlenmesi için kapsamlı çalışmalar ihtiyaç vardır.

6. SONUÇLAR

- Klinik 50 metisilin dirençli *S. aureus* izolatının, identifikasyonu ve metisilin direnci multipleks PZR yöntemi ile 16sRNA, *nuc* ve *mecA* genleri amplifiye edilerek doğrulandı.
- Klinik 50 metisilin dirençli koagülaz negatif stafilokok izolatının, identifikasyonu ve metisilin direnci multipleks PZR yöntemi ile 16sRNA ve *mecA* genleri amplifiye edilerek doğrulandı.
- Multipleks PZR’de pozitif kontrol suşu olarak kullanılan *S. aureus* ATCC 43300 suşunda, 756, 533 ve 270 bp’lik bantlar gösterildi.
- 100 MRS izolatının tümü linezolid, teikoplanin, quinopristin-dalfopristin ve kloramfenikole duyarlı bulundu.
- MRSA izolatlarının tümü trimetoprim-sülfametaksazol’e duyarlı bulunurken, MRKNS izolatlarında trimetoprim-sülfametaksazol duyarlılığı % 36 bulundu.
- MRSA izolatlarının tümü siprofloksasin, gentamisin ve tetrasikline dirençli bulunurken, MRKNS izolatlarında siprofloksasin, gentamisin ve tetrasiklin direnç oranları sırasıyla %96, %70 ve %40 olarak bulundu.
- Eritromisin ve klindamisin duyarlılıkları MRSA izolatları için sırasıyla %14 ve %62, MRKNS izolatları için sırasıyla %6 ve %40 olarak bulundu.
- PZR yöntemiyle Sınıf 1 integron varlığının araştırıldığı çalışmamızda; pozitif kontrol suşu olarak kullanılan *E. Coli* K8 suşunda, *intI 1* gen bölgesini temsil eden 923 bp’lik bant gösterildi.
- Klinik 100 MRS izolatının hiçbirinde, *intI 1* gen bölgesinin araştırıldığı PZR yöntemi ile sınıf 1 integron varlığı tespit edilemedi.

7. KAYNAKLAR

- Arakawa Y, Murakami M, Suzuki K, Ito H, Wacharotayankun R, et al. 1995. A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene *blaIMP*. *Antimicrob. Agents Chemother*, 39, 1612–15.
- Bannerman TL and Peacock SJ. 2007. *Staphylococcus, Micrococcus, and Other Catalase-Positive Cocci*. Murray PR, Baron EJ, Jorgenson JH, Landry ML, Pfaller MA. *Manual of Clinical Microbiology*. Volume 1 ASM Press Washington, D.C., 9th Edition, 390-411.
- Bass L, Liebert CA, Lee MD ve ark. 1999. Incidence and characterization of integrons, genetic elements mediating multiple- drug resistance, in avian *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 43: 2925–2929.
- Ben-Ami R, Navon-Venezia S, Schwartz D, Carmeli Y. 2003. Infection of a ventriculoatrial shunt with phenotypically variable *Staphylococcus epidermidis* masquerading as polymicrobial bacteremia due to various coagulase-negative *Staphylococci* and *Kocuria varians*. *J Clin Microbiol*, 41, 2444-7.
- Berg T, Firth N, Apisiridej S, Hettiaratchi A, Leelaporn A, Skurray RA.1998. Complete nucleotide sequence of pSK41: evolution of staphylococcal conjugative multiresistance plasmids. *J Bacteriol*, 180, 4350–4359.
- Bilgehan H. 1993. Gram olumlu koklar. *Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri İnfeksiyonları*. Barış yayınları, Fakülteler Kitabevi, İzmir, 8. Basım, 187-210.
- Bilgehan H. 2004. Gram olumlu koklar. *Klinik Mikrobiyolojik Tanı*. Barış yayınları, Fakülteler Kitabevi, İzmir, 4. Baskı, 495-506.
- Biskri L, Mazel D. 2003. Erythromycin esterase gene *ere(A)* is located in a functional gene cassette in an unusual class 2 integron. *Antimicrob. Agents Chemother*, 47, 3326–31.
- Bismuth R, Couvalin P. 2010. Aminoglycosides and gram positive bacteria. Courvalin P, LeClercq R, Rice LB. *Antibiogram*. ESKA Publishing, ASM Press, 213-223.

- Boucher Y, Labbate M, Koenig JE, Stokes HW. 2007. Integrons: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria. *Trends Microbiol*, 15, 301–9.
- Bozdogan BÜ, Esel D, Whitener C, Browne FA, Appelbaum PC. 2003. Antibacterial susceptibility of a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strain isolated at the Hershey Medical Center. *J Antimicro Chemother*, 52, 864–8.
- Cambray G, Guerout AM, Mazel D. 2010. Integrons, *Annu. Rev. Genet*, 44:141–66.
- Cattoir V, Leclercq R. 2010. β -lactams and Staphylococci. Courvalin P, LeClercq R, Rice LB. *Antibiogram*. ESKA Publishing, ASM Press, 99-107.
- Centron D, Roy PH. 2002. Presence of a group II intron in a multiresistant *Serratia marcescens* strain that harbors three integrons and a novel gene fusion. *Antimicrob Agents Chemother*, 46, 1402–1409.
- Chambers HF, DeLeo FR. 2009. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol*, 7, 629–641.
- Chandler M & Mahillon J. 2002. Insertion sequences revisited. *Mobile DNA II* (Craig NL, Craigie R, Gellert M & Lambowitz AM, eds). ASM Press, Washington, DC. 305–366.
- Charani E, Cooke J, Holmes A. 2010. Antibiotic stewardship programmes—what's missing?. *J Antimicrob Chemother*, 65, 2275-7.
- Clark NC, Olsvik O, Swenson JM, Spiegel CA, Tenover FC. 1999. Detection of a streptomycin/spectinomycin adenyltransferase gene (*aadA*) in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 43, 157-60.
- Collis CM, Kim MJ, Partridge SR, Stokes HW, Hall RM. 2002. Characterization of the class 3 integron and the site-specific recombination system it determines. *J. Bacteriol*, 184, 3017–26.

- Collis CM, Kim MJ, Partridge SR, Stokes HW, Hall RM. 2002. Characterization of the class 3 integron and the site-specific recombination system it determines. *J Bacteriol*, 184, 3017-26.
- Crowley D, Daly M, Lucey B ve ark. 2002. Molecular epidemiology of cystic fibrosis-linked *Burkholderia cepacia* complex isolates from three national referral centres in Ireland. *J Appl Microbiol*, 92, 992–1004.
- Dalgaard A, Forslund A, Tam NV, Vinh DX, Cam P. 1999. Cholera in Vietnam: changes in genotypes and emergence of class I integrons containing aminoglycoside resistance gene cassettes in *Vibrio cholerae* O1 strains isolated from 1979 to 1996. *J Clin Microbiol*, 37, 734–741.
- Dobrindt U, Hochhut B, Hentschel U, Hacker J. 2004. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat Rev Micro*, 2, 414–424.
- Dündar V, Öztürk Dündar D. 2008. Stafilokok İnfeksiyonları. Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Nobel Tıp Kitapevleri. İstanbul, 3. Baskı, 2065-2077.
- EARSS yıllık raporları, <http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net/publications/Pages/documents.aspx>
- Eraç B, Gülay Z. Molecular epidemiology of PER-1 extended spectrum beta-lactamase among gram-negative bacteria isolated at a tertiary care hospital. *Folia Microbiol (Praha)*, 52, 535-41.
- Fluit A.C, Schmitz F.J. 1999. Class 1 integrons, gene cassettes, mobility and epidemiology. *Eur J Microbiol Infect Dis*, 18, 761-770.

- Fluit AC, Schmitz FJ. 2004. Resistance integrons and super-integrons. *Clin. Microbiol. Infect*, 10, 272–88.
- Forbes BA, Sahn DF, Weissfeld AS. 2007. *Staphylococcus, micrococcus*, and similar organisms. *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*. St.Louis, Missouri. Mosby Elsevier. 12th edition, 254-63.
- Fraimow HS. 2010. Lipopeptides, lipoglycopeptides and glycolipodepsipeptides. Courvalin P, LeClercq R, Rice LB. *Antibiogram*. ESKA Publishing, ASM Press, 295-303.
- Gacar GG, Midilli K, Kolayli F, Ergen K, Gundes S, Hosoglu S, Karadenizli A, Vahaboglu H. 2005. Genetic and enzymatic properties of metallo-beta-lactamase VIM-5 from a clinical isolate of *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 49, 4400-3.
- Gibreel A, Skold O. 2000. An integron cassette carrying *dfr1* with 90-bp repeat sequences located on the chromosome of trimethoprim-resistant isolates of *Campylobacter jejuni*. *Microb Drug Resist*, 6, 91–98.
- Gill SR, Fouts DE, Archer GL, Mongodin EF, DeBoy RT, Ravel J, Paulsen IT, Kolonay JF, Brinkac L, Beanan M, Dodson RJ, Daugherty SC, Madupu R, Angiuoli SV, Durkin AS, Haft DH, Vamathevan J, Khouri H, Utterback T, Lee C, Dimitrov G, Jiang L, Qin H, Weidman J, Tran K, Kang K, Hance IR, Nelson KE, 3066 N. Malachowa, F. R. DeLeo Fraser CM. 2005. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *J Bacteriol*, 187, 2426-38.
- Gillies RR. 1984. *Staphylococci*. *Gillies&Dodds Bacteriology Illustrated*. Churchill Livingstone, 5th Edition, 37-42.
- Gillings M, Boucher Y, Labbate M, Holmes A, Krishnan S ve ark. 2008. The evolution of class 1 integrons and the rise of antibiotic resistance. *J. Bacteriol*, 190, 5095–100.

- Girlich D, Karim A, Poirel L, Cavin MH, Verny C, Nordmann P. 2000. Molecular epidemiology of an outbreak due to IRT-2 beta-lactamase-producing strains of *Klebsiella pneumoniae* in a geriatric department. *J Antimicrob Chemother*, 45, 467–473.
- Goerke C, Pantucek R, Holtfreter S, Schulte B, Zink M, Grumann D, Broker BM, Doskar J, Wolz C. 2009. Diversity of prophages in dominant *Staphylococcus aureus* clonal lineages. *J Bacteriol*, 191, 3462-8.
- Goldstein C, Lee MD, Sanchez S, Hudson C, Phillips B, Register B, Grady M, Liebert C, Summers AO, White DG, Maurer JJ. 2001. Incidence of class 1 and 2 integrases in clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals, and exotics. *Antimicrob Agents Chemother*, 45, 723-6.
- Gökırmak. 1994. *Staphylococcus*. Kılıçtırgay ve ark. Klinik Mikrobiyoloji. Bursa Güneş & Nobel Tıp Kitabevleri, 2. Basım, 5-12.
- Hall RM, Collis CM. 1995. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol Microbiol*, 15, 593-600.
- Hart T, Shears P. 2001. Bakteriler ve Hastalık. Tıp Mikrobiyolojisi Renkli Atlas. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 85-92.
- Heidelberg JF, Eisen JA, Nelson WC, Clayton RA, Gwinn ML, et al. 2000. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature*, 406, 477–83.
- Hochhut B, Lotfi Y, Mazel D, Faruque SM, Woodgate R, Waldor MK. 2001. Molecular analysis of antibiotic resistance gene clusters in *Vibrio cholerae* O139 and O1 SXT constins. *Antimicrob. Agents Chemother*, 45, 2991–3000.
- http://en.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_aureus

- Hu LF, Chang X, Ye Y, Wang ZX, Shao YB, Shi W, Li X, Li JB. 2011. *Stenotrophomonas maltophilia* resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole mediated by acquisition of sul and dfrA genes in a plasmid-mediated class 1 integron. *Int J Antimicrob Agents*, 37, 230-4.
- International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). 2009. Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*): guidelines for reporting novel SCC*mec* elements. *Antimicrob Agents Chemother*, 53, 4961–4967.
- Ito T, Okuma K, Ma XX, Yuzawa H, Hiramatsu K. 2003. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: Genomic island SCC. *Drug Resist Update*, 6, 41-52.
- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 1987. *The Staphylococci*. Review of Medical Microbiology. Appleton&Lange, California, 17th Edition, 217-222.
- Jones RN, Low DE, Pfaller MA. 1999. Epidemiologic trends in nosocomial and community-acquired infections due to antibiotic-resistant gram-positive bacteria: the role of streptogramins and other newer compounds. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 33, 101-12.
- Khan SA. 2005. Plasmid rolling-circle replication: highlights of two decades of research. *Plasmid*, 53, 126–136.
- Kingsbury DT, Wagner GE, Segal GP 1985. Gram-positive cocci. *Microbiology*. Harwal Publishing Company. Pennsylvania, 81-93.
- Köseoğlu Ö. 2004. Integrons. *Mikrobiyol Bul*, 38, 305-12.
- L’Abee-Lund TM, Sorum H. 2001. Class 1 integrons mediate antibiotic resistance in the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* worldwide. *Microb Drug Resist*, 7, 263–272.

- Labbate M, Case RJ, Stokes HW. 2009. The integron/gene cassette system: an active player in bacterial adaptation. *Methods Mol. Bio*, 532, 103–25.
- Lartigue MF, Poirel L, Aubert D & Nordmann P. 2006. In vitro analysis of ISEcp1B-mediated mobilization of naturally occurring β -lactamase gene blaCTX-M of *Kluyvera ascorbata*. *Antimicrob Agents Ch*, 50, 1282–1286.
- Leclercq R. 2010. Glycopeptides and staphylococci. Courvalin P, LeClercq R, Rice LB. *Antibiogram*. ESKA Publishing, ASM Press, 275-283.
- Leclercq R. 2010. Macrolides, lincosamides and streptogramins. Courvalin P, LeClercq R, Rice LB. *Antibiogram*. ESKA Publishing, ASM Press, 305-325.
- Levings RS, Djordjevic SP & Hall RM. 2008. SGI2, a relative of *Salmonella* genomic island SGI1 with an independent origin. *Antimicrob Agents Ch*, 52, 2529–2537.
- Linden PK. 1998. Clinical implications of nosocomial gram-positive bacteremia and superimposed antimicrobial resistance, 29, 24-33.
- Lindsay JA. 2010. Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol*, 300, 98–103.
- Livermore DM. 2000. Antibiotic resistance in staphylococci. *Int J Antimicrob Agents*, 16, 3-10.
- Livermore DM. 2003. Bacterial Resistance: Origins, Epidemiology, and Impact. *Clinical Infectious Diseases*, 36, 11-23.
- Marquez C, Labbate M, Ingold AJ, Chowdhury PR, Ramirez MS ve ark. 2008. Recovery of a functional class 2 integron from an *Escherichia coli* strain mediating a urinary tract infection. *Antimicrob. Agents Chemothe*, 52, 4153–54.

- Martinez-Freijo P, Fluit AC, Schmitz FJ, Grek VSC, Verhoef J, Jones ME. 1998. Class 1 integrons in gram-negative isolates from different European hospitals and association with decreased susceptibility to multiple antibiotic compounds. *J Antimicrob Chemother*, 42, 689–696.
- Mazel D, Dychinco B, Webb VA, Davies J. 1998. A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome. *Science*, 280, 605–8.
- Mazel D. 2006. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat Rev Microbiol*, 4, 608–620.
- Moreillon P, Que Y, Glauser MP. 2005. *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). *Mandell, Douglas and Bennet's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Philadelphia : Elsevier, 6th edition, 2321-2351.
- Morikawa K, Inose Y, Okamura H, Maruyama A, Hayashi H, Takeyasu K, Ohta TA. 2003. New staphylococcal sigma factor in the conserved gene cassette: functional significance and implication for the evolutionary processes. *Gen Cell*, 8, 699–712.
- Naas T, Mikami Y, Imai T, Poirel L, Nordmann P. 2001. Characterization of In53, a class 1 plasmid and composite transposon-located integron of *Escherichia coli* which carries an unusual array of gene cassettes. *J. Bacteriol*, 183, 235–49.
- Nandi S, Maurer JJ, Hofacre C, Summers AO. 2004. Gram-positive bacteria are a major reservoir of class 1 antibiotic resistance integrons in poultry litter. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 101, 7118–22.
- Natalia Malachowa and Frank R. DeLeo. 2010. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cell. Mol. Life Sci*, 67, 3057–3071.
- Navia MM, Capitano L, Ruiz J ve ark. 1999. Typing and characterization of mechanisms of resistance of *Shigella* spp. isolated from feces of children under 5 years of age from Ifakara, Tanzania. *J Clin Microbiol*, 37, 3113–3117.

- Nesvera J, Hochmannova J, Patek M. 1998. An integron of class 1 is present on the plasmid pCG4 from gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum*. FEMS Microbiol. Lett, 169, 391–95.
- Nordmann P, Poirel L. 2002. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. Clin Microbiol Infect, 8, 321–331.
- Norskov-Lauritsen N, Sandvang D, Hedegaard J ve ark. 2001. Clonal origin of aminoglycoside-resistant *Citrobacter freundii* isolates in a Danish county. J Med Microbiol, 50, 636–641.
- Novick R, Subedi A. 2007. The SaPIs: mobile pathogenicity islands of staphylococcus. Chem Immunol Allergy, 93, 42–57.
- Olsen JE, Christensen H, Aarestrup FM. 2006. Diversity and evolution of bla_Z from *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci. J Antimicrob Chemother, 57, 450–460.
- Oppenheim BA. 1998. The changing pattern of infection in neutropenic patients. Antimicrob Chemother, 41, 7–11.
- Opuş A. 2009. Seftazidime dirençli *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında Per-1 enziminin sınıf-1 integronlarla ilişkisinin moleküler yöntemlerle araştırılması. Uzmanlık tezi. T.C Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Samsun
- Ozgumus OB, Caylan R, Tosun I, Sandalli C, Aydın K, Koksall I. 2007. Molecular epidemiology of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates carrying IMP-1 metallo-beta-lactamase gene in a University Hospital in Turkey. Microb Drug Resist, 13, 191-8
- Ozgumus OB, Celik-Sevim E, Alpay-Karaoglu S, Sandalli C, Sevim A. 2007. Molecular characterization of antibiotic resistant *Escherichia coli* strains isolated from tap and spring waters in a coastal region in Turkey. J Microbiol, 45, 379-87.

- Ozgumus OB, Sandalli C, Sevim A, Celik-Sevim E, Sivri N. 2009. Class 1 and class 2 integrons and plasmid-mediated antibiotic resistance in coliforms isolated from ten rivers in northern Turkey. *J Microbiol*, 47, 19-27.
- Özgünen T. 2008. Gram-Pozitif Koklar. Levinson W. Tıbbi Mikrobiyoloji ve İmmünoloji. Dokuzuncu Baskı. Güneş Tıp Kitabevleri. Ankara, 106-118.
- Petersen A, Guardabassi L, Dalsgaard A, Olsen JE. 2000. Class I integrons containing a dhfrI trimethoprim resistance gene cassette in aquatic *Acinetobacter* spp. *FEMS Microbiol Lett*, 182, 73–76.
- Ploy MC, Lambert T, Couty JP, Denis F. 2000. Integrons: an antibiotic resistance gene capture and expression system. *Clin Chem Lab Med*, 38, 483-7.
- Poirel L, Decousser JW & Nordmann P. 2003. Insertion sequence ISEcp1B is involved in expression and mobilization of a blaCTX-M b-lactamase gene. *Antimicrob Agents Ch*, 47, 2938–2945.
- Rådström P, Sköld O, Swedberg G, Flensburg J, Roy PH, Sundström L. 1994. Transposon Tn5090 of plasmid R751, which carries an integron, is related to Tn7, Mu, and the retroelements. *J Bacteriol*, 176, 3257-68.
- Ramirez MS, Pineiro S, Centron D. 2010. Novel insights about class 2 integrons from experimental and genomic epidemiology. *Antimicrob. Agents Chemothe2*, 54, 699–706.
- Reacher M, Shah A, Livermore DM ve ark. 2000. Determination of trends in bacteraemia and antibiotic resistance of its pathogens reported in England and Wales between 1990 and 1998. *Br Med Journ*, 320, 213–6.
- Roe MT, Vega E, Pillai SD. 2003. Antimicrobial resistance markers of class 1 and class 2 integron-bearing *Escherichia coli* from irrigation water and sediments. *Emerg Infect Dis*, 9, 822-6.

- Rowe-Magnus DA, Guerout AM, Ploncard P, Dychinco B, Davies J, Mazel D. 2001. The evolutionary history of chromosomal super-integrins provides an ancestry for multiresistant integrins. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 98, 652–57.
- Sally R. Partridge SR, Tsafnat G, Coiera E, Iredell JR. 2009. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrins. *FEMS Microbiol Rev*, 33, 757–784.
- Sally R. Partridge. 2011. Analysis of antibiotic resistance regions in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 35, 820–855.
- Sandalli C, Buruk CK, Sancaktar M, Ozgumus OB. 2010. Prevalence of integrins and a new *dfrA17* variant in Gram-negative bacilli which cause community-acquired infections. *Microbiol Immunol*, 54, 164-9.
- Schleifer, K. H. 1986. Gram-positive cocci, In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharp, and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 2. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md, 999-1002
- Severino P, Magalhaes VD. 2002. The role of integrins in the dissemination of antibiotic resistance among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from an intensive care unit in Brazil. *Res Microbiol*, 153, 221–226.
- Shi L, Zheng M, Xiao Z, Asakura M, Su J, et al. 2006. Unnoticed spread of class 1 integrins in gram positive clinical strains isolated in Guangzhou, China. *Microbiol. Immunol*, 50, 463–67.
- Shibata N, Doi Y, Yamane K, Yagi T, Kurokawa H, Shibayama K, Kato H, Kai K, Arakawa Y. 2003. PCR typing of genetic determinants for metallo-beta-lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J Clin Microbiol*, 41, 5407-13.

- Sorum H, Roberts MC, Crosa JH. 1992. Identification and cloning of a tetracycline resistance gene from the fish pathogen *Vibrio salmonicida*. *Antimicrob. Agents Chemother*, 36, 611–15.
- Stokes HW & Hall RM. 1989. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol Microbiol*, 3, 1669–1683.
- Szmigielski S, Prevost G, Monteil H, Colin DA, Jeljaszewicz J. 1999. Leukocidal toxins of staphylococci. *Zentralbl Bakteriol*, 289, 185–201.
- Tauch A, Gotker S, Puhler A, Kalinowski J, Thierbach G. 2002. The 27.8-kb R-plasmid pTET3 from *Corynebacterium glutamicum* encodes the aminoglycoside adenylyltransferase gene cassette *aadA9* and the regulated tetracycline efflux system Tet 33 flanked by active copies of the widespread insertion sequence IS6100. *Plasmid*, 48, 117–129.
- Thati V, Shivannavar CT, Gaddad SM. 2011. Vancomycin resistance among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates from intensive care units of tertiary care hospitals in Hyderabad. *Indian J Med Res*, 134, 704-8.
- Tiwari HK, Sen MR. 2006. Emergence of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) from a tertiary care hospital from northern part of India. *Infect Dis*, 6, 156.
- Toleman MA, Bennett PM & Walsh TR. 2006. Common regions e.g. orf513 and antibiotic resistance: IS91-like elements evolving complex class 1 integrons. *J Antimicrob Chemother*, 58, 1-6.
- Tünger A. 2004. *Staphylococcus aureus*: Mikrobiyoloji, Patogenez ve Epidemiyoloji. Ulusoy S, Usluer G, Ünal S. Gram-Pozitif Bakteri İnfeksiyonları. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 9-22.
- Van Belkum A, Goessens W, van der Schee C ve ark. 2001. Rapid emergence of ciprofloxacin-resistant Enterobacteriaceae containing multiple gentamicin resistance-associated integrons in a Dutch hospital. *Emerg Infect Dis*, 7, 862–871.

- Varon E. 2010. Quinolones and gram positive bacteria. Courvalin P, LeClercq R, Rice LB. Antibioqram. ESKA Publishing, ASM Press, 243-259.
- Waldvogel FA. 1995. *Staphylococcus aureus* (including toxic shock syndrome). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, New York: Churchill Livingstone, 4th ed., 1754–77.
- Weigel LM, Clewell DB, Gill SR, Clark NC, McDougal LK, Flannagan SE, Kolonay JF, Shetty J, Killgore GE, Tenover FC. 2003. Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. Science, 302, 1569–1571.
- Willett HP. Staphylococcus. Joklik WK, Willett HP, Amos DB. 1993. Özel Bakteriyoloji ve Bakteri İnfeksiyonları. Barış yayınları, Fakülteler Kitabevi, İzmir, 8. Basım, 187-244.
- Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman E, Procop et al. 2006. Gram positive cocci Part I: Staphylococci and related gram positive cocci. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology 6th ed. Philadelphia, Lippincott, 623-662.
- Wu S ve ark. 1996. Tracking the evolutionary origin of the methicillin resistance gene: cloning and sequencing of a homologue of *mecA* from a methicillin susceptible strain of *Staphylococcus sciuri*. Microb. Drug Res, 2, 435–441.
- Xu Z, Shi L, Zhang C, Zhang L, Li X, Cao Y, Li L, Yamasaki S. 2007a. Nosocomial infection caused by class 1 integron-carrying *Staphylococcus aureus* in a hospital in South China. Clin Microbiol Infect, 13, 980-4.
- Xu H, Davies J, Miao V. 2007b. Molecular characterization of class 3 integrons from *Delftia* spp. J. Bacteriol, 189, 6276–83.

- Xu Z, Shi L, Alam MJ, Li L, Yamasaki S. 2008a. Integron-bearing methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in South China, 2001-2004. *FEMS Microbiol Lett*, 278, 223-30.
- Xu Z, Li L, Alam MJ, Yamasaki S, Shi L. 2008b. First confirmation of integron-bearing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Curr Microbiol*, 57, 230-268.
- Xu Z, Li L, Shirtliff ME, Peters BM, Peng Y, Alam MJ, Yamasaki S, Shi L. 2010. First report of class 2 integron in clinical *Enterococcus faecalis* and class 1 integron in *Enterococcus faecium* in South China. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 68, 315-7.
- Xu Z, Li L, Shi L, Shirtliff ME. 2011. Class 1 integron in staphylococci. *Mol Biol Rep*, 38, 5261-5279.
- Yarwood JM, McCormick JK, Paustian ML, Orwin PM, Kapur V, Schlievert PM. 2002. Characterization and expression analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island 3. *J Biol Chem*, 277, 13138-47.
- Yılmaz Ş. 2010. *Staphylococcus aureus* kökenlerinin multilokus dizi tiplendirmesi. Doktora tezi. T.C Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Samsun
- Zhang H, Shi L, Li L, Guo S, Zhang X, Yamasaki S, Miyoshi S, Shinoda S. 2004. Identification and characterization of class 1 integron resistance gene cassettes among *Salmonella* strains isolated from healthy humans in China. *Microbiol Immunol*, 48, 639-45.

