

FARKLI STAPHYLOCOCCUS SUŞLARININ FENOTİPİK YÖNTEMLER, RAPD-PCR VE REP-PCR İLE TIPLENDİRİLMESİ

Neslihan Sürücü

ÖZ

Staphylococcus aureus tüm dünyada en önemli hastane kökenli enfeksiyon etkenlerinden biridir. Günümüzde nozokomiyal patojenler arasında öneminin giderek artması, epidemilere yol açabilmesi ve çoklu antibiyotik direncine bağlı tedavi seçeneklerinin kısıtlı olması nedeniyle dünya tıp gündeminin başlarında yer almaktadır. *S.aureus* suşlarının antibiyotiklere karşı çok kısa zamanda direnç geliştirmesi, Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*-MRSA) görülme sıklığındaki artışa ve vankomisin dirençliliğinin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Bu nedenle tanımlamanın en kısa sürede, hızlı ve güvenilir bir şekilde yapılması gerekmektedir.

Bu çalışmada, çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşları ile koagülaz negatif *Staphylococcus* suşlarının RAPD-PCR (Random Amplified Polimorphic DNA-PCR) ve REP-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic-PCR) yöntemi ile tiplendirilmeleri amaçlanmaktadır. Bu amaçla fenotipik yöntemlerle tanımlanan *Staphylococcus* suşların antibiyotik duyarlılıkları incelenerek antibiyotip grupları oluşturuldu. 46 *Staphylococcus* suşunda (26 Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus*, 15 Metisiline Duyarlı *Staphylococcus aureus* ve 5 Koagülaz Negatif *Staphylococcus*) 8 farklı antibiyotip grubu belirlendi. Antibiyotiplemenin ardından, bu suşlar RAPD-PCR ve REP-PCR yöntemi kullanılarak tiplendirildi ve elde edilen dendogramlar incelendiğinde, RAPD-PCR ile 10 farklı genotip, REP-PCR ile 16 farklı genotip belirlendi.

Anahtar Kelimeler: *Staphylococcus aureus*, antibiyotipleme, RAPD-PCR, REP-PCR.

Danışman: Prof. Dr. Nilüfer AKSÖZ, Hacettepe Üniversitesi. Fen Fakültesi. Biyoloji Bölümü. Biyoteknoloji Anabilim Dalı

TYPING OF DIFFERENT STAPHYLOCOCCUS STRAINS BY PHENOTYPIC METHODS, RAPD-PCR AND REP-PCR

Neslihan SÜRÜCÜ

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is one of the most important nosocomial pathogens all over the world. Nowadays, the increase in the importance of *S.aureus* among nosocomial pathogens, leading to epidemics and limited antimicrobial treatment makes its place at the top of the world medical agenda. Developing resistance against various antimicrobial agents contributes to wide range in the prevalence of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*-MRSA and the emergence of the vancomycin resistance. Hence, rapid and reliable identification of these microorganisms in short term is required.

The aim of this study is to identify *Staphylococcus aureus* and CNS (Coagulase Negative *Staphylococcus*) isolates isolated from various clinical specimens by using RAPD-PCR (Random Amplified Polimorphic DNA-PCR) and REP-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic-PCR). For this purpose, antibiotype groups were generated by the examination of antibiotic susceptibilities of *Staphylococcus* strains which were identified by using phenotypic methods. Eight different antibiotype groups were assigned in forty-six *Staphylococcus* strains (twenty-six Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*, fifteen Methicillin Sensitive *Staphylococcus aureus* ve five Coagulase Negative *Staphylococcus*). After antibiotyping, these strains were identified by using RAPD-PCR and REP-PCR methods. When dendograms were analyzed, ten different genotypes were assigned by RAPD-PCR and sixteen different genotypes were assigned by REP-PCR.

Key Words: *Staphylococcus aureus*, antibiotyping, RAPD-PCR, REP-PCR.

Advisor: Prof. Dr. Nilüfer AKSÖZ, Hacettepe University, Faculty Of Science, Biology Department, Biotechnology Section

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında bilgisi, deneyimi ile yanımda olan, değerli yorum ve önerileri ile katkıda bulunan sevgili hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Nilüfer Aksöz'e;

Lisans ve yüksek lisans öğrenimim sırasında her an yanımda olan, ilgi ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam Öğr. Gör. Dr. Işıl Seyis Bilkay'a;

Çalışmamın deneysel aşamasında değerli katkılarından dolayı Doç. Dr. Afife İzbırak'a ve Prof. Dr. Sibel Sümer'e;

Çalışmam boyunca yoğun temposu içerisinde zaman ayıran ve hiçbir zaman desteğini esirgemeyen Arş. Gör. Esra Deniz Candan'a;

Çalışmamın deneysel aşamasında yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Sinem Diken'e, çektiği fotoğraflarla tezimi renklendiren Arş. Gör. Yusuf Doruk Aracagök'e;

Tüm çalışmalarım boyunca büyük bir özveriyle çalışan ve tüm içtenliğiyle yanımda olan özel çalışma öğrencimiz Didem Molla'ya;

Yaşamımın her anında ilgi ve şevkatiyle yanımda olan annem Huriye Sürücü'ye, desteğine ihtiyaç duyduğum her an yanı başımda olan babam Adnan Sürücü'ye ve bugünlere gelmemde çok büyük emeği olan biricik büyükbabam Sadık Sürücü'ye;

Çalışmalarım boyunca sıkıntılarımı paylaşan canım kardeşlerim Nagehan Ünal ve Sıla Sürücü'ye;

Sonsuz sevgisi, anlayışı, içtenliği ve fedakarlığı ile her an yanımda olan ve beni yüreklendiren Övünç İdil'e;

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZ	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Genel Mikrobiyolojik Özellikleri.....	4
2.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	6
2.3.1. Morfoloji ve kültürasyon.....	6
2.3.2. Patojenik faktörler.....	6
2.3.2.1. İnce yapı.....	6
2.3.2.2. Hücre dışı enzimler ve toksinler	7
2.3.2.2.1. Toksinler.....	7
2.3.2.2.2. Enzimler	9
2.3.3. <i>Staphylococcus aureus</i> enfeksiyonları	11
2.3.3.1. Toksinlere bağlı olarak ortaya çıkan enfeksiyonlar.....	11
2.3.3.2. Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları	11
2.3.3.3. Stafilokokların yayılımı ile oluşan enfeksiyonlar	12
2.3.4. CNS enfeksiyonları.....	12
2.3.5. Stafilokoklarda antibiyotik direnci	13
2.3.6. Metisiline dirençli Stafilokoklar.....	14
2.3.7. Metisiline direnç mekanizması.....	14
2.3.8. Hastane enfeksiyonları (Nosokomiyal enfeksiyonlar)	15
2.3.8. Mikrobiyal tiplendirme yöntemleri	16
2.3.9. Filogenetik analiz.....	21
2.3.10. RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymorphic DNA)	21
2.3.11. Bakterilerde tekrarlayan gen segmentleri	22
2.3.12. rep-PCR tiplendirme yöntemi	23
2.3.13. <i>Staphylococcus aureus</i> ile yapılan tiplendirme çalışmaları.....	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	27

3.1. Çalışmalarda Kullanılan Mikroorganizmalar	27
3.2. İzolatların Teşhis Edilmesi.....	27
3.2.1. Kanlı agarda β - hemoliz.....	27
3.2.2. Gram Boyama	28
3.2.3. Mannitol Tuzlu Agar Besiyeri'nde mannitol fermentasyonu	29
3.2.4. Koagülaz varlığının saptanması	29
3.2.5. Katalaz varlığının saptanması	30
3.3. <i>Staphylococcus</i> Suşlarının İzole Edildikleri Klinik Materyallere Göre Dağılım Oranlarının Belirlenmesi.....	31
3.4. <i>Staphylococcus</i> Suşlarının Servislere Göre Dağılım Oranlarının Hesaplanması	31
3.5. Antibiyotipleme	31
3.5.1. Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi.....	31
3.5.2. Antibiyotiplerin belirlenmesi ve antibiyotip oranlarının hesaplanması.....	33
3.5.3. MRSA'ların kullanılan antibiyotiklere direnç oranlarının saptanması	33
3.6. Genotipik Yöntemler	33
3.6.1. DNA izolasyonu	34
3.6.2. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)	34
3.1.1. Amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile analizi	36
3.1.2. Kümeleme analizi	38
4. SONUÇLAR	40
4.1. Çalışmalarda Kullanılan Mikroorganizmalar	40
4.2. <i>Staphylococcus</i> Teşhisi	40
4.3. <i>Staphylococcus</i> Suşlarının İzole Edildikleri Klinik Materyallere Göre Dağılım Oranlarının Belirlenmesi.....	40
4.4. <i>Staphylococcus</i> Suşlarının Servislere Göre Dağılım Oranlarının Hesaplanması	44
4.5. Antibiyotipleme	44
4.5.1. Antibiyotik duyarlılık profillerinin ve antibiyotiplerin belirlenmesi.....	44
4.5.2. <i>Staphylococcus</i> suşlarında antibiyotik direnci	46
4.5.3. Antibiyotik direnç oranlarının belirlenmesi	47
4.6. Genotipik Analizler	48
4.6.1. PCR ürünlerinin agaroz jelde görüntülenmesi	49
4.6.2. Kümeleme analizi sonuçları.....	54

5. TARTIŞMA.....	58
6. KAYNAKLAR.....	71
ÖZGEÇMİŞ	82

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Kanlı agarda β -hemoliz.....	28
Şekil 3.2. Koloni morfolojisi.....	28
Şekil 3.3. <i>Staphylococcus aureus</i> 'un ışık mikroskopunun x100'lük objektifteki görüntüsü.	28
Şekil 3.4. Mannitol Tuzlu Agar Besiyeri'nde mannitol fermentasyonu	29
Şekil 3.5. Koagülaz varlığının saptanması.	30
Şekil 3.6. Katalaz varlığının saptanması.	30
Şekil 3.7. PCR reaksiyon karışımının hazırlanması ve PCR uygulaması.	35
Şekil 3.8. Agaroz jelin hazırlanması.	37
Şekil 3.9. Agaroz jelin dökülmesi ve yüklemeye hazır hale getirilmesi.	37
Şekil 3.10. Örneklerin agaroz jele yüklenmesi.....	38
Şekil 3.11. Yatay agaroz jel elektroforezi düzeneği.	38
Şekil 4.1. <i>Staphylococcus</i> suşlarının hastalara ait klinik örneklerle göre dağılımı. 41	
Şekil 4.2. MRSA suşlarının hastalara ait klinik örneklerle göre dağılımı.....	41
Şekil 4.3. <i>Staphylococcus</i> suşlarının servislere göre dağılımı.	44
Şekil 4.4. MRSA'larda direnç oranı.....	48
Şekil 4.5. A3 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.	49
Şekil 4.6. A4 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.	50
Şekil 4.7. RW3A primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.	51
Şekil 4.8. REP2-I primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.	52
Şekil 4.9. REP1R-I primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.	53
Şekil 4.10. A3 ve A4 primerleri ile RAPD-PCR analizi sonucu UPGMA metoduyla oluşturulan ve <i>Staphylococcus</i> örnekleri arasındaki genetik ilişkiyi gösteren dendogram.	56
Şekil 4.11. RW3A, REP1R-I ve REP2-I primerleri ile REP-PCR analizi sonucu UPGMA metoduyla oluşturulan ve <i>Staphylococcus</i> örnekleri arasındaki genetik ilişkiyi gösteren dendogram.	57

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. İnsanda en sık rastlanan <i>Staphylococcus</i> türleri.	5
Çizelge 2.1. Hastane enfeksiyonları etkenlerini tiplendirme yöntemleri.....	17
Çizelge 2.2. Hastane enfeksiyonları etkenlerinin analizinde tercih edilen moleküler teknikler.....	19
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan antibiyotikler, kodları, disk içeriği ve zon çapları	32
Çizelge 3.2. PCR reaksiyon karışımı bileşenleri ve konsantrasyonları.....	35
Çizelge 3.3. PCR döngüsü.	36
Çizelge 3.4. Primerler, baz dizileri ve %'de GC oranları.....	36
Çizelge 4.1. <i>Staphylococcus</i> suşlarının test sonuçları.....	42
Çizelge 4.2. <i>Staphylococcus</i> suşlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları.....	45
Çizelge 4.3. <i>Staphylococcus</i> suşlarında antibiyotik direnci.	47
Çizelge 4.4. <i>Staphylococcus</i> suşlarının dirençli oldukları antibiyotik sayısı.....	48
Çizelge 4.5. RAPD ve REP primerlerinin oluşturduğu polimorfizm oranları.....	53
Çizelge 4.6. RAPD-PCR ve REP-PCR ile belirlenen profiller ve suşların dağılımı.	55
Çizelge 5.1. Çeşitli çalışmalarda <i>Staphylococcus aureus</i> 'ların tiplendirilmesinde kullanılan RAPD primerleri.....	65

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	Adenin
AMC	Amoksisilin-Klavulonik Asit
ATCC	American Type Culture Collection
bç	Baz çifti
BHI	Brain Heart Infusion
BORSA	Borderline oxacilline resistant <i>S.aureus</i>
C	Sitozin
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CRF	Coagulase-reacting factor
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotid trifosfat
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
ERIC	Enterobacterial repeat intergenic consensus
G	Guanin
kb	Kilobaz
CNS	Koagülaz Negatif Stafilokoklar
M	Molar
mM	Milimolar
µM	Mikromolar
MODSA	Modified resistant <i>S.aureus</i>
MRCNS	Metisilin dirençli koagülaz negatif <i>Staphylococcus</i>
MSCNS	Metisilin duyarlı koagülaz negatif <i>Staphylococcus</i>
MSSA	Metisilin Hassas <i>Staphylococcus aureus</i>
MRSA	Metisilin Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
NTSYS-PC	Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System
PBP	Penisilin bağlayan protein
PCR	Polymerase chain reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
RAPD	Random amplified polymorphic DNA (Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA)
REP	Repetitive Extragenic Palindromic
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism

SAHN	Sequential, agglomerative, hierarchical and nested clustering
SIMQUAL	Similarity for Qualitative Data
T	Timin
TBE	Tris-Borat-EDTA
TSST-1	Toksik şok sendromu toksini-1
UPGMA	Unweighted pair group method using arithmetic averages/ aritmetik ortalamayı kullanan ağırlıksız çift grup metodu
μ l	Mikrolitre
α	Alfa
β	Beta
γ	Gamma
δ	Delta

1. GİRİŞ

Stafilokoklar, nozokomiyal enfeksiyon etkenleri arasında ilk sıralarda yer almakta ve günümüzde de önemini hala korumaktadır (Özkalp ve Baybek, 2003; Nikbakht et al., 2008). Sistemik ve lokal birçok enfeksiyonun etkeni olan *Staphylococcus* türleri, toplum ve hastane kaynaklı olabilmeleri yanında son yıllarda antimikrobiyal ajanların çoğuna dirençli hale gelmeleri nedeni ile de önemi artan bakterilerdir (van Leeuwen et al., 1999; Onanuga et al., 2005; Kurutepe vd., 2007). *S.aureus*, yumuşak doku enfeksiyonları, toksik şok sendromu, solunum sistemi enfeksiyonları, endokardit, besin zehirlenmesi, osteomyelit, menenjit, sepsis ve bakteriyemi gibi birçok enfeksiyonun primer etkenidir (Waldvogel, 2000). Direnç gelişimi ile ortaya çıkan metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşları ise tüm dünyada birçok hastane ve sağlık kuruluşunda önemle üstünde durulması gereken hastane enfeksiyonu kaynaklarındandır (van der Zee et al., 1999; Özkalp ve Baybek, 2003; Ross et al., 2005; Sabat et al., 2006).

1940'ların başında penisilinin klinik kullanıma girmesi ile stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde önemli bir başarı elde edilmiştir. Ancak stafilokoklarda penisilin direncinin 1940'lı yılların ortalarından itibaren giderek arttığı görülmüştür. 1960'larda stafilokoklar tarafından üretilen ve penisilini parçalayan penisilinaza dayanıklı metisilinin geliştirilmesiyle stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde ikinci kez başarı sağlanmıştır. Ancak kısa bir süre sonra stafilokoklarda metisilin direnci tanımlanmıştır. 1980'li yılların başından itibaren de metisilin dirençli *S.aureus* (MRSA) suşlarında çoklu antibiyotik direnci ortaya çıkmaya başlamıştır (Kluytmans et al., 1995; Sampathkumar, 2007). Günümüzde direnç sorununun giderek yaygınlaşması ile birlikte MRSA tüm dünyada hastane enfeksiyonuna neden olan çok ciddi bir sorun haline gelmiştir (van Leeuwen et al., 1996; Tambic et al., 1997).

Patojen mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonlarının kaynağının saptanması, bu enfeksiyonlar için uygun tedavi yönteminin belirlenmesi, enfeksiyon kaynağı olan suşların yayılımlarının takibi ve baskın suşların belirlenmesi için kökenlerin doğru tanımlanmaları ve tiplendirmeleri gerekmektedir (Tenover et al., 1994). Rutin laboratuvarlarda mikrobiyal tanımlamada kullanılan

fenotipik özelliklerin belirlenmesi için protein içeriği, bakteriyofaj, kromotografik profiller, biyotipleme ve duyarlılık testlerinden yararlanılmaktadır. Ancak bu özellikleri temel alan fenotipik yöntemler, zamanla geliştirilmesine rağmen ilerleyen aşamalarda yerini DNA'nın temel aldığı genotipik yöntemlere bırakmaya başlamıştır (Tenover et al., 1994; van Belkum et al., 1995).

Enfeksiyon etkeni olan mikroorganizmanın bulaş kaynağının tespiti ve hastaların epidemiyolojik olarak ilişkilerinin belirlenmesinde kullanılan moleküler tiplendirme yöntemlerinin sayısı her geçen gün artmaktadır. Yöntemler arasından hangisinin kullanılacağına, yöntemin ayırım gücü, tekrarlanabilirliği, kullanım kolaylığı, kurulma maliyeti, testin süresi ve yorumlama kolaylığı gibi bazı kriterler göz önünde bulundurularak karar verilmektedir (Saraçlı, 2002).

Moleküler tanı yöntemlerinin gelişmesi ve bu yöntemlerin kullanılması enfeksiyon hastalıklarının tanısında ve kontrol altına alınmasında yeni bir devrim başlatmıştır. Plazmit profili analizi, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ve PCR (Polymerase Chain Reaction) gibi moleküler yöntemler klinik laboratuvarlarda oldukça popüler olarak kullanılan yöntemlerdir. PCR temelli yöntemler, kültürasyona ihtiyaç duyulmaksızın enfeksiyon nedeni olan patojen mikroorganizmaların hızlı bir şekilde belirlenmesinde uygulanmaya başlamıştır (Tang et al., 1997).

PCR, patojen mikroorganizmaların tanımlanmasında oldukça fazla kullanılan, gelişmiş bir nükleik asit amplifikasyon yöntemidir (Tang et al., 1997). PCR temelli yöntemler, hastalık etkenlerinin ve hastalıklarla bağlantılı olan genlerin belirlenmesinde, genlerdeki çeşitli mutasyonların tayininde, antimikrobial direncin kısa sürede belirlenmesinde ve mikroorganizmaların genotipik olarak tiplendirilmesinde kullanılmaktadır. Ayrıca genotipe göre ilaç geliştirilmesi ve adli tıp gibi alanlarda bu yöntemden yararlanılmaktadır. PCR uygulamasında, aynı tür içindeki farklı suşlarda primer bağlanma yerlerinin sayısı ve birbirine olan uzaklıkları farklı olacağından, agaroz elektroforezinde, amplifiye edilen fragmentlerin sayı ve büyüklükleri de farklı olacaktır. Amplifikasyon sonucunda, jel elektroforezinde gözlenen suşlara ait bant profilleri birbirleriyle karşılaştırılarak değerlendirme yapılmaktadır (van Belkum et al., 1994). PCR uygulamasından sonra dendogram

analizleri ile filogenetik haritalar çıkartılarak farklı taksonomik düzeyler belirlenebilmektedir (van Belkum et al., 1993).

Bu çalışmanın amacı, PCR temelli moleküler tiplendirme yöntemlerinden RAPD-PCR (Random Amplified Polimorphic DNA-PCR) ve REP-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic-PCR) yöntemi kullanılarak çoklu antibiyotik direnci gösteren MRSA suşları ile MSSA (Metisilin Duyarlı *Staphylococcus aureus*) ve CNS (Koagülaz Negatif *Staphylococcus* sp.) suşlarının tiplendirilmesinde RAPD-PCR ve REP-PCR yönteminin ayırım gücünün ve kullanılabilirliğinin belirlenmesidir.

Bu çalışmada, Mart 2006-Aralık 2007 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nin çeşitli servislerinde yatan hastalara ait farklı klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus* suşları toplandı. Fenotipik tanımlaması yapılan bu suşlardan 26 MRSA, 15 MSSA ve 5 CNS suşu çalışma kapsamına dahil edilerek fenotipik bir tiplendirme yöntemi olan ve antibiyotik duyarlılık profillerini esas alan antibiyotikleme yöntemi ile tiplendirildi. Daha sonra genotipik tiplendirme yöntemlerinden RAPD-PCR ve REP-PCR tekniği ile analiz edildi.

Çalışmada, *Staphylococcus* suşlarının çeşitli antibiyotiklere olan duyarlılıkları incelenmiş, metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşlarının çoklu antibiyotik direnci gösterdiği bulunmuştur. Bu suşların etken olduğu enfeksiyonların tedavi seçeneklerinin kısıtlı olması nedeniyle MRSA suşlarının önemi bir kez daha bu çalışma ile vurgulanmıştır.

Ülkemizde ve tüm dünyada sağlık problemlerinin başında gelen MRSA suşlarının yayılımının önlenmesi, MRSA suşlarındaki antibiyotik direnç artışının önlenmesi için stratejiler geliştirilmelidir. Bu stratejilerin belirlenmesi için öncelikle hastanelerdeki yaygın suşların doğru tanımlanmaları gerekmektedir. Çalışmamızda literatürde *Staphylococcus* suşlarının RAPD-PCR ve REP-PCR ile tiplendirilmesinde kullanılan primerler araştırılmış ve bu primerler ile analiz gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bulguların ülkemizde yapılacak olan diğer çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

Stafilokoklar ilk kez 1878 yılında Robert Koch tarafından tanımlanmış ve 1880 yılında Pasteur tarafından sıvı besiyerinde üretilmiştir. 1881 yılında İskoçyalı cerrah Alexander Ogston tarafından çıbanlarda bulunduğu, fare ve kobaylar için patojen olduğu belirtilmiş ve 1884 yılında Rosenbach tarafından pigmentli ve pigmentsiz koloni biçimleri ayırt edilerek *Staphylococcus aureus* isimlendirilmiştir. Koagülaz negatif stafilokok türleri ise ilk kez Baird-Parker tarafından tanımlanmıştır (Cengiz, 1999; Waldvogel, 2000).

2.1. Genel Mikrobiyolojik Özellikleri

Stafilokoklar, Gram pozitif kok morfolojisindeki bakterilerin gruplandırıldığı Micrococcaceae familyası içerisinde yer alırlar. Tekli, ikili, dörtlü hücreler halinde bulunabilirler, üç veya dört hücreden oluşan kısa zincirler yapabilirler. Stafilokoklar birden fazla düzlemde bölünerek, birbirlerinden ayrılmadıklarından üzüm salkımı benzeri (*Staphylo*: Üzüm salkımı, *Coccus*: tanesi) düzensiz, 0.5-1.5 µm çapında kümeler oluşturmaktadırlar. Hareketsiz, spor oluşturmayan, oksidaz negatif, kapsülsüz, optimal olarak 37°C'de ve pH 7,4'te üreyen, fakültatif anaerob mikroorganizmalardır. Daha çok aerob üremeyi tercih ederler. Anaerobik ortamda glukozdan asit oluştururlar (Cengiz, 1999; Waldvogel, 2000).

Stafilokoklar, koagülaz etkinliklerine bakılarak başlıca iki grupta incelenirler. Birinci grup Koagülaz pozitif stafilokoklar olup bu grupta önemli tek tür *Staphylococcus aureus*'dur. İkinci grupta ise koagülaz negatif stafilokoklar (CNS) yer alır. Bunlar arasındaki en önemli tür ise *S.epidermidis* olup, CNS enfeksiyonlarının çok büyük bölümünden sorumludur. *S.saprophyticus* kadınlarda üriner sistem enfeksiyonu etkeni olması, *S.haemolyticus* da ender rastlanan ama çok dirençli bir hastane enfeksiyonuna yol açması nedeni ile önemlidir (Waldvogel, 2000).

Stafilokok türleri DNA/DNA ilişkileri ve fenotipik özelliklerine göre en az dört grup altında toplanabilirler:

- ❖ *Staphylococcus epidermidis* grubunda; *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* ve *S. saccharolyticus* türleri,
- ❖ *Staphylococcus saprophyticus* grubunda; *S. saprophyticus*, *S. cohnii*, *S. xylosus* türleri,
- ❖ *Staphylococcus simulans* grubunda; *S. simulans*, *S. carnosus* türleri,
- ❖ *Staphylococcus sciure* grubunda; *S. sciure*, *S. lentus* türleri yer almaktadır (Bilgehan, 1994).

Staphylococcus aureus, *Staphylococcus auricularis*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus hyicus* ve *Staphylococcus caseolyticus* herhangi bir gruba dahil edilmemiştir.

İnsan sağlığı açısından en önemli tür *S. aureus*'dur. Etken olduğu enfeksiyonların klinik belirtilerine yol açan bir dizi hücre dışı enzim ve ekzotoksinlere sahiptir. Koagülaz negatif stafilokoklar ise klasik fırsatçı patojenlerdendir. *Staphylococcus* cinsi içinde 30'dan fazla tür ve alt tür bulunmaktadır. En önemli *Staphylococcus* türleri Çizelge 1.1'de görülmektedir.

Çizelge 1. 1. İnsanda en sık rastlanan *Staphylococcus* türleri (Kayser, 2002).

Tür	Özellikler
<i>Staphylococcus aureus</i>	Koagülaz pozitif; koloniler altın sarısı. İnvazif, lokal, irinli enfeksiyonlar: furunkül, karbunkül, impetigo, yara enfeksiyonları, sinuzit, otitis media, mastitis puerperalis, ostit, grip sonrası pnömoni, sepsis. Toksine bağlı hastalıklar: besin zehirlenmesi, dermatitis exfoliativa, toksik şok sendromu.
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Koagülaz negatif, novobiosine duyarlı; Koagülaz negatif stafilokoklar içinde en sık rastlanan etken; fırsatçı; konakta predispozan faktörlerin varlığı önkoşul; diskret klinik semptomlarla seyreden, yabancı cisme bağlı enfeksiyonlar.
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Koagülaz negatif, novobiosine dirençli. Genç kadınlara (%10-20) idrar yolu enfeksiyonu; erkekte, nadiren, nonspesifik üretrit etkeni.

2.3. *Staphylococcus aureus*

2.3.1. Morfoloji ve kültürasyon

S. aureus bakterileri küçük ve yuvarlak Gram pozitif koklardır. Hücre bölünmesi farklı düzlemlerde gerçekleştiği için hücreler preparatlarda üzüm salkımı şeklinde bir arada görülürler. *S. aureus* bilinen basit besiyerlerinde ve optimum 37°C'de üretilirler. Kanlı jeloz besiyerinde 24 saatte porselen görünümlü, konveks, düzgün yüzeyli, sıklıkla sarı pigmentli koloniler oluşturur. Kolonilerin etrafında karakteristik hemoliz zonları oluşur (Kayser, 2002).

Plazmayı pıhtılaştırma yeteneğini gösteren koagülaz deneyi, *S. aureus*'u diğer stafilokoklardan ayırt etmede oldukça önemli, en yaygın olarak kullanılan ve en çok kabul gören identifikasyon kriteridir (Bilgehan, 1994; Foster, 1996).

2.3.2. Patojenik faktörler

Virülansı en yüksek olan stafilokok türü *S.aureus*'dur. Stafilokokların virülansında rol oynayan faktörler; hücre duvar yapıları, kapsül, yüzey proteinleri, toksinleri ve enzimleridir.

2.3.2.1. İnce yapı

Hücre duvarı çok tabakalı kalın mureinden oluşur. Lineer teikoik asitler ve polisakkaritler mureindeki polisakkarit ile kovalent bağlarla bağlıdır. Sitoplazma zarındaki lipo teikoikasitler tüm murein tabakası boyunca bulunurlar ve murein tabakanın dışına doğru uzanırlar. Teikoikasitler ve lipo teikoikasitler komplemanı alternatif yoldan aktive ederler ve makrofajlardan sitokin salınımını uyarırlar. Hücre duvarındaki proteinler mureinin peptid kısımlarına peptid bağlarıyla bağlanırlar. Kümeleştirici (Clumping) faktör, fibronektin bağlayıcı protein ve kollagen bağlayıcı protein spesifik olarak fibrinojen, fibronektin ve kollagene bağlanırlar. Doku ve ilgili matriks proteinleri ile kaplı yabancı cisimlere yapışmadan sorumludurlar. Protein A immunoglobulinlerin Fc kısımlarına bağlanır. İmmunoglobulinlerin Protein A ile 'yanlış' bağlanmasının opsonize edici antikorların 'doğru' bağlanmasını

engelleyerek fagositozu zorlaştırdığı kabul edilmektedir. Bazı *S.aureus* suşları polisakkarit yapısında olan ve antifagositik etkinliğe sahip kapsül oluştururlar (Kayser, 2002; Arda, 2000).

2.3.2.2. Hücre dışı enzimler ve toksinler

S.aureus'un etken olduğu enfeksiyonların çoğunda patogenez çoklu faktörler tarafından sağlanır. *S.aureus* pek çok hücre dışı madde oluşturur ve bu maddeler, kısmen, *S.aureus*'un oluşturduğu enfeksiyonun klinik tablosunu belirlemektedir (Kayser, 2002).

2.3.2.2.1. Toksinler

S.aureus, konak hücre morfolojisi ve/veya fonksiyonu üzerinde etkili olabilen çok sayıda ekstraselüler toksin üretebilmektedir. Enzimatik aktiviteleri ya da süperantijen özellikleri ile bu toksinler sitokin salınımının indükleyerek, yoğun inflamatuvar yanıt olan bölgelerde de üremelerini devam ettirebilmektedirler (Cengiz, 1999). *Staphylococcus aureus*'un sitolitik toksin, lökositin, enterotoksin, ekfoliyatif toksin, toksik şok sendromu toksin-1 (TSST-1) gibi çeşitli toksinleri bulunmaktadır.

Sitolitik toksinler

Stafilokokların salgıladığı, eritrositler ve çeşitli hücreler üzerinde sitolitik etkileri olan ekzotoksinlerdir. Bu toksinler α , β , γ ve δ olmak üzere dört gruba ayrılırlar (Foster, 1996; Özerol, 2001; Zinsser, 2005).

-Alfa toksin: İlk kez Kraus ve Clairmont tarafından 1900 yılında tanımlanan bu toksin *S.aureus* insan suşlarının ana hemolizindir. Hemolitik, dermonekrotik, lizozom parçalayıcı ve doku kültürlerinde sitolitik etkileri vardır. Dolaşım, kas ve böbrek korteksi dokuları toksine karşı oldukça duyarlıdır ve bu dokularda tahribat meydana getirmektedir.

-Beta toksin: İlk kez 1935 yılında Glenny ve Stevens tarafından tanımlanan bu toksin Stafilokok Sfingomyelinazı olarak da isimlendirilir. Sfingomyelin üzerine etki ederek eritrositleri eritir.

-Gamma toksin: 1938'de Smith ve Price tarafından tanımlanmış, Möllby Wadström tarafından elde edilmiştir. Özellikle stafilokokların etken olduğu kemik enfeksiyonlarında yüksek bulunması, bu toksinin bu hastalıklarda etkili olduğunu düşündürmektedir.

-Delta toksin: 1947 yılında Williams ve Harper tarafından tanımlanan bu toksinin biyolojik etkinliği oldukça geniştir. Eritrosit, lökosit, makrofaj, lenfosit ve trombositleri hasara uğratan bir proteindir.

İnsanlarda hastalık oluşturan *S.aureus* suşlarında bu sitolitik toksinlerden en çok bulunan alfa ve delta toksinlerdir. *S.aureus* suşlarının %95'inde bunlardan biri, %82'sinde her ikisi birlikte bulunur (Batıkutlu, 2006).

Lökosidin

S.aureus tarafından oluşturulan bu toksinin lökositler ve makrofajlar üzerine litik etkisi vardır. Toksin birbirinden ayrı F (Fast) ve S (Slow) adında iki protein komponentinden oluşmuştur. Bu komponentlerden her biri iyi antijen yapısında olup, herbirinden ayrı toksoid oluşturulur. Hücre zarında potasyum ve diğer katyonlara karşı geçirgenliği artıran gözeneklerin açılmasını sağlarlar (Batıkutlu, 2006).

Enterotoksin

Isıya dirençli, 100 °C'ye 30 dakika dayanabilen, polipeptit yapısında maddelerdir. Özellikle yüksek CO₂'li atmosfer ortamında karbondhidratlı ve proteinli besiyerlerinde üreyen stafilokoklar tarafından oluşturulurlar. Enterotoksinin A, B, C1, C2, D, E ve F şeklinde yedi immünolojik tipi vardır. *S.aureus* enterotoksinleri süperantijendir (Kayser, 2002; Zinsser, 2005; Batıkutlu, 2006).

Eksfoliyatif toksin

Stafilokok enfeksiyonlarının veziküler ve eksfoliyatif deri lezyonlarından sorumlu olan bu toksin Epidermolitik toksin olarak da bilinir. Antijenik ve biyokimyasal yapıları bakımından en az iki farklı eksfoliyatifin bulunduğu saptanmıştır. A tipi kromozomal, B tipi plazmide bağlı genlerce oluşturulur (Batıkutlu, 2006). Küçük çocuklarda sıklıkla rastlanan 'haşlanmış deri sendromu' na neden olan faj grup II stafilokoklar tarafından üretilen bir proteindir (Kapral, 1971).

Toksik şok sendromu toksini-1 (TSST-1)

Toksik Şok Sendromu Toksini (TSST-1) suşların yaklaşık % 1'i tarafından oluşturulur. Bu toksin de enterotoksin gibi bir süperantijendir ve çok sayıda T-lenfositin klonal oluşumunu indükler, bu olay sonucunda yoğun sitokin üretimi gerçekleşir. Buna bağlı olarak toksik şokun klinik semptomları ortaya çıkmaktadır (Kayser, 2002).

2.3.2.2.2. Enzimler

Staphylococcus aureus'un koagülaz, deoksiribonükleaz, hiyalüronidaz, lipaz, fibrinolizin, β -Laktamaz gibi çeşitli enzimleri bulunmaktadır (Foster, 1996; Zinsser, 2005).

Koagülaz

Staphylococcus aureus tarafından oluşturulan bir plazma pıhtılaştırma proteindir. Serbest ya da bağlı koagülaz (clumping faktör) olmak üzere iki tipi bulunmaktadır. Bağlı koagülaz, fibrinojeni direkt olarak fibrine dönüştürür ve stafilokokların kümeleşmesine neden olur. Serbest koagülaz, CRF (coagulase-reacting factor) ile reaksiyona girerek trombine benzer yapıda stafilotrombini oluşturur. Stafilotrombin fibrinojeni fibrine dönüştürür (Foster, 1996). *S. aureus* için standart belirleyici olan koagülaz testi ile patojen olan-olmayan stafilokok ayrımı yapılır. Koagülaz pozitif stafilokokların üzerinde oluşan kalın fibrin tabakasının, mikroorganizmayı

fagositoza karşı koruyarak, patojenliğe katkı sağladığı ileri sürülmektedir (Batıkutlu, 2006).

Katalaz

Tüm Stafilokoklarda bulunan bu enzim, fagositik hücreler tarafından stafilokoklar hücre içine alındıktan sonra, toksik H₂O₂'yi inaktive edip, H₂O₂'yi su ve oksijene dönüştürür. Bakteriler, bu enzim sayesinde fagositlerin içinde toksik oksijen radikalleri tarafından öldürülmeye direnç kazanır (Batıkutlu, 2006)

Deoksiribonükleaz

Stafilokokların çoğunda bulunan bu enzim DNA'yı hidrolize eder. Genellikle Koagülaz pozitif stafilokoklar tarafından üretilmektedir (Zinsser, 2005).

Hyalüronidaz (Yayılma faktörü)

Bağ dokusunun yapısında bulunan bu enzim hyalüronik asitin depolimerizasyonuna neden olarak *Staphylococcus aureus*'un dokularda yayılımını kolaylaştırır ve enfeksiyonun yayılmasını sağlar (Zinsser, 2005).

Lipaz

S.aureus suşlarının tümü ve koagülaz negatif stafilokokların yaklaşık 1/3'ü tarafında üretken bu enzim, dokuda bulunan yağları hidrolize ederek vücudun lipid içeren bölgelerinde stafilokokların yayılmasına yardımcı olur. Ayrıca, lipaz enzimi, stafilokokların yüzeysel dokuları invaze ederek fronkül ve karbonkül gibi enfeksiyonların gelişimine neden olmaktadır (Tünger, 2003).

Fibrinolizin (Sitafilokinaz)

Plazmada bulunan plazminojeni aktive ederek plazmin oluşturan bu enzim, fibrini parçalayarak enfeksiyonun diğer dokulara yayılmasına neden olur (Bilgehan, 1994; Foster, 1996).

β-Laktamazlar

β-laktamazlar, penisilin grubu antibiyotiklerdeki beta-laktam halkasının hidroksil grubunu parçalayarak etkisiz hale getirir ve bakterilerin β-laktam antibiyotiklere karşı direnç kazanmasına neden olur (Tünger, 2003).

2.3.3. *Staphylococcus aureus* enfeksiyonları

S.aureus, insanlarda basit bir deri enfeksiyonundan, çok ciddi ve ölümcül, hayatı tehdit edebilen değişik tablolara neden olabilmektedir. *S.aureus*' un iyi bilinen virülans faktörlerinin yanı sıra, yaygın olarak kullanılan invaziv girişimler, hastane enfeksiyonlarının insidansındaki artış, enfeksiyon kontrol önlemlerine yeterince uyulmaması, antibiyotiklere dirençli kökenlerin ortaya çıkması, intravenöz ilaç bağımlılığı ve diabetes mellitusun artan prevalansı stafilokok enfeksiyonlarının artışında önemli rol oynamıştır.

S.aureus' un neden olduğu enfeksiyonlar, toksinlere bağlı enfeksiyonlar, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları ve stafilokokların yayılımı ile oluşan enfeksiyonlar olmak üzere üç bölümde incelenirler.

2.3.3.1. Toksinlere bağlı olarak ortaya çıkan enfeksiyonlar

- Stafilokoksik haşlanmış deri sendromu
- Toksik şok sendromu
- Besin zehirlenmesi

2.3.3.2. Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları

- Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları
 - İmpetigo
 - Folikülit
 - Furonkül
 - Karbonkül
 - Hidradenitis süpürativa

- Mastit
- Cerrahi yara enfeksiyonları

2.3.3.3. Stafilokokların yayılımı ile oluşan enfeksiyonlar

- Bakteremi-sepsis
- Kardiyovasküler sistem enfeksiyonları
 - Endokardit
 - Perikardit
 - Mediyastinit
 - Septik vaskülit
- Solunum sistemi enfeksiyonları
 - Pnömoni
 - Ampiyem
- Kas, iskelet sistemi enfeksiyonları
 - Osteomyelit
 - Septik artrit
 - Septik bursit
- Santral sinir sistemi enfeksiyonları
 - Menejit
 - Spinal epidural apse
- Üriner sistem enfeksiyonları

(<http://infek.med.ege.edu.tr/dersnotlari/stafinf.pdf>)

2.3.4. CNS enfeksiyonları

CNS'lardan biri olan *S.epidermidis* insanlarda deri florasının çok önemli bir üyesidir. Bu nedenle uzun yıllar kültürlerden üretildiğinde kontaminan bir bakteri olarak kabul edilmiş ve enfeksiyon etkeni olarak düşünülmemiştir. Oysa; günümüzde CNS'ların özellikle hastane ortamında son derece ciddi ve tedavisi güç enfeksiyonlara neden olduğu bilinmektedir. Kalp kapak endokarditleri (özellikle prostetik kapak), intravasküler kateter enfeksiyonları, serebrospinal şant enfeksiyonları, prostetik eklem enfeksiyonları, vasküler greft enfeksiyonları periton

diyaliz kateterleri ile ilişkili peritonitler neden oldukları çok sayıda enfeksiyonların en önemlileridir (Dünder, 2000).

2.3.5. Stafilokoklarda antibiyotik direnci

Stafilokoklar 100 yılı aşkın bir süredir en önemli enfeksiyon etkenlerinden biri olarak tıp dünyasını meşgul etmektedir. 1940 yılına kadar, özellikle pnömoni, sepsis, bakteremi ve endokardit gibi son derece ölümcül olan stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde, penisilin klinik kullanıma girmesi ile büyük ölçüde başarı sağlanmıştır. Bununla birlikte, penisilin çok yaygın kullanılması ile zamanla penisilinaz üreten kökenler ortaya çıkmaya başlamıştır. Stafilokoklar, zamanla artan penisilin direncine ek olarak, daha sonraki yıllarda penisilin yanısıra tetrasiklin, eritromisin ve streptomisin gibi o dönemin güncel antibiyotiklerine de direnç geliştirmeye başlamışlardır. 1960 yılında, penisilin (PRP: penisilinaza dirençli penisilinler) türevlerinin gelişmesi ile stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde ikinci kez başarı sağlanmıştır. Ancak bir yıl sonra PRP'lere de direnç gösteren stafilokoklar ortaya çıkmış ve stafilokoklarda metisilin direnci tanımlanmıştır. 1970'li yılların sonu ile 1980'li yılların başlarından itibaren de MRSA suşlarında beta-laktam antibiyotikler dışında kinolonlar, makrolidler, linkozamidler, aminoglikozidler, kloramfenikol ve kotrimaksazol gibi birçok antibiyotiğe karşı çoklu antibiyotik direnci ortaya çıkmaya başlamıştır. Penisilinaz üreten, fakat metisilin direnci göstermeyen kökenlere karşı etkili olabilen çok sayıda antibiyotik bulunmasına karşın metisiline dirençli stafilokok enfeksiyonlarına karşı günümüzde tek antibiyotik grubu olarak glikopeptitler bulunmaktadır (Haznedaroğlu, 2007). Ancak, Japonya, Amerika, Avrupa ve Kore'de glikopeptitlere de dirençli stafilokok kökenlerinin bildirilmesi dirençli kökenlerin giderek artması ihtimalini doğurmuştur (Centers for Disease Control and Prevention 2000; Kim et al. 2000; Marlowe et al. 2001). Günümüzde direnç sorununun giderek yaygınlaşması ile birlikte MRSA tüm dünyada hastane enfeksiyonu salgınlarına yol açan çok ciddi bir sorun haline gelmiştir.

2.3.6. Metisiline dirençli Stafilokoklar

Metisiline dirençli stafilokoklar tüm beta-laktam antibiyotiklere dirençli olmalarının yanı sıra, makrolidler, linkozamidler, kinolonlar, tetrasiklin ve aminoglikozidler gibi birçok antibiyotiğe de yüksek oranlarda direnç göstermektedirler. Stafilokoklardaki metisilin direnç oranları özellikle hastane kökenlerinde oldukça yüksektir. Bu nedenle metisilin direnci özellikle hastane enfeksiyonlarında çok önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. MRSA enfeksiyonlarının tedavisinde tüm beta laktam antibiyotikler ve yanı sıra çoklu direnç nedeniyle diğer grup antibiyotiklerin de seçilememesi sonucunda, günümüzde bu enfeksiyonların tedavisinde yukarıda belirtildiği gibi yaygın olarak glikopeptit antibiyotikler kullanılmaktadır. MRSA'lar beta laktam dışındaki gruplardan bazılarında (örneğin trimetoprim-sulfametoksazol, makrolit gibi) duyarlı olabilmekle beraber ciddi enfeksiyonların tedavisinde bu duyarlılık sonucuna güvenilmemeli ve yine de glikopeptitler kullanılmalıdır. Ancak, non-komplike yüzeysel bir deri enfeksiyonu gibi ciddi olmayan enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilirler. Günümüzde klinik kullanımda olan iki glikopeptit antibiyotik bulunmaktadır. Bunlar vankomisin ve teikoplanindir (Haznedaroğlu, 2007).

2.3.7. Metisiline direnç mekanizması

MRSA suşları, metisiline duyarlı *S.aureus* (MSSA) suşlarında bulunmayan, β -laktam antibiyotiklere düşük afinite gösteren penisilin bağlayan protein 2a veya 2' (PBP2a) olarak adlandırılan bir protein üretmektedir. Bu protein kromozomal bir gen olan *mecA* geni tarafından kodlanır. PBP2a proteini ve *mecA* genine sahip *S. aureus* suşları metisiline intrensek direnç gösterirler ve tüm β -laktam antibiyotiklere dirençlidirler (Dündar, 2000).

Metisiline düşük düzeyde dirence neden olan aşırı β -laktamaz üreten suşlar (BORSA) ve normal ancak penisiline göreceli olarak düşük afinite gösteren PBP bulunduran suşlar (MODSA) bulunmakla birlikte laboratuvarında saptanan bu özelliklerin klinik bir anlamı bulunmamaktadır. Bu suşlarla oluşan ağır

enfeksiyonlar, β -laktamaza dayanıklı penisilinler ve sefalosporinlerle tedavi edilebilmektedir (Dünder, 2000).

Metisilin direncinin fenotipik ekspresyonu ancak 10^3 - 10^6 hücrede bir olmaktadır. Bu özellik nedeniyle MRSA suşlarındaki metisilin direncine heterojen direnç denir. Direncin heterojen ekspresyonundan mecA geni dışında farklı birçok bölgede bulunan genetik lokuslar sorumlu tutulmaktadır (Dünder, 2000).

Koagülaz-negatif stafilokok türlerinin birçoğunda da metisilin direnci aynı mecA geni ve PBP2a proteini ile olmakta ve aynı şekilde heterojen direnç görülmektedir. Ancak metisiline dirençli koagülaz-negatif stafilokoklar yaygın olarak bulunmakta ve tek bir suştan kaynaklanan salgınlar nadiren görülmektedir. Bu nedenle hastanelerde metisiline dirençli koagülaz-negatif stafilokokların tiplendirilmelerine nadiren gerek duyulmaktadır (Dünder, 2000).

2.3.8. Hastane enfeksiyonları (Nosokomiyal enfeksiyonlar)

Hastane enfeksiyonları hastanede ortaya çıkan enfeksiyonlardır. Hasta hastaneye yattıktan 48-72 saat sonra ve taburcu olduktan sonra 10 gün içinde gelişen enfeksiyonlar olarak tanımlanır. Hastane enfeksiyonları sıklıkla ameliyat yerinin enfeksiyonu, zatürree, idrar yolu enfeksiyonu ve kan dolaşımı enfeksiyonu olarak karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca vücudun her bölgesinde meydana gelebilmektedir. Hastane enfeksiyonlarının gelişiminde, enfeksiyonların tedavileri sırasında hastalara uygulanan solunum cihazları, ilaç ve kan verilmek üzere damar içine yerleştirilen aletler ve protezler de oldukça önemli kaynaklar arasında sayılabilmektedir. (Çalangu, 2001; Durmaz, 2001).

Hastanelerdeki mortalite ve morbiditenin önemli kaynaklarından olan hastane enfeksiyonları günümüzde önemli bir sağlık problemi oluşturmaktadır. ABD'de her yıl yaklaşık iki milyon kişi hastane kaynaklı enfeksiyonlara yakalanmakta ve bu enfeksiyonlar yaklaşık olarak seksen sekiz bin kişinin ölümüne neden olmaktadır (Andrei and Zervos, 2006; Singh et al., 2006).

Günümüzde hastane enfeksiyonlarının kaynaklarını tespit etmek ve gerekli önlemleri almak için yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Hastane enfeksiyonlarının görülme sıklığı %3-21 arasında değişmekte olup, ortalama %8.4 olarak bildirilmektedir. A.B.D.'nde yapılan araştırma sonuçlarına göre; ölüm sebepleri sıralamasında hastane enfeksiyonları, kalp hastalıkları, kanser ve beyin kanamalarından sonra dördüncü sırada yer almaktadır (Çalangu, 2001; Durmaz, 2001).

Hastane enfeksiyonlarının oluşmasında rol oynayan en önemli faktör, hastanede kalma süresidir. Bu süre enfeksiyonun tipine göre genellikle 4-10 gün arasında değişmektedir. Türkiye'de ve dünyada hastane enfeksiyonu oluşturabilen mikroorganizmalar arasında metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'ün (MRSA) oldukça önemli bir yeri vardır. Hastane enfeksiyonu etkeni olan *S.aureus* suşlarının en önemli kaynağı hastane personeli, aile bireyleri ya da bu suşlarla enfekte veya kolonize olan hastalardır (Çalangu, 2001; Durmaz, 2001).

Hastanelerdeki mikroorganizmalar toplum içinde edinilen mikroorganizmalar kıyasla tedavisi daha güç enfeksiyonlara neden olmaktadır. Hastanelerde yoğun antibiyotik kullanımı nedeni ile birçok antibiyotiğe dirençli hale gelen pek çok mikroorganizmanın bulunması, tedaviyi daha da güçleştirmektedir. Gereksiz ve aşırı antibiyotik uygulamaları, hem hastalarda yan etkilerin ortaya çıkmasına hem de tedavi maliyetini artırmasına neden olmaktadır. Bu nedenle doğru ve yeterli dozda antibiyotik kullanılması oldukça önemlidir (Çalangu, 2001; Durmaz, 2001).

2.3.8. Mikrobiyal tiplendirme yöntemleri

Patojen mikroorganizmaların tiplendirilmesi, epidemiyolojik olarak ilişkili kökenlerin genetik olarak da ilişkili olup olmadığını belirlemek açısından oldukça önemlidir. Mikroorganizmaların karakterizasyonu için gerekli olan geleneksel mikrobiyolojik yöntemler çeşitli testlere dayanmaktadır. Hastane enfeksiyonları epidemiyolojisi ve kontrolünde spesifik patojen türlerinin belirlenmesi için geleneksel mikrobiyolojik yöntemlerin yanı sıra, son yıllarda gelişen moleküler tiplendirme yöntemleri önemli katkılar sağlamaktadır. DNA ve PCR temelli moleküler epidemiyolojik tiplendirme yöntemleri, enfeksiyon etkenlerinin daha hızlı tanımlanması, özellikle üretimi zor

olan etkenlerin kültürü, kökenlerin tanımlanması, klonal ilişkilerin saptanması, antibiyotik direncinin belirlenmesi ve hastane enfeksiyonları epidemiyolojisi konusunda akılcı patojen kontrol yöntemlerinin belirlenmesi ve uygulanması için yeni bir devrim başlatmıştır. Moleküler yöntemler, pek çok nosokomiyal patojenin epidemiyolojisinin daha açık ve ayrıntılı olarak anlaşılmasına ışık tutarken, enfeksiyon etkeninin belirlenmesinde duyarlılık ve özgüllüğün de artmasına imkan sağlamıştır (Andrei and Zervos, 2006). Hastane enfeksiyonları etkenlerini tiplendirmede kullanılan yöntemler Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Hastane enfeksiyonları etkenlerini tiplendirme yöntemleri (Durmaz, 2007).

Fenotipik Yöntemler	Genotipik Yöntemler
✓ Biyotipleme	✓ Plazmid analizi
✓ Serotipleme	✓ Kromozomal DNA’nın restriksiyon enzim analizi: RFLP
✓ Bakteriyofaj tiplemesi	✓ Ribotipleme
✓ Bakteriyosin tiplemesi	✓ Bölgeye özgü PCR-RFLP
✓ Antibiyotik duyarlılık paterni	✓ Sekans analizi
✓ Protein analizi	✓ RAPD
▪ Multilokus enzim elektroforezi	✓ REP
▪ İmmunoblot fingerprinting	✓ ARDRA
▪ Hücresel proteinlerin poliakrilamid jel elektroforezi	✓ AFLP
	✓ Microarray teknolojisi

RFLP: Restriction fragment length polymorphism; REP: Repetitive Extragenic Palindromic; RAPD: Random Amplification of Polymorphic DNA; ARDRA: Amplified rDNA Restriction Analysis; AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphisms.

Yüksek mortalite ve morbiditeye neden olan nosokomiyal enfeksiyonlar ve giderek artan çoklu antibiyotik dirençli kökenlerin geniş yayılım göstermesi küresel bir sorun haline gelmiştir. Hastaneye yatan hastalar diyabet, böbrek yetmezliği, bağışıklık yetmezliği, cerrahi girişimler, protez uygulamaları gibi farklı nedenlerle enfeksiyonlara eğilimli olmaktadır. Dirençli mikroorganizmalar ile gelişen enfeksiyonlara zemin teşkil eden bu enfeksiyonların tedavisi oldukça güç ve pahalı olmakla birlikte, mortalitesi de yüksektir. Bu nedenle hayatı tehdit eden bu enfeksiyonların kontrol altına alınması ve önlenmesi çok önemlidir (Bergogne-Bérézin, 1999).

Hastane enfeksiyonlarına neden olan çoklu direnç gösteren patojenler oldukça önemli bir problem haline gelmiştir. Antimikrobiyal direnç problemi gösteren en önemli patojenler genellikle Gram (+) nosokomiyal patojenler grubunda yer alan vankomisin dirençli Enterococci, MRSA ve yakın geçmişte ortaya çıkan glikopeptit ilımlı ve dirençli *S.aureus*'dur. Gram (-) basiller arasında ise geniş spektrumlu beta laktamaz üreten *Escherichia coli* suşları, *Klebsiella pneumoniae*, fluorokinolon dirençli *Pseudomonas aeruginosa* ve *E. coli* suşları yer alır (Andrei and Zervos, 2006; Singh et al., 2006).

Staphylococcus aureus toplum ve hastane kökenli enfeksiyonlara neden olabilen mikroorganizmaların başında gelmektedir (Centers for Disease Control and Prevention, 1997). Stafilokokal enfeksiyonların tedavisinde penisilin kullanımını izleyen yıllarda gelişen direnç, 1960'lı yıllarda beta laktamaza dirençli yarı sentetik penisilinleri (metisilin, oksasilin, nafsilin) gündeme getirmiştir (Topçu vd., 2002). 1980'li yılların başından itibaren *S.aureus* suşlarında metisilin direncinin yaygınlaşması ile birlikte, bu suşların neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde yaygın bir şekilde vankomisin kullanılmaya başlanmıştır (Centers for Disease Control and Prevention, 1997). Son yıllarda metisiline ek olarak vankomisin dirençliliğinin de bildirilmesiyle MRSA enfeksiyonlarının kontrol altında tutulması oldukça güçleşmiştir (Onasanya et al., 2003). Çoklu antibiyotik dirençliliği gösteren MRSA suşlarının ortaya çıkması ve direnç sorununun giderek yaygınlaşması ile birlikte MRSA tüm dünyada hastane enfeksiyonu salgınlarına yol açan çok ciddi bir sorun haline gelmiştir (Dündar, 2000). Bu bağlamda enfeksiyona neden olan mikroorganizmanın doğru tanımlanması büyük önem taşımaktadır.

Epidemiyolojik çalışmalar için gerekli olan alt-tür düzeyinde tiplendirmede fenotipik yöntemler ön bilgi vermektedir. Ancak çoğunlukla kesin ayırım için daha önce belirtildiği gibi moleküler yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Mikroorganizmaların tanımlanmasında uygulanan moleküler mikrobiyolojik yöntemlerin sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Hastane enfeksiyonları etkenlerinin analizinde tercih edilen moleküler teknikler Çizelge 2.2'de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Hastane enfeksiyonları etkenlerinin analizinde tercih edilen moleküler teknikler (Durmaz, 2007).

Organizma	Temel Metot	Alternatif Metotlar
<i>Staphylococcus aureus</i>	PFGE	RAPD-PCR, PPA, REP-PCR
Koagülaz negatif stafilokoklar	PFGE	PPA
Enterokoklar	PFGE	AP-PCR
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	PFGE	Serotipleme
<i>Burkholderia, Stenotrophomonas, Acinetobacter</i>	PFGE	Ribotipleme
<i>E.coli, Citrobacter, Proteus, Providencia</i>	PFGE	Ribotipleme, AP-PCR, PPA, REP-PCR
<i>Klebsiella, Enterobacter, Serretia</i>	PFGE	Ribotipleme, PPA
<i>Pseudomonas aureginosa</i>	PFGE	
<i>Clostridium difficile</i>	AP-PCR, REP-PCR	PFGE
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	IS6110 RFLP	REP-PCR

PFGE: Pulsed-Field Gel Electrophoresis; PPA: Plazmid profil analizi; REP-PCR: Repetitive Extragenic Palindromic-PCR; AP-PCR: Arbitrarily Primed-PCR; RFLP: Restriction fragment length polymorphism; RAPD-PCR: Random Amplification of Polymorphic DNA-PCR.

Plazmid profil analizi, bakteriyel tiplendirmede araç olarak kullanılan ilk moleküler yöntemdir. Bu yöntem klonal ilişkilerin belirlenmesinde uygulanabilir olmasa da, özel bir direnç geni veya gen kasetinin yayılmasını belirlemek ve takip etmek için kullanılmaktadır. Plazmitler hareketli ekstrakromozomal DNA parçacıkları olduğu için, bakteriler taşıdığı plazmiti kaybedebilir ya da kazanabilir. Bu bağlamda epidemiyolojik olarak ilişkili suşlar farklı plazmit profilleri gösterebilmektedir. Endemik ve epidemik suşlar arasındaki farklılıkları belirlemek açısından uzun süreli takipte bu yöntemi uygulamak yararlı değildir (Andrei and Zervos, 2006; Singh et al., 2006).

Kromozomal DNA'nın restriksiyon enzim analizi ile oluşan RFLP (restriction fragment length polymorphisms) farklı paternleri aynı türün farklı kökenlerini ayırmada ve birçok mikroorganizmanın tiplendirilmesinde uygulanmaktadır (Andrei and Zervos, 2006; Singh et al., 2006).

Ribotipleme, Southern blot yöntemi kullanılarak hedeflenen rRNA gen bölgesi analiz edilir. Ayrım gücü PFGE ve bazı PCR temelli yöntemlere göre daha düşüktür (Andrei and Zervos, 2006; Singh et al., 2006).

Moleküler tiplendirme yöntemlerinin altın standardı olarak kabul edilen PFGE (pulsed-field gel electrophoresis), büyük DNA fragmentlerinin (1000 kbp'den büyük) analizini gerçekleştirmek için uygulanan bir yöntemdir. PFGE yöntemi; agaroz içine gömülü durumda bulunan bakteriden yapısal bütünlüğü bozulmadan izole edilen kromozomun restriksiyon enzimi ile kesilmesi sonucunda oluşan profilin incelenmesi esasına dayanır. PFGE ile analiz edilen çeşitli enfeksiyon etkenleri arasında *Enterococcus sp.*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp.* (Grup A ve B), *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aereginosa*, *Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, *Vibrio cholerae* türleri sayılabilir alır (Andrei and Zervos, 2006; Singh et al., 2006).

PCR temelli tiplendirme yöntemleri 1998 yılında Hoelzel ve Green tarafından detaylı olarak tanımlanmıştır (Hoelzel and Green, 1998). Daha sonraki yıllarda mikroorganizmaların tanımlanması üzerinde yapılan geniş alanlara yayılan çalışmalar büyük bir etki yaratmıştır. Genotipleme çalışmalarında kullanılan PCR temelli tiplendirme yöntemleri arasında PCR-RFLP, rep-PCR, RAPD-PCR'dir. PCR temelli tiplendirme yöntemleri ile spesifik DNA parçacıklarının çoğaltılması sağlanarak DNA polimorfizmi belirlenebilmektedir. Bu yöntemler spesifik mikroorganizmaların tiplendirilmesine olanak sağlamaktadır. Ayrıca bu yöntemler ile toksin, virülans faktörleri ve antibiyotik direnç genleri saptanabilmektedir. Etken mikroorganizmaların PCR uygulamaları ile direk olarak tanımlanması geleneksel kültür metodları ile karşılaştırıldığında daha kısa zaman almaktadır (Andrei and Zervos, 2006; Singh et al., 2006).

Yapılan birçok çalışmada kullanılan moleküler tekniklerin temeli farklı DNA fragment uzunluklarının elektroforetik ayırımına dayanmaktadır. Belirli bir tiplendirme metodunun kullanılabilirliğinin değerlendirilmesinde jelde oluşan bant paternleri önem taşımaktadır. Aynı tür içindeki farklı suşlarda primerlerin bağlanma yerlerinin sayısı ve birbirine olan uzaklıkları farklı olacağından, agaroz elektroforezinde, amplifiye edilen parçaların sayı ve büyüklükleri de farklılık gösterecektir. Bu farklılıklar suşlar arasında bant polimorfizminin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Böylece amplifikasyon sonucunda jel elektroforezinde gözlenen

her bir izolata ait bant profilleri birbirleriyle karşılaştırılarak filogenetik analizler yapılmaktadır (Andrei and Zervos, 2006; Singh et al., 2006).

2.3.9. Filogenetik analiz

Filogenetik analiz, yaygın bir ata soyundan gelen türlerin soyları hakkındaki hipotezlerin test edilmesi süreci anlamına gelmektedir. Bu analiz organizmaların yakın ilişkilerinin belirlenmesi ve bu organizmaların evrimsel soylar kapsamında bir yere konulması için kullanılmaktadır. Organizmalar arasındaki evrimsel ilişkilerin araştırması şeklinde tanımlanan filogeni, geleneksel olarak önerilen fenotip ilişkilerine dayalı olarak, organizmaların taksonomik sınıflandırılmasının bir bölümüdür. Moleküler filogenetik analiz, hızlı DNA dizilenmesinin oluşumu ile daha yaygın bir kullanım alanı bulmuştur ve filogenetik analiz için yararlı olan moleküler dizilere ait birçok veritabanı oluşturulmuştur (Rademaker and Savelkoul, 2004).

2.3.10. RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymorphic DNA)

RAPD-PCR yöntemi ilk olarak Williams ve arkadaşları ile Welsh ve McClelland tarafından tanımlanmıştır (Welsh and McClelland, 1990; Williams, 1990). Rasgele çoğaltılmış Polimorfik DNA-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RAPD-PCR) tekniği; rastgele dizilimdeki kısa oligonükleotid primerleri kullanarak ve genomdaki farklı bölgeleri çoğaltarak genetik polimorfizmi belirleyen bir PCR tekniğidir. Bu yöntemde reaksiyonun gerçekleşebilmesi için araştırılan genomun baz dizilimi hakkında herhangi bir özel DNA ön bilgisine ya da özel primerlerin sentezine ihtiyaç yoktur. Primerlerin GC/AT oranlarının %50 ya da daha büyük olması oldukça önemlidir. RAPD tekniğinde, düşük bağlanma sıcaklıklarında kısa rasgele tasarlanmış primerlerin tek veya çift olarak kullanımı ile genom çoğaltılmaktadır. Bağlanma sıcaklığının düşük olması primerlerin rasgele birçok yere bağlanarak DNA sentezini başlatmasını sağlar. Rasgele ve çok kısa DNA parçacıklarından çoğaltılması ile farklı fragmentler oluşur. Böylece farklı bir lokusu temsil eden her bir PCR ürünü ile DNA düzeyindeki farklılık tahmin edilebilmektedir (Bardakçı, 2001; Onasanya, 2003)

RAPD tekniği kullanılarak belirlenen DNA polimorfizmi agaroz jelde RAPD bandının varlığı ya da yokluğu ile kendini göstermektedir. Ayrıca genomda meydana gelen delesyon, insersiyon veya primerlenme bölgelerindeki ve bölgeler arasındaki nükleotit diziliminin farkını yansıtmaktadır (Bardakçı, 2001; Onasanya, 2003).

RAPD-PCR yöntemi kullanılarak; *Acinetobacter baumannii*, *Candida albicans*, *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Proteus mirabilis*, *Streptococcus sp.*, *Histoplasma capsulatum*, *Salmonella enteritidis*, *Haemophilus somnus*, *Leptospira*, *Staphylococcus aureus*, *Legionella pneumophila*, suşları arasında tanımlama yapılmıştır (Olive and Bean, 1999).

Rasgele primerlerin genomdaki sayısız bölgeyi çoğaltabilme potansiyeli ve çoğalan DNA parçacıkları, RAPD tekniğini genetik uzaklık ve filogenik araştırmalar için tercih edilir hale getirmiştir. Her ne kadar, RAPD profilinin tekrarlanabilirliği hala tartişmanın odak noktası ise de, RAPD tekniği ucuz, kısa sürede çok sayıda DNA işaretleyicisi geliştirmedeki etkinliği ve çok gelişmiş aletlere az gereksinim göstermesi nedeniyle önemlidir (Olive and Bean, 1999; Bardakçı, 2001; Onasanya, 2003).

2.3.11. Bakterilerde tekrarlayan gen segmentleri

Tüm organizmaların genomlarında tekrarlayan sekanslar bulunmaktadır. Ökaryotik genomlarda DNA sekans organizasyonu tek-kopya sekanslardan meydana gelen çok sayıda tekrarın aralıklı olarak dağılmasıyla gerçekteşir. İnsan genomunda (3×10^9 baz çifti=bç) bulunan 300 bç *Alu* tekrarlayan sekansları tüm genomun %3-6'sını oluşturur ve haploid genom başına 300.000 kopya düşmektedir. Prokaryotik genomlarda da çeşitli düşük kopya sayılı tekrar sekansları bulunmaktadır (insersiyon sekansları, rRNA operonları, tRNA genleri, vb.). Bu sekanslar kromozomal delesyonlar, duplikasyonlar, inversiyonlar gibi DNA'nın yeniden yapılanma sürecinde kromozomal yapıya katkıda bulunurlar (Rademaker and Savelkoul 2004).

Prokaryotlarda tekrarlayan sekanslar ilk olarak *Salmonella typhimurium* ve *Escherichia coli*'de tanımlanan REP (repetitive extragenetic palindrome) ve PU (palindromic unit) sekanslarıdır. REP benzeri sekanslar diğer prokaryotlarda da gösterilmesine rağmen konsensus sekansları bakteriden bakteriye değişebilmektedir. Bu sekansların rollerinin ne olduğu tam olarak bilinmemektedir. Gen regülasyonunda rol aldıkları transkripsiyon sonlandırıcı oldukları düşünülmektedir. Gen ifadesinde mutlaka gerekli elementler değildir ancak ifadeyi düzenleyici olabilirler (Rademaker and Savelkoul 2004).

Bir diğer tekrarlayan birim ise ERIC (enterobacterial repetitive intergenic repeat unit) sekanslarıdır. Bu sekanslar kromozomlarda kodlanmayan transkriplenmiş bölgelerde bulunurlar ve buldukları bölgeler türlere göre farklılık göstermektedir. Başlangıçta sadece *Enterobacteriaceae* ve *Vibrinoceae* türlerinde buldukları düşünülen ERIC ve REP sekanslarının birçok türde bulunduğu belirlenmiştir. Bu sekanslara yönelik primerler kullanılarak bakteri genomlarının parmak izi paternleri ilk olarak 1991'de belirlenmiştir. Bu bölgelerin milyonlarca yıldır korunduğu düşünüldüğünde, bu tekrarlanan elementlerin DNA-protein ilişkisinde önemli rolleri olduğu varsayılabilir (Rademaker and Savelkoul 2004).

Bazı DNA giraz ve polimerazların REP sekanslarına bağlandıkları gösterilmiştir. Bu sekansların RNA'ya transkribe edildikleri ve RNA ara ürünleri olarak dağıldıkları düşünülmektedir (Rademaker and Savelkoul 2004).

2.3.12. rep-PCR tiplendirme yöntemi

rep-PCR tiplendirme yönteminde birçok bakteri genomunda karakteristik bölgelerde pekçok kopya halinde bulunan, doğal olarak var olan ve yüksek oranda korunmuş, tekrarlayan DNA dizilerine komplementer olan primerler kullanılmaktadır. rep-PCR karmaşık ve yüksek oranda özgül genomik parmak izleri oluşturur. Bu yöntem 'interrepeat spacer length polymorphism' analizi olarak da tanımlanabilir (Vanechoutte 1996). Bu primerlerin ve PCR'ın kullanımı REP, ERIC ve BOX elemanları arasındaki farklı genomik bölgelerin selektif amplifikasyonu ile karakterizedir. Tekrarlayan diziler üç başlıkta toplanmıştır. Bunlar; REP dizileri, ERIC dizileri ve *Streptococcus pneumoniae*'nin BOX

elemanıdır. Bu diziler genomda farklı gen içi pozisyonlarda bulunurlar. Oligonükleotit primerler REP ve ERIC bölgesindeki ters tekrarlardan dışarıya doğru, BOX bölgesinin box A altünitesinden DNA sentezini başlatacak şekilde tasarlanırlar. REP, ERIC ve BOX elemanları arasında kalan farklı genomik bölgeler bu primerler kullanılarak selektif olarak PCR ile çoğaltılırlar. Bu protokoller sırası ile REP-PCR, ERIC-PCR, BOX-PCR ile refere edilirler ve rep-PCR adı altında toplanırlar (Rademaker and Savelkoul 2004).

Suşlar arasında tekrar elementlerinin sayısı ve lokalizasyon farkı moleküler tipleme için gerekli olan tipe özgü bant profilini oluşturmaktadır. Bakteriyel izolatlardan elde edilen rep-PCR genomik fingerprintler tür, alt tür ve suş seviyesinde ayırım sağlamaktadır. REP-PCR ile tiplendirme kolay uygulanabilir olması, çok sayıda izolat ile çalışılabilmesi ve ayırt ediciliğinin yüksek olması nedeniyle bakteriyel popülasyonların filogenetik yapıları ve taksonomik farklılıklarını belirlemede kullanılabilir (Rademaker and Savelkoul 2004).

rep-PCR genomik parmakizi yönteminin bir avantajı da kullanılan primerlerin çeşitli Gram negatif ve Gram pozitif bakteriler için tanı koydurucu parmak izi paternleri oluşturmasıdır. Genomik yapı ya da tekrarlayan diziler ile ilgili ön bilgiye ihtiyaç duyulmamaktadır. Bu durum RAPD-PCR protokolleri için denemeye ya da tesadüfen uygun rastgele primer gereksinimini ortadan kaldırır. Ayrıca rep-PCR konak DNA'sının (insan, hayvan ya da bitki) bulunduğu örneklerde de spesifik parmak izleri oluşturur (Rademaker and Savelkoul 2004).

İngiltere'de 20 hastaneden izole edilen 50 *Clostridium difficile* suşu tekrarlayan bölgelere yönelik üç PCR yöntemi ile çalışıldığında; ERIC-PCR yönteminin ayırt edici olmadığı, REP-PCR'ın BOX-PCR'dan daha ayırt edici olduğu ve suşların tek bir klondan kaynaklanmadığı gösterilmiştir. REP-PCR'da palindromik kökte bulunan korunmuş 38 bç'lik DNA sekansları, ERIC-PCR'da ise ekstragenik bölgelerde bulunan 126 bç'lik DNA sekanslarına yönelik primerler kullanılırken, RAPD-PCR'da 10-20 bazlık rastgele seçilmiş primerler kullanılmaktadır. Her üç yöntemin *Francisella tularensis* suşlarının epidemiyolojik karşılaştırması için kullanıldığı bir çalışmada ayırım gücü en yüksek yöntem REP-PCR olarak bildirilmiştir (Rademaker and Savelkoul 2004).

2.3.13. *Staphylococcus aureus* ile yapılan tiplendirme çalışmaları

Stafilokoklarda görülen metisilin direnci, tüm dünyada olduğu gibi Türkiye’de de giderek artış göstermektedir. MRSA suşlarının diğer antibiyotiklere direnç kazanması ve çoklu antibiyotik direncinin ortaya çıkması önemli bir problem haline gelmiştir. Bu nedenle MRSA suşlarının araştırılması, neden olduğu enfeksiyonlar için uygun tedavi protokülünün belirlenmesi ve geliştirilmesi hala ilgi odağı olmaya devam etmektedir.

Çeşitli çalışmalarda, MRSA'ların pek çok antibiyotiğe olan direnç oranları incelenmiş olup, yıllar içinde MRSA'larda çoklu antibiyotik direnci ile bir çok antibiyotiğe olan direncin arttığı saptanmıştır (Kim et al., 2004; Shittu and Lin, 2006).

MRSA suşlarına karşı etkin mücadelenin gerçekleştirilebilmesi için öncelikle bu suşları doğru ve kısa sürede tanımlanması ardından da tiplendirilmesi gerekmektedir. Günümüzde bu suşların fenotipik tiplendirilmesinde antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. 2007 yılında Ankara’da yapılan bir çalışmada, 115 hastadan izole edilen MRSA suşunun 16 antibiyotiğe olan duyarlılık paternleri incelendiğinde 4 farklı antibiyotip profili bulunmuştur (Karabiber ve Mert Dinç, 2007). Ayrıca 2006 yılında Güney Afrika’da yapılan diğer bir çalışmada ise 61 MRSA suşunun 9 antibiyotiğe olan direnç durumları incelenmiş ve 12 farklı antibiyotip tespit edilmiştir (Shittu and Lin, 2006).

Tiplendirme çalışmalarında pek çok farklı yöntem kullanılmakta ve özellikle moleküler yöntemler giderek önem kazanmaktadır. Geleneksel tiplendirme yöntemlerinin yerine moleküler yöntemlerin kullanıldığı mikroorganizmaların başında *S.aureus* gelmektedir. *S.aureus* suşlarının moleküler tiplendirilmesinde kullanılan altın standart olarak kabul edilen PFGE yöntemi zaman alıcı, titizlik gerektiren, kompleks bir sistemdir. Ayrıca laboratuvarlar arasında standardizasyon probleminin bulunması bu yöntemle elde edilen verilerin karşılaştırılmasını zorlaştırmaktadır. Geleneksel PCR temelli teknikler bazı kısıtlamaları olmasına rağmen, PFGE ile karşılaştırıldığında daha hızlı, kolay ve ucuzdur (Andrei and Zervos 2006; Singh et al., 2006).

Literatür incelendiğinde, *S.aureus* suşlarının PCR temelli tekniklerden ribotiplendirme, PFGE, REP-PCR, RAPD-PCR, multiplex PCR ve RFLP ile tiplendirildiği görülmektedir (Saulner, 1993; Hojo et al.,1995; Cha et al., 2006; Alarco'n et al., 2006; Rabouam et al., 1999; Fung et al., 2001; Ross et al., 2005). Epidemiyolojik analizinin yapıldığı ayrıntılı bir çalışmada, çoğu metisiline dirençli 59 *S.aureus* suşunun 6 farklı moleküler tiplendirme yöntemi ile genotiplendirilmesi karşılaştırılmıştır. Bu incelenen yöntemler; 1) multiple-lokus VNTR analizi serine protease V8 (*sspa*), protein A (*spa*), Ser-asp-rich fibrinogen-binding proteins (*sdrCDE*), clumping factor A (*clfA*), clumping factor B (*clfB*), fibrinogen-binding proteins (*fnbAB*), collogen adhesin A (*cna*) genlerine yönelik; 2) tripleks PCR (*coa*, *spa* ve HVR bölgelerine yönelik primerlerle); 3) STAR-RP; 4)RAPD; 5-6) REP (iki farklı primerle) olarak sıralanmaktadır. Çalışmada kullanılan 6 yöntemden sadece ML-VNTR sonuçları PFGE sonuçları ile tamamen uyumlu bulunmuştur (Sabat et al., 2006).

Yapılan diğer bir kapsamlı çalışmada, MRSA izolatlarının tiplendirilmesinde 6 farklı genotipik tiplendirme yönteminin ayırım gücü karşılaştırılmıştır. Bu yöntemler, PFGE, RAPD, 16S-23S rDNA, protein A geni, HVR, koagülaz genine yönelik PCR 'dır. Yapılan çalışma sonucunda, PFGE ile 28 tip,16S-23S rDNA ile 10 tip, RAPD ile 9 tip, protein A-geni PCR ile 5 tip, HVR-PCR ile 5 tip, koagülaz geni PCR ile 2 farklı tip bulunmuştur (Nikbakht et al., 2008).

Ekim-Mart 2003 arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'den toplanan MRSA'ların araştırıldığı bir diğer çalışmada, PFGE ve antibiyotipleme yöntemleri kullanılarak bu suşlar karakterize edilmiştir. Buna göre, incelenen 85 izolatın 53 tanesini (%45) bünyesinde bulunduran bir baskın tip belirlenmiştir (Tip A). Bu baskın tipin dışında daha az örnekle temsil edilen üç tip (Tip B, C, D) saptanmıştır. İzolatlar 9 farklı antibiyotip göstermiştir (Elçi, 2005).

Literatürde MRSA suşlarının, yukarıda da belirtildiği gibi, çeşitli fenotipik ve genotipik tiplendirilmeleri çalışmaları bulunmaktadır. Bu çalışmalarla MRSA'ların doğru ve hızlı bir şekilde tanımlanması, bu bakteriler arasındaki ilişkilerin ortaya çıkarılması hedeflenmiştir. Ancak MRSA suşları ile mücadelede daha önce belirtildiği gibi tam başarı sağlanamadığından dolayı bu suşlar tüm dünyada önemini korumaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmalarda Kullanılan Mikroorganizmalar

Çalışma kapsamında, Mart 2006-Aralık 2007 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nin çeşitli servislerinde yatan hastalara ait kan, derin trakeal aspirasyon, pü, yara gibi farklı klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus* suşları toplandı. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 suşu pozitif kontrol olarak kullanıldı. Çalışmamızda toplanan örneklerin fenotipik teşhisi gerçekleştirildikten sonra, 26 MRSA, 15 MSSA ve 5 CNS suşu çalışma kapsamına dahil edildi. Bu suşlar, %5 Koyun Kanlı Agar Besiyeri'ne inoküle edilerek 37°C'de inkübe edildi. Bu kültürlerden örnek alınarak, DNA izolasyonu, PCR (Poimeraz Zincir Reaksiyonu) gibi çalışmalar için tekrar kullanılması amacıyla %10 gliserollü BHI sıvı besiyerine ekildi ve 37°C'de inkübe edildikten sonra -20°C'de saklandı. Bu kültürler iki ayda bir pasajlanarak, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Anabilim Dalı Mikrobiyal Taksonomi ve Kültür Koleksiyonları Laboratuvarı'nda toplandı.

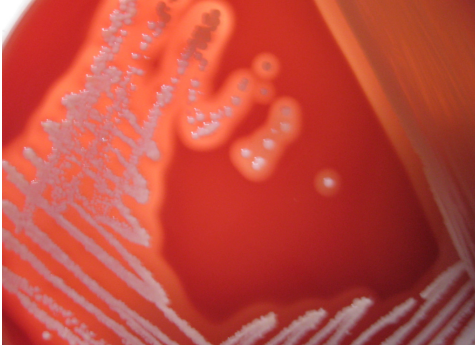
Çalışmamızda söz konusu edilen sonuçlara ait fotoğraflar Canon 450D kullanılarak tarafımızca çekilmiştir.

3.2. İzolatların Teşhis Edilmesi

3.2.1. Kanlı agarda β- hemoliz

Staphylococcus suşları, %5 Koyun Kanlı Besiyeri'ne inoküle edildi ve 37°C'de bir gece boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında suşların koloni morfolojisi, pigmentasyonu ve hemoliz tipi değerlendirildi. Etrafında şeffaf bir beta hemoliz zonu oluşturan koloni örnekleri pozitif olarak değerlendirildi (Arda, 2000; Bauer et al., 1974) (Şekil 3.1.).

Stafilokoklar, yuvarlak, düzgün, opak, 1-3 µm çapında hafif konveks kolonilere sahiptir. *Staphylococcus aureus* kolonileri daha büyük ve parlaktır (Bauer et al., 1974; Sneath et al., 1986) (Şekil 3.2.).



Şekil 3.1. Kanlı agarda β -hemoliz

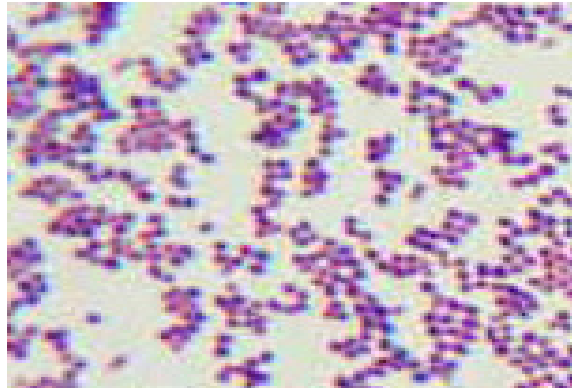


Şekil 3.2. Koloni morfolojisi

3.2.2. Gram Boyama

İncelenecek olan kültürden preparat hazırlandı. Bu aşamada temiz bir lam üzerine bir damla serum fizyolojik damlatılarak, incelenecek kültürde üreyen kolonilerden öze yardımıyla örnek aktarıldı ve ince bir film tabakası halinde yayıldı. Kuruma işlemi tamamlandıktan sonra 3 kez alevden geçirilerek, bakterilerin lam üzerine fiksasyonu sağlandı. Preparat, Gram Boyama Tekniğine göre sırasıyla kristal viyole, lugol, alkol ve son olarak bazik fuksin ile boyandı. Daha sonra distile su ile yıkanarak kurumaya bırakıldı. Preparata immersiyon yağı damlatılarak ışık mikroskopunun x100'lük objektifinde incelendi (Bilgehan, 1990; Collins et al., 2001).

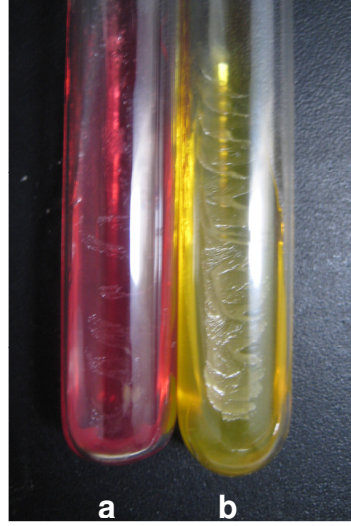
Staphylococcus türleri gram pozitif üzüm salkımı şeklinde koklar olarak görünürler (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. *Staphylococcus aureus*'un ışık mikroskopunun x100'lük objektifteki görüntüsü.

3.2.3. Mannitol Tuzlu Agar Besiyeri'nde mannitol fermentasyonu

Staphylococcus türleri Mannitol Tuzlu Agar Besiyeri'ne inoküle edildi. Besiyeri bileşimindeki yüksek tuz konsantrasyonu diğer bakterilerin gelişimini engellerken, *Staphylococcus aureus* buna tolerans göstermektedir ve hızlı bir şekilde üreyebilmektedir. Mannitol fermentasyonu sonucu oluşan asit, besiyerinde pH indikatörü olarak bulunan fenol kırmızısının rengini kırmızıdan sarıya dönüştürmektedir. Değerlendirme sonucunda besiyerinde sarı renk gözlenmesi ile test sonucu pozitif olarak değerlendirildi (Bauer et al., 1974; Collins et al., 2001) (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4. Mannitol Tuzlu Agar Besiyeri'nde mannitol fermentasyonu
(a-negatif, b-pozitif)

3.2.4. Koagülaz varlığının saptanması

Plazmayı pıhtılaştırma yeteneğini gösteren koagülaz deneyi, *S.aureus*'u diğer stafilokoklardan ayırt etmede en yaygın olarak kullanılan, en çok önem taşıyan ve genel olarak kabul gören identifikasyon kriteridir. *S.aureus* koagülaz pozitifdir. İki farklı yöntemle koagülaz testi yapılabilir. Birincisi stafilokokların besiyerine saldıkları serbest koagülazın araştırıldığı tüp testidir. İkincisi ise kümeleştirme faktörü olarak da bilinen bağlı koagülazın araştırıldığı lam testidir. Lam testi hızlı sonuç vermekle birlikte, *S.aureus* suşlarının %10-15'i bu yöntemle negatif sonuç verebilir. Bu nedenle lamda yapılan koagülaz testi negatif görünen ve diğer

patojenite kriterlerine bakılarak *S. aureus* olmasından şüphelenilen örneklere tüpte koagülaz testi yapılmaktadır.

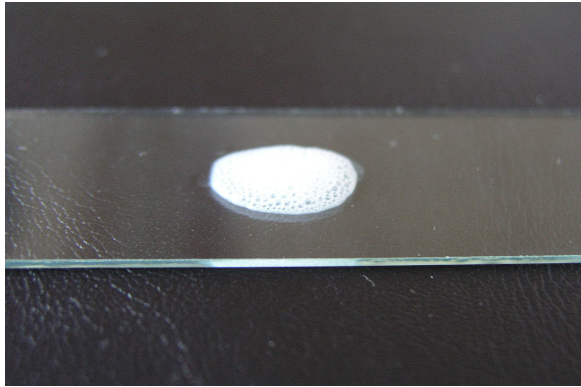
Bir gecelik Mannitol tuzlu agar kültüründen 2-3 koloni lam üzerine alınarak ¼ sulandırılmış 0.5 ml plazma içerisine ilave edildi. Pıhtılaşma oluşması halinde test sonucu pozitif olarak değerlendirildi (Collins et al., 2001) (Şekil 3.5.).



Şekil 3.5. Koagülaz varlığının saptanması.

3.2.5. Katalaz varlığının saptanması

Nutrient Agar (NA) besiyerine inoküle edildikten sonra 24 saat inkübe edilen bakteri kültüründen öze yardımıyla az miktarda lam üzerine örnek alınarak, üzerine 2-3 ml %3 H₂O₂ ilave edildi. H₂O₂ damlatır damlatmaz hızla oksijen üretimi sonucu hava kabarcığının oluşması halinde test sonucu pozitif olarak değerlendirildi (Collins et al., 2001) (Şekil 3.6.).



Şekil 3.6. Katalaz varlığının saptanması.

3.3. *Staphylococcus* Suşlarının İzole Edildikleri Klinik Materyallere Göre Dağılım Oranlarının Belirlenmesi

Çalışma için toplanan örneklerin toplandıkları hastaneden elde edildikleri klinik materyallere (KM) göre dağılım oranları hesaplandı.

$$\text{KM'den elde edilen örnek oranı} = \frac{\text{KM'den izole edilen örnek sayısı}}{\text{Toplam örnek sayısı}} \times 100$$

3.4. *Staphylococcus* Suşlarının Servislere Göre Dağılım Oranlarının Hesaplanması

Çalışma için toplanan örneklerin toplandıkları hastanedeki servislere göre dağılımları tespit edildi. Çalışma süresince izole edilen *Staphylococcus* suşlarının gruplandırılarak servislere göre dağılım oranları hesaplandı.

$$\text{Servisdeki örnek oranı} = \frac{\text{Servisten izole edilen örnek sayısı}}{\text{Toplam örnek sayısı}} \times 100$$

3.5. Antibiyotipleme

3.5.1. Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Antimikrobiyal ilaçlara karşı duyarlılık birçok yöntem ile saptanabilmektedir. Bu yöntemler; Katı veya sıvı besiyerlerinde seyreltme (dilüsyon) yöntemleri, Disk difüzyon yöntemi, Gradyent difüzyon (Etest®) yöntemi ve Antimikrobik ajanları inaktive eden enzimlerin saptanması yöntemidir. Bu çalışmada, antibiyotik duyarlılıklarını belirlemek amacıyla Disk Difüzyon (Kirby-Bauer) Yöntemi kullanıldı. Antibiyotik direncinin saptanmasında CLSI (Clinical and Laboratory Standards

Institue) önerileri doğrultusunda uygulanan disk difüzyon yöntemi güvenilir bir yöntem olduğundan tercih edildi.

Çalışmamızda, klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus* suşlarının antibiyotiklere duyarlılıklarının disk difüzyon yöntemi ile araştırılması için öncelikle bu suşlara ait kültürlerden BHI sıvı besiyerine ekim yapıldı. Bir gecelik BHI kültürü Mc Farland No:0.5 bulanıklığına göre ayarlandı. Bulanıklığı ayarlanan kültürden eküvyonla alınan örnek Mueller-Hinton Agar'a inoküle edildi ve kuruması beklendi. Yüzey kuruduktan sonra, üzerine test edilecek antibiyotik diskleri yerleştirildi ve 18-24 saat 37°C'de inkübasyona tabi tutuldu. İnkübasyon sonrasında; disk çevresinde bakterilerin üremediği bölgede oluşan inhibisyon alanı çapları ölçülerek; Duyarlı (S; sensitive), Orta düzey (I; intermediate) ya da Dirençli (R; resistant) olarak değerlendirme yapılmaktadır (Bauer et al., 1974; Arda, 2000; CLSI, 2005). Bu bağlamda, elde edilen sonuçlar klinik laboratuvar standartları ulusal komitesinin verdiği standartlar esas alınarak değerlendirildi. Çalışmada duyarlılıkları test edilecek olan antibiyotikler rutin olarak hastaneler tarafından test edilen antibiyotikler arasından seçildi. Bu kapsamda; örneklerin 11 antibiyotiğe (Ampisilin; Amoksisilin-Klavulonik Asit, Siprofloksasin, Gentamisin, Eritromisin, Oksasillin, Penisilin, Rifampin, Trimetoprim-Sulfametoksazol, Vankomisin, Klindamisin) olan duyarlılıkları CLSI tarafından önerilen zon tablosu ile karşılaştırılarak duyarlı, ılımlı ve dirençli olarak değerlendirildi (Çizelge 3.1.).

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan antibiyotikler, kodları, disk içeriği ve zon çapları.

Antibiyotik Adı	Kodu	Disk içeriği	Zon çapı (mm)		
			R	I	S
Amoksisilin-Klavulonik Asit	AMC	20/10 µg	≤19	-	≥20
Eritromisin	E	15 µg	≤13	14-22	≥23
Gentamisin	CN	10 µg	≤12	13-14	≥15
Oksasillin	OX	1 µg	≤10	11-12	≥13
Penisilin	P	10 Ünite	≤28	-	≥29
Rifampin	RA	5 µg	≤16	17-19	≥20
Ampisilin	AM	10 µg	≤28	-	≥29
Trimetoprim-Sülfametoksazol	TMP-SXT	1.25 µg	≤10	11-15	≥16
Siproflaksosin	CIP	5 µg	≤15	16-20	≥21
Vankomisin	VA	30 µg	≤9	10-11	≥12
Klindamisin	CC	2 µg	≤14	15-20	≥21

R: Resistant (dirençli); I: Intermediate (orta derece duyarlı); S: Sensitive (hassas)

3.5.2. Antibiyotiplerin belirlenmesi ve antibiyotip oranlarının hesaplanması

Antibiyotiplerin belirlenmesinde fenotipik bir özellik olan bakterilerin antibiyotik paternleri esas alındı. Antibiyotip grupları, bakterilerin antibiyotik duyarlılık sonuçları esas alınarak oluşturuldu.

Bu çalışmada kullanılan 11 antibiyotik için (Ampisilin, Amoksisilin-Klavulonik Asit, Siprofloksasin, Gentamisin, Eritromisin, Oksasillin, Penisilin, Rifampin, Trimetoprim-Sulfametoksazol, Vankomisin, Klindamisin) antibiyotik duyarlılık test sonuçları değerlendirilerek aynı paterni gösteren izolatlar aynı numara ile belirtilen antibiyotip grubuna dahil edildi. Her farklı patern gösteren izolat grubu için farklı bir antibiyotip grubu oluşturuldu.

3.5.3. MRSA'ların kullanılan antibiyotiklere direnç oranlarının saptanması

Çalışma kapsamına alınan MRSA suşlarının antibiyotik hassasiyet sonuçları incelenerek kullanılan antibiyotiklere karşı direnç oranları hesaplandı.

$$\text{Antibiyotiğe direnç oranı} = \frac{\text{Antibiyotiğe dirençli örnek sayısı}}{\text{Toplam örnek sayısı}} \times 100$$

3.6. Genotipik Yöntemler

Çalışmada DNA izolasyonu, PCR ile DNA amplifikasyonu, elektroforez ile bantların ayrıştırılması, bantların jelde görüntülenmesi ve fotoğraflanmasından oluşan PCR analiz yönteminin tüm aşamaları Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Anabilim Dalı Mikrobiyal Taksonomi ve Kültür Koleksiyonları Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Bu aşamalar uygulama sırası göz önünde bulundurularak aşağıda alt başlıklar halinde özetlenmiştir.

3.6.1. DNA izolasyonu

Çalışma kapsamına alınan bakteri örnekleri 1.5ml'lik ependorf tüplerde hazırlanan Brain Heart İnfüzyon sıvı besiyerine (pH 7.4±0.2) ekilerek 37°C'de 72 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası bu kültürlerden DNA izolasyonu EZ-10 Spin Column Genomic DNA Minipreps Kit (BioBasic-BioGen) kullanılarak gerçekleştirildi.

EZ-10 Spin Column Genomic DNA Minipreps Kit protokolü :

1. 10^6 - 10^7 bakteri oda sıcaklığında 8.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı tamamen uzaklaştırıldıktan sonra 200µl soğuk Tris EDTA (TE) tamponu eklendi.
2. İlk basamakta hazırlanan 200µl örneğe 400µl 'Digestion Solution' eklendi ve iyice karıştırıldı. Daha sonra 4µl Proteinaz K solüsyonu (2mg/150µl) eklenerek 55°C'de 5 dakika inkübe edildi.
3. 260µl %100 etanol eklenerek iyice karıştırıldı.
4. Karışım 2ml'lik toplama tüpü içinde bulunan kolonlara uygulandı ve 8.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
5. Santrifüj edildikten sonra tüpteki sıvı kısım uzaklaştırıldı.
6. 500µl 'Wash Solution' eklenerek 8.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Bu işlem 1 kez daha tekrarlandıktan sonra tüpteki sıvı kısım uzaklaştırıldı.
7. Yıkama solüsyonunun kalıntılarının uzaklaştırmak için 1.000 rpm'de 2 dakika spin edildi.
8. EZ-10 kolonu 1.5ml'lik temiz ependorf tüpüne yerleştirildi. Kolondaki membranın merkezine 50µl 'Elution Buffer' eklendi ve 50°C'de 2 dakika inkübe edildi.
9. 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek saf DNA elde edilmiş oldu.

3.6.2. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

PCR aşamasında, DNA'nın primerlere özgü bölgelerin çoğaltılmasında 0.2 ml'lik ependorf tüpleri kullanıldı. Tüplerdeki toplam hacim 50 µl olacak şekilde 10xPCR buffer, MgCl₂, dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), primer, Taq polimeraz enzimi (Roche Applied Science), genomik DNA ve steril su içeren PCR solüsyonu oluşturuldu. PCR solüsyonunu oluşturan bu bileşenlerin farklı konsantrasyonlarını içeren çeşitli reaksiyon kombinasyonları ile ön deneyler yapıldı. Bu bileşenlerin en

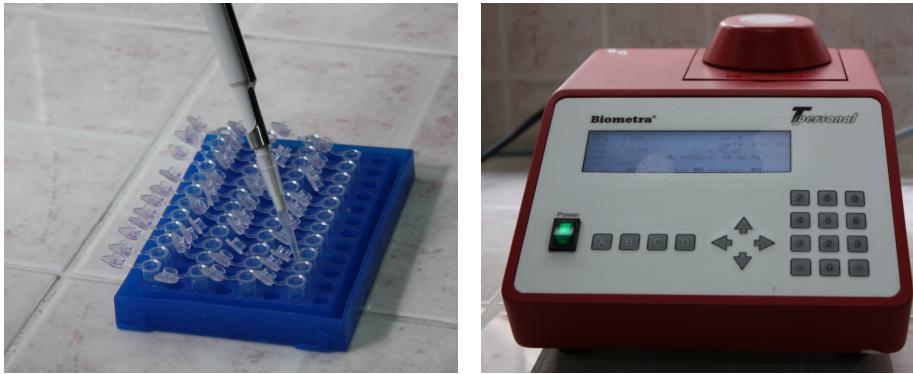
uygun miktarları belirlendikten sonra PCR reaksiyonu standardize edilerek tüm DNA örneklerinin seçilen primerler ile çoğaltılması sağlandı (Çizelge 3.2.) (Şekil 3.7.).

Çizelge 3.2. PCR reaksiyon karışımı bileşenleri ve konsantrasyonları.

PCR Bileşeni	1 örnek için (µl)	Son Konsantrasyon
10×PCR Tamponu	5 µl	1x (1.5 mM MgCl ₂)
Primer (5 µM)	4 µl	0.4 µM
dNTP karışımı (2.5 mM)	4 µl	0.2 mM
Genomik DNA	5 µl	~50 ng
Taq DNA Polimeraz (5 U/ µl)	0.4 µl	2 U
Steril su	31.6 µl	-
Reaksiyon hacmi	50 µl	-
10×PCR Tamponu (pH: 8.3): 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, 15 mM MgCl ₂		

Optimizasyonun ardından, uygun konsantrasyonlardan oluşan reaksiyon karışımı yine uygun PCR programına tabii tutuldu. Primerlere özgü DNA bölgelerinin çoğaltılmasında kullanılan PCR programı Çizelge 3.3'de gösterilmiştir.

Uygun reaksiyon karışımı ve uygun PCR programının saptanması sonrasında, REP-PCR analizi için RW3A (5'-TCGCTCAAACAACGACACC-3'), REP1R-I (5'-IIICGICGICATCIGGC-3') ve REP2-I (5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3'), RAPD-PCR analizi için A3 (5'-AGCAGCCTGC-3') ve A4 (5'-AGGCCGCTTA-3') primerleri kullanılarak PCR programı uygulandı. RAPD-PCR ve REP-PCR için kullanılan bu primerler literatürdeki çalışmalar incelenerek seçilmiştir. Çizelge 3.4'de kullanılan primerlerin baz dizileri, T_m dereceleri ve GC baz yüzdeleri verilmiştir.



Şekil 3.7. PCR reaksiyon karışımının hazırlanması ve PCR uygulaması.

Çizelge 3.3. PCR döngüsü.

Ön denatürasyon	95 °C	2 dakika	
Denatürasyon	95 °C	1 dakika	} 42 döngü
Anneling	* °C	1 dakika	
Uzama	72 °C	2 dakika	
Son Uzama	72 °C	5 dakika	
Bekleme	20 °C	∞	

*RW3A primeri için 54 °C, REP1R-I primeri için 38 °C, REP2-I primeri için 46 °C, A3 primeri için 32 °C, A4 primeri için 30 °C.

Çizelge 3.4. Primerler, baz dizileri ve %'de GC oranları.

Primer Sekansları (5' → 3' yönünde)	Tm (°C)	% GC
RW3A-TCGCTCAAACAACGACACC	60 °C	50
REP1R-I-IIICGICGICATCIGGC	40 °C	50
REP2-I-ICGICTTATCIGGCCTAC	48 °C	50
A3-AGCAGCCTGC	34 °C	70
A4-AGGCCGCTTA	32 °C	60

PCR analizinde pozitif kontrol olarak *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 suşu kullanıldı. Buna ek olarak, negatif kontrol olarak ise PCR reaksiyon karışımında genomik DNA yerine steril su konularak hazırlanan örnek kullanıldı.

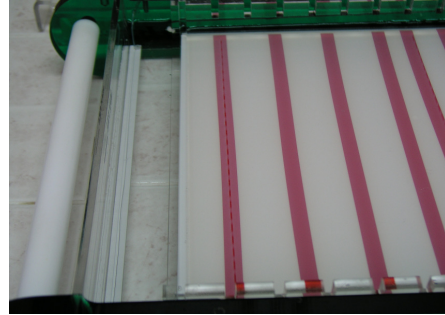
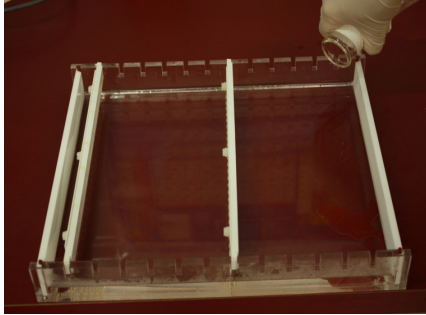
3.1.1. Amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile analizi

PCR aşamasından sonra çoğaltılan DNA bölgelerinin boyutlarına göre ayrılması için agaroz jel elektroforezi yapıldı. DNA parçalarının ayrımı için %1.8'lik agaroz jel kullanıldı. Bu amaçla 8.1 gr toz agaroz tartılarak erlenmayer içerisine konuldu. Üzerine pH'sı 8.3'e ayarlanan 500 ml 1xTBE tamponu (Tris-Borik Asit-EDTA; 10xTBE: 0.9M Tris-Base, 0.9M Borik Asit, 0.02M EDTA) eklenerek tampon içindeki agaroz eriyene kadar mikrodalga fırında tutuldu (Şekil 3.8.). Jel kaynarken şeffaf bir hal alması beklendi ve kaynamanın ardından 50-60 °C arası sıcaklığa

kadar soğutuldu. Soğutulan jele yatay elektroforez tankına dökülmeden önce 5mg/ml'lik etidium bromür eklendi. Jel, örneklerin yükleneceği kuyucukların oluşmasını sağlayacak tarakların takılı olduğu yatay elektroforez tankına döküldü. Jel polimerize olduktan sonra taraklar özenli bir şekilde çıkarıldı ve daha sonra içerisinde 1xTBE çözeltisi bulunan elektroforez tankına yerleştirildi (Şekil 3.9.).

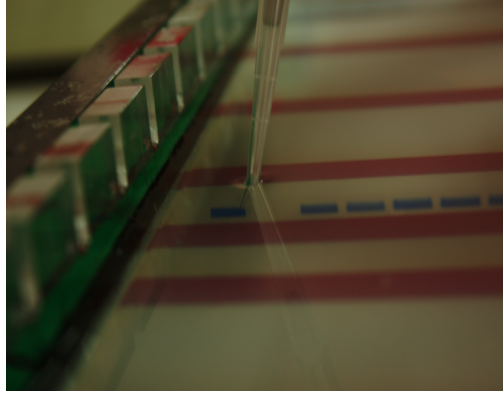


Şekil 3.8. Agaroz jelin hazırlanması.



Şekil 3.9. Agaroz jelin dökülmesi ve yüklemeye hazır hale getirilmesi.

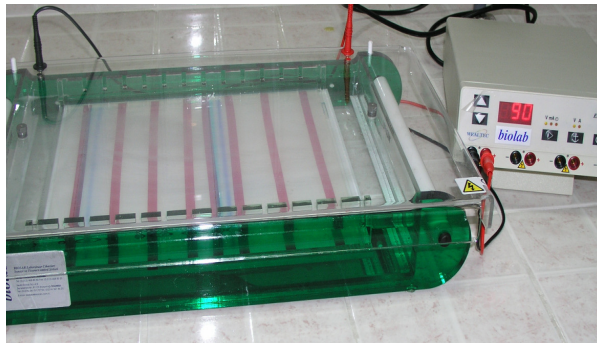
18 µl PCR ürününe 3 µl 6xYükleme boyası (%0.05 Bromfenol Mavisi, %0.05 Ksilen Siyanol, %36 Gliserol, 30mM EDTA, Takara) eklenerek amplifikasyon ürünlerinin boyanması sağlandı ve toplam hacim 21 µl olacak şekilde kuyucuklara yüklendi (Şekil 3.10.).



Şekil 3.10. Örneklerin agaroz jele yüklenmesi.

Jelin ilk ve son kuyucuklarına elektroforez işlemi sonunda oluşacak bantların doğru şekilde yorumlanmasını sağlayacak olan 4 µl 1 kb DNA markörü yine 6x Loading Buffer ile boyanarak yüklendi.

Yükleme işlemi bittikten sonra elektroforez tankı güç kaynağına bağlanarak örnekler agaroz jelde 90 volt sabit voltaj uygulanarak 5 saat yürütüldü (Şekil 3.11.). Daha sonra jel Gel Logic 200 Molecular Imaging System görüntüleme sistemi (Kodak, Rochester) ile görüntülendi.



Şekil 3.11. Yatay agaroz jel elektroforezi düzeneği.

3.1.2. Kümeleme analizi

Analizin gerçekleştirilmesi, genetik benzerlik ve farklılıkların belirlenmesi amacıyla her bir primer için ayrı ayrı elde edilen jel fotoğrafları incelenerek monomorfik (tüm suşlarda bulunan) ve polimorfik (bazı suşlarda bulunan) bantlar belirlendi.

Bu kapsamda analiz için NTSYS-PC (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) versiyon 2.1 (Rohlf, 2000) bilgisayar programında öncelikle NT-Edit versiyon 1.2 f alt programı kullanıldı. Polimorfik yani bilgi sağlayan bantlar temel alınarak, bantların varlığına (1) yokluğuna (0) değeri verilerek bir veri matrisi oluşturuldu. Bu matristen yola çıkarak primerlerin verdikleri polimorfik bantların polimorfizm oranları hesaplandı. Bant matrisleri oluşturulduktan sonra SIMQUAL (Similarity for Qualitative Data) alt programı kullanılarak çeşitler arasındaki Dice eşitliğini temel alan benzerlik matrisleri (similarity index) yapıldı. Son aşamada SAHN (sequential, agglomerative, hierarchical and nested clustering) kümeleme alt programı ve bu program içinde benzerlik matrislerini temel alan UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages/ aritmetik ortalamayı kullanan ağırlıksız çift grup metodu) algoritması kullanılarak suşlara ait dendogramlar çizildi.

4. SONUÇLAR

4.1. Çalışmalarda Kullanılan Mikroorganizmalar

Çalışmamızda toplanan örneklerin fenotipik teşhisi gerçekleştirildikten sonra, 26 MRSA, 15 MSSA, 5 CNS ve *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 suşu çalışma kapsamına dahil edilerek toplam 47 *Staphylococcus* suşu incelendi.

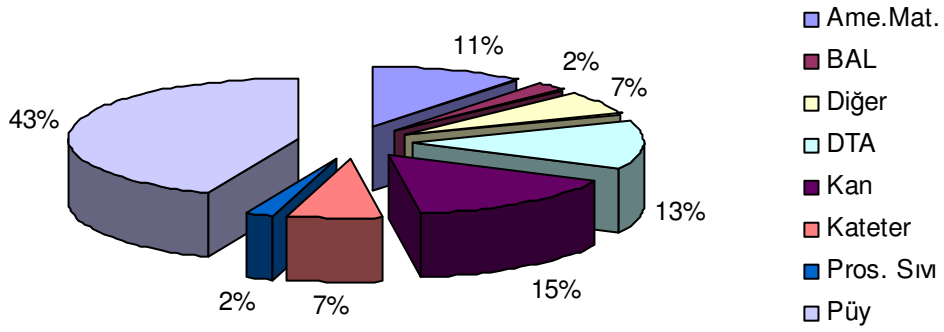
4.2. *Staphylococcus* Teşhisi

Bu çalışma kapsamında toplanan örneklerin gram özelliği, koloni morfolojisi, kanlı agarda beta hemoliz, mannitol fermentasyonu, koagülaz ve katalaz aktivitesi özellikleri incelenerek *Staphylococcus aureus* ve CNS suşları tanımlandı. İncelenen suşların sayısı, uygulanan testler ve bu testlerin sonuçları Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

4.3. *Staphylococcus* Suşlarının İzole Edildikleri Klinik Materyallere Göre Dağılım Oranlarının Belirlenmesi

Staphylococcus suşlarının hastalara ait klinik örnekler göre dağılım oranları belirlendi. Çalışmamız kapsamında incelenen *Staphylococcus* suşlarının klinik örnekler göre dağılımı incelendiğinde, bu suşların sırasıyla en sık pü, kan ve derin trakeal aspirattan izole edildiği gözlemlendi (Şekil 4.1.). MRSA suşlarının klinik örnekler göre dağılımı incelendiğinde, bu suşların da yine en sık pü ve derin trakeal aspirattan izole edildiği gözlemlendi (Şekil 4.2.). MSSA ve CNS suşlarının izole edildiği klinik örneklerin başında da pü gelmektedir (Çizelge 4.1.).

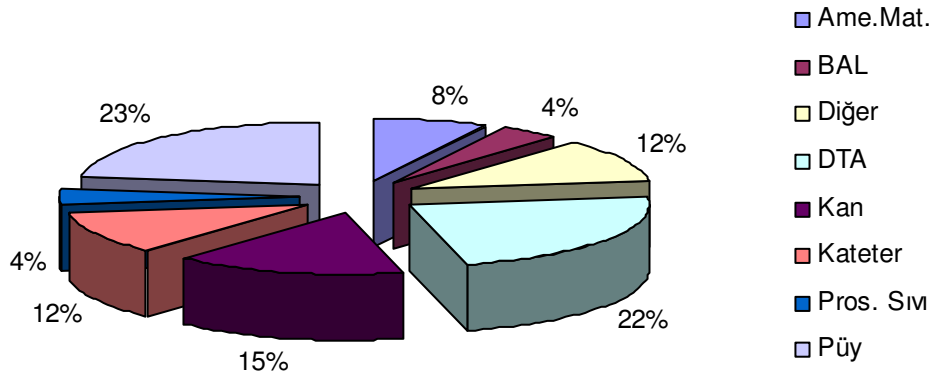
Klinik Örnek



Şekil 4.1. *Staphylococcus* suşlarının hastalara ait klinik örneklerle göre dağılımı.

Ame. Mat.: Ameliyat materyali; *BAL*: Bronş alveolar lavaj;
DTA: Derin Trakeal Aspirasyon; *Pros. Sıvı*: Prostatik sıvı.

Klinik Örnek-MRSA



Şekil 4.2. MRSA suşlarının hastalara ait klinik örneklerle göre dağılımı.

Ame. Mat.: Ameliyat materyali; *BAL*: Bronş alveolar lavaj;
DTA: Derin Trakeal Aspirasyon; *Pros. Sıvı*: Prostatik sıvı.

Çizelge 4.1. *Staphylococcus* suşlarının test sonuçları.

İzolat Numarası	Bölüm	Cinsiyet	Örnek Türü	Hemoliz	Gram özelliği	Mannitol fermentasyonu	Koagülaz	Katalaz	Antibiyotip
R1	G.C.S.	E	Pros. Sıvı	+	+	+	+	+	<i>Ant1</i>
R2	G.C.S.	E	Püy	+	+	+	+	+	<i>Ant1</i>
R3	B.A.S.	K	DTA	+	+	+	+	+	<i>Ant2</i>
R4	P.C.S.	E	Püy	+	+	+	+	+	<i>Ant2</i>
R5	Ü.S.	K	Diğer	+	+	+	+	+	<i>Ant2</i>
R6	P.C.S.	K	Püy	+	+	+	+	+	<i>Ant2</i>
R7	G.C.D.B.	E	Püy	+	+	+	+	+	<i>Ant2</i>
R8	G.C.S.	E	Kateter	+	+	+	+	+	<i>Ant1</i>
R9	D.D.B.	K	Kan	+	+	+	+	+	<i>Ant1</i>
R10	D.D.B.	K	DTA	+	+	+	+	+	<i>Ant2</i>
R11	B.C.D.B	K	Ame. Mat.	+	+	+	+	+	<i>Ant3</i>
R12	D.D.B	E	Diğer	+	+	+	+	+	<i>Ant1</i>
R13	G.C.D.B.	K	Kateter	+	+	+	+	+	<i>Ant1</i>
R14	P.C.S.	K	Püy	+	+	+	+	+	<i>Ant2</i>
R15	G.C.S.	E	Kan	+	+	+	+	+	<i>Ant1</i>
R16	POLK	E	DTA	+	+	+	+	+	<i>Ant2</i>
R17	B.C.S.	K	DTA	+	+	+	+	+	<i>Ant1</i>
R18	D.D.B.	K	Kateter	+	+	+	+	+	<i>Ant1</i>
R19	O.S.	E	BAL	+	+	+	+	+	<i>Ant1</i>
R20	B.C.D.B.	E	Ame. Mat.	+	+	+	+	+	<i>Ant2</i>
R21	N.B.	E	DTA	+	+	+	+	+	<i>Ant2</i>
R22	P.C.S.	E	Diğer	+	+	+	+	+	<i>Ant2</i>
R23	D.B.	E	Püy	+	+	+	+	+	<i>Ant1</i>
R24	D.B.	E	Kan	+	+	+	+	+	<i>Ant1</i>
R25	D.B.	E	Kan	+	+	+	+	+	<i>Ant2</i>
R26	N.Y.B.	K	DTA	+	+	+	+	+	<i>Ant2</i>

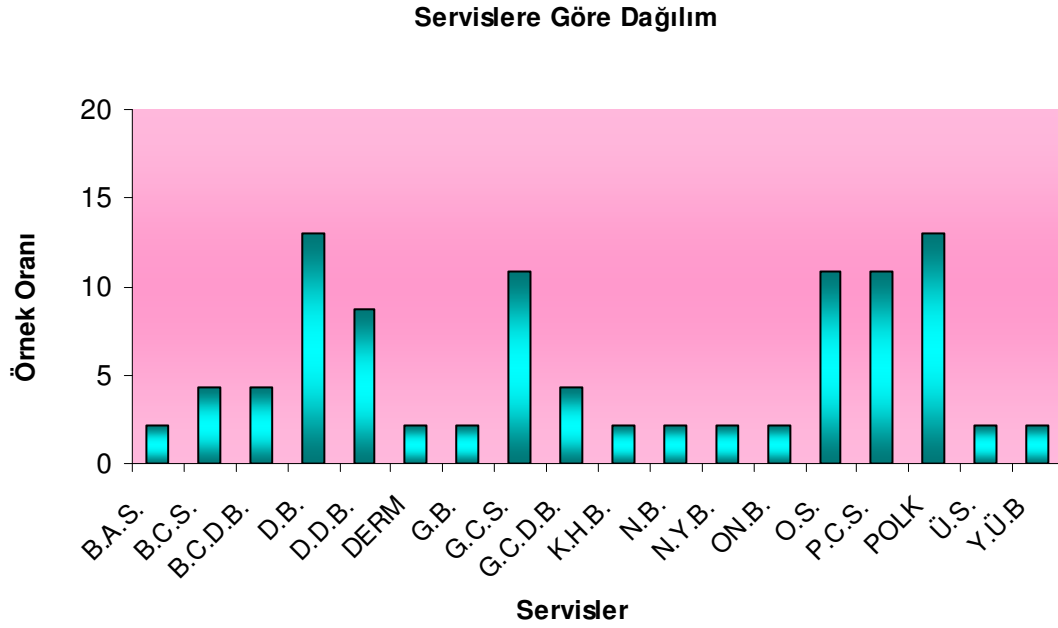
Çizelge 4.1. *Staphylococcus* suşlarının test sonuçları (devamı).

İzolat Numarası	Bölüm	Cinsiyet	Örnek Türü	Hemoliz	Gram özelliği	Mannitol fermentasyonu	Koagülaz	Katalaz	Antibiyotip
S1	G.B.	E	Püy	+	+	+	+	+	Ant4
S2	D.B.	E	Püy	+	+	+	+	+	Ant4
S3	POLK	K	Püy	+	+	+	+	+	Ant4
S4	D.B.	K	Kan	+	+	+	+	+	Ant4
S5	POLK	K	Püy	+	+	+	+	+	Ant4
S6	POLK	K	Püy	+	+	+	+	+	Ant4
S7	O.S.	K	Ame. Mat.	+	+	+	+	+	Ant4
S8	P.C.S.	E	Püy	+	+	+	+	+	Ant4
S9	POLK	E	Püy	+	+	+	+	+	Ant4
S10	D.B.	E	Püy	+	+	+	+	+	Ant5
S11	POLK	E	Kan	+	+	+	+	+	Ant4
S12	O.S.	K	Püy	+	+	+	+	+	Ant4
S13	O.S.	K	Ame. Mat.	+	+	+	+	+	Ant4
S14	ON.D.B	K	Püy	+	+	+	+	+	Ant4
S15	O.S.	E	Ame. Mat.	+	+	+	+	+	Ant6
C1	B.C.S.	K	Püy	-	+	-	+	+	Ant4
C2	DERM	E	Püy	-	+	-	+	+	Ant4
C3	G.C.S.	E	Püy	-	+	-	+	+	Ant7
C4	K.H.B.	K	Püy	-	+	+	+	+	Ant8
C5	Y.Ü.B.	K	Kan	-	+	-	+	+	Ant4

R: Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus*; S: Metisilin Duyarlı *Staphylococcus aureus*;
C: Koagülaz Negatif *Staphylococcus sp.*; B.A.S.: Büyük Acil Servis; B.C.S.: Beyin Cerrahi Servisi;
B.C.D.B: Beyin Cerrahi Devamlı Bakım; D.B.: Dahiliye Bölümü; D.D.B.: Dahiliye Devamlı Bakım;
DERM: Dermatoloji Bölümü; G.B.: Göz Bölümü; G.C.S.: Genel Cerrahi Servisi; G.C.D.B.: Genel
Cerrahi Devamlı Bakım; K.H.B.: Kadın Hastalıkları Bölümü; N.B.: Nöroloji Bölümü; N.Y.B.: Nöroloji
Yoğun Bakım; ON.B.: Onkoloji Bölümü; O.S.: Ortopedi Servisi; P.C.S.: Plastik Cerrahi Servisi;
POLK.: Poliklinik; Ü.S.: Üroloji Servisi; Y.Ü.B.: Yanık Ünitesi Bölümü; Ame. Mat.: Ameliyat
materyali; BAL: Bronş alveolar lavaj; DTA: Derin Trakeal Aspirasyon; Pros. Sıvı: Prostatik sıvı.
+: Pozitif sonuç, -: Negatif sonuç, Ant: *Staphylococcus* suşları için antibiyotip patern tipi.

4.4. *Staphylococcus* Suşlarının Servislere Göre Dağılım Oranlarının Hesaplanması

Araştırma kapsamında toplanan ve fenotipik tiplendirmesi gerçekleştirilen *Staphylococcus* suşlarının servislere göre dağılım oranları belirlendi. *Staphylococcus* suşlarının servislere göre dağılım bulguları toplu olarak değerlendirildiğinde en fazla örneğin, poliklinik ve dahiliye bölümüne ait olduğu tespit edildi (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. *Staphylococcus* suşlarının servislere göre dağılımı.

B.A.S.: Büyük Acil Servis; B.C.S.: Beyin Cerrahi Servisi; B.C.D.B.: Beyin Cerrahi Devamlı Bakım; D.B.: Dahiliye Bölümü; D.D.B.: Dahiliye Devamlı Bakım; DERM: Dermatoloji Bölümü; G.B.: Göz Bölümü; G.C.S.: Genel Cerrahi Servisi; G.C.D.B.: Genel Cerrahi Devamlı Bakım; K.H.B.: Kadın Hastalıkları Bölümü; N.B.: Nöroloji Bölümü; N.Y.B.: Nöroloji Yoğun Bakım; ON.B.: Onkoloji Bölümü; O.S.: Ortopedi Servisi; P.C.S.: Plastik Cerrahi Servisi; POLK.: Poliklinik; Ü.S.: Üroloji Servisi; Y.Ü.B.: Yanık Ünitesi Bölümü.

4.5. Antibiyotipleme

4.5.1. Antibiyotik duyarlılık profillerinin ve antibiyotiplerin belirlenmesi

Staphylococcus suşlarının antibiyotik duyarlılıklarını belirlemek amacıyla Disk Difüzyon (Kirby-Bauer) Yöntemi kullanıldı. Bakteriler CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) tarafından önerilen antibiyotikler içerisinde seçilen 11

antibiyotiğe (Ampisilin, Amoksisilin-Klavulonik Asit, Siprofloksasin, Gentamisin, Eritromisin, Oksasillin, Penisilin, Rifampin, Trimetoprim-Sulfametoksazol, Vankomisin, Klindamisin) olan duyarlılıkları zon tablosu ile karşılaştırılarak duyarlı, ılımlı, dirençli olarak değerlendirildi. Antibiyotiplerin belirlenmesinde fenotipik bir özellik olan bakterilerin antibiyotik paternleri esas alındı. Aynı paterni gösteren suşlar aynı antibiyotip numarası ile belirtildi (Çizelge 4.2.).

Çizelge 4.2. *Staphylococcus* suşlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları.

SUŞ NO	AM	AMC	CC	CIP	E	GM	OX	P	RA	SXT	VA	Ant
R1	D	D	H	D	H	D	D	D	D	H	H	Ant1
R2	D	D	H	D	H	D	D	D	D	H	H	Ant1
R3	D	D	D	D	D	D	D	D	D	H	H	Ant2
R4	D	D	D	D	D	D	D	D	D	H	H	Ant2
R5	D	D	D	D	D	D	D	D	D	H	H	Ant2
R6	D	D	D	D	D	D	D	D	D	H	H	Ant2
R7	D	D	D	D	D	D	D	D	D	H	H	Ant2
R8	D	D	H	D	H	D	D	D	D	H	H	Ant1
R9	D	D	H	D	H	D	D	D	D	H	H	Ant1
R10	D	D	D	D	D	D	D	D	D	H	H	Ant2
R11	D	H	D	D	D	D	D	D	D	H	H	Ant3
R12	D	D	H	D	H	D	D	D	D	H	H	Ant1
R13	D	D	H	D	H	D	D	D	D	H	H	Ant1
R14	D	D	D	D	D	D	D	D	D	H	H	Ant2
R15	D	D	H	D	H	D	D	D	D	H	H	Ant1
R16	D	D	D	D	D	D	D	D	D	H	H	Ant2
R17	D	D	H	D	H	D	D	D	D	H	H	Ant1
R18	D	D	H	D	H	D	D	D	D	H	H	Ant1
R19	D	D	H	D	H	D	D	D	D	H	H	Ant1
R20	D	D	D	D	D	D	D	D	D	H	H	Ant2
R21	D	D	D	D	D	D	D	D	D	H	H	Ant2
R22	D	D	D	D	D	D	D	D	D	H	H	Ant2
R23	D	D	H	D	H	D	D	D	D	H	H	Ant1
R24	D	D	H	D	H	D	D	D	D	H	H	Ant1
R25	D	D	D	D	D	D	D	D	D	H	H	Ant2
R26	D	D	D	D	D	D	D	D	D	H	H	Ant2

Çizelge 4.2. *Staphylococcus* suşlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları (devamı).

SUŞ NO	AM	AMC	CC	CIP	E	GM	OX	P	RA	SXT	VA	Ant
S1	D	H	H	H	H	H	H	D	H	H	H	Ant4
S2	D	H	H	H	H	H	H	D	H	H	H	Ant4
S3	D	H	H	H	H	H	H	D	H	H	H	Ant4
S4	D	H	H	H	H	H	H	D	H	H	H	Ant4
S5	D	H	H	H	H	H	H	D	H	H	H	Ant4
S6	D	H	H	H	H	H	H	D	H	H	H	Ant4
S7	D	H	H	H	H	H	H	D	H	H	H	Ant4
S8	D	H	H	H	H	H	H	D	H	H	H	Ant4
S9	D	H	H	H	H	H	H	D	H	H	H	Ant4
S10	D	H	H	H	H	H	H	D	H	H	H	Ant4
S11	D	H	H	H	H	H	H	D	H	H	H	Ant4
S12	D	H	H	H	H	H	H	D	H	H	H	Ant4
S13	D	H	H	H	H	H	H	D	H	H	H	Ant4
S14	D	H	H	H	H	H	H	D	H	H	H	Ant4
S15	D	H	H	H	D	H	H	D	H	H	H	Ant6
C1	D	H	H	H	H	H	H	D	H	H	H	Ant4
C2	D	H	H	H	H	H	H	D	H	H	H	Ant4
C3	D	D	H	D	H	H	D	D	H	H	H	Ant7
C4	D	D	D	D	D	D	D	D	H	H	H	Ant8
C5	D	H	H	H	H	H	H	D	H	H	H	Ant4

R: Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus*; *S*: Metisilin Duyarlı *Staphylococcus aureus*;
C: Koagülaz Negatif *Staphylococcus sp.*; AM: Ampisilin; AMC: Amoksisilin-Klavulonik Asit;
CC: Klindamisin; E:Eritromisin; GM: Gentamisin; OX: Oksasilin; P: Penisilin; RA: Rifampin;
SXT: Trimetoprim-Sulfametoksazol; VA: Vankomisin; D: Dirençli; H: Hassas;
Ant: *Staphylococcus* suşları için antibiyotip patern tipi.

4.5.2. *Staphylococcus* suşlarında antibiyotik direnci

Antibiyotiplerin belirlenmesinden sonra oluşturulan antibiyotiplerdeki direnç durumları incelendi. Daha sonra antibiyotiklere dirençli suş sayıları belirlendi (Çizelge 4.3.).

Antibiyotip dağılımları incelendiğinde, *Staphylococcus* suşları için 8 ayrı antibiyotip paterni belirlendi. Bu antibiyotip paternlerinden antibiyotip 1,2 ve 3'ün MRSA suşlarında, antibiyotip 5 ve 6'nın MSSA suşlarında, antibiyotip 7 ve 8'in CNS suşlarında, antibiyotip 4'ün ise hem MSSA hem de CNS suşlarında görüldüğü tespit edildi (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.3. *Staphylococcus* suşlarında antibiyotik direnci.

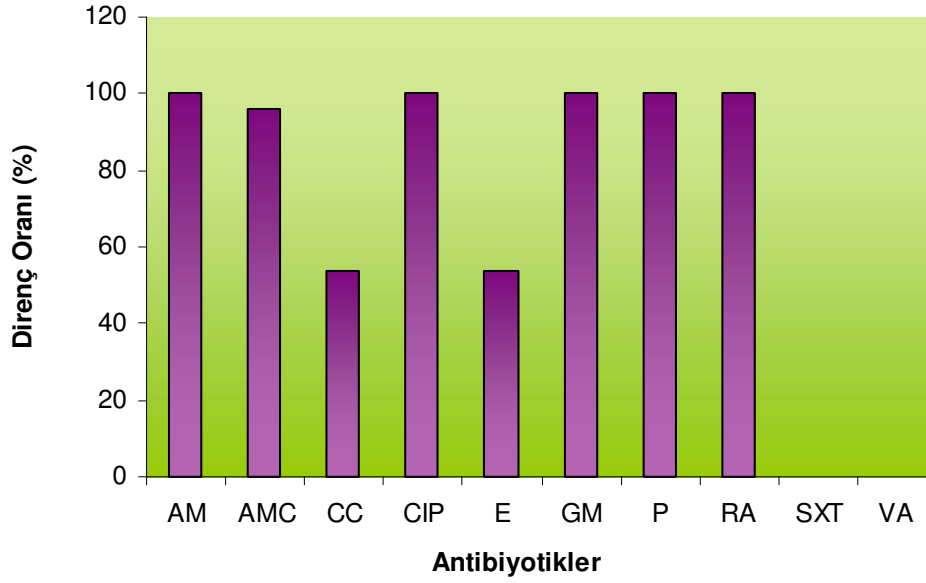
Antibiyotikler	Dirençli Suş Sayısı		
	MRSA (n:26)	MSSA (n:15)	CNS (n:5)
Ampisilin	26	15	5
Amoksisilin-Klavulonik Asit	25	0	2
Klindamisin	14	0	1
Siproflaksosin	26	1	2
Eritromisin	14	1	1
Gentamisin	26	0	1
Oksasilin	26	0	2
Penisilin	26	15	5
Rifampin	26	1	0
Trimetoprim-Sulfametoksazol	0	0	0
Vankomisin	0	0	0

4.5.3. Antibiyotik direnç oranlarının belirlenmesi

MRSA suşlarında görülen çoklu antibiyotik direnci klinikte önemli sorunlara neden olmaktadır. Bu nedenle nosokomiyal enfeksiyon etkeni olan bu suşların antibiyotik direnç oranlarının bilinmesi oldukça önemlidir. Çalışmamızda MRSA suşları için test edilen antibiyotiklere olan direnç oranları; Ampisilin, Gentamisin, Penisilin, Rifampin ve Siproflaksosin için %100, Amoksisilin-Klavulonik Asit için %96, Klindamisin ve Eritromisin için %54 olarak tespit edildi. Trimetoprim-sulfametoksazole ve Vankomisine dirençli MRSA suşuna rastlanmamıştır (Şekil 4.4.).

Çalışmada kullanılan 10 antibiyotik incelendiğinde MRSA suşlarının 12'sinin altı antibiyotiğe, 13'ünün sekiz antibiyotiğe, 1'inin yedi antibiyotiğe dirençli olduğu bulundu (Çizelge 4.4.). Bu sonuçlar incelenen MRSA'ların birçok antibiyotiğe dirençli olduğunu ve çoklu antibiyotik direnci gösterdiğini desteklemektedir. MSSA ve CNS suşlarının test edilen antibiyotiklere direnç durumları incelendiğinde ise, bu suşların birçok antibiyotiğe duyarlı olduğu bulundu (Çizelge 4.4.).

MRSA'larda Direnç Oranı



Şekil 4.4. MRSA'larda direnç oranı.

AM: Ampisilin; AMC: Amoksisilin-Klavulonik Asit; CC: Klindamisin; CIP: Siproflaksosin; E:Eritromisin; GM: Gentamisin;P: Penisilin; RA: Rifampin; SXT: Trimetoprim-Sulfametoksazol; VA: Vankomisin.

Çizelge 4.4. *Staphylococcus* suşlarının dirençli oldukları antibiyotik sayısı.

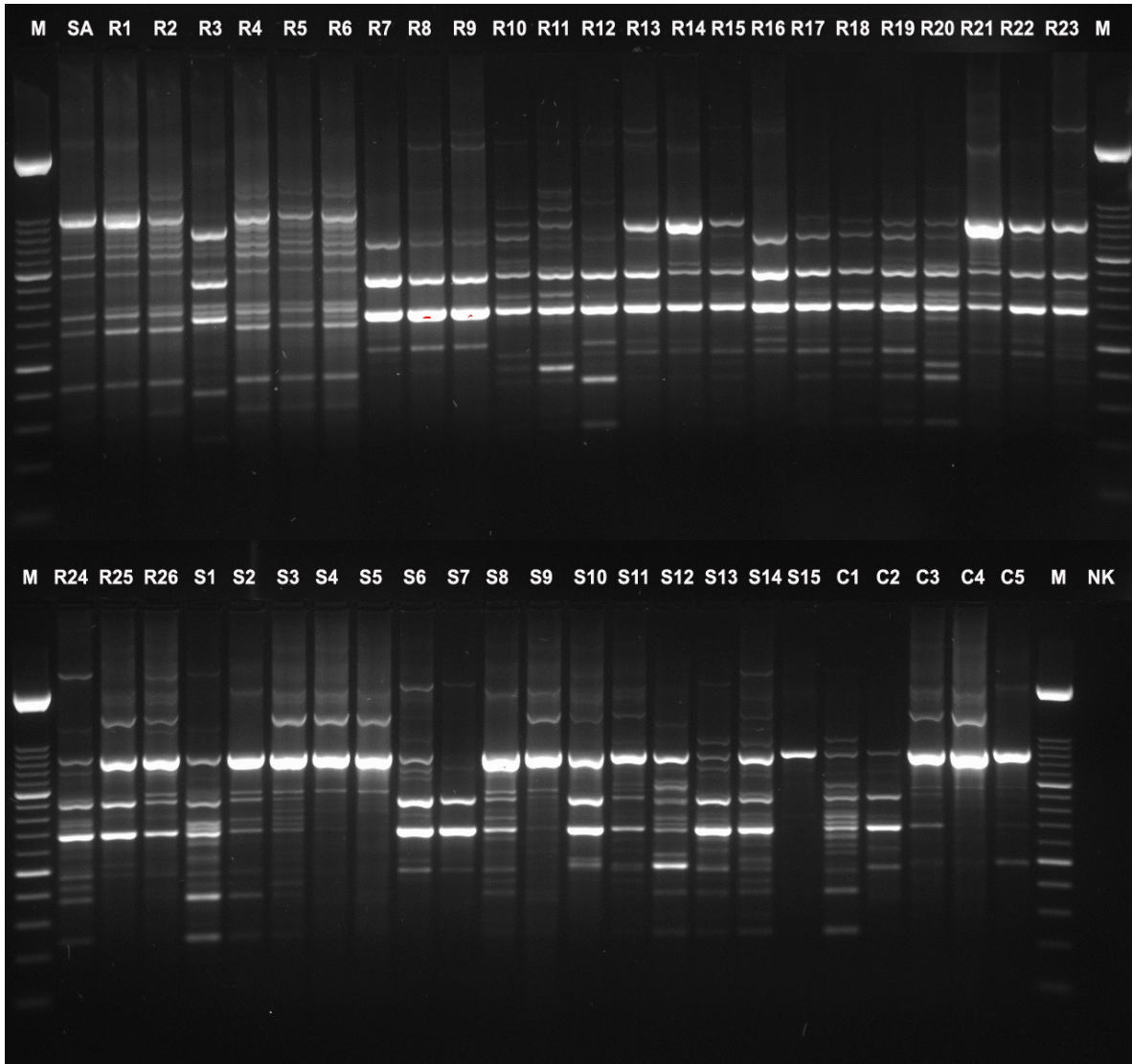
Bakteriler	Örnek Sayısı	Dirençli Bulunan Antibiyotik Sayısı
MRSA (n:26)	12	6
	13	8
	1	7
MSSA (n:15)	13	2
	1	4
	1	3
CNS (n:5)	3	2
	1	5
	1	8

4.6. Genotipik Analizler

Çalışmamız kapsamında incelenen MRSA, MSSA ve CNS suşları, fenotipik bir yöntem olan antibiyotikleme ile tiplendirildikten sonra, genotipik yöntemlerden RAPD-PCR ve REP-PCR yöntemi ile analiz edildi.

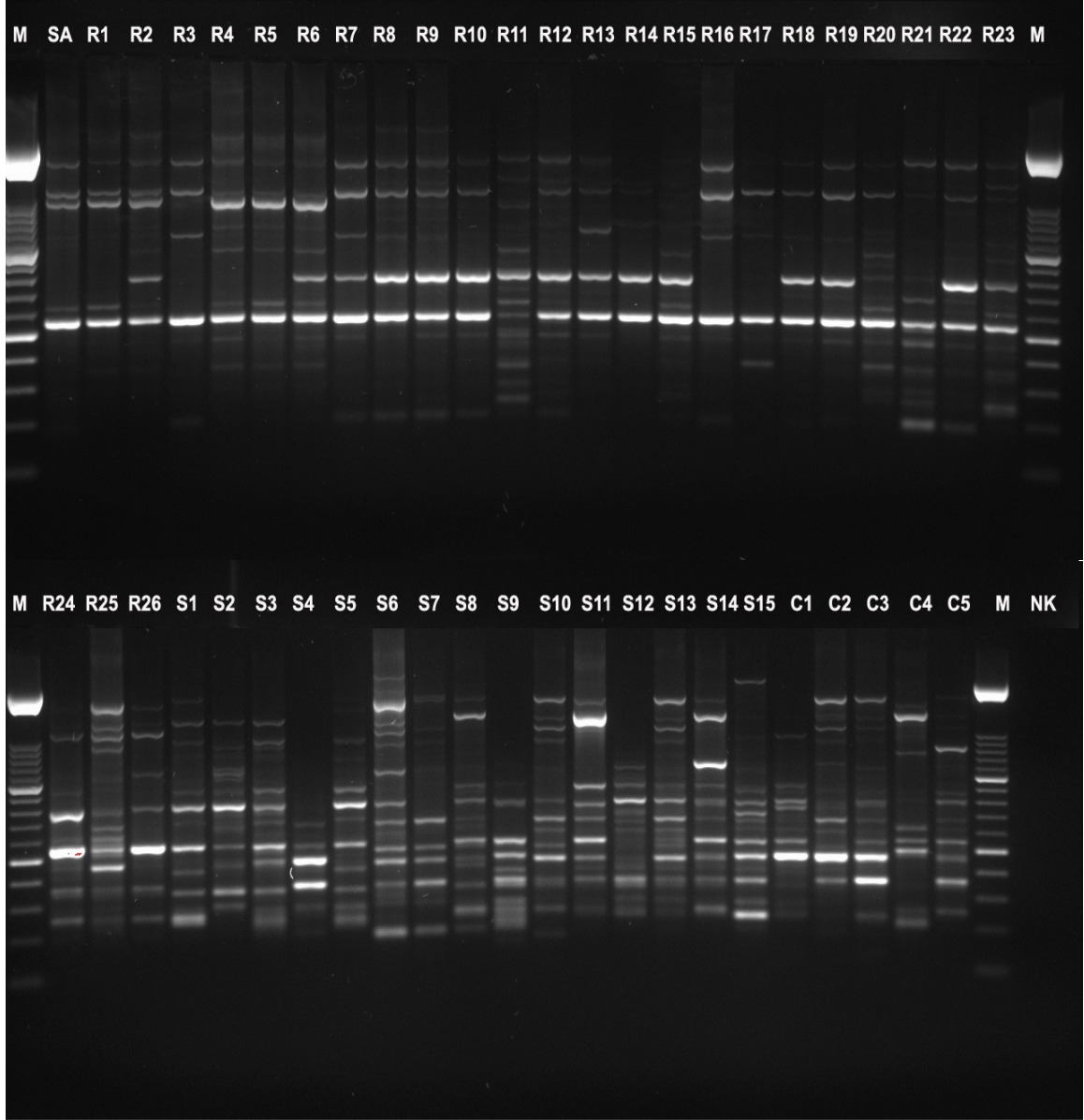
4.6.1. PCR ürünlerinin agaroz jelde görüntülenmesi

Çalışmamızda MRSA, MSSA ve CNS suşları RAPD-PCR analizi için 2 farklı primer (A3 ve A4), REP-PCR analizi için 3 farklı primer (RW3A, REP1R-I ve REP2-I) ile tarandı. RAPD-PCR ve REP-PCR analizi sonucunda, çalışmada kullanılan primerlerin oluşturduğu polimorfizm oranları hesaplandı (Çizelge 4.5). RAPD-PCR ve REP-PCR analizlerinden elde edilen jel görüntüleri Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da gösterilmiştir.



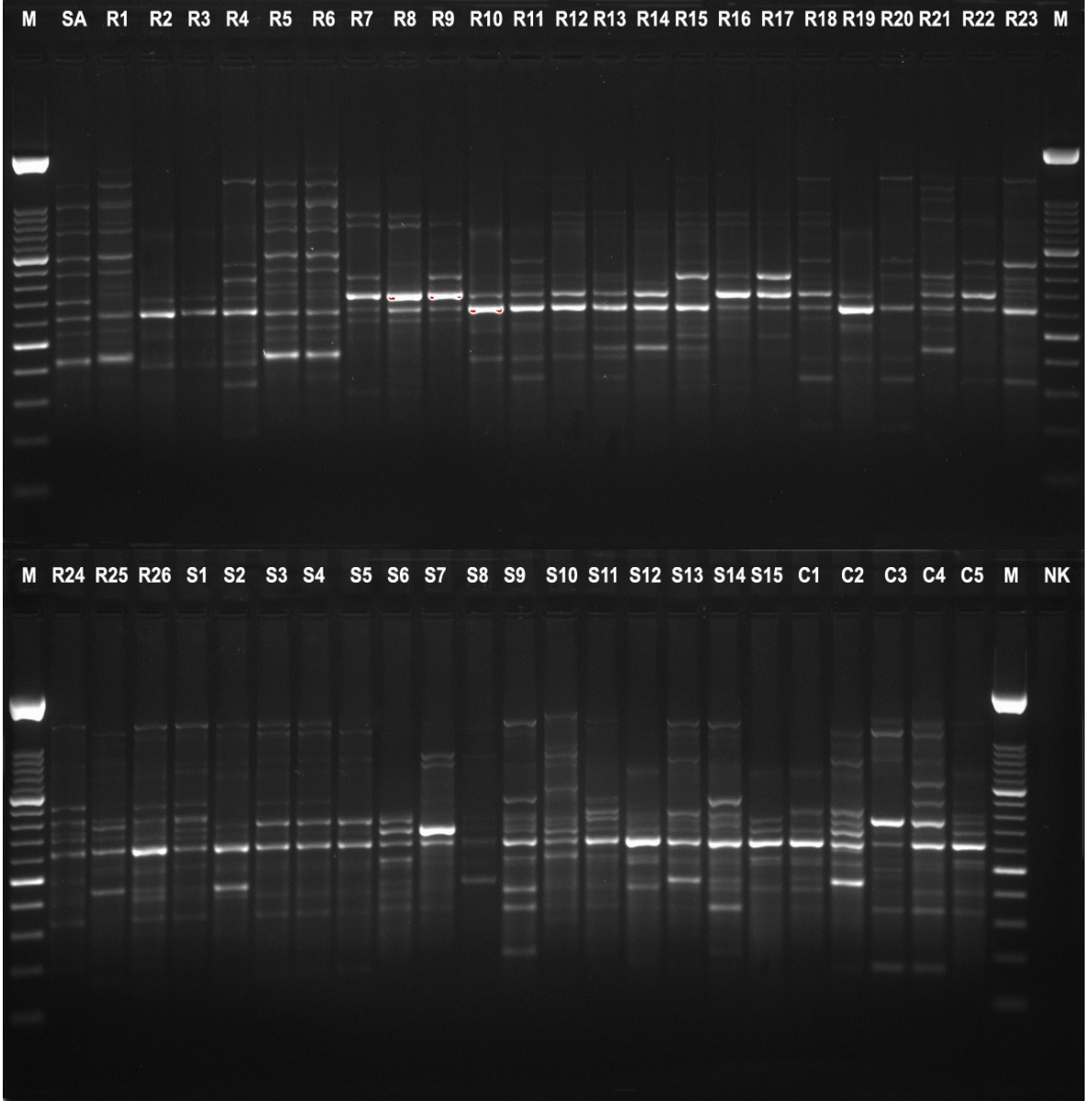
Şekil 4.5. A3 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.

SA: *Staphylococcus aureus*; R1-26: Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus* suşları;
S1-15: Metisilin Duyarlı *Staphylococcus aureus* suşları; C1-5: Kogülaz Negatif *Staphylococcus* sp.;
NK: Negatif kontrol; M: 100 bp DNA moleküler ağırlık markeri.



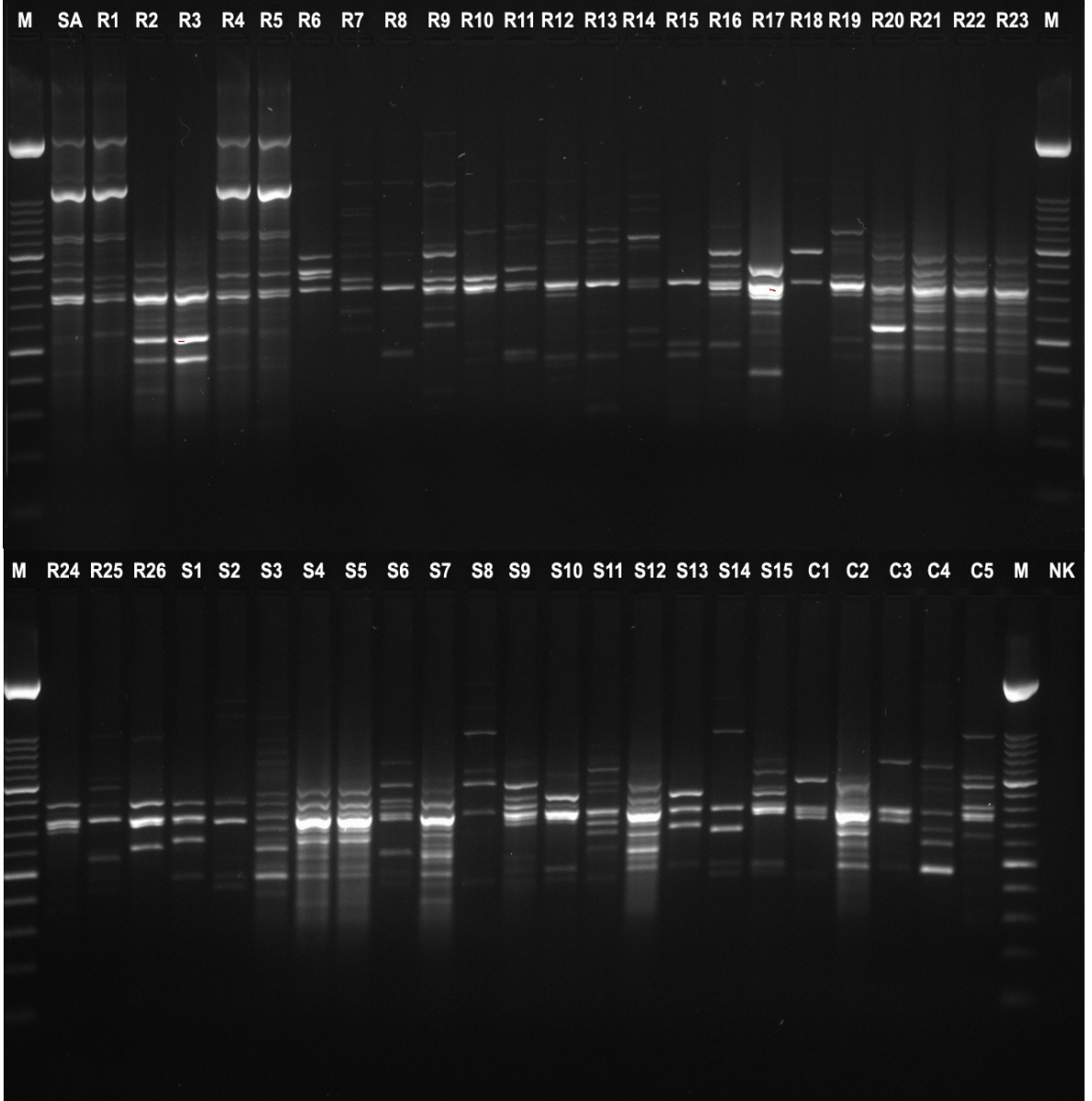
Şekil 4.6. A4 primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.

SA: *Staphylococcus aureus*; R1-26: Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus* suşları;
S1-15: Metisilin Duyarlı *Staphylococcus aureus* suşları; C1-5: Kogülaz Negatif *Staphylococcus* sp.;
NK: Negatif kontrol; M: 100 bç DNA moleküler ağırlık markeri.



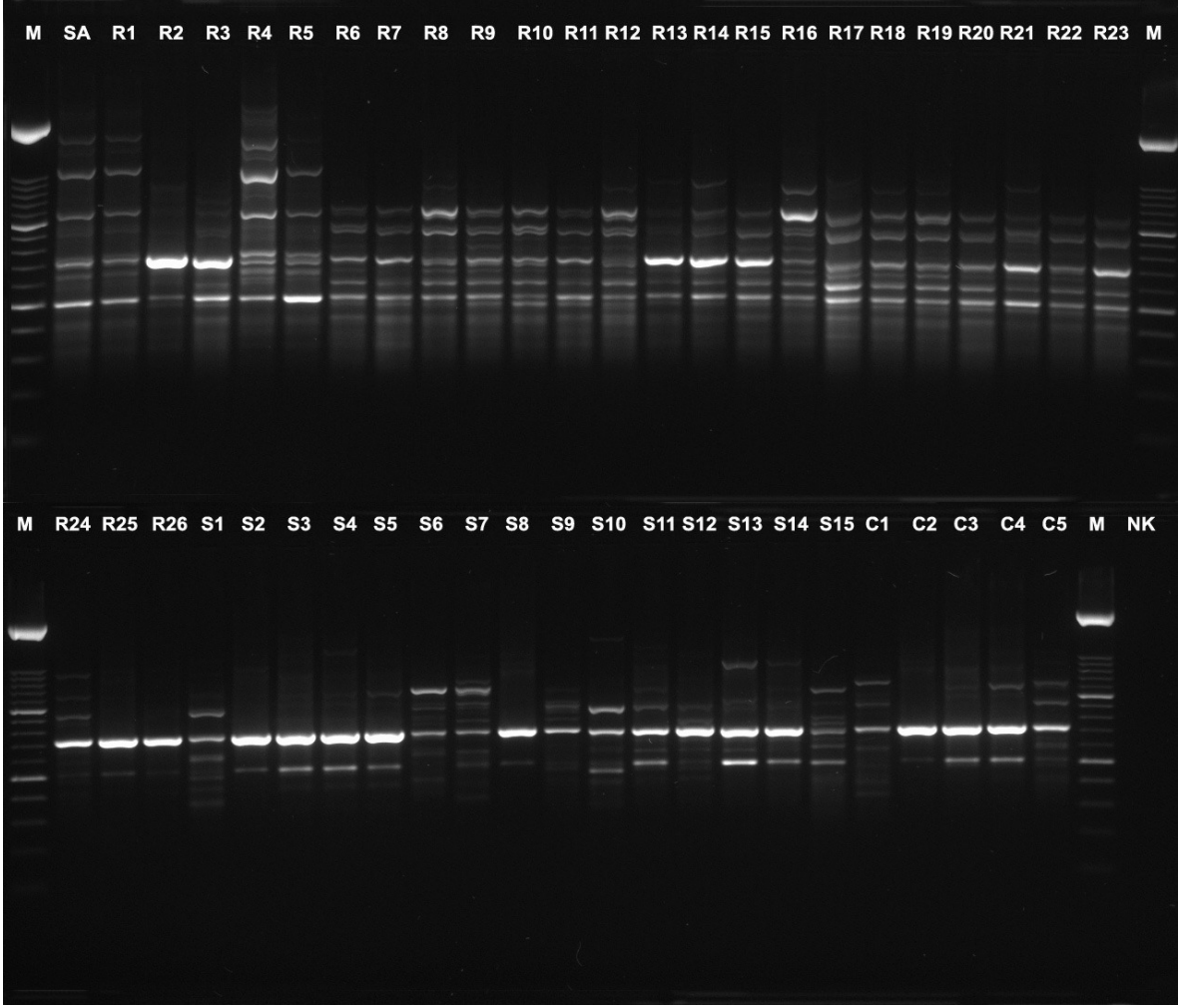
Şekil 4.7. RW3A primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.

SA: *Staphylococcus aureus*; R1-26: Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus* suşları;
S1-15: Metisilin Duyarlı *Staphylococcus aureus* suşları; C1-5: Kogülaz Negatif *Staphylococcus sp.*;
NK: Negatif kontrol; M: 100 bç DNA moleküler ağırlık markeri.



Şekil 4. 8. REP2-I primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.

SA: Staphylococcus aureus; R1-26:Metisilin Dirençli Staphylococcus aureus suşları; S1-15: Metisilin Duyarlı Staphylococcus aureus suşları; C1-5: Kogülaz Negatif Staphylococcus sp.; NK: Negatif kontrol; M: 100 bç DNA moleküler ağırlık markeri.



Şekil 4.9. REP1R-I primeri kullanılarak elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.

SA: *Staphylococcus aureus*; R1-26: Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus* suşları;
S1-15: Metisilin Duyarlı *Staphylococcus aureus* suşları; C1-5: Kogülaz Negatif *Staphylococcus sp.*;
NK: Negatif kontrol; M: 100 bp DNA moleküler ağırlık markeri.

Çizelge 4.5. RAPD ve REP primerlerinin oluşturduğu polimorfizm oranları.

Primer	Dizi	Toplam Bant Sayısı	Monomorfik Bant Sayısı	Polimorfik Bant Sayısı	% Polimorfizm
RW3A	TCGCTCAAACAACGACACC	20	2	18	90.0
REP1R-I	IIICGICGICATCIGGC	13	2	11	84.6
REP2-I	ICGICTTATCIGGCCTAC	16	0	16	100.0
A3	AGCAGCCTGC	16	0	16	100.0
A4	AGGCCGCTTA	19	0	19	100.0

4.6.2. Kümeleme analizi sonuçları

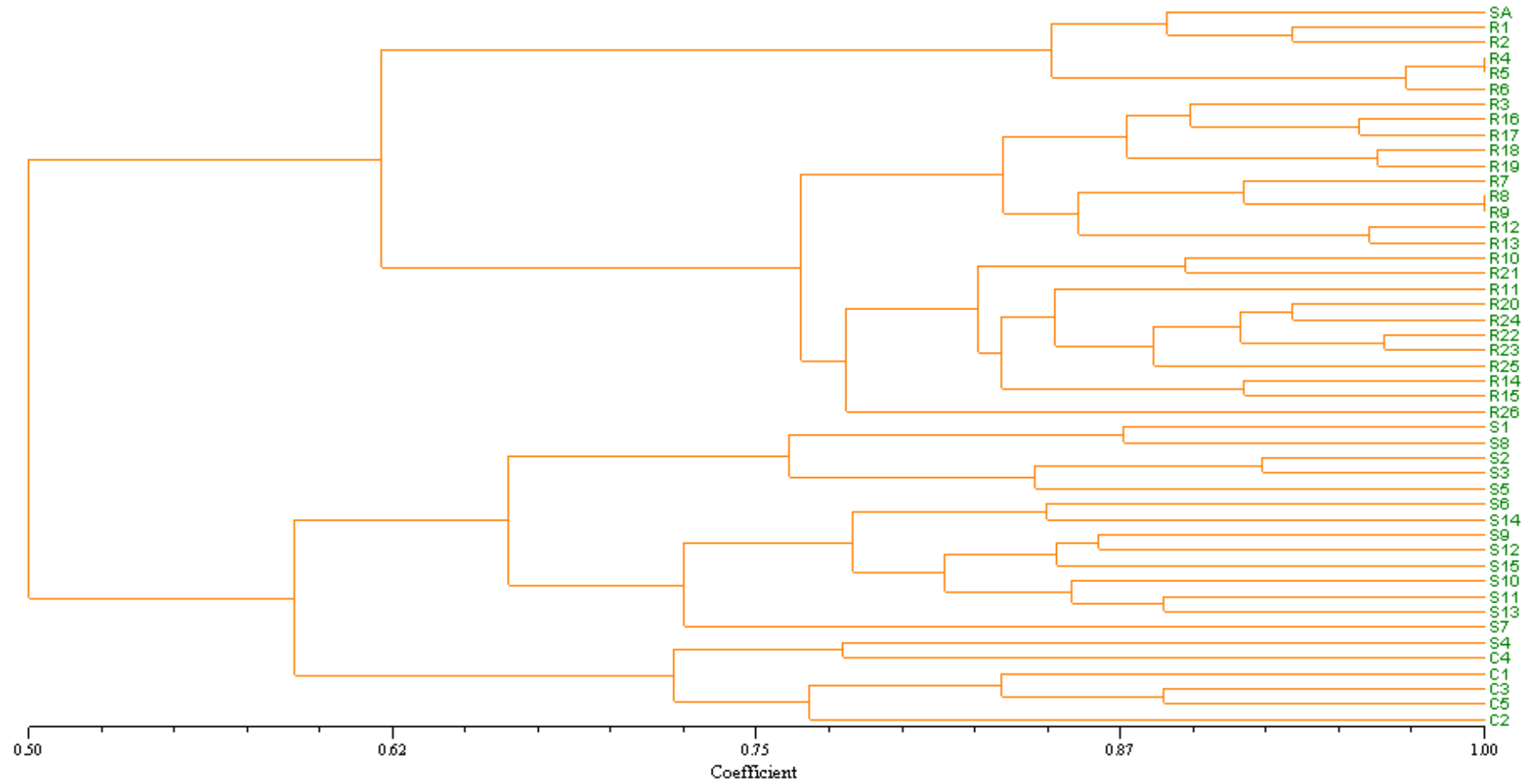
Literatürde *Staphylococcus* türlerinin tiplendirilmesinde kullanılan RAPD primerleri (A3, A4) ve REP primerleri (RW3A, REP1R-I ve REP2-I) taranması sonucu seçilen primerler çalışma kapsamına alındı. Bu primerlerin analizinde elde edilen polimorfik bantlar temel alınarak NTSYS-pc 2.1 programı ile dendogram çizildi.

Çalışmamızda incelenen 26 MRSA, 15 MSSA ve 5 CNS suşunun RAPD-PCR analizinde A3 ve A4 primerleri birlikte değerlendirilerek dendogram çizildi (Şekil 4.10.). Dendogram verileri değerlendirilirken, her bir farklı patern tiplendirme amacı ile özgül tip olarak belirlendi ve farklı bir rakam ile gösterildi. Kümeleme analizi ile değerlendirme sonucu oluşan ve genotipler arasındaki genetik ilişkileri gösteren dendogramın farklı sayıda genotip içeren 2 ana gruptan oluştuğu saptandı. Kümeleme analizi sonucunda oluşan gruplar incelendiğinde, Grup1'i yalnızca MRSA suşlarının oluşturduğu, Grup 2'yi ise MSSA ve CNS suşlarının oluşturduğu görüldü (Şekil 4.10.). Oluşan RAPD-PCR paternleri incelendiğinde 10 farklı genotip belirlendi (Genotip 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10). MRSA suşlarında 4 farklı genotip (Genotip 1, 2, 3, 4) tespit edilirken MSSA suşlarında ise 5 farklı genotip (Genotip 5, 6, 7, 8, 9) saptandı. RAPD-PCR tiplendirmesi sonucunda belirlenen genotipler ve içerdikleri suşların dağılımı Çizelge 4.6'da gösterildi.

Çalışmamızda incelenen 26 MRSA, 15 MSSA ve 5 CNS suşunun REP-PCR analizinde, RW3A, REP1R-I ve REP2-I primerleri birlikte değerlendirilerek dendogram çizildi (Şekil 4.11.). Dendogram verileri değerlendirilirken, her bir farklı patern tiplendirme amacı ile özgül tip olarak belirlendi ve farklı bir harf ile gösterildi. REP-PCR paternleri incelendiğinde 16 farklı genotip belirlendi (Genotip A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P). Genotip A, B, C, D, E ve F'nin yalnızca MRSA suşlarında, Genotip G, I, L ve M' nin ise yalnızca MSSA suşlarında görüldüğü belirlendi. Genotip H, J, K' nın ise hem MRSA hem de MSSA suşlarında görüldüğü tespit edildi. REP-PCR tiplendirmesi sonucunda belirlenen genotipler ve içerdikleri suşların dağılımı Çizelge 4.6'da gösterildi.

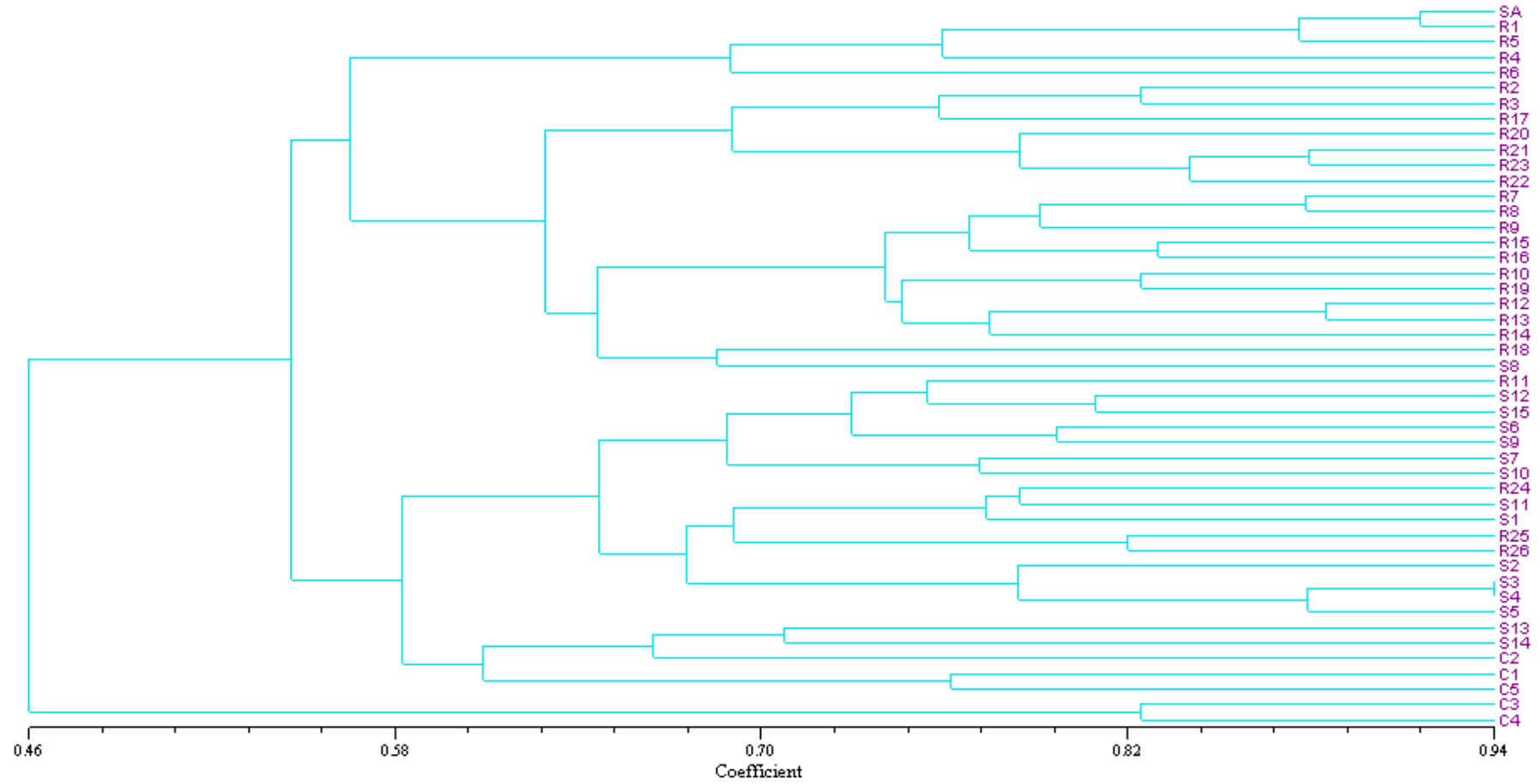
Çizelge 4.6. RAPD-PCR ve REP-PCR ile belirlenen profiller ve suşların dağılımı.

Suş No	RAPD-PCR Genotipleri	REP-PCR Genotipleri
R1	1	A
R2	1	C
R3	2	C
R4	1	B
R5	1	A
R6	1	C
R7	2	E
R8	2	E
R9	2	E
R10	3	E
R11	3	H
R12	2	E
R13	2	E
R14	3	E
R15	3	E
R16	2	E
R17	2	C
R18	2	F
R19	2	E
R20	3	D
R21	3	D
R22	3	D
R23	3	D
R24	3	J
R25	3	K
R26	4	K
S1	5	J
S2	5	K
S3	5	L
S4	9	L
S5	6	L
S6	7	H
S7	9	I
S8	5	G
S9	7	H
S10	9	I
S11	9	J
S12	7	H
S13	9	M
S14	7	M
S15	8	H
C1	10	O
C2	10	N
C3	10	P
C4	9	P
C5	10	O
Staphylococcus aureus ATCC 29213	1	A
Genotip Sayısı	10	16



Şekil 4.10. A3 ve A4 primerleri ile RAPD-PCR analizi sonucu UPGMA metoduyla oluşturulan ve *Staphylococcus* örnekleri arasındaki genetik ilişkiyi gösteren dendrogram.

SA: *Staphylococcus aureus*; R1-26: Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus* suşları; S1-15: Metisilin Duyarlı *Staphylococcus aureus* suşları; C1-5: Kogülaz Negatif *Staphylococcus* sp.



Şekil 4.11. RW3A, REP1R-I ve REP2-I primerleri ile REP-PCR analizi sonucu UPGMA metoduyla oluşturulan ve *Staphylococcus* örnekleri arasındaki genetik ilişkiyi gösteren dendrogram.

SA: *Staphylococcus aureus*; R1-26: Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus* suşları; S1-15: Metisilin Duyarlı *Staphylococcus aureus* suşları;
C1-5: Kogülaz Negatif *Staphylococcus* sp.

5. TARTIŞMA

S.aureus, hastane enfeksiyonlarının etkeni olarak en sık izole edilen bakterilerin başında gelmektedir. Stafilokoklar, 1950'li yıllardan itibaren, penisiline daha sonra metisiline ve devamında da pek çok antibiyotiğe direnç geliştirmiştir (Tambic et al., 1997). Hastane enfeksiyonlarına neden olan MRSA'larda görülen bu antibiyotik direncindeki artış ve bu dirençli patojenlerin üniteler ve hastaneler arasında yayılımı, tedavi başarısızlıklarına, hasta morbiditesi ve mortalitesinde artışa, büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Centers for Disease Control, 1992). CNS'ler ise başta sepsis ve bakteriyemilerde olmak üzere, son yıllarda hastane enfeksiyonlarının en önemli etkenleri arasında yer almaktadır (Gürdoğan vd., 1999). Bu nedenle *S.aureus* ve CNS'ların etken olduğu enfeksiyonlar ile mücadelede bu suşların tiplendirilmeleri ve etkin tedavi yönteminin belirlenmesi oldukça önemlidir.

Stafilokok enfeksiyonlarında doğru tedavinin yapılabilmesi için metisilin direncinin saptanması gereklidir. Metisilin direncinin bilinmesi, hem beta-laktam hem de beta-laktam olmayan bazı antibiyotiklerin seçimi ve klinik kullanımında rehber olabilmektedir. Bu nedenle, bu suşların neden olduğu enfeksiyonlar için etkin ve uygun antimikrobial tedavi protokolünün belirlenmesi, MRSA suşlarının doğru tanımlanması, MRSA yayılımının önlenmesi gerekmektedir. Bu bağlamda MRSA enfeksiyonları ile mücadelede bu suşların yayılımlarının takibi ve tiplendirilmeleri ile baskın suşların belirlenmesi gerekmektedir.

Çalışmamızda Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nin farklı servislerinden ve farklı klinik örneklerden elde edilen *Staphylococcus* suşlarının fenotipik ve genotipik yöntemlerle tanımlanması ve baskın suş tiplerinin belirlenmesi amaçlandı. *Staphylococcus* suşlarının gram boyama, kanlı agarda beta hemoliz, pigmentasyon, mannitol fermentasyonu, katalaz ve koagülaz aktiviteleri incelenerek fenotipik yöntemlerle ön tanımlaması yapıldıktan sonra, literatürde incelenen birçok antibiyotiğe olan direnç oranları belirlendi. Daha sonra antibiyotik duyarlılıklarını esas alan ve birçok hastane salgınında temel tiplendirme aracı haline gelen antibiyotikleme gerçekleştirildi.

Çalışmamız kapsamında incelenen *Staphylococcus* suşlarının klinik örneklerle göre dağılımı incelendiğinde, bu suşların sırasıyla en sık pü, kan ve derin trakeal aspirattan izole edildiği gözlemlendi (Şekil 4.1.). MRSA suşlarının da yine en sık pü ve derin trakeal aspirattan izole edildiği gözlemlendi (Şekil 4.2.). MSSA ve CNS suşlarının izole edildiği klinik örneklerin başında da pü gelmektedir (Çizelge 4.1.). Bizim çalışmamıza benzer şekilde Ocak 1998 ile Aralık 2000 tarihleri arasında Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD Laboratuvarı'nda çeşitli klinik örneklerden izole edilerek hastalık etkeni olduğu kabul edilen 446 stafilocok kökeni incelendiğinde, %52'sinin püden izole edildiği tespit edilmiştir (Aydın vd., 2001). Ocak 2000-Ocak 2002 yılları arasında Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesi'nde yatmakta olan hastalardan izole edilen 72 MRSA suşunun dahil edildiği bir çalışmada, MRSA'ların en sık izole edildiği klinik materyal pü ve trakeal aspirat olarak tespit edilmiştir (Namıduru ve Karaoğlan, 2003). Sağlık Bakanlığı Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nden Aralık 2005 - Mayıs 2006 tarihleri arasında izole edilen 214 stafilocok örneğinin araştırıldığı bir diğer çalışmada bizim çalışmamız ile benzer olarak MRSA suşlarına en fazla trakeal aspiratta rastlanmıştır (Akıner, 2006).

Staphylococcus suşlarının yayılımının takibi bu suşlarla mücadele için önemli olduğundan çalışmamızda incelenen *Staphylococcus* suşlarının servislere göre dağılımı değerlendirildiğinde, bu suşların görüldüğü servisler sırasıyla en fazla; Poliklinik ve Dahiliye Bölümü, Ortopedi Servisi/ Genel Cerrahi Servisi/ Plastik Cerrahi Servisi olarak tespit edildi (Şekil 4.3.).

Biyokimyasal yöntemlerle çoğunlukla tür düzeyinde tanımlanan suşların birbirleri ile olan klonal ilişkileri tam olarak anlaşılabilir değildir. Epidemiyolojik çalışmalar için gerekli olan alt tür düzeyinde tiplendirilmede mikroorganizmaların antibiyotik duyarlılık paternlerine dayanan antibiyotikleme gibi pek çok fenotipik yöntem uygulanmaktadır (Durmaz, 2007).

Çalışmamızın amaçlarından biri incelenen suşların fenotipik tiplendirilmesi idi. Bu nedenle çalışmamızda fenotipik bir tiplendirme yöntemi olan antibiyotik duyarlılıkları profilleri incelenerek antibiyotikleme yapıldı. Bunun sonucunda

antibiyotip dağılımları incelendiğinde, *Staphylococcus* suşları için 8 ayrı antibiyotip paterni belirlendi. Bu antibiyotip paternlerinden antibiyotip 1,2 ve 3'ün MRSA suşlarında, antibiyotip 5 ve 6'nın MSSA suşlarında, antibiyotip 7 ve 8'in CNS suşlarında, antibiyotip 4'ün ise hem MSSA hem de CNS suşlarında görüldüğü tespit edildi (Çizelge 4.2.). MRSA suşları için 10 antibiyotiğe olan direnç profili incelendiğinde, 3 ayrı antibiyotip paterni bulundu (Çizelge 4.2.). Benzer çalışmalar incelendiğinde, 2007 yılında Ankara'da 115 hastadan izole edilen MRSA suşunun 16 antibiyotiğe olan direnç profili incelendiğinde 4 farklı antibiyotip profili (Karabiber ve Mert Dinç, 2007), 2006 yılında Güney Afrika'da yapılan diğer bir çalışmada ise 61 MRSA suşunun 9 antibiyotiğe olan direnç durumları incelendiğinde 12 farklı antibiyotip profili tespit edilmiştir (Shittu and Lin, 2006). Montesinos ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 124 MRSA suşunun 12 antibiyotiğe direnç oranı incelenmiş ve 10 farklı antibiyotip saptanmıştır (Montesinos et al., 2002).

MRSA suşlarında antibiyotik duyarlılık paternlerinin incelenmesi, bir hastanede aynı zamanda birden fazla hastada aynı suşla karşılaşılması salgın konusunda uyarıcı olabilirken, farklı suşla karşılaşılması yeni bir tehlikenin ortaya çıkabileceğine işaret etmesi bakımından oldukça önemlidir. Bu nedenle antibiyotiklere direnç oranlarının belirlenmesi, hastanelerde MRSA yayılımının takibi açısından dikkate alınması gereken bir belirleyicidir. MRSA suşlarının ayırtedilmesinde farklı çalışmalarda bir veya birkaç farklı antibiyotiğe duyarlılık belirleyici olmuştur. Archer ve Mayhall, var olan suştan farklı olarak, rifampin direnci sayesinde hastaneye yeni bir suşun girdiğini fark edebilmişlerdir. Amorim ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise, Brezilya ve İberya'da MRSA suşlarının ayırt edilmesinde trimetoprim-sulfametoksazol duyarlılığı önemli bir fenotipik belirleyici olmuştur (Karabiber ve Mert Dinç, 2007).

Antibiyotiklere direnç oranlarının belirlenmesinin öneminden dolayı çalışmamız amaçlarından bir diğeri test edilen antibiyotiklere karşı direnç oranları değerlendirilmesi idi.

Çalışmamızda test edilen antibiyotiklere karşı direnç durumu incelendiğinde, MSSA suşlarında pek çok antibiyotiğe karşı direnç oranları düşük iken, MRSA

suşlarında bu oranlar oldukça yüksek bulundu. Çalışmamızdan elde ettiğimiz bu sonuçlar Hasbek ve arkadaşları (2002) tarafından yapılan çalışmanın sonuçları ile paralellik göstermektedir. Çalışmamızda CNS suşlarında metisilin direncine bağlı olarak antibiyotik direncinin değiştiği görüldü. MSCNS (Metisilin duyarlı koagülaz negatif *Staphylococcus*) suşları ampisilin ve penisiline dirençli iken, MRCNS (Metisilin dirençli koagülaz negatif *Staphylococcus*) suşlarının bu antibiyotiklere ek olarak amoksisilin-klavulonik asit, klindamisin, siprofloksasin, gentamisin ve eritromisin gibi antibiyotiklere karşı da dirençli olduğu görüldü.

Çalışmamızda MRSA suşlarının antibiyotik direnç oranları incelendiğinde, ampisilin, siprofilaksosin, gentamisin, penisilin ve rifampine % 100 oranında direnç gösterdiği saptanmıştır. Vankomisine dirençli MRSA suşuna rastlanmamıştır (Şekil 4.4.).

Günümüzde MRSA ile enfekte olguların tedavisi ancak; nadiren etkili olan birkaç antibiyotik dışında, glikopeptid grubu olarak adlandırılan ve sadece damar içi yoldan uygulanabilen vankomisin ve teikoplanin adlı iki antibiyotikle mümkün olabilmektedir. Glikopeptidlerin olumsuz yönleri arasında; önemli yan etkilerinin bulunması ve tedavi maliyetinin pahalı olması belirtilebilir. Son on yıl içinde önce azalmış vankomisin duyarlılığı sonrası vankomisine karşı heterojen dirençli stafilokok suşlarının (VRSA) bildirilmesi de glikopeptidlerin olumsuz yönlerindedir (Hiramatsu et al., 1997). Vankomisine duyarlılığı azalmış *S.aureus* suşları ilk olarak Japonya'da tanımlanmış, daha sonra da Amerika, Avrupa ve Kore'de bildirilmiştir. Bütün bu gelişmeler metisiline dirençli stafilokokların özellikle MRSA suşlarının etken olduğu enfeksiyonların tedavisinde glikopeptidlere alternatif olabilecek bir antibiyotik arayışını gündeme getirmiştir (Kim et al., 2004; Shittu and Lin, 2006; Thouverez et al., 2003). Çalışmamızda farklı servislerden toplanan MRSA suşlarının antibiyogram sonuçları incelendiğinde, bütün izolatların vankomisine duyarlı olduğunu saptanmıştır (Çizelge 4.2.). Elde edilen bu sonuç literatür ile uyumlu bulunmuştur. Literatürde de nadir olarak bildirilen çalışmalar dışında henüz çoğunlukla vankomisine duyarlı MRSA suşları bildirilmektedir (Kim et al., 2004; Shittu and Lin, 2006).

MRSA'lar β -laktam grubu antibiyotiklere karşı dirençlidir (Çokça vd., 1998; Polyzou et al., 2001). *S.aureus* suşlarında CLSI önerilerine göre oksasilin/metisilin direncinin saptanması tüm β -laktam ajanları için yorum yapılabilmesini sağlamaktadır. Çalışmamızda MRSA suşlarının tamamının penisilin ve ampiciline direnç gösterdiği tespit edildi (Çizelge 4.2.). Bu bulgularımız sözü edilen bakteri enfeksiyonlarında tedavi seçeneklerinin son derece kısıtlı olduğuna işaret etmektedir. Sonuçlarımız ise daha önce yapılan çalışmalarla uyum göstermektedir (Kim et al., 2004; Shittu and Lin, 2006).

Çalışmamızda test edilen diğer antibiyotik rifampindir. MRSA suşları için rifampine direnç oranı % 100 olarak belirlendi (Çizelge 4.2.). Literatürde daha önce yayımlanmış farklı sonuçların bildirildiği bu çalışmalar göz önüne alındığında MRSA'larda rifampine karşı direncin giderek arttığı gözlenmektedir (Shittu and Lin, 2006; Ekşi vd., 2007). Bu durum da rifampinin MRSA enfeksiyonlarında tek başına kullanılmaması gerektiğini göstermektedir.

Genel olarak MRSA suşlarının aminoglikozid grubu antibiyotiklere dirençli olduğu kabul edilmektedir. Çalışmamızda MRSA suşlarının gentamisine % 100 direnç gösterdiği bulundu (Çizelge 4.2.). Gentamisin direnci yıllar içinde artmakta olup, farklı çalışmalarda % 77.1 (2003), % 95.0 (2004) ve %96.7 (2006) oranlarında direnç saptanmıştır (Ertek vd., 2003; Kim et al., 2004; Shittu and Lin, 2006).

Çalışmamızda MRSA suşları için eritromisin ve klindamisin direnç oranı % 54 olarak saptandı (Çizelge 4.2.). Daha önce yapılan ulusal çalışmalar incelendiğinde, MRSA suşlarında eritromisin direnci % 56 ve % 58,6 olarak bulunmuştur. Bulgularımız bu sonuçlar ile paralellik göstermektedir (Diler ve Kocabeyoğlu, 1998; Özkalp ve Baybek, 2003).

Çalışmamızda trimetoprim-sulfametoksazole dirençli MRSA suşu saptanmamıştır (Çizelge 4.2.). Mamıkoğlu ve ark. hastanede yatan hastalardan izole ettikleri 225 MRSA suşu ile yaptıkları çalışmada trimetoprim-sulfametoksazol direncini % 4 olarak bulmuşlardır (Şengöz vd., 2004). Daha önce yapılan ulusal bir çalışma ve Kore'de yapılan diğer bir çalışmada MRSA suşları için % 6.5 ve % 8.9 gibi oldukça düşük direnç oranları tespit edilmiştir (Sancak vd., 2000; Kim et al., 2004).

MRSA'lardaki glikopeptidlere karşı gelişen direnç göz önüne alındığında, trimetoprim-sulfametoksazolün MRSA enfeksiyonlarının tedavisinde etkin olduğu belirtilebilmektedir. Ayrıca vankomisin toksisitesi ve yüksek maliyeti göz önüne alındığında, trimetoprim-sulfametoksazol bu mikroorganizmalarla oluşan enfeksiyonlarda bir tedavi alternatifi olarak düşünülebilir.

Stafilokoklarda metisilin direnci giderek artmakta olan bir problemdir. Metisiline dirençli olan suşlar beta-laktam antibiyotiklerin yanı sıra pek çok antibiyotiğe dirençli olabilmektedir. Ayrıca direnç gelişimi ile nozokomiyal enfeksiyon sıklığındaki artış arasında da bir paralellik saptanmıştır (Archer and Climo, 1994). Bu çalışmada kullanılan 10 antibiyotik incelendiğinde MRSA suşundan 12'si altı antibiyotiğe, 13'ü sekiz antibiyotiğe, 1'i yedi antibiyotiğe dirençli bulundu (Çizelge 3.4). Bu sonuçlar incelenen MRSA'ların birçok antibiyotiğe dirençli olduğunu ve çoklu antibiyotik direnci gösterdiğini desteklemektedir. Bu suşların antibiyotik direncinin aşılması ve neden oldukları enfeksiyonların başarı ile tedavisi için antibiyotik duyarlılık testlerinin öneriler doğrultusunda yapılması ve en uygun antibiyotik seçiminin sağlanması oldukça önemlidir.

Çoklu antibiyotik direnci taşıdıkları için metisilin dirençli *S. aureus* suşlarının yol açtığı enfeksiyonlarda kullanılabilecek antibiyotik sayısı oldukça sınırlıdır. Metisilin ve beta-laktam antibiyotiklere dirençli olan bu suşların insidansındaki artış ve bu suşların etken olduğu enfeksiyonların tedavilerinde kullanılabilecek glikopeptid grubu antibiyotikler olması, bu antibiyotiklerin kullanımı sonucunda direnç gelişiminin olabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle MRSA enfeksiyonlarının tedavisinde glikopeptid grubu antibiyotikleri kullanılmadan önce enfeksiyon etkenlerinin ve antibiyotik duyarlılık paternlerinin incelenmesi, mümkün olduğunca kültür ve antibiyogram sonuçlarına göre tedavinin seçilmesi, gereken endikasyonlarda da kombine tedavinin tercih edilmesi gerektiği düşünülmektedir.

Bakterilerin tiplendirilmesi, herhangi bir salgın esnasında kaynağın saptanması, bulaş yollarının belirlenmesi ve etkin koruma önlemlerinin alınması açısından büyük yararlar sağlamaktadır. Fransa'da bir üniversite hastanesinde çıkan bir MRSA salgınında 27 izolata antibiyotiplendirme, plazmid analizi, ribotyping ve IS tiplendirilmesi yapılmış, antibiyotiplendirme ile 5 antibiyotip tespit edilmiş, epidemik

suşun fenotipinin endemik suşun fenotipinden farklı olması bakımından kullanılan yöntemler içinde ayırt ettirici olan yöntemin antibiyotiplendirme olduğu saptanmıştır. Böylece salgının plastik cerrahi servisinde çıktığı ve buradan tüm hastaneye yayıldığı anlaşılabilmiştir (Karabiber ve Mert Dinç, 2007). Bu nedenle antibiyotik duyarlılık paternleri ve antibiyotip profillerinin belirlenmesi alınacak kontrol önlemleri bakımından oldukça önemlidir. Ancak antibiyotiplenmenin ayırım gücü her zaman yeterli olmayabilir. Özellikle antibiyotik dirençlilik genlerini içeren plazmidlerin aktarılması sonucunda hızlıca değişkenlik gösterebilmektedir. Bu bağlamda bu yöntemin güvenilirliği azalmakta ve tiplendirmede farklı yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Özellikle epidemiyolojik çalışmalarda suşlarda kesin ayırım yapılabilmesi için son yıllarda gelişen DNA temelli moleküler tekniklerin kullanılması önemlidir. Bu bağlamda çalışmamızda *S.aureus* ve CNS suşları, antibiyotik duyarlılıklarını esas alan ve fenotipik bir yöntem olan antibiyotiplenmenin ardından genotipik yöntemlerle de tiplendirilmesi amaçlandığı için RAPD-PCR ve REP-PCR teknikleri uygulanmıştır.

Birçok bakterinin moleküler tiplendirilmesinde RAPD-PCR tekniği kullanılarak DNA parmak izi analizi yapılmıştır. Bu teknik ile *Acinetobacter baumannii*, *Candida albicans*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Proteus mirabilis*, *Streptococcus sp.*, *Histoplasma capsulatum*, *Salmonella enteritidis*, *Haemophilus somnus*, *Leptospira sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Legionella pneumophila* türleri tiplendirilmiştir (Olive and Bean, 1999). Moleküler tanımlamada kullanılan bu RAPD yönteminin başarısını, az miktardaki DNA ile yüksek oranda polimorfizm yakalaması oluşturmaktadır. Ayrıca DNA parçalarını çoğaltmada rasgele dizilimler kullanılarak, PCR analizlerinde başlangıç DNA dizilimi bilgisinin gerekliliği ortadan kaldırılmıştır (Williams et al. 1990). Literatürde MRSA suşlarının epidemiyolojisinin araştırıldığı pek çok çalışmada suşlar RAPD-PCR tekniği kullanılarak tiplendirilmiştir (Tambic et al., 1999; Pereira et al., 2002; Onasanya et al., 2003; Reinoso et al., 2004; Nikbakht et al., 2008). Bu çalışmalarda kullanılan RAPD primerleri Çizelge 5.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 5.1. Çeşitli çalışmalarda *Staphylococcus aureus*'ların tiplendirilmesinde kullanılan RAPD primerleri.

Araştırmacılar	RAPD Primerleri (5'-3')
Pereira et al., 2002	AGCGTCACTG TGACCCGCC GCGATCCCCA
Onasanya et al., 2003	CCGCTACCGA TCGCCAGCCA GACACGGACC CCCAGCTAGA GGTGGCATCT CTGGACGTCA GTGACCGAGT TCGCATCCCT CTGATGCGTG CACAGCGACA
Reinoso et al., 2004	GAGGGAAGAG ACGATGAGCC ACCGCCTGCT
Tambic et al., 1999	ACAACCTGCTC AGCAGCCTGC

S.aureus suşlarının moleküler analizinde RAPD-PCR yöntemi ile tiplendirildiği çalışmalar incelendiğinde bu tekniğin uygulanabilir olduğu ileri sürülmektedir. Yoğun bakım ünitesinden izole edilen 59 *S.aureus* suşunun (32 MRSA ve 27 MSSA) dahil edildiği bir çalışmada RAPD primerlerinin oluşturduğu bant profilleri incelendiğinde, 41 primerin ayırım gücünün olmadığı, 3 primerin ise 59 *S.aureus* suşunu ayırmada oldukça informatif bant profilleri oluşturduğu tespit edilmiştir (Mahadeva et al., 2007). 2005 yılında Malezya'da yapılan bir çalışmada farklı hastanelerden izole edilen 50 *S. aureus* suşu RAPD tekniği ile tanımlanmıştır. 4 farklı primer ile yapılan RAPD analizi sonucu, 3 primerle oluşan bant profilleri incelendiğinde her bir izolat için sayısı 1-11 arasında değişen anlamlı bant oluşumu gözlenmiştir (Neela et al., 2005).

Çalışmamızda *S.aureus* suşlarının RAPD-PCR ile tiplendirilmesinde farklı sayıda suş içeren genotipler belirlendi. Genotip 1'de yer alan R1 ve R2 suşlarının aynı servisten (Genel Cerrahi Servisi) gönderildiği ve aynı antibiyotip paternine (Ant1) sahip olduğu görüldü. Ayrıca metisilin dirençli olduğu bilinen ve referans suş olarak kullanılan *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 suşunun da bu genotipin farklı bir

alttipinde yer aldığı görüldü. Aynı antibiyotipi gösteren (Ant 2) R4, R5 ve R6 suşlarının da bu genotipin farklı alttipinde yer aldığı belirlendi. Ayrıca R4 ve R6 suşlarının da aynı servisten (Plastik Cerrahi Servisi) gönderildiği tespit edildi (Çizelge 4.1.) (Çizelge 4.6.).

Genotip 2'de bulunan R3, R16 ve R17 suşlarının aynı klinik materyalden (derin trakeal aspirat) izole edildiği ve R3 ile R16 suşunun aynı antibiyotipi (Ant 2) gösterdiği belirlendi. Bu genotipin farklı alttiplerinde bulunan R17 ile R18 ve R19 suşlarının aynı antibiyotipi (Ant 1) gösterdiği tespit edildi. Genotip 2 grubunda yer alan R8 ve R9 suşunun da yine aynı antibiyotipi (Ant 1) gösterdiği tespit edildi. Bu genotipin farklı bir alttipinde yer alan R12 ve R13 suşlarının da R8 ve R9 suşları ile aynı antibiyotipi (Ant 1) gösterdiği belirlendi. R9 ve R12 suşlarının aynı servisten (Dahiliye Devamlı Bakım) gönderildiği tespit edildi (Çizelge 4.1.) (Çizelge 4.6.).

Genotip 3 grubunda yer alan ve aynı klinik materyalden (derin trakeal aspirat) izole edilen R10 ve R21 suşlarının aynı antibiyotip paternine (Ant 2) sahip olduğu görüldü. R11 suşunun diğer suşlardan farklı bir alttipde bulunduğu görüldü. Genotip 3 grubunun farklı bir alttipinde bulunan R23 ve R24 suşlarının aynı servisten (Dahiliye Bölümü) gönderildiği ve aynı antibiyotip paternine (Ant1) sahip olduğu görüldü. Ayrıca diğer suşlardan Nöroloji Yoğun Bakım'da bulunması bakımından farklılık gösteren R26 suşunun yine diğer suşlardan farklı olarak Genotip 4 grubunda olduğu belirlendi (Çizelge 4.1.) (Çizelge 4.6.).

Genotip 5 grubundaki aynı klinik materyalden (püye) izole edilen S1, S8, S2, S3 suşlarının aynı antibiyotip paternine (Ant 4) sahip olduğu görüldü. Ayrıca Genotip 7 grubundaki S6, S14, S9 ve S12 suşlarının da püyeden izole edildiği ve antibiyotip 4 paternini gösterdiği belirlendi. Diğer tüm suşlardan farklı bir antibiyotip paterni gösteren S15'in Genotip 8 grubuna dahil olduğu görüldü. S10, S11, S9, S7, S4 ve C4 suşları Genotip 9 grubunda bulunurken C1, C3, C5 ve C2 suşlarının Genotip 10 grubunda bulunduğu tespit edildi (Çizelge 4.1.) (Çizelge 4.6.).

Moleküler tiplendirme yöntemlerinden biri olan REP-PCR, *S.aureus* suşları dahil olmak üzere pekçok bakteri türünün ayırımında ve tanımlanmasında kullanılmaktadır (Swamimathan et al., 1993). Bu yöntem *S.aureus*, *Acinetobacter sp.*, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis* ve *Aspergillus* gibi epidemiyolojik açıdan önemli birçok prokaryotik ve ökaryotik organizmanın tiplendirilmesinde kullanılan uygun bir yöntem olarak bilinmektedir (Ross et al., 2005). Literatürde MRSA suşlarının tiplendirilmesinde sekans olarak RepMP3 bölgesini hedef alarak REP-PCR stratejisini uygulayan birçok çalışma bulunmaktadır (van der Zee et al., 1999; Olive and Bean, 1999; Deplano et al., 1997; Deplano et al., 2000; Öztop vd., 2004).

Bu çalışmada *S.aureus* ve CNS suşlarının REP-PCR ile genotiplendirilmesi, *Mycoplasma pneumoniae*'nin tekrar elementi homologlarının *Staphylococcus* türlerinde araştırılması olarak tanımlanmıştır. *Mycoplasma pneumoniae*'nin Gram pozitif bakterilerden köken alması nedeniyle *S.aureus* suşlarının REP-PCR ile tiplendirilmesinde tekrarlayan bu sekanslardan yararlanılabileceği düşünülmüştür. Bu amaçla, REP-PCR uygulamasında *M.pneumoniae* tekrar sekanslarından (RepMP3) köken alan RW3A (5'-TCGCTCAAACAACGACACC-3') primeri kullanılmıştır. Bu sekans *S.aureus* kromozomunda sayı ve pozisyon bakımından farklılık göstererek incelenen suşlar arasında farklı REP-PCR profillerinin meydana gelmesini sağlamaktadır. REP-PCR profillerindeki çeşitlilik, RW3A primeri için hedef olarak görev yapan yayılmış rep-benzeri elementler arasında bulunan bölgelerde oluşan çeşitlenme için belirleyici olmaktadır. RW3A primerinin uzunluğu (20-mer) ve *S.aureus* kromozomal DNA'sının her iki ipliğinde hedef olan sekansa yüksek derecede homoloji göstermesi şüphesiz ki anlamlı bant paternlerinin elde edilmesini sağlamaktadır. Bant büyüklüklerindeki farklılıklar, farklı genomlarda bulunan tekrar elementleri arasındaki polimorfizmi belirlemektedir. Böylece bu primer ile oluşan PCR ampikonları agaroz jel elektroforezinde yüksek oranda ayırt edici paternler meydana getirmektedir

DelVecchio ve arkadaşları tarafından yapılan, MRSA suşlarının RW3A primeri ile REP-PCR tiplendirilmesinin gerçekleştirildiği bir çalışmada, farklı merkezlerden toplanan 170 MRSA suşu incelendiğinde, 8 farklı REP-PCR bant profili bulunmuştur. Ayrıca bu çalışmada 21 MSSA suşu da aynı yöntem ile analiz

edilmiş ve elde edilen paternlerin diğer 8 paternden farklı olduğu tespit edilmiştir (DelVecchio et al., 1995).

60 *Staphylococcus* türü (59 *S.aureus* ve 1 *S.intermedius*) ile yapılan, REP-PCR yönteminin çeşitli tiplendirme yöntemleri ile karşılaştırıldığı bir çalışmada, 14 farklı REP-PCR bant paterni belirlenmiştir. *S.intermedius* suşunun özgül bant profili gösterdiği tespit edilmiştir. MRSA ve MSSA suşlarında gözlenen REP-PCR bant profilleri incelendiğinde ise, bizim çalışmamız ile uyumlu olarak metisilin duyarlı ve dirençli suşlarda kesin bir ayırım söz konusu olmadığı saptanmıştır. Ancak 5 farklı REP-PCR tipinin çoğunlukla (%95) MRSA suşlarında görüldüğü bulunmuştur. Buna ek olarak, REP-PCR yöntemi RAPD-PCR ve PFGE yöntemleri ile karşılaştırıldığında REP-PCR'ın RAPD-PCR ve PFGE kadar ayırt edici olduğu, REP-PCR'ın tekrarlanabilirliğinin de RAPD-PCR'dan daha yüksek olduğu bulunmuştur (van Der Zee et al., 1999).

Nascimento ve arkadaşlarının 21 bakteriosin üreten *S.aureus* suşunun genotipik tiplendirmesini yaptığı çalışmada, 6 farklı REP-PCR paterni bulmuşlardır. Bu çalışmada ayrıca AP-PCR yöntemi ile tiplendirme yapmışlar ve elde edilen AP-PCR paternleri ile REP-PCR paternleri karşılaştırıldığında, aynı tip AP-PCR paterni gösteren suşların çoğunlukla yine aynı tip REP-PCR paterni gösterdikleri tespit edilmiştir (Nascimento et al., 2005). Bu bağlamda birbirleri ile uyumluluk gösteren RAPD-PCR ve REP-PCR tekniklerinin ayırt edici profiller oluşturmaları nedeni ile *S.aureus* (özellikle metisilin dirençli *S.aureus*) suşlarının tiplendirilmesinde kullanılabileceği gösterilmiştir.

Wieser ve Busse (2000) tarafından yapılan, *S.aureus* suşu ile birlikte farklı *Staphylococcus* türlerinin REP-PCR ile analizinin yapıldığı bir çalışmada, *S.aureus* suşunda hiçbir bant gözlenmezken, diğer suşlarda 1-2 bant gözlendi. Bazı *Staphylococcus* türlerinde birkaç bant saptanmasına rağmen, informatif bant oluşumu görülmemesi sonucunda gözlenen bant paternlerinin türe ya da suşa özgü olmadığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada REP1R-I (5'-IIICGICGICATCIGGC-3') ve REP2-I (5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3') primerleri kullanılarak yapılan REP-PCR'ın *Staphylococcus* türlerinin tanımlanmasında kullanılabilecek uygun bir yöntem olmadığı ileri sürülmektedir (Wieser and Busse, 2000). Çalışmamızda

REP1R-I ve REP2-I primerleri ile ayrı ayrı dendogram çizildiğinde anlamlı sonuçlar elde edilememiştir. Bulgularımız yukarıda sözü edilen çalışmanın sonuçları ile uyumlu bulunmuştur.

REP-PCR yöntemi Versalovic et al. (1991) tarafından bakteriyel genomda bulunan tekrarlayan DNA elementlerinin amplifikasyonu ile farklı profillerin elde edilerek gerçekleştirilen moleküler tiplendirme olarak tanımlanmıştır. Bu yöntem kolay uygulanabilir olması, az ya da çok sayıda izolat ile çalışılabilmesi ve ayırt ediciliğinin yüksek olması nedeniyle moleküler tiplendirme çalışmalarında tercih edilen yöntemler arasındadır. REP-PCR yönteminin *S.aureus* suşlarının tiplendirilmesi için altın standart olarak kabul edilen PFGE yöntemine göre ayırım gücünün daha düşük olmasına rağmen, REP-PCR ve PFGE yöntemleri ile elde edilen sonuçların birbirleri ile uyumlu olduğunu gösteren birçok çalışma bulunmaktadır. Bütün bu çalışmalar *S.aureus* suşlarını tiplendirmede REP-PCR analizinin uygulanabilir bir yöntem olduğunu göstermektedir. Bunun yanı sıra REP-PCR'da primer optimizasyonu, sonuçların değerlendirilmesindeki bazı zorluklar ve tekrarlanabilirlik gibi sorunların üstesinden gelmek üzere otomatize bir sistem geliştirilmiştir (Diversilab System-Bacterial Barcodes, USA). Bu sistemde standardize edilmiş olarak sunulan malzemelerle PCR uygulanmakta ve web-destekli bir bilgisayar programı ile sonuçlar değerlendirilmektedir. Böylece 2-3 günlük PFGE zamanına karşılık 4 saatte sonuç alınmaktadır. İki yöntemin vankomisine dirençli enterokok suşları için kullanıldığı bir çalışmada uyum %83 olarak bulunmuştur.

S.aureus suşlarının tiplendirilmesinde RAPD-PCR ve REP-PCR yöntemleri karşılaştırıldığında RAPD-PCR yönteminin REP-PCR yöntemine göre daha ayırt edici olduğu görüldü. İncelenen 47 *Staphylococcus* suşunun 28'inde RAPD ve REP genotipleri uyumlu bulunmuştur.

Bazı araştırmalar MRSA suşlarının tiplendirilmesinde antibiyotik direnç paternlerinin belirleyici olduğunu destekler niteliktedir. Ancak antibiyotik direnç paternlerinin RAPD paternleri ile birlikte değerlendirilmesi bu suşların tiplendirilmesinde klonal ilişkinin ortaya konulması bakımından kolaylık sağlamaktadır. Çalışmamızda genotipik tiplendirme yöntemlerinin antibiyotik

duyarlılıklarını esas alan fenotipik tiplendirme yöntemlerinden daha duyarlı olduğu sonucuna varıldı. Literatürde *S.aureus* suşlarının tiplendirilmesinde pek çok farklı genotipik yöntem tanımlanmıştır. Genotipik yöntemler içinde PFGE özellikle MRSA suşlarının tiplendirilmesinde altın standart olarak kabul edilmektedir. Ancak, zaman alıcı, titizlik gerektiren ve kompleks bir sisteme ihtiyaç duyulan bu yöntemin en önemli dezavantajlarından biri de laboratuvarlar arasında standardizasyon probleminin bulunmasıdır. Bu nedenle suşların tiplendirilmesinde farklı yöntemlerin kullanılabilirliğinin belirlenmesi gerekmektedir. *S.aureus* suşlarının tiplendirilmesi ve dirençli suşların yayılımının önlenmesi için suşlar arasındaki klonal ilişkinin ortaya konulması oldukça önemlidir. Çalışmamızdan elde edilen bulgular RAPD-PCR ve REP-PCR yöntemlerinin özellikle MRSA suşlarının tiplendirilmesinde uygun birer moleküler analiz yöntemi olduğunu göstermektedir. Çalışmamızdan elde edilen bulgulara göre suşların tiplendirilmesinde farklı yöntemlerin bir arada kullanılmasının daha güvenilir sonuçlara ulaşılmasını sağladığı düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Akiner, G., 2006, Klinik materyallerden elde edilen *Staphylococcus aureus* suşlarının metisilin ve vankomisin dirençliliklerinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü.
- Alarcón, B., Vicedo, B., Aznar, R., 2006, PCR-based procedures for detection and quantification of *Staphylococcus aureus* and their application in food, Journal of applied microbiology, 100, 352-64.
- Andrei, A., Zervos, M.J., 2006., The application of molecular techniques to the study of hospital infection, Arch Pathol Lab. Med., 130, 662-66.
- Archer, G. L., and Climo M. W., 1994, Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci. Antimicrob. Agents Chemother., 38, 2231–2237.
- Arda, M., 2000, Temel Mikrobiyoloji, Medisan Yayınları, Ankara.
- Bardakçı, F., 2001, Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Turk. J. Biol., 25, 185-196.
- Batıkutlu, S., 2006, Çeşitli klinik materyallerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarında metisilin direnci ve E-Test ile vankomisin MIC değerlerinin araştırılması, Uzmanlık Tezi, S.B. Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği.
- Bauer, J.D., Ackermann, PG. and Toro, G., 1974, Clinical Laboratory Methods. 8th Ed. Mosby.
- Bergogne-Bérézin, E., 1999, Current Guidelines for the Treatment and Prevention of Nosocomial Infections. Drugs 58, Suppl., 1, 51–67.
- Bilgehan, H., 1990, Klinik mikrobiyoloji, özel bakteriyoloji ve bakteri enfeksiyonları, Barış Yayınları, İzmir. 184-204.

Bilgehan, H., 1994, Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları, Barış Yayınları, Bornova, 188-211.

Cengiz, A.T., Ustaçelebi, Ş., *Staphylococcus*, Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Güneş Kitabevi, Ankara, 339-346 p.

Centers for Disease Control, 1992, Public health focus: Surveillance, prevention and control of nosocomial infections. Morbidity and Mortality Weekly Report, 41, 783-7.

Centers for Disease Control and Prevention, 1997, Update: *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin, United States 1997. Morbidity and Mortality Weekly Report , 46, 813-815.

Centers for Disease Control and Prevention, 2000, *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin: Illinois, 1999. Morbidity and Mortality Weekly Report, 48, 1165-1167.

Cha, J.O., Lee, J.K., Jung, Y.H., Yoo, J.I., Park, Y.K., Kim, B.S. and Lee Y.S., 2006, Molecular analysis of *Staphylococcus aureus* isolates associated with staphylococcal food poisoning in South Korea, J. Appl. Microbiol., 101, 864–871.

Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005, Antimikrobik duyarlılık testleri için uygulama standartları, Onbeşinci bilgi eki, 25, 1, CLSI Wayne, Pa, USA 172 p.

Collins, C.H., Lyne, P.M. and Grange, J.M., 2001, Collin's and Lyne's Microbiological Methods, Oxford University Press Inc., Newyork, 110-111p.

Çalangu, S., 2001, Hastane İnfeksiyonlarının Önemi, <http://www.das.org.tr/dosya/kongre/kong2002/020.pdf>

- Çokça, F., Arman, D., Altay, G., 1998, Vankomisin ile rifampisin, amikasin, siprofloksasin ve imipenem kombinasyonlarının *Staphylococcus aureus* suşlarına in vitro sinerjik etkisi. Klimik Derg 1, 11, 109-111.
- Del Vecchio, V. G., J. M. Petroziello, M. J. Gress, F. K. McCleskey, G. P. Melcher, H. K. Crouch, and J. R. Lupski, 1995, Molecular genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* via fluorophore-enhanced repetitive-sequence PCR. J. Clin. Microbiol., 33, 2141-2144.
- Deplano, A., A. Schuermans, J. Van Eldere, W. Witte, H. Meugnier, et al., 2000, Multicenter evaluation of epidemiological typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains by repetitive-element PCR analysis. J. Clin. Microbiol., 38, 3527-3533.
- Diler, M. ve Kocabeyoğlu, Ö., 1998, Değişik kaynaklardan izole edilen 1200 Stafilokok suşunun türlere ve metisilin direncine göre dağılımı ile beta-laktam dışı bazı antibiyotiklere duyarlılık oranları, Klimik Dergisi, 11, 112-115.
- Durmaz, B., 2001, Hastane İnfeksiyonlarında Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarının Rolü, II. Sterilizasyon Dezenfeksiyon Hastane İnfeksiyonları Kongre Kitabı, Samsun, 100-110 p.
- Durmaz, R., 2007, 4. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kurs Kitapçığı, Malatya.
- Dündar, V., 2000, Metisiline Dirençli Stafilokok İnfeksiyonları. Klimik Dergisi, 13, 26-27.
- Ekşi, F., Balci, İ., Gayyurhan, E.D., Çekem, G., 2007, Klinik örneklerden soyutlanan *Staphylococcus aureus* suşlarının metisilin direncinin belirlenmesi ve antimikrobiyal ilaçlara duyarlılıklarının değerlendirilmesi. Turkish Journal of Infection, 21, 27-31.

- Elçi, S.D., 2005, Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları ve Pulse Field Jel Elektroforezi ile tiplendirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü.
- Ertek, M., Yazgı H., Aktaş, E., Ayyıldız, M., Parlak, A., 2003, Metisiline dirençli Stafilocokların linezolid ve diğer bazı antimikrobiyal ajanlara duyarlılığının araştırılması, Mikrobiyol Bült., 37, 235-240.
- Foster, T., 1996, *Staphylococcus*, Medical Microbiology. Baron S. (eds.), <http://www.gsbs.utmb.edu/microbook/ch012.htm>.
- Fung, C.P., Ho, M.W., Wang, F.D., Tsai, K., Liu, C.E., Liu, C.Y., Siu, L.K., 2001, Investigation of an outbreak caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a cardiovascular surgery unit by Ribotyping, Randomly Amplified Polymorphic DNA and Pulsed-Field Gel Electrophoresis, APMIS, 109,6, 474-480.
- Gürdoğan K, Arman D, Akdaş F, Dizbay M., 1999 Kan kültürlerinden izole edilen koagülaz negatif stafilocokların antibiyotiklere direnç durumları, Klimik Derg., 12(2);73-5.
- Hasbek, M. vd., 2002, Stafilocoklarda Metisilin Direncinin Farklı Yöntemlerle Belirlenmesi ve Çoğul Antibiyotik Direnci. C.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi, 24, 179-184.
- Haznedaroğlu, T., 2007, Metisilin Dirençli *S.aureus* (MRSA), Korunma ve Kontrol, GATA İnfeksiyon Kontrol Komitesi. <http://www.gata.edu.tr/infkom/MRSA.pdf>.
- Hiramatsu, K., Hanaki, H., Ino, T., Yabuta, K., Oguri, T., Tenover, F.C., 1997, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. J Antimicrob Chemother., 40, 135-146.
- Hoelzel, A., Gren, A., 1998, PCR Protocols and Population Analysis by Direct DNA Sequencing and PCR-based DNA Fingerprinting, ed: Hoelzel A.R., Molecular

Genetic Analysis of Populations: a Practical Approach. IRL Press, Oxford, 201-233 p.

Hojo, S., Fujita, J., Negayama, K., Ohnishi, T., Xu, G., Yamaji, Y., Ohada, H., and Takahara, J., 1995, DNA fingerprinting by arbitrary primed polymerase chain reaction (AP-PCR) for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Jpn. Assoc. Infect. Dis., 69, 506–510.

Kapral, F.A., Miller, M.M., 1971, Product of *Staphylococcus aureus* Responsible for the Scalded-Skin Syndrome, Infection and Immunity, 4, 5, 541-545.

Karabiber, N., Mert Dinç, Bedia, 2007, Çeşitli klinik örneklerden izole edilen MRSA suşlarının antibiyotiplendirilmesi ve eritromisin zon içi üreme gösteren MRSA suşları, ANKEM Derg., 21, 50-58.

Kayser, F.H., Bienz, K.A., Eckert, J., Zinkernagel, R.M., 2002, Tıbbi Mikrobiyoloji, Çevirenler: Mine Anğ Küçüker, Emel Tümbay, Özdem Anğ, Zayre Erturan; Nobel yayınları, İstanbul.

Kim, M., Pai, C.H., Woo, J.H., Ryu, J.S., Hiramatsu K., 2000, Vancomycin-Intermediate *S. aureus* in Korea. J Clin Microbiol., 38, 3879-3881.

Kim, H.B., Jang, H.C., Nam, H.J. et al., 2004, In vitro Activities of 28 Antimicrobial Agents Against *Staphylococcus aureus* isolates, Antimicrob Agents Chemother., 48, 1124–1127.

Kluytmans, J., van Leeuwen, W., Goessens, W. et al., 1995, Food-initiated outbreak of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* analyzed by pheno- and genotyping. J. Clin. Microbiol., 33,1121-1128.

Kurutepe S., Sürücüoğlu S., Gazi H., Teker A., Özbakkaloğlu B., 2007, Metisiline dirençli ve duyarlı *Staphylococcus aureus* suşlarının antibiyotiklere direnç oranları, İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection), 21, 187-191.

- Mahadevaa, D., Rankinb, K.S., Mullerc, S.D., Typing of *Staphylococcus aureus* clinical isolates using Random Amplification of Polymorphic DNA Method and comparison with antibiotic susceptibility typing doi:10.1016/j.jhin.2007.10.004, 388.
- Marlowe, E.M., Cohen, M.D., Hindler, J.F., Ward, K.W., Bruckner, D.A., 2001, Practical strategies for detecting and confirming vancomycin-intermediate *S. aureus*: A Tertiary-Care Hospital Laboratory Experience, J Clin Microbiol., 39, 2637-2639.
- Montesinos, I., Salido E., Delgado T., Cuervo M., Sierra A., 2002, Epidemiologic genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis at a university hospital and comparison with antibiotyping and protein A and coagulase gene polymorphisms. J Clin Microbiol., 40, 2119-2125.
- Namıduru, M., Karaoğlan, İ., 2003, Cerrahi yoğun bakım ünitesinde hastane infeksiyonu etkeni olan *Staphylococcus aureus* suşlarının antibiyotik dirençleri, Van Tıp Dergisi, 10, 72-75.
- Nascimento, J.S., Giambiagi-de-Marval M., Oliveira S.S., Ceotto H., Santos K.R.N., Bastos M.C.F., 2005, Genomic fingerprinting of bacteriocin-producer strains of *Staphylococcus aureus*, Res Microbiol., 156, 837-842.
- Neela, V., Mariana, N.S., Radu, S., Zamberi, S., Raha, A.R. and Rosli, R., 2005, Use of RAPD to investigate the epidemiology of *Staphylococcus aureus* infection in Malaysian hospitals, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 21, 245-251.
- Nikbakht, M., Nahaei, M.R., Akhi, M.T., Asgharzadeh, M., Nikvash, S., 2008, Molecular fingerprinting of Meticillin-Resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients and staff of two Iranian Hospitals., J Hosp Infect., 69, 46-55.

- Olive, M.D. and Bean, P., 1999, Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J. Clin. Microbiol.*, 37, 1661-1669.
- Onanuga A., Oyi A.R., Onaolapo J.A., 2005, Prevalence and susceptibility pattern of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* isolates among healthy women in Zaria, Nigeria, *Afr. J. Biotechnol.*, 4, 1321-1324.
- Onasanya, A., Mignouna, H.D. and Thottappilly, G., 2003, Genetic fingerprinting and phylogenetic diversity of *Staphylococcus aureus* isolates from Nigeria. *African J. Biotech.*, 2 : 246-250.
- Özerol, İ.E., 2001, *Staphylococcus aureus*, Bakteriyoloji. http://web.inonu.edu.tr/~iozerol/iozerol/BAKTERIYOLOJI/Staphylococcus_spp/Staphylococcus_aureus
- Özkalp B., Baybek H., 2003, Klinik Örneklerden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarının Çeşitli Antibiyotiklere in vitro Duyarlılıkları, *Genel Tıp Derg.*, 12, 65-68.
- Öztop, A., Pinarbasi H., Kocagöz S., Bakici M. Z., Bakir M., 2004, Molecular Genotyping of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains in a Teaching Hospital in Turkey, *Microbial Drug Resistance*. June 1, 10:154-159.
- Pereira M.S.V., Leal N.C., Leal T.C.A., Sobreira M., de Almeida A.M.P., Siqueira-Júnior J.P., Campos-Takaki G.M., 2002, Typing of human and bovine *Staphylococcus aureus* by RAPD-PCR and Ribotyping-PCR, *Letters in Applied Microbiology*, 35, 1, 32-36.
- Polyzou A., Slavakis A., Pournaras S., Maniatis A.N., Sofianou D., Tsakris A., 2001, Predominance of a Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* clone susceptible to erythromycin and several other non- β -lactam antibiotics in a Greek Hospital. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48, 231-234.

- Rabouam, C., Comes, A. M., Bretagnolle, V., Humbert, J. F., Periquet, G. & Bigot, Y., 1999, Features of DNA fragments obtained by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) assays. *Molecular Ecology*, 8, 493-503.
- Rademaker, J.L.W., Savelkoul, P., 2004, PCR Amplification-Based Microbial Typing.” In D.H. Persing, Tenover, F.C., Versalovic, J., Tang, Y., Unger, E.R., Relman, D.A., White, T.J. (Eds) *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice*, Washington, DC, ASM Pres., 197-221.
- Reinoso, E., Betteraa, S., Frigerioa, C., DiRenzob, M., Calzolaria, A., Bogni, C., 2004, RAPD-PCR Analysis of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine and human hosts, *Microbiological Research* 159, 245–255.
- Rohlf, F. J., 2000, NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and multivariate analysis system: version 2.01. Applied Bioinformatics, New York.
- Ross, T.L., Merz, W.G., Farkosh, M., et al., 2005, Comparison of an Automated Repetitive Sequence-Based PCR Microbial Typing System to Pulse-Field Gel Electrophoresis for Analysis of Outbreaks of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.*, 43, 5642-5647.
- Sabat, A., Malachowa, N., Miedzobrodzki, J. and Hryniewicz, W., 2006, Comparison of PCR-based methods for typing *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal Of Clinical Microbiology*, 44, 3804–3807.
- Sampathkumar, P., 2007, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: The Latest Health Scare., *Mayo Clin Proc.*, 82, 1463-1467.
- Sancak, B., Günalp, A., 2000, Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus* İzolatlarının Mupirosin ve Diğer Antibiyotiklere Olan Duyarlılıkları., *Mikrobiyol Bült.*, 34, 209-213.

- Saraçlı, M., 2002, *Candida* İnfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısında Moleküler ve Genetik Tanı Yöntemleri, *Candida Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Simpozyumu*, ed: Kiraz N., Kiremitçi A., Akgün Y., Eskişehir, 133-144.
- Saulnier, P., Bourneix, C., Prevost, G. et al., 1993, Random amplified polymorphic DNA assay is less discriminant than pulsed-field gel electrophoresis for typing strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 31, 982–985.
- Shittu, A.O. and Lin, J., 2006, Antimicrobial susceptibility patterns and characterization of clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in Kwazulu-Natal Province, South Africa., *BMC Infectious Diseases*, 6, 125.
- Singh, A., Goering, R.V., Simjee, S., Foley, S.L., Zervos, M.J., 2006, Application of molecular techniques to the study of hospital infection, *Clin Microbiol Rev.*, 19, 512-30.
- Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. ed., 1986, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.*, Williams and Wilkins, Baltimore.
- Şengöz, G., Yıldırım, F., Kart Yaşar, K., Şengöz, A., Nazlıcan, Ö., 2004, *Stafilokok* suşlarının fusidik asit ve çeşitli antibiyotiklere direnci, *Ankem Derg.*,18, 105-108.
- Tambic, A., Power, E.G.M., Talsania, H. et al., 1997, Analysis of outbreak of non-phage-typeable methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by using a randomly amplified polymorphic DNA assay. *J. Clin. Microbiol.*, 35, 3092-3097.
- Tambic, A, Power, EGM, Tambic, T, Snur I, French, GL., 1999, Epidemiological analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Zagreb trauma hospital using a randomly amplified polymorphic DNA-typing method. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*,18, 335-40.

- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Archer, G. et al., 1994, Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol., 32, 407-415.
- Thouverez, M., Muller, A., Hocquet, D., Talon, D. and Bertrand, X., 2003, Relationship between molecular epidemiology and antibiotic susceptibility of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a French Teaching Hospital. Med Microbiol., 52, 801-806.
- Topçu, A.W., Söyletir, G., Doğanay, M., 2002, İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi., Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 165, 1507 p.
- Tünger, A., Çavuşoğlu, C., Korkmaz, M., 2003, Mikrobiyoloji, Asya Tıp Yayıncılık, İzmir, 41-50 p.
- Ulusoy S., Stafilokok Enfeksiyonları, Ders Notları, Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları AD., <http://infek.med.ege.edu.tr/dersnotlari/stafinf.pdf>
- van Belkum, A., Bax, R., Peerbooms, P. , Goessens, W. H. F., Leeuwen, N. and Quint, W. G. V., 1993, Comparison of phage typing and DNA fingerprinting by polymerase chain reaction for discrimination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. J. Clin. Microbiol., 31, 798–803.
- van Belkum, A., 1994, DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR. Clin Microbiol Rev., 7, 174–184.
- van Belkum, A., Kluytamans, J., Van Leeuwen, W. et al., 1995, Multicenter evaluation of arbitrarily primed PCR for typing of *Staphylococcus aureus* strains. J. Clin. Microbiol. 33, 1537–1547.
- van der Zee A, Verbakel H, van Zon JC, Frenay I, van Belkum A, Peeters M, Buiting A, Bergmans A., 1999, Molecular genotyping of *Staphylococcus aureus* strains:comparison of repetitive element sequence-based PCR with

various typing methods and isolation of a novel epidemicity marker. *J Clin Microbiol.*, 37, 342 -9.

van Leeuwen, W., Sijmons, M., Sluijs, J. et al., 1996, On the nature and use of Randomly Amplified DNA from *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 34, 2770-2777.

van Leeuwen, W., Verbrugh, H., van der Velden, J. et al., 1999., Validation of binary typing for *Staphylococcus aureus* strains. *J. Clin. Microbiol.* 37, 664-674.

Versalovic, J., Koeuth, T. and Lupski, J.R., 1991, Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.*, 19, 6823–6831.

Waldvogel, F.A., 2000, *Staphylococcus aureus.*, ed: Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R., Principles and Practice of Infectious Diseases, 5th edn. Churchill Livingstone, Philadelphia, 2069 p.

Welsh, J. and McClelland, M., 1990, Fingerprinting genome using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.*, 18, 7213-7218.

Wieser, M. and Busse, H.J., 2000, Rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. *Internation. J. Sys. Evol. Microbiol.* 50, 1087-1093.

Williams, J.G, Kubelik, A.R., Livak, K.J., et al., 1990, DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18:6531-6535.

Zinsser, H., 2005, *Staphylococcus*, *Todar's Online Textbook of Bacteriology*, Kenneth Todar University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology. <http://textbookofbacteriology.net/staph.html>.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı: Neslihan SÜRÜCÜ

Doğum Tarihi: 10. 11. 1982

Doğum Yeri: ANKARA

Tabiiyeti: T.C.

Medeni Hali: Bekar

Adresi:

Ev: Akın cad. Oğuzlar sok. Pınar Apt. No: 148/2 Yenimahalle/ANKARA

İş: Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji

Anabilim Dalı 06532 Beytepe/ANKARA

Telefon-İş: 90 (312) 2978024

Faks : 90 (312) 2992028

E-mail: nsurucu@hacettepe.edu.tr

Yabancı Dil: İngilizce

Eğitim Durumu: Hacettepe Üniversitesi / Ankara, 2004

Özel Bilim Fen Lisesi / Ankara, 2000

Özel Bilim Koleji / Ankara, 1997

2006- : Bilim Uzmanlığı, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü

İlgi Alanları: Tıbbi Mikrobiyoloji, İmmünoloji, Biyoteknoloji.

Ulusal Tebliğler:

SÜRÜCÜ N., SEYİS I., 'Farklı Hastanelerden Toplanan Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus* Suşlarının Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi ve Değerlendirilmesi', 15. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, Antalya, 28-31 Ekim 2007, Sf:63 (Poster Bildiri).

Projeler:

1. 'Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarının tanımlanması ve Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD) PCR analizi ile karşılaştırılması', Öğr. Gör. Işıl SEYİS BİLKAY, H.Ü. Bilimsel Araştırmalar Birimi, Proje no: 0501601007 (Tamamlandı, 2008).
2. 'Çeşitli Klinik İzolatlardan Elde Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarının Farklı PCR Yöntemleri ile Tiplendirilmesi', Prof. Dr. Nilüfer AKSÖZ, H.Ü. Bilimsel Araştırmalar Birimi, Proje No: 08D04601001 (Devam ediyor).

Ulusal Toplantılar:

1. '4. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi', 25-28 Nisan 2008, Sheraton Hotel & Towers, Ankara, izleyici.
2. 'Farklı Hastanelerden Toplanan Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus* Suşlarının Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi ve Değerlendirilmesi', 28-31 Ekim 2007, 15. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi', Antalya, poster bildiri.
3. '4. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kursu', 3-7 Eylül 2007, Turgut Özal Tıp Merkezi, Malatya, kursiyer.
4. 'Real-time PCR kursu', 24-25 Haziran 2008, H.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD Laboratuvarları Morfoloji Binası, Ankara, kursiyer.
5. '5. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi', 24-28 Haziran 2008, Bilkent Otel, Ankara, izleyici.