

T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***Staphylococcus aureus* KÖKENLERİNİN MULTİLOKUS DİZİ  
TİPLENDİRMESİ**

**DOKTORA TEZİ**

Şule KIRCA YILMAZ

Samsun  
Ağustos-2010



T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***Staphylococcus aureus* KÖKENLERİNİN MULTİLOKUS DİZİ  
TİPLENDİRMESİ**

**DOKTORA TEZİ**

Şule KIRCA YILMAZ

Danışman: Yrd.Doç.Dr. İbrahim Çağatay ACUNER

Samsun  
Ağustos-2010

T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bu çalışma jürimiz tarafından **Mikrobiyoloji** programında doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof.Dr.Belma DURUPINAR

OMÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji AD.

Üye: Prof.Dr.Cafer EROĞLU

OMÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji AD.

Üye: Prof.Dr.Hasan BAĞCI

OMÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD.

Üye: Prof.Dr.Rıza DURMAZ

RSHMB Moleküler Mikrobiyoloji  
Referans Laboratuvarı, Ankara

Üye: Yrd.Doç.Dr.Çağatay ACUNER

OMÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji AD.

Tezin Adı: *Staphylococcus aureus* kökenlerinin multilokus dizi tiplendirmesi.

Tezi Teslim Eden: Şule KIRCA YILMAZ

Tez Savunma Sınav Tarihi: 05.Ekim.2010

Tez Danışmanı: Yrd.Doç.Dr.Çağatay ACUNER

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurul'unca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

Prof.Dr.Süleyman KAPLAN

Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, tez çalışmamın planlanması ve yürütülmesinde büyük katkıları olan ve ihtiyaç duyduğum her an yardımcı olan ve yol gösteren değerli hocam Yrd.Doç.Dr. İbrahim Çağatay ACUNER'e, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Belma DURUPINAR'a, Prof.Dr. Murat GÜNAYDIN'a, Prof.Dr. Murat HÖKELEK'e, Prof.Dr. Cafer EROĞLU'na, Doç.Dr. Asuman BİRİNCİ'ye, Doç.Dr. Ahmet Yılmaz ÇOBAN'a, Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı hocalarına,

Başvurumu kabul eden ve laboratuvarlarında çalışmama izin vererek, spaptiplendirme ve MLST testlerini bizzat yapmamı sağlayan Robert Koch Enstitüsü'nden Prof.Dr. Wolfgang WITTE ve Dr. Birgit STROMMENGER'e ve laboratuvar çalışanlarına,

Tezimin istatistik analiz aşamasındaki yardımlarından dolayı Prof.Dr. Yüksel BEK'e,

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum araştırma görevlisi arkadaşlarıma ve Mikrobiyoloji Anabilim Dalı personeline,

Hayatım boyunca sonsuz özveri ve hoşgörü ile beni bugünlere getiren, varlıkları ile bana güç veren canım anneme ve canım babama, her zaman yanımda olan biricik kardeşime, sevgisini ve desteğini esirgemeyen sevgili eşime,

SONSUZ TEŞEKKÜRLER...

Bu çalışma, OMÜ-BAP T-500 numaralı proje ile desteklenmiştir.

**ÖZET**  
***Staphylococcus aureus* KÖKENLERİNİN MULTİLOKUS DİZİ**  
**TİPLENDİRMESİ**

**Şule KIRCA YILMAZ, Doktora Tezi**  
**Ondokuz Mayıs Üniversitesi Samsun, Ağustos-2010**

*Staphylococcus aureus* hastane kökenli ve toplum kökenli çeşitli infeksiyonlara yol açan önemli bir insan patojenidir. Hastanelerde ve toplum içinde metisilin-dirençli *S. aureus* (MRSA) epidemik kökenlerinin prevalansındaki artış infeksiyon kontrol önlemleri açısından büyük önem taşımaktadır. Hedeflenen kontrol önlemlerinin alınması için MRSA' nın genotiplendirilmesi gereklidir.

Bu çalışmanın temel amacı; multi-lokus dizi tiplendirme (MLST) ile *Staphylococcus aureus* bölgesel suşlarının uzun dönemli epidemiyolojik ve evrimsel ilişkilerinin belirlenmesidir.

OMÜ-SUVAM (Ondokuz Mayıs Üniversitesi-Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi) hastanesi, Türkiye'nin kuzeyinde Karadeniz kıyı bölgesinde yer alan ve Samsun ve çevresindeki 3,665,000 kişilik nüfusa hizmet eden bir bölge hastanesi niteliğindedir. Bölgedeki komşu illerden (Ordu, Tokat, Çorum, Amasya ve Sinop) çok sayıda hasta kabul edildiğinden izolat örnekleme tüm bölgeyi temsil etmektedir. OMÜ-SUVAM hastanesine kabul edilen yatan hastalardan Aralık 2006-Şubat 2007 tarihleri elde edilen izolatlar prospektif olarak, ardışık ve tekrarlı olarak toplandı. Çalışmaya, İnfeksiyon Kontrol Komitesi tarafından kolonizasyon veya nozokomiyal infeksiyon tanısı alan hastalardan izole edilen MRSA izolatları ( $n=48$ ) ve yalnızca nozokomiyal infeksiyon tanısı alan hastalardan izole edilen MSSA (metisilin-duyarlı *S. aureus*) izolatları ( $n=7$ ) olmak üzere, toplamda, 55 izolat dahil edildi. İzolatların klonal ilişkileri, PFGE (pulsed-field gel electrophoresis), *spa* (stafilokokal protein A) tiplendirme ve MLST ile araştırıldı.

PFGE sonuçlarının analizi ile MRSA izolatlarında 14 farklı pulsotip ortaya çıktı. MSSA izolatlarının ise, her birinin ayrı bir pulsotip paternine sahip olduğu görüldü. MRSA izolatları arasında, ikisi hariç hepsi t30 *spa* tipindeydi. Farklı *spa* tiplerinin multilokus dizi analizi sonucunda tek sekans tipi (ST239) belirlendi. MSSA izolatları arasında, 7 farklı *spa* tipi ve 7 farklı sekans tipi saptandı. Bu çalışmanın sonucunda, nozokomiyal MSSA izolatlarının uzun dönemli klonal çeşitlilik sergilediği ve hastanemizdeki hiper-endemik çevre ortamında, kolonize olan ve nozokomiyal enfeksiyona maruz kalan hastalarda, uzun süredir baskın olan MRSA klonunun, beş büyük pandemik MRSA klonundan biri olan, epidemik ST239 klonu olduğu belirlendi.

Bu çalışmanın sonuçları, çeşitli nozokomiyal enfeksiyonlara yol açan *Staphylococcus aureus* kökenlerinin, lokal (bölgesel), ulusal ve uluslararası uzun dönemli surveyansı için temel oluşturmaktadır.

Anahtar Sözcükler: *Staphylococcus aureus*, dizi analizi, moleküler epidemiyoloji

**ABSTRACT**  
**MULTILOCUS SEQUENCE TYPING of *Staphylococcus aureus* STRAINS**

**Şule KIRCA YILMAZ, Ph.D. Thesis**

**University of Ondokuz Mayıs, Samsun, August-2010**

*Staphylococcus aureus* is an important human pathogen causing various healthcare-associated and community-acquired infections. The increase in the prevalence of epidemic strains of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in hospitals and even in community require special attention of infection control. Genotyping of MRSA is important for targeted control measures.

The main objective of this study is to determine lacking recent evolutionary history of the biogeographically local strains of *Staphylococcus aureus* through their characterization by the use of multi-locus sequence typing (MLST).

OMU-SUVAM university hospital is the most advanced in the province Samsun and its hinterland serving a total population of ca. 3,665,000 at the Black Sea shore region of north Turkey. Many patients from the neighbouring 5 cities (namely Ordu, Tokat, Çorum, Amasya, and Sinop) of the region are being admitted to the hospital. Thus, the sources of the isolate sampling is representative of the region. *Staphylococcus aureus* strains isolated from the specimens of the inpatients who have admitted to the inpatient clinics of OMU-SUVAM were collected prospectively, sequentially (*i.e.* non-selected), and non-repetitively. A total of 55 *S. aureus* isolates, including 48 of MRSA and 7 of MSSA, were used in this study. The clonal relationship of the isolates was investigated by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) typing, *spa* typing and MLST.

According to the analysis of PFGE results 14 different pulsotypes were determined for MRSA strains and all of seven MSSA strains had different PFGE patterns. All of the MRSA strains except for two, were t30 by *spa* typing. ST239 was the only sequence type among the MRSA strains. All of the MSSA strains were of different sequence types by *spa* typing and MLST. In conclusion, ST239, one of the five



major globally epidemic MRSA clones, was the evolutionarily long-term predominant clone circulating in our hospital in a hyper-endemic setting.

The results of this study provide the local baseline information for local and national long-term surveillance of the *Staphylococcus aureus* strains that are responsible for various significant healthcare associated infections.

Key Words: *Staphylococcus aureus*, sequence typing, molecular epidemiology

**SİMGELER VE KISALTMALAR**

ark: Arkadaşları

Bp: “Base pair”, Baz çifti

BSA: “Bovine serum albumin”, Sığır serum albumini

BURP: “Based upon related patterns”

BURST: “Based upon related sequence types”

C: Kolonizasyon

CC: Klonal kompleks

°C: Santigrad derece

CAPD: “Continuous ambulatory peritoneal dialysis”, Sürekli ayaktan periton diyalizi

DNA: Deoksiribonükleik asit

DNaz: Deoksiribonükleaz

dNTP: Deoksiribonükleozit trifosfat

ddNTP: Dideoksiribonükleozit trifosfat

EDTA: Etilen diamin tetra asetik asit

f: “Forward”, İleri

Fc: “Fragment crystallizable”, Kristalize olabilen parça

HIV: “Human immunodeficiency virus”, İnsan immünyetmezlik virüsü

HK-MRSA: Hastane kökenli MRSA

HST: Hücre süspansiyon tamponu

Ig: İmmünglobulin

IV: İntravenöz

İKK: İnfeksiyon kontrol komitesi

Kb: Kilobaz

MLEE: Multilokus enzim elektroforezi

MLST: “Multilocus sequence typing”, Multi lokus dizi tiplendirme

mL: Mililitre

mM: Milimolar

MRSA: Metisilin-dirençli *S. aureus*

MSSA: Metisilin-duyarlı *S. aureus*

NCTC: “National collection of type cultures”, Ulusal tip kültür koleksiyonu

NI: Nozokomiyal infeksiyon

nm: Nanometre

PBP: Penisilin bağlayan protein

PCR: "Polymerase Chain Reaction", Polimeraz zincir reaksiyonu

PFGE: "Pulsed field gel electrophoresis", Atım (değişken) alanlı jel elektroforezi

pH: "Potentia hydrogenii", Hidrojen iyon konsantrasyonu

r: "Reverse", Geri

RNA: Ribonükleik asit

rpm: "Revolutions per minute", Dakikadaki devir sayısı

S: "Smooth", Düzgün

SAPI: Standardize antibiyotik fenotip indeksi

SCC*mec*: "Staphylococcal cassette chromosome *mec*", Stafilokokal kaset kromozom  
*mec*

SLST: "Single locus sequence typing", Tek lokus dizi tiplendirme

SLV: "Single locus variant", Tek lokus varyantı

spa: Stafilokokal protein A

ST: Sekans tipi

TBE: Tris-borik asit-EDTA

TE: Tris HCl-EDTA

TK-MRSA: Toplum kökenli MRSA

TŞST-1: Toksik şok sendromu toksini-1

UPGMA: "Unweighted pair group method with mathematical averaging",

Ağırlıklandırılmamış çift gruplarının matematik ortalama ile oluşturulması  
yöntemi

UV: Ultraviole

V: Volt

µL: Mikrolitre

**İÇİNDEKİLER**

	<b>Sayfa</b>
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
İÇİNDEKİLER	x
ŞEKİL LİSTESİ	xii
TABLO LİSTESİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Stafilokoklar	4
2.1.1. Tarihçe	4
2.1.2. Morfoloji ve Biyokimyasal Özellikler	4
2.1.3. Virulans ve Patojenite	5
2.1.3.1. Kapsüler Polisakkarit	5
2.1.3.2. Peptidoglikan	6
2.1.3.3. Teikoik Asit	6
2.1.3.4. Protein A	6
2.1.3.5. Enzimler	6
2.1.3.6. Toksinler	7
2.1.4. Tanımlama	8
2.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	9
2.2.1. Epidemiyoloji	9
2.2.2. Metisilin Direnci	11
2.3. Hastane İnfeksiyonlarının Kontrolünde Moleküler Tekniklerin Yeri	16
2.3.1. Moleküler tiplendirme çalışmalarında kullanılan bazı terimler	19
2.4. DNA Dizi Analizi	20
2.4.1. Multilokus Dizi Tiplendirme (MLST)	23
2.4.2. <i>spa</i> Tiplendirme	27
2.5. PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis)	29
2.5.1. Tenover, modifiye Tenover ve ESGEM Kriterleri	31

3. GEREÇ VE YÖNTEM	33
3.1. <i>S. aureus</i> İzolatlarının Tanımlanması	33
3.2. Besiyerleri ve Tamponlar	33
3.3. <i>S. aureus</i> Bakteri Hücrelerinden DNA Ekstraksiyonu	34
3.3.1. DNA'nın Görüntülenmesi	35
3.4. <i>spa</i> Tiplendirme	36
3.4.1. PCR Yöntemiyle <i>spa</i> Geninin Amplifikasyonu	36
3.4.2. Agaroz Jel Elektroforezi	36
3.4.3. PCR Purifikasyonu	37
3.4.4. <i>spa</i> Sekans Reaksiyonları	38
3.5. Multilokus Dizi Analizi	39
3.5.1. PCR Yöntemiyle "Housekeeping" Genlerinin Amplifikasyonu	39
3.5.2. Agaroz Jel Elektroforezi	40
3.5.3. PCR Purifikasyonu	40
3.5.4. MLST Sekans Reaksiyonları	41
3.6. PFGE Yöntemi ile Tiplendirme	42
3.6.1. İzolatların hazırlanması	42
3.6.2. İzolatların Agaroz Gömülmesi	42
3.6.3. Agaroz İçindeki Hücrelerin Parçalanması	42
3.6.4. Agaroz Kalıpların Yıkanması	43
3.6.5. DNA'nın RE ile Kesilmesi	43
3.6.6. Elektroforez Jelinin Hazırlanması ve Kalıpların Jele Yüklenmesi	43
3.6.7. Elektroforez	44
3.7. İstatistik Analiz	45
4. BULGULAR	46
5. TARTIŞMA	54
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	60
KAYNAKLAR	62
ÖZGEÇMİŞ	70

**ŞEKİL LİSTESİ**

	<b>Sayfa</b>
<b>Şekil 1.</b> mlst. net web sayfası	25
<b>Şekil 2.</b> MLST prosedürünün şematik sunumu	26
<b>Şekil 3.</b> Protein A geninin haritası	28
<b>Şekil 4.</b> QIAquick 8 purifikasyon kiti prosedürü	37
<b>Şekil 5.</b> QIAvac 6S Cihazı	37
<b>Şekil 6.</b> MRSA izolatlarının SmaI makrorestriksiyon analizi ile elde edilen DNA paternlerinin Dice benzerlik katsayısı kullanılarak çizilen dendrogramı	47
<b>Şekil 7.</b> MSSA izolatlarının PFGE ile elde edilen bant paternleri	51

**TABLO LİSTESİ**

	<b>Sayfa</b>
<b>Tablo 1.</b> <i>S. aureus</i> 'ta tanımlanan SCC <i>mec</i> tipleri	14
<b>Tablo 2.</b> PFGE ve PCR-tabanlı tiplendirme yöntemlerinin prosedür özelliklerinin karşılaştırılması	32
<b>Tablo 3.</b> <i>spa</i> sekans reaksiyon karışımı	38
<b>Tablo 4.</b> Housekeeping genler için sekans reaksiyon karışımı	41
<b>Tablo 5.</b> MRSA izolatlarının özellikleri	48
<b>Tablo 6.</b> MRSA izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları	49
<b>Tablo 7.</b> MSSA izolatlarının özellikleri	51
<b>Tablo 8.</b> MSSA izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları	51
<b>Tablo 9.</b> Fenotip, genotip ve infeksiyon durumuna göre MRSA (sporadik olmayan) izolat grupları	53

## 1. GİRİŞ

*Staphylococcus aureus* hem toplum kökenli hem de nozokomiyal infeksiyonlara yol açan önemli bir bakteriyel patojendir (Cho ve ark., 2006). Bu mikroorganizmanın geliştirdiği direnç mekanizmaları nedeni ile kullanılmaya başlanan yarı sentetik tedavi ajanlarından biri olan metisilin 1959-1960'ta klinik kullanıma girmiş ve bir yıl içinde metisiline dirençli izolatlar bildirilmiştir (Kılıç ve ark., 2005; Gordon ve Lowy, 2008). Metisiline dirençli izolatların neden olduğu ciddi infeksiyonların tedavisinde uzun yıllar glikopeptidler kullanılmıştır. Ancak 1997 yılında Japonya'dan vankomisine duyarlılığı azalmış bir *S. aureus* kökeni ve ABD'den vankomisine dirençli ilk *S. aureus* kökeni bildirilmiştir (Ulusoy, 2009). Özellikle son birkaç dekatta birçok ülkede metisilin-dirençli *Staphylococcus aureus* infeksiyonları artış göstermiştir (Cho ve ark., 2006). Akdeniz ülkelerini kapsayan bir çalışmada, 2003-2005 arasında 36 aylık bir dönemde kan kültürlerinden elde edilen invazif *S. aureus* izolatlarının duyarlılık test sonuçlarına göre; MRSA oranlarının Kıbrıs ve Ürdün'de ~%55, Malta'da %50, Fas'ta ve Tunus'ta ~%20, Türkiye'de ise ~%40 olduğu gösterilmiştir (Borg ve ark., 2007). Türkiye'de 1997-2006 yılları arasında çeşitli merkezlerde yapılan çalışmalarda MRSA oranları %25-61 olarak bildirilmiştir (Gönüllü, 2008). MRSA infeksiyonları morbidite ve mortalitenin artmasına, hastanede kalış süresinin uzamasına ve sağlık kuruluşlarının ekonomik yükünün artmasına neden olur (Wisplinghoff ve ark., 2005). Rubin ve ark.'nın (1999) araştırmasında MRSA ile infekte bir hastanın tedavi maliyetinin MSSA ile infekte bir hastanın tedavi maliyetinden 2500 \$ daha yüksek olduğu gösterilmiştir.

MRSA'nın saptanmasından sonra bulaş yollarının gösterilmesi ve infeksiyon kontrol önlemlerinin etkili olup olmadığının belirlenmesi için genetik tiplendirmeye ihtiyaç duyulur. Birçok farklı genotiplendirme yönteminin kullanımında olmasına karşın, PFGE ile genomik DNA'nın SmaI makrorestriksiyon analizi oldukça tercih edilen bir yöntemdir. *spa* tiplendirme ve multilokus dizi tiplendirme gibi dizi analizi teknikleri MRSA'nın büyük veritabanlarının oluşmasını sağlamıştır. *spa* geninin sekans polimorfizminin belirlenmesi; yüksek verim kapasitesi, tekrarlanabilirlik ve verilerin



taşınabilir ve karşılaştırılabilir olması sebebiyle halen en popüler MRSA tiplendirme yöntemidir (te Witt ve ark., 2010).

*S. aureus* salgınları çoğunlukla belirli bir suşun klonal yayılımından kaynaklanır (Witte ve ark., 2006; DeLeo ve Chambers, 2009). Epidemiyolojide tiplendirmenin amacı; epidemik klonu epidemiyolojik olarak ilişkisiz suşlardan ayırmaktır (Struelens, 1998; Witte ve ark., 2006). Moleküler epidemiyolojik tiplendirme yöntem ve tekniklerinde bulunması ve saptanması istenen ideal ve temel özellik şudur; türaltı düzeyde aynı hedef popülasyonun epidemik suşları arasında stabil kalan özelliğin, epidemik olarak ilişkili olmayan diğer suşlarda çeşitlilik göstermesi istenir. Tiplendirilebilirlik derecesinin yüksek olması için tiplendirmede kullanılan özellik, tür içindeki izolatların tamamına yakınında gösterilebilir olmalıdır. Tiplendirme sonuçları, aynı izolat için tekrarlanan testlerde aynı zamanda salgın sırasında ve farklı laboratuvarlarda tekrarlanabilir olmalıdır (van Belkum, 2003; Witte ve ark., 2006; van Belkum ve ark., 2007). PFGE, *spa* tiplendirme, *SCCmec* tiplendirme ve MLST, MRSA izolatlarının epidemik özelliklerinin belirlenmesinde kullanılan moleküler tekniklerdir (Wisplinghoff ve ark., 2005). Özellikle MLST, *S. aureus*'un zaman boyutu bakımından uzun-dönemdeki ve fiziksel biyocoğrafya boyutu bakımından büyük coğrafi bölgelerdeki epidemiyolojisini ve evrimini gösterebilen ve bu amaçlara yönelik araştırmalarda kullanılabilen önemli bir moleküler epidemiyolojik tiplendirme aracıdır (Jolley ve ark., 2001; Cookson ve ark., 2007).

Bu çalışmanın temel amacı; metisilin-dirençli *Staphylococcus aureus* infeksiyonları bakımından hiper-endemik bir çevre ortamı durumunda olan OMÜ-SUVAM hastanesi ve hizmet sunduğu bölge için, infeksiyon kontrolüne yönelik çalışmalarda kullanılmak üzere, lokal, ulusal ve global ölçekte karşılaştırılabilir olan ve uzun-dönemli epidemiyolojik bilgi veren temel surveyans verilerini sağlamaktır. Bu amaçla, OMÜ-SUVAM hastanesinde izole edilen *Staphylococcus aureus* kökenlerinde, zaman boyutu bakımından göreceli olarak daha kısa dönemli epidemiyolojik bilgi sağlayan PFGE ve *spa* tiplendirme tekniklerine ek olarak, özellikle uzun dönemli epidemiyolojik bilgi sağlayan MLST yöntemi kullanılarak, hastanemiz ve bölgemiz ile ilgili eksiksiz, saklanabilir, taşınabilir ve karşılaştırılabilir nitelikte moleküler

epidemiyolojik veri elde edilmiştir. Elde edilen veriler, uluslararası moleküler epidemiyolojik veritabanlarına girilerek aynı laboratuvarlarda farklı dönemler arasında ve aynı dönemde veya farklı dönemlerde farklı laboratuvarlar arasında, lokal, ulusal veya global ölçekte yapılacak karşılaştırmalı epidemiyolojik veya evrimsel çalışmalarda kullanıma hazır olması sağlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Stafilokoklar

#### 2.1.1. Tarihçe

Stafilokokları ilk kez 1878'de Robert Koch tanımlamış, 1880'de Pasteur sıvı besiyerinde üretmiştir. 1881'de Alexander Ogston, insan abse materyalinden elde ettiği bakteriyi "*staphylococcus*" olarak adlandırmıştır, fare ve kobaylar için patojen olduğunu vurgulamıştır. *Staphylococcus* terimi, Yunanca'da üzüm salkımı anlamına gelen "staphyle" kelimesinden türetilmiştir. Rosenbach 1884'te beyaz renkli kolonileri *S. albus*, sarı-portakal rengi kolonileri ise *S. aureus* olarak isimlendirmiştir (Cengiz, 1999; Tünger, 2004; Bannerman ve Peacock, 2007).

#### 2.1.2. Morfoloji ve Biyokimyasal Özellikler

Stafilokoklar, 0.5-1.5 µm çapında, kok morfolojisinde, hareketsiz, sporsuz, Gram pozitif boyanan bakterilerdir. Birden fazla düzlemde bölünerek çoğalmalarından dolayı üzüm salkımına benzer kümeler oluştururlar. Ancak tekli, ikili, dörtlü veya kısa zincirler şeklinde de görünebilirler. *S. aureus* subsp. *anaerobius* ve *S. saccharolyticus* dışında fakültatif anaeropturlar. Katalaz pozitif ve oksidaz negatif özellik gösterirler, lizostafine duyarlıdırlar (Tünger ve ark., 2005; Winn ve ark., 2006; Plata ve ark., 2009).

Genellikle %7.5-10 sodyum klorür içeren basit besiyerlerinde kolaylıkla ürerler; üremek için çeşitli aminoasitlere ve B vitaminlerine gereksinim duyarlar (Cengiz, 1999; Plata ve ark., 2009). Kanlı agarda 18-24 saatte yuvarlak, düzgün, 1-4 mm çapında, hafif konveks, beta-hemolitik veya non-hemolitik koloniler oluştururlar. Optimal üreme ısıları 30-37°C, optimal pH:7-7.5'tir. 18-40°C gibi geniş bir ısı aralığında üreyebilen bakterilerdir. Gliserol monoasetat gibi yağ asitleri ile zenginleştirilmiş besiyerinde 37°C'de üretildiklerinde, karotenoidlerinden dolayı pigment oluştururlar. Anaerob koşullarda ve buyyonda pigment yapmazlar. *S. aureus* altın sarısı, *S. epidermidis* tebeşir beyazı renginde koloniler oluşturur (Cengiz, 1999; Winn ve ark., 2006).

Stafilokoklar, başta glukoz olmak üzere maltoz, laktoz, fruktoz gibi karbonhidratları gaz oluşturmada fermentatif olarak parçalarlar ve son ürün olarak laktik asit yaparlar. *S. aureus*, koagülaz ve DNaz pozitif olması, mannitolü fermente etmesi ile diğer stafilokok türlerinden ayrılır (Cengiz, 1999; Bannerman ve Peacock, 2007). Ayrıca 1.7 molara kadar yüksek sodyum klorür konsantrasyonlarına toleranslıdır (Plata ve ark., 2009).

### 2.1.3. Virulans ve Patojenite

*S. aureus*, virulansı en yüksek olan stafilokok türüdür. Bakterinin virulans faktörleri ile konak savunma sistemi arasındaki ilişkiye bağlı olarak infeksiyon meydana gelir (Cohen, 1986).

#### ***S. aureus* virulans faktörleri**

- Kapsül
- Peptidoglikan
- Teikoik asit
- Protein A
- Enzimler (katalaz, koagülaz, fibrinolizin, hyaluronidaz, lipaz, nükleaz, penisilinaz)
- Toksinler
- Sitotoksinler [Hemolizinler ( $\alpha$  hemolizin,  $\beta$  hemolizin,  $\sigma$  hemolizin,  $\gamma$  hemolizin, lökosidin)]
- Eksfoliyatif toksin, enterotoksinler, toksik şok sendromu toksini-1 (TŞST-1)

#### 2.1.3.1. Kapsüler Polisakkarit

*S. aureus*'un mukoid suşlarında polisakkarit yapıda mikrokapsül bulunmaktadır. Kapsül; bakteriyi fagositozdan korur, konak hücrelere ve kateter gibi yabancı cisimlere tutunmasını sağlar. *S. aureus*'ta 11 kapsüler serotip tanımlanmıştır. Klinik izolatların çoğunda serotip 5 veya 8 bulunmuştur. Serotip 8 toksik şok sendromu toksini üretimi ile de ilişkilidir (Branger ve ark., 1990; Winn ve ark., 2006; Bannerman ve Peacock, 2007).

### 2.1.3.2. Peptidoglikan

Hücre duvarı kuru ağırlığının yaklaşık %50'sini oluşturmaktadır. Hücre duvarına sağlamlık ve esneklik verir. Endotoksin benzeri aktiviteye sahiptir; makrofajlardan sitokin salınımını uyarır, kompleman aktivasyonuna yol açar, ayrıca monositlerden interlökin-1 üretimini sağlar, polimorfonükleer lökositlerin infeksiyon bölgesine toplanmalarına ve sonuçta abse oluşumuna neden olur (Tünger, 2004; Winn ve ark., 2006).

### 2.1.3.3. Teikoik Asit

Türe özgü şeker-alkol-fosfat polimerleridir. Hücre yüzeyinde yer alan teikoik asit bakteriye antijenik özellik kazandırır. *S. aureus* 'ta ribitol teikoik asit *S. epidermis*'te gliserol teikoik asit bulunur. Teikoik asit gram pozitif bakterilerin mukozal yüzeylere spesifik olarak tutunmasını sağlar (Winn ve ark., 2006; Bannerman ve Peacock, 2007).

### 2.1.3.4. Protein A

*S. aureus* 'un hücre duvarında; peptidoglikan yapının en dışında yer alır. IgG3 dışındaki tüm IgG, IgA2 ve bazı IgM'lerin Fc parçaları ile reseptörleri ile bağlanma yeteneğindedir. Bakteriyi fagositoza karşı korur, komplemanı aktive eder, erken ve gecikmiş tip hipersensitivite reaksiyonlarına neden olur (Cengiz, 1999; Bilgehan, 2000).

### 2.1.3.5. Enzimler

**Katalaz:** Tüm stafilokoklar, toksik hidrojen peroksiti toksik olmayan oksijen ve suya ayırdıran katalaz enzimi üretir. Katalaz, fagosite edilmiş bakterinin oksijen radikalleri ile öldürülmesini engelleyerek konak savunma mekanizmasını bozar (Bannerman ve Peacock, 2007).

**Koagülaz:** Ekstrasellüler bir proenzimdir. Coagulase-Reacting Factor (CRF) ile birleşerek aktif duruma geçer ve plazmayı pıhtılaştırır. Koagülaz pozitif stafilokokların üzerinde oluşan kalın fibrin tabakasının, bakteriyi fagositoza karşı koruyarak patojenliğe katkı yaptığı ileri sürülmektedir (Cengiz, 1999).

**Fibrinolizin:** Stafilokinaz adı da verilir. Hemen hemen tüm *S. aureus* suşları tarafından üretilen fibrinolizin fibrin ağını eriterek infeksiyonun dokulara yayılmasına sebep olur.

**Hyaluronidaz:** Baę dokusundaki hyaluronik asiti hidrolize ederek bakterinin dokuda yayılımını kolaylaştırır.

**Lipaz:** Lipidleri hidrolize ederek stafilokokların yağlı deride yerleşmesini sağlar (Tünger ve ark., 2005; Winn ve ark., 2006).

**Nükleaz:** *S. aureus*'ların %90-96'sında bulunan ısıya dirençli bir fosfodiesterazdır (Cengiz, 1999).

**Penisilinaz:**  $\beta$ -laktamaz olarak da bilinir, *bla* geni tarafından kodlanır. Penisilinin hücre duvarı prekürsörlerine bağlanmasını engelleyerek bakteri hücre duvarı sentezinin inhibisyonunu önler (Farley, 2008). Penisilinin klinik kullanıma girdiği dönemlerde hemen hemen tüm stafilokok suşları penisiline duyarlı iken penisilinaz sayesinde bugün stafilokokların %90'ından fazlası penisiline dirençlidir (Dünder, 2000; Bannerman ve Peacock, 2007).

### 2.1.3.6. Toksinler

**Alfa hemolizin:** 33000 dalton ağırlığında bir polipeptiddir. Eritrosit, lökosit, hepatosit, trombosit gibi birçok hücreye ve hücre kültürlerine toksik etki gösterir. Tavşan eritrositlerine hemolitik aktivitesi en fazladır, insan eritrositlerine fazla bir etkisi yoktur. İnsan makrofajları ve trombositleri üzerine litik etkisi vardır (Cengiz, 1999; Bilgehan, 2000; Murray ve ark., 2002).

**Beta hemolizin:** 35000 Dalton ağırlığında ısıya duyarlı bir proteindir. Stafilokokal sfingomyelinazdır. Fibroblast, makrofaj, lökosit ve eritrositlere toksik etki gösterir. En iyi koyun daha az olarak da insan ve tavşan eritrositlerini eritir (Cengiz, 1999; Murray ve ark., 2002).

**Gama hemolizin:** İnsan, tavşan ve koyun eritrositlerine etkilidir.

**Delta hemolizin:** 103000 Dalton ağırlığında olup eritrosit, lökosit, makrofaj, lenfosit ve trombositleri hasara uğratan bir proteindir. İnsan, tavşan, koyun ve maymun eritrositlerini eritir.

**Lökosidin:** Elektroforetik olarak birbirinden ayrı iki protein komponentinden (F: Fast ve S: Slow) oluşmuştur. Her iki komponent de antijeniktir ve toksoide dönüştürülebilir. Lökosidin; lökositler ve makrofajlar üzerine litik etkilidir (Cengiz, 1999; Murray ve ark., 2002).

**Eksfoliyatif toksin:** Ekzotoksin niteliğinde bir proteindir. Antijenik ve biyokimyasal yapıları farklı iki tipi bulunmuştur; eksfoliyatif toksin A ve eksfoliyatif toksin B. Stafilocok infeksiyonlarının veziküler ve eksfoliyatif deri lezyonlarından sorumludur (Tünger, 2004).

**Enterotoksinler:** Isıya dirençli, 100°C'ye 30 dakika dayanabilen polipeptid yapısında maddelerdir. Isıya dayanıklı olduğu için kısa süreli pişirmede tahrip olmazlar. Özellikle yüksek CO<sub>2</sub>'li ortamda, karbonhidratlı ve proteinli besiyerlerinde üreyen stafilocoklar tarafından oluşturulurlar; gıda zehirlenmesine yol açarlar (Waldvogel, 2000).

**TŞST-1:** Özellikle, menstruasyon döneminde vajinal tampon kullanan kadınlarda ve yara infeksiyonu olan kişilerde toksik şok sendromuna neden olur (Jawetz ve Levinson, 2008).

#### 2.1.4. Tanımlama

Stafilocokların tümü gram pozitif boyanır. Stafilocoklar ve mikrokoklar, katalaz testi ile enterokokoklar ve streptokoklardan ayrılır. Pigment oluşumunun tanıda fazla önemi yoktur. Stafilocoklar, glukozlu oksidasyon fermentasyon besiyerinde fermentatif etki gösterirler. Kanlı agarda tipik *S. aureus* kolonileri; beta hemoliz zonu bulunan, altın sarısı renge düz, konveks kolonilerdir. *S. aureus*'un bütün suşları koagülaz pozitifdir ve manitolü fermente eder. Bu özelliklerin dışında tanıda yüksek tuz konsantrasyonlu ortamda üreme, protein A, termostabil nükleaz gibi basit testler kullanılır (Cengiz, 1999; Winn ve ark., 2006; Bannerman ve Peacock, 2007; Forbes ve ark., 2007).

## 2.2. *Staphylococcus aureus*

### 2.2.1. Epidemiyoloji

*Staphylococcus aureus*, stafilokoklar arasında en önemli insan patojenidir (Winn ve ark., 2006). Gerek toplum gerekse hastane kökenli infeksiyonların en sık karşılaşılan etkenlerindendir (Ulusoy ve Arda, 2003). Her ne kadar normal floranın bir üyesi de olsa uygun koşullarda fırsatçı infeksiyonlara neden olabilir (Winn ve ark., 2006). Toksin üretimi ya da direkt invazyon ve doku hasarı ile hastalığa yol açar (Murray ve ark., 2002).

Doğumdan itibaren *S. aureus* göbek, perine ve deriye kolonize olur. Daha sonraki yıllarda özellikle burunda yerleşir. İnsanların %20 kadarı sürekli taşıyıcı durumundadır. Doğurgan çağıdaki kadınların %10'unun vajeninde bulunur. Rektal, faringeal, aksillar ve perineal taşıyıcılık da söz konusudur.

İnsülin enjeksiyonu olan diyabet hastaları, kronik hemodiyaliz ve CAPD hastaları, kronik dermatolojik hastalıkları olanlar, IV ilaç alışkanlığı olanlar ve HIV pozitif kişilerde taşıyıcılık ve infeksiyon oranı daha fazladır. Taşıyıcılar travma, cerrahi ve diğer riskli durumlarda taşıyıcı olmayanlara göre çok daha yüksek oranda infeksiyon riski taşırlar (Dündar ve Öztürk Dündar, 2008).

- Lökosit kemotaksisinde konjenital defektler (Wiskott-Aldrich sendromu, Down sendromu, Job sendromu ve Chediak-Higashi sendromu gibi) veya kazanılmış defektler (diabetes mellitus, romatoid artrit gibi),
- Konjenital veya kazanılmış hipogamaglobulinemilere ya da kompleman komponenti (özellikle C3 ve C5) eksikliklerine ve defektlerine sekonder gelişen antikor opsonizasyonundaki defektler,
- Bakterilerin fagositozu takiben intrasellüler öldürülmesindeki defektler,
- Yanık, cerrahi insizyon, ekzema gibi deri hasarları, yabancı cisim varlığı, diğer etkenlerle infeksiyon (özellikle virüslerle)
- Malignensi, alkolizm ve kalp hastalığı gibi altta yatan kronik hastalıklar,
- Terapötik veya profilaktik antimikrobiyal kullanımı ciddi *S. aureus* infeksiyonlarına zemin hazırlayan faktörlerdendir (Winn ve ark., 2006).



*S. aureus*, Gram pozitif bakterilere bağı bakteremilerin en sık etkeni olmasının yanısıra deri ve yumuşak doku infeksiyonları, cerrahi alan infeksiyonları, pnömoni ve ampiyem, osteomyelit ve septik artrit, endokardit gibi çok sayıda ciddi infeksiyonlara da neden olabilmektedir (Ulusoy ve Arda, 2003). Hastane kökenli infeksiyona neden olan metisilin-dirençli *S. aureus* (HK-MRSA) izolatları sıklıkla bakteremi, pnömoni ve yara infeksiyonlarından elde edilir. Yabancı cisimler, uzamış yatış süresi ve uzun dönem antibiyotik kullanımı MRSA kaynaklı hastane infeksiyonları için risk faktörleridir. Toplum kökenli MRSA (TK-MRSA) izolatları 1980'lerde ortaya çıkmıştır ve ABD, Avrupa ve Avustralya'da endemik hale gelmiştir. Yakın temas gerektiren spor dalları ile uğraşanlar, askeri personel, IV ilaç bağımlıları, hapisane mahkumları, Aborjinler, sosyo-ekonomik düzeyi düşük olanlar TK-MRSA için risk altındaki gruplardır (Wijaya ve ark., 2006). TK-MRSA izolatları  $\beta$ -laktam antibiyotikler dışındaki antibiyotiklere daha duyarlı olmaları, genotiplerinin farklı oluşu ve farklı *SCCmec* tipine ve Panton-Valentine lökosidini olarak adlandırılan virulans faktörüne sahip olmaları ile HK-MRSA izolatlarından ayrılırlar. Septik artrit, bakteremi, toksik şok sendromu, nekrotizan fasiit, nekrotizan pnömoni, deri ve yumuşak doku infeksiyonlarından izole edilmişlerdir (Carvalho ve ark., 2010).

*S. aureus* infeksiyonları bakterinin dış ortamdan alınmasıyla ya da daha sıklıkla kolonizasyon sonucunda ortaya çıkar (Liu, 2009). Büyük örnek popülasyonları ile yapılan çalışmalarda toplumdaki MRSA kolonizasyonunun %0.26-9.2 arasında değiştiği gösterilmiştir. MRSA kolonizasyonu aylarca hatta yıllarca devam edebilir; deri bütünlüğünün bozulması, en az iki vücut bölgesinde kolonizasyon varlığı ve florokinolon kullanım öyküsü kolonizasyon süresini artıran risk faktörleridir (Farley, 2008).

### 2.2.2. Metisilin Direnci

Penisilinin ortaya çıkışına kadar, *S. aureus* ile infekte hastaların mortalite oranı yaklaşık %80 idi. 1940'ların başlarında, *S. aureus* infeksiyonları penisilinle tedavi edilmiştir fakat 1942'de önce hastanelerde daha sonra toplum içinde ilk dirençli izolatlar ortaya çıkmıştır (Deurenberg ve ark., 2007). Bu direnç, penisilin hidrolize-eden enzim (penisilinaz) kodlayan bir plazmidin kazanılmasıyla ortaya çıkmıştır. Epidemik klonlar, 1950'li yıllarda birbiri ardına penisilin G, streptomisin, kloramfenikol, oksitetrasiklin ve daha sonra da makrolidlere direnç kazanmıştır (Gülay, 2008). 1960'tan bu yana, tüm *S. aureus* izolatlarının yaklaşık %80'i penisiline dirençli hale gelmiştir (Deurenberg ve ark., 2007).

1960'lı yıllarda penisilin-dirençli *S. aureus* infeksiyonlarının tedavisi için oksasilin ve metisilin gibi semisentetik, penisilinaz-dirençli penisilinler kullanıma girmiştir. İlk MRSA olguları 1961 yılında İngiltere'de bildirilmiştir. O zamandan günümüze MRSA klonları tüm dünyada yayılmıştır (Gülay, 2008).

*S. aureus*'un metisiline direnç kazanmasını sağladığı bilinen üç mekanizma vardır:

- i)  $\beta$ -laktamazların aşırı üretimi
- ii) normal penisilin-bağlayan proteinlerin (PBP'lerin) modifikasyonu
- iii) klinik izolatların en sık kullandığı mekanizma olan *mecA* olarak adlandırılan kromozomal bir genin eksprese ettiği yeni bir penisilin-bağlayan protein (PBP2a ya da PBP2') sentezi (Palavecino, 2007)

PBP2a,  $\beta$ -laktam ajanlara düşük afinite göstermektedir. Normalde *S. aureus* suşlarının sitoplazmik membrana bağlı dört tane PBP'i vardır. Bu PBP'ler,  $\beta$ -laktam ajanlar tarafından inaktive edilirler, PBP2a ise fonksiyonuna devam eder ve stabil peptidoglikan yapının sentezini sağlar.  $\beta$ -laktam antibiyotikler duyarlı suşlarda hücre duvarındaki PBP'lere (transpeptidaz ve karboksipeptidaz enzimleri) bağlanarak peptidoglikanı sağlamlaştıracak çapraz bağların oluşumunu engeller. Ayrıca, otolizinleri uyararak hücre ölümünü sağlar. Ancak metisiline dirençli suşlarda  $\beta$ -laktam antibiyotikler PBP2a'ya bağlanamadığı için, tüm  $\beta$ -laktam ajanlara karşı direnç görülür (Gülay, 2008). Dirençli suşlarda benzer miktarlarda PBP2A bulunmasına rağmen direnç

düzeyleri değişebilir, PBP2a aracılı  $\beta$ -laktam direncini *fem* (factor essential for the expression of methicillin resistance) ve *aux* (auxilliary; yardımcı faktör) olarak adlandırılan diğer genetik lokuslar ile otolizinlerin aktivitesi de etkiler (Yücesoy, 2003; Gülay, 2008). Örneğin pentaglisin köprülerinin oluşumundan sorumlu *fem* mutasyonlarında *mecA* varlığına karşın  $\beta$ -laktam MİK düzeyleri yükselmez.

*S. aureus*'da ve diğer stafilokoklarda PBP2a, *mecA* adı verilen bir gen tarafından kodlanır (Gülay, 2008). *mecA* determinantını eksprese eden *S. aureus* suşları MRSA (metisilin-dirençli *S. aureus*) olarak adlandırılır (Winn ve ark., 2006). *mecA* geni, SCC*mec* (staphylococcal cassette chromosome *mec*) adı verilen 21-67 kb uzunluğundaki mobil DNA parçalarında bulunmakta ve bunların vasıtasıyla taşınmaktadır. Bu gen metisiline duyarlı stafilokok suşlarında bulunmaz (Dündar ve Öztürk Dündar, 2008; Kılıç, 2008).

SCC*mec*; bakteriyofajlar, transpozonlar, konjugatif transpozonlar ya da integre plazmidler gibi bilinen diğer mobil genetik elementlerden farklıdır. *S. aureus*'un virulansı ile ilişkili bir gen taşımadığından patojenite adasından (PI) farklı olarak, genomik ada sayılabilir (Hiramatsu ve ark., 2002). Sadece  $\beta$ -laktam veya  $\beta$ -laktam dışı antibiyotikler için direnç geni taşımaktadır. SCC*mec* elementleri, faj transdüksiyonu veya diğer genetik transfer sistemleri ile taşınabilmektedir. SCC*mec* içinde ayrıca insersiyon dizileri ve *mecA* transkripsiyonunu düzenleyen genler de bulunmaktadır (Gülay, 2008; Kılıç, 2008). SCC*mec* elementi iki esansiyel gen kompleksinden oluşmuştur: *mec* gen kompleksi ve *ccr* gen kompleksi.

***ccr* gen kompleksi;** SCC*mec* gen kaset bölgesinin mobilitesinden yani *S. aureus* kromozomundaki spesifik bir bölgeye integrasyonundan ve bu bölgeden ayrılmasından sorumludur. *ccr* genlerinden ve çevresindeki fonksiyonu bilinmeyen açık okuma bölgeleri (ORFlar) den oluşur. *S. aureus* 'ta birbirinden filogenetik olarak farklı üç tane *ccr* geni (*ccrA*, *ccrB*, *ccrC*) tanımlanmıştır; *ccrA* ve *ccrB*'nin 4 allotipi vardır, *ccrC* ise tek allotiptir. DNA dizilerindeki benzerlik yeni *ccr* genlerinin tanımlanması için %50'nin altında olmalıdır, yeni allotiplerin belirlenmesi içinse %50-85 arasında olmalıdır.

*S. aureus*'ta saptanan *ccr* gen kompleksi tipleri: tip 1 (*ccrA1B1*)  
 tip 2 (*ccrA2B2*)  
 tip 3 (*ccrA3B3*)  
 tip 4 (*ccrA4B4*)  
 tip 5 (*ccrC*)

***mec* gen kompleksi;** *mecA* ve düzenleyici genleri ve ilişkili insersiyon dizilerinden oluşur. Günümüze kadar *mec* gen kompleksleri ile ilgili 5 temel sınıf (A-E) tanımlanmıştır.  $\beta$ -laktam direnç fenotipini belirler (Gülay, 2008; IWG-SCC, 2009).

Bu komplekslerin yapıları ve nükleotid dizileri SCC*mec* tipini tanımlamada kullanılır. SCC*mec* elementi *mec* ve *ccr* gen komplekslerinin yanı sıra J bölgeleri (joining-region) adı verilen dizileri de içerir. Bu bölgelerin ek direnç determinantları taşıdığı sanılmaktadır. J bölgelerindeki varyasyonlar SCC*mec* alttiplerinin tanımlanmasında kullanılır (Deurenberg ve ark., 2007; Kılıç, 2008). Şimdiye kadar sekiz SCC*mec* tipi (tip I-VIII) belirlenmiştir (IWG-SCC, 2009). Temel SCC*mec* tiplerinin yanı sıra IA, II(A-G), III(A ve B), IV(a/b,c,d,E,F,g) gibi birçok varyant da tarif edilmiştir. SCC*mec* tip I, tip IV ve tip V sadece  $\beta$ -laktam antibiyotiklere direnç sağlar. SCC*mec* tip II ve tip III ise kaset içine integre olmuş plazmidler (pUB110, pI258 ve pT181) ve bir transpozon (Tn554) aracılığıyla ek direnç genleri taşıdığından çoklu dirençten sorumludurlar (Okuma ve ark., 2002; Deurenberg ve ark., 2007; Kılıç, 2008; Gülay, 2008). Plazmid pUB110 kanamisin, tobramisin, bleomisin direncinden sorumlu *ant(4')* genini; pI258 penisilin ve ağır metal direncini, pT181 tetrasiklin direncini taşırken, Tn554 ise indüklenabilir MLSb tipi dirence yol açan *ermA* genini taşımaktadır. *S. aureus* SCC*mec* dışında kromozomun değişik bölümlerinde ya da plazmidler üzerinde de direnç elemanları içermektedir (Gülay, 2008).

**Tablo 1.** *S. aureus*'ta tanımlanan SCC*mec* tipleri (IWG-SCC, 2009)

SCC <i>mec</i> Tip	<i>Ccr</i> gen kompleksi	<i>mec</i> gen kompleksi
I	1 (A1B1)	B
II	2(A2B2)	A
III	3 (A3B3)	A
IV	2(A2B2)	B
V	5 (C)	C2
VI	4 (A4B4)	B
VII	5 (C)	C1
VIII	4 (A4B4)	A

Çeşitli coğrafi bölgelerden, klinik MRSA suşlarının farklı klonları izole edilmiştir. Farklı klonal kökenler, farklı zamanlarda ve durumlarda farklı SCC*mec* tipleri kazanmışlardır. İlk MRSA suşu, SCC*mec* elementinin bir MSSA (metisilin-duyarlı *S. aureus*) kromozomuna integre olmasıyla ortaya çıkmıştır. *mec*'in kökeninin bilinmemesine rağmen; SCC*mec*'in hem koagülaz-pozitif hem de koagülaz-negatif stafilkoklar (KNS) arasında geçiş yapabildiği ve *mecA*-pozitif KNS'lerin yeni MRSA klonlarının ortaya çıkmasında potansiyel SCC*mec* donörleri olabileceği belirtilmiştir (Hiramatsu ve ark., 2002; Witte ve ark., 2006; Garza-González ve ark., 2010).

1961'de İngiltere'de izole edilen ilk MRSA suşu, SCC*mec* tip I'e sahiptir ve 1960'larda dünya çapında yayılmış eski bir klondur. 1982'de SCC*mec* tip II'ye sahip bir klon Japonya'da bulunmuştur. Bu New York/Japonya klonu da dünya çapında yayılmıştır (Deurenberg ve ark., 2007). Bunu, 1985'te Yeni Zelanda'da SCC*mec* tip III bulunduran klonun bulunması takip etmiştir. SCC*mec* tip I-III hastane kökenli MRSA suşlarında bulunur, tip I; 34 kb uzunluğunda olup 1960'larda yaygındır, tip II; 53 kb uzunluğunda olup Japonya, Kore ve ABD'de yaygındır, tip III; en büyük (67 kb) element olup Almanya, Avusturya, Hindistan ve diğer Güney Asya ve Pasifik bölgelerinde yaygındır. SCC*mec* tip IV'e sahip MRSA suşları 1990'larda yayılmıştır ve 21. yüzyılın başlarında SCC*mec* tip IV'e sahip ilk MRSA suşu Avustralya'da bulunmuştur.

MRSA, dünyadaki nozokomiyal infeksiyonların majör etkenlerinden biridir. MRSA'nın dünya çapındaki yayılımı genetik özellikleri spesifik olan birkaç klonun üzerinden ilerlemektedir (Deurenberg ve ark., 2007). Bugüne kadar beş büyük pandemik MRSA klonu bildirilmiştir: İber (ST247-IA), Brezilya (ST239-IIIA), Macar (ST239-III), New York/Japonya (ST5-II), pediatrik (ST5-IV) klonları. İlk MRSA izolatları ile bugünkü MRSA klonları arasındaki ilişkinin açıklanması için karşıt iki teori ortaya sürülmüştür. Tek-klon teorisine göre bütün MRSA klonları ortak bir ataya sahiptir ve buna göre SCCmec *S. aureus* içerisine sadece bir kez alınmıştır, multi-klon teorisine göre ise SCCmec, farklı *S. aureus* genetik yapılarına birkaç kez katılmıştır. İkinci teori, yapılan çalışmalarla da desteklenmiştir (Deurenberg ve ark., 2007); aynı sekans tipinden olup farklı SCCmec tiplerine sahip olan MRSA izolatları saptanmıştır. Bu durum göz önüne alınarak MRSA klonlarının hem sekans tipini hem de SCCmec tipini içerecek şekilde isimlendirilmesi önerilmektedir (Enright ve ark., 2002).

SCCmec kaset gen tiplendirme sistemi, HK- ve TK-MRSA suşlarının ayırımında bağımsız bir kriter olarak kullanılmaktadır. HK-MRSA suşları, 34-67 kb uzunluğunda üç tip SCCmec gen kaseti (I, II ve III) taşımaktadırlar. İyi tanımlanmış çoklu dirençli olmayan TK-MRSA suşları, daha çok tip IV ve V SCCmec kaset gen tipleri taşımaktadır. Yapılan çalışmalar, TK-MRSA suşlarında tespit edilen yeni SCCmec kaset gen tiplerinin, HK-MRSA suşlarından evrimsel olarak bağımsız olduğunu göstermektedir. MLST (multilokus dizi tiplendirme) ve PFGE (pulsed-field gel electrophoresis) teknikleri ile bölgesel olarak yaygın olan HK-MRSA suşlarının, TK-MRSA suşlarından genetik temelde farklı oldukları da ortaya çıkmıştır (Kılıç, 2008).

Toplumda IV ilaç bağımlıları, altta yatan ciddi hastalık tablosu olan bireyler, antimikrobiyal tedavi alanlar ve yakın zamanda hastaneden taburcu olanların yer aldığı yüksek risk grupları MRSA infeksiyonu için ilk rapor edilen olgular içinde yer alır (Bannerman ve Peacock, 2007). Sistemik MRSA infeksiyonlarının mortalitesinin yüksek olmasından dolayı metisiline ve diğer antibakteriyel ajanlara karşı direnç gelişimi önemli bir problemdir. MRSA'nın tiplendirilmesi; infeksiyon kontrol önlemlerinin alınmasında kullanılır (Harmsen ve ark., 2003). Hastanelerde epidemik

MRSA kökenlerinin ortaya çıkması ve yayılması infeksiyon kontrol önlemlerinin önemini ortaya koymuştur. Hedeflenen infeksiyon tedbirleri için tiplendirme yapmak şarttır (Strommenger ve ark., 2006)

### **2.3. Hastane İnfeksiyonlarının Kontrolünde Moleküler Tekniklerin Yeri**

Hastane infeksiyonları, sağlık kuruluşlarında önemli morbidite ve mortalite kaynağıdır. Çoklu-direnç gösteren patojenlerin yol açtığı hastane kaynaklı infeksiyonlar giderek artış göstermektedir (Singh ve ark., 2006). Hastane infeksiyonlarının, dirençli bakterilerin ortaya çıkması ve yayılması nedeniyle yerel önemine ek olarak küresel önemi de vardır. Dünyanın herhangi bir yerindeki bir hastanede ortaya çıkan hastane infeksiyonu etkeni dirençli bir bakteri klonunun, global yayılıma yol açabildiği gösterilmiştir (Acuner, 2008). Nozokomiyal infeksiyonların epidemiyolojisinin belirlenmesi ve akılcı kontrol önlemlerinin alınması için patojenler arasındaki ilişkinin saptanması gereklidir. Epidemiyolojik çalışmalarda izolatların moleküler ilişkilerinin belirlenmesinde PFGE, PCR (polimeraz zincir reaksiyonu)-tabanlı ve MLST gibi DNA-tabanlı moleküler yöntemler tercih edilen yöntemlerdir (Singh ve ark., 2006).

Bakteriler arasındaki klonal ilişkinin ortaya konulmasıyla epidemik izolatlar, sporadik veya endemik olanlardan ayrılmakta, salgınla ilgili suşlar belirlenmekte; salgının kapsamı, kaynak ve rezervuarı, spesifik klonların farklı merkezler arasındaki yayılımı hakkında bilgi edinilebilmektedir. Bu veriler kullanılarak halk sağlığı kontrolünde kullanılmak üzere ulusal ve uluslararası salgınların veri bankaları oluşturulabilmekte, herhangi bir yer ve zaman içindeki infeksiyonun özellikleri tanımlanabilmektedir (Durmaz, 2008).

Bakteri tiplendirme yöntemleri infeksiyon hastalıklarının epidemiyolojik surveyansı, salgınların değerlendirilmesi, infeksiyonların seyri, patogenez çalışmaları ve bakteri genetiği gibi alanlarda faydalı bilgiler sağlamaktadır. "DNA parmak izi" oluşturmayı hedefleyen moleküler tiplendirme yöntemleriyle, epidemiyolojik olarak ilişkili olan aynı tür içindeki izolatların genetik olarak da ilişkili olup olmadıkları araştırılmaktadır (Durmaz, 2008). Temelde tiplendirmeye bir salgından sorumlu etkenin aynı ve tek suş olup olmadığı sorusuna yanıt aranır. Kullanılan yöntemlerin

ayırıcı gücünün oldukça iyi olması gerekir. Tiplendirme yöntemlerinde olması gereken diğer bir özellik ise karşılaştırılabilirliktir. Moleküler tiplendirme yöntemlerinin bazıları çok değişken bölgeleri inceler, bu yolla yeni oluşan, yakın döneme ait farklılaşmalar ortaya konur. Diğer yöntemler ise daha iyi korunan genleri veya bölgeleri hedefler. Korunan bölgelerin analizi ile popülasyon genetiği ve bakteri filogenisi çalışılabilir. Ne kadar çok bölge veya lokusun analizi yapılırsa yöntemin ayırıcı gücü o denli artar (Bozdoğan, 2008).

Konvansiyonel tiplendirme yöntemleri, bakteri epidemiyolojisinde halen tanımlamada kullanılan temel yöntemlerdir (Struelens, 1996). Bu yöntemlerden bazıları; antijen farklılığına dayanan serolojik tiplendirme, standart bir faj setine karşı dirence dayalı faj-tiplendirme, hücrenin metabolik özelliklerine göre biyotiplendirme, spesifik bakteriyosinlerin varlığına bağlı bakteriyosin tiplendirme ve antibiyotik direncine göre tiplendirme (Feil ve Enright, 2004). Antibiyogram tiplendirme, nozokomiyal salgınların belirlenmesinde uzun yıllar kullanılmıştır. Bununla birlikte, konvansiyonel yöntemlerin farklı mikroorganizmalara uygulanabilirliği sınırlıdır ve popülasyon genetiği çalışmaları için duyarlılığı yeterli değildir (Struelens, 1996).

Epidemiyolojik tiplendirmenin ayırıcı gücü, mikrobiyal DNA'nın moleküler analizinin gerçekleştirilmesi ile geliştirilmiştir. Konvansiyonel yöntemlerin aksine, DNA analizi hemen her mikroorganizma türüne uygulanabilir (Struelens, 1996).

1980'li yılların başlarından itibaren HK-MRSA Hollanda ve Kuzey Avrupa ülkeleri hariç tüm dünyada artış göstermiştir. Bu artış hastanelerde bazı epidemik klonların ortaya çıkması ve yayılmasına bağlıdır. Tüm dünyada bildirilen HK-MRSA suşları 4 büyük klonal komplekste toplanan 11 klonun üyesidir. Bu klonlar arasında ST239, ST247, ST254, ST22 ve ST45 gibi bazıları kıtalararası yayılım göstermiştir.

1990'lı yılların başlarından itibaren PFGE ile SmaI makrorestriksiyon patern analizi hem yerel ve uluslararası epidemik suşların tanımlanmasını sağlamış hem de farklı *S. aureus* suşları arasında genetik ve evrimsel yakınlık bulunabileceğini göstermiştir. Ancak suşların filogenetik ilişkilerinin tam olarak anlaşılması, dizi analizi



tabanlı bir teknik olan MLST analizi ve SCC<sub>mec</sub> elemanlarının gruplandırılması ile mümkün olmuştur. MLST, PFGE'den farklı olarak klon içerisindeki alt tipleri ve farklılıkları göstermez. PFGE ise bunları gösterdiği için salgın analizinde yararlıdır (Gülay, 2008).

Moleküler tiplendirme sistemlerinin geliştirilmesiyle infeksiyon hastalıklarının epidemiyolojisinde büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. Aynı türün popülasyonları içinde genotipik ve fenotipik çeşitliliğin geniş olmasına rağmen aynı bulaş zincirinde yer alan izolatlar klonal olarak ilişkilidir, bunun nedeni aynı ata hücreden köken almalarıdır (Durmaz, 2001; Tang ve Stratton., 2010). Klonal ilişkili mikroorganizmalar; ortak virulans faktörleri, biyokimyasal özellikleri ve genetik karakterleri paylaşan aynı türün üyesidirler. Bu bilgiler, hastanelerde ve toplum içerisinde hastalığın yayılmasını anlamada ve kontrol altına almada oldukça yararlıdır (Durmaz, 2001).

Suş tiplendirme teknolojisinin performansı belirli kriterlerle değerlendirilir:

**Ayrım gücü:** Ayırt edilemeyen ya da yakın ilişkili suşların gerçekten klonal olup aynı bulaş zincirinde yer alma olasılıklarını tanımlar. Tiplendirme sistemlerinin anahtar özelliğidir.

**Tekrarlanabilirlik:** Aynı suşun tekrar test edilmesinden sonra aynı sonuçları elde etme kapasitesini tanımlar.

**Stabilite:** Klonal izolatların zaman içinde hep aynı tipi gösterebilme olasılığını ifade eder. Tiplendirme sisteminin klonal ilişkiyi belirlediği ve subklonal varyantları epidemiyolojik olarak ilişkisizdir şeklinde yanlış sınıflandırmadığı takdirde varyasyon olsa dahi stabiliteden söz edilebilir.

**Tiplendirilebilirlik:** Moleküler bir tiplendirme sistemi ile genotipi belirlenebilen izolatların oranıdır.

**Epidemiyolojik Uyum:** Tiplendirme sisteminin iyi tanımlanmış bir salgına ait epidemiyolojik olarak ilişkili olan tüm izolatları aynı klon içinde sınıflandırma kapasitesidir

Bu kriterlerin yanında uygulama kolaylığı, sonuçların yorumlanabilirliği, maliyet ve ekipmanın uygunluğu da tiplendirme sistemleri için sorgulanması gereken noktalardır. Ayrıca salgın yönetimi ile ilgili kararlar alınırken yarar sağlaması için olabildiğince hızlı sonuç alınabilmelidir. Bu şartların hepsini birden sağlayan optimal bir tiplendirme sistemi olmadığından sistemlerin kombine kullanımı gereklidir (Struelens, 1998).

### **2.3.1. Moleküler tiplendirme çalışmalarında kullanılan bazı terimler**

**Epidemiyolojik tiplendirme sistemi:** Epidemiyolojik belirteçler olarak adlandırılan fenotipik ya da genotipik özelliklere dayalı olarak, aynı mikroorganizma türüne veya taksonuna dahil olan epidemiyolojik olarak ilişkisiz izolatların ayrımını sağlayan, aynı salgından ya da bulaş zincirinden elde edilen ve tek bir ortak atadan gelen izolatların yakın ilişkisini saptayan sistemdir.

**İzolat:** Bir izolasyon plağındaki tek bir koloniden üreyen ve tür seviyesine kadar identifikasyonu yapılmış saf kültür popülasyonudur.

**Suş:** Aynı türün diğer izolatlarından farklı fenotipik ve/veya genotipik özellikler sergileyen izolat ya da izolatlar grubudur.

**Salgın suşu:** Aynı türün hem epidemiyolojik hem de genetik olarak ilişkili olan izolatlarıdır. Ortak fenotip ve genotipe sahip oldukları ve belirli bir zaman diliminde izole edildikleri için, bu izolatların klonal olarak ilişkili olduğu varsayılır.

**Referans suş:** İleri çalışmalar için saklanan, iyi tanımlanmış olan suştur.

**Tip:** Belirli bir tiplendirme sistemine göre bir suşun sergilediği spesifik bir özellik ya da özelliklerdir.

**Klon:** Ortak bir atadan gelen, genetik olarak aynı bir veya daha fazla organizmadır.

**Epidemiyolojik olarak ilişkili izolatlar:** Belli bir bölgeden ya da belli bir zaman diliminde hastalardan, kullanılan eşyalardan veya çevreden toplanan örneklerin kültüründen elde edilen ve ortak bir kaynaktan geldikleri düşünülen izolatlardır (Struelens, 1996; Durmaz, 2001).

## 2.4. DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizinde dört ana basamak vardır:

1. Genellikle DNA amplifikasyonunu da içine alan nükleik asit izolasyonu
2. DNA sentezi ve nükleik asit hedefinin işaretlenmesi
3. İşaretlenmiş hedeflerin elektroforetik olarak ayrılması
4. Elektroforezden elde edilen bilginin anlamlı DNA dizi bilgisine dönüştürülmesi  
(Alcorn ve Anderson, 2006)

**Nükleik asit izolasyonu;** izolasyon yönteminin seçimi, hedef molekülün yapısına bağlıdır. Nükleik asit hedefleri arasında RNA veya DNA, plazmidler ya da PCR ürünleri bulunabilir. Bu hedefler, tanısal dizi analizinden önce PCR ile in vitro olarak çoğaltılırlar. (Sanger ve ark., 1977; Mitchell ve Merril, 1989; Manoni ve ark., 1992)

**İşaretleme Stratejileri ve DNA Dizi Analizi;** 1977 yılında Allan MAXAM-Walter GILBERT ve Frederick SANGER tarafından iki farklı DNA dizi analizi yöntemi bulunmuştur (Sambrook ve ark., 1989).

**I- Maxam ve Gilbert'in kimyasal kırılma yöntemi:** Hidrazin, dimetil sülfat ya da formik asitin DNA'da bulunan bazıları özgül olarak değiştirmesine ve daha sonra eklenen piperidinin değişikliğe uğramış nükleotitlerin bulunduğu noktalardan zinciri kırmasına dayanır (Maxam ve Gilbert, 1977; Sambrook ve ark., 1989).

**II- Sanger-Coulson'un zincir sonlanma yöntemi:** Enzimatik DNA sentezine dayanır, günümüzde en yaygın kullanılan dizi analizi tekniğidir. Bu yöntemde dizisi saptanacak olan DNA zinciri yeni sentezlenecek zincir için kalıp olarak kullanılır, tek veya çok sayıda oligonükleotid primer ve denatüre edilmiş bir hedef dizi (genellikle bir PCR ampliconu) ile in vitro olarak DNA sentezi gerçekleştirilir. DNA polimeraz, dNTP'lerin (deoksiribonükleozit trifosfat) yanısıra deoksiribozun 3'pozisyonunda OH grubu taşımayan ddNTP'leri (dideoksiribonükleozit trifosfat) de kullanabilir. Sentezlenen DNA'ya bir ddNTP'nin katılması 3' pozisyonunda OH grubu olmadığı için sentezi durdurur. Böylelikle PCR amplifikasyonu sırasında ortama dideoksi nükleotid zincir sonlandırıcılarının eklenmesi ile nükleik asit amplifikasyonu tamamlanmadan sonlandırılır (Sanger ve ark., 1977; Mitchell ve Merril, 1989; Manoni ve ark., 1992; Klug ve Cummings, 2000).

**DNA Fragmentlerinin Ayrılması ve Sinyal Belirlenmesi;** Kalıp jeller veya kapillerler kullanılarak DNA dizisinin belirlenmesinden sonra elde edilen DNA parçalarına elektroforez uygulanarak jel üzerinde yan yana yürütülür. Uygulanan elektriksel alanın etkisi ile DNA parçacıkları en kısası en önde olmak üzere jel üzerinde bir merdiven görüntüsü oluşturur (Prober ve ark., 1987; Klug ve Cummings, 2000). Elektroforezle zaman bağımlı elektroforetik izler oluşturularak DNA fragmentlerinin göçü belirlenir. Fragment büyüklüğü ve işaretleme kimyası ile belirlenen 3' ucunun kimliğine göre, elektroforetik izler anlamlı DNA dizi bilgisine dönüştürülür (Prober ve ark., 1987). Poliakrilamid jeller her iki teknik için de kullanılır ve yüksek ayırım gücüne sahiptir. DNA dizi analizi reaksiyonu sonucu elde edilen fragmentler jel üzerinde gümüş boyama, radyoaktif veya floresan boyalarla işaretlenerek tespit edilebilir (Sambrook ve ark., 1989).

Otomatik DNA cihazlarının gelişmesi ile poliakrilamid jellerin yerini polikarbon bileşikleri olan polimerler almıştır. Bu polimerler yoğunluklarına göre farklı ayırım gücüne sahiptirler. Otomatik analizde de Sanger'in enzimatik DNA sentezine dayanan zincir sonlanma yöntemi kullanılmıştır. Otomatik DNA dizi analiz cihazları basit olarak, sabit bilgisayarda yüklü programlar ile bu programların yönettiği elektroforez sistemini içerir. Elektroforetik ünitelerde bulunan lazer ışık kaynağı ile monokromatik bir ışık oluşturulur. DNA'nın bulunduğu jelmatriks bu monokromatik ışık ile taranır. DNA'ya bağlanan floresan boya ışık ile taranan bölgeye geldiğinde uyarılır. Uyarılan boya kendi için karakteristik olan dalga boyunda ışığı geri yansıtır. Yansıyan bu ışık demeti bir detektör tarafından kaydedilir. Kaydedilen veriler bilgisayar programları ile değerlendirilerek sonuçlar grafiksel ya da matematiksel olarak bilgisayar ekranına aktarılır (Sambrook ve ark., 1989). Dizi verisinin kalitesini ve değerlendirilmesini etkileyen çeşitli değişkenler arasında, elde edilen piklerin yüksekliği, genişliği ve pikler arası uzaklık yer almaktadır. Piklerin yüksekliği, belirlenebilen sinyal yoğunluğu ile; pik genişliği, her bir sinyalin birbirine göre dağılımı ile; pikler arası uzaklık ise, farklı fragmentlerin çözünürlüğü ile ilişkilidir. Çeşitli floresan boyalar ve lazer okuma teknolojileri sayesinde dört nükleotidin de aynı anda belirlenmesi mümkündür.

Bugün en sık kullanılan yaklaşım olan Sanger DNA dizi analizi ile oluşturulan fragmentlerin büyüklüğü, birbirinden sadece bir baz ile farklılık gösterir, bu nedenle güvenli veri elde edebilmek için yüksek çözünürlükte ayırma stratejilerinin kullanılması gerekir (Prober ve ark., 1987).

**Kapiller Elektroforez:** Kapiller elektroforezin avantajları, kalıp jel hazırlanmasının gerekmemesi, otomatik örnek yükleme ve uygulama kolaylığıdır. Kapiller cihazlar, ileri düzeyde otomasyon sağladığından laboratuvarında işyükü azalır. Otomatik DNA dizi analizi cihazları, taşıdıkları çok sayıda kapiller sayesinde yüksek kapasiteli kalıp jel dizi analizi cihazlarından daha yüksek kapasitede çalışabilmekte ve daha kısa sürede daha fazla örneği işleyebilmektedir. Örnekler kapillerlerden yatay akım kuvvetine ilerler, burada lazer örnek akışını aydınlatır. Çok sayıda kapiller, tek bir lazerle aydınlatılabilecek şekilde lineer diziler şeklinde düzenlenmiştir. Daha sonra lens ile her bir floresan emisyon sinyali toplanır (Hanning ve ark., 2000; Dovichi ve Zhang, 2001).

**Dizi Verilerinin Değerlendirilmesi:** Elektroforetik görüntünün anlamlı DNA dizi verisine dönüştürülmesi için bilgisayar destekli algoritmalar, manuel işlem ve dizi derlemesi gereklidir. Manuel işlem ve dizi derlemesi, son dizi verisini işleme, belli pozisyonlardaki nükleotid karışımlarını belirleme ve baz karışıklıklarını çözmeyi içermektedir. Elde edilen dizi verisinin kalitesinin değerlendirilebilmesi için son dizi verisinin manuel olarak değerlendirilmesi önerilmektedir (Alcorn ve Anderson, 2006).

### 2.4.1. Multilokus Dizi Tiplendirme (MLST)

Tiplendirme sistemleri, bir bakteriyel tür içinde bulunan çok sayıdaki genotipi ortaya koyabilme yeteneğine sahip olmalıdır (Hanage ve ark., 2006). MRSA suşlarının tiplendirilmesinde altın standart PFGE olmasına rağmen DNA dizilerine dayalı yöntemler daha sık kullanılmaya başlanmıştır bunun nedeni dizi verilerinin laboratuvarlar arasında internet yoluyla transfer edilebilmesi ve karşılaştırılabilir olmasıdır. MLST, esansiyel proteinleri kodlayan korunmuş genlerin analizine dayanan bir yöntemdir. MLST ilk olarak *Neisseria meningitidis* için geliştirilmiştir, 2000 yılında başarılı bir şekilde *S. aureus*'a uyarlanmıştır. *arcC*, carbamate kinase; *aroE*, shikimate dehydrogenase; *glp*, glycerol kinase; *gmk*, guanylate kinase; *pta*, phosphate acetyltransferase; *tpi*, triosephosphate isomerase ve *yqiL*, acetyl coenzyme A acetyltransferase genlerinin internal fragmentleri (~450 bp) PCR ile amplifiye edilir ve sekanslanır. Bu genlerin seçilmesinin sebebi, çok sayıda alellerinin olması ve *S. aureus* popülasyonunun genetik çeşitliliğini tanımlamada yeterli çözünürlüğü sağlamalarıdır. Ancak; MLST yüksek maliyet ve fazla işgücü gerektirdiğinden MRSA'nın rutin surveyansı için uygun değildir (Harmsen ve ark., 2003; Strommenger ve ark., 2006; Saunders ve Holmes, 2007). PFGE, çeşitli bakteri türlerine uygulanabilmesi nedeniyle sık kullanılan bir yöntemdir, ancak bazı kısıtlamaları bulunmaktadır. Laboratuvarlar arası DNA fragment paternlerinin karşılaştırılması zor olabilmektedir. Global epidemiyoloji açısından, genetik değişimin yavaş geliştiği ve seçici nötr olduğu esansiyel metabolik fonksiyonları kodlayan genler olan "housekeeping" genlerdeki dizi değişimleri idealdir (Hanage ve ark., 2006). Bant tabanlı tiplendirme yöntemleriyle karşılaştırıldığında genomik polimorfizmlerin sekans ile analizinin önemli bir avantajı, sonuçların net bir şekilde yorumlanabilmesi ve taşınabilmesidir (Witte ve ark., 2006).

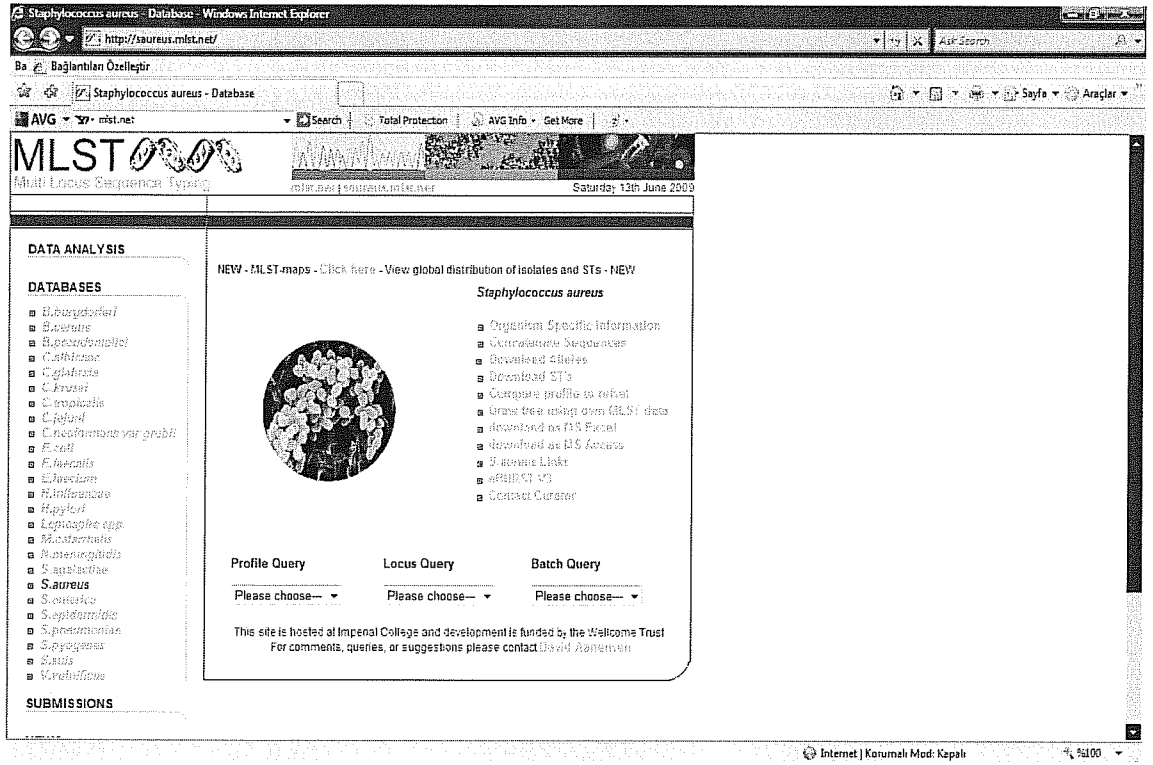
Multilokus enzim elektroforezi (MLEE), mikroorganizmaların biyotiplerinin incelenmesine çok değerli görüşler sağlamış olan bir tiplendirme yöntemidir (Selander ve ark., 1986). Ancak faydaları; laboratuvarlar arası sonuçların karşılaştırılma zorluğu ve elde edilen verilerin popülasyon genetik analizleri için uygun olmaması, bu yüzden genetik değişimlerin çoğunun indekslenememesi nedeni ile kısıtlıdır ve epidemiyolojide geniş kullanım olanağı yoktur. Ayrıca "housekeeping" genlerdeki değişimlerin indirekt

olarak indekslenmesi otomatize DNA dizi cihazlarının artması nedeniyle gereksizdir (Maiden ve ark., 1998; Witte ve ark., 2006).

MLST, bakterilerin epidemiyolojik analizinde kullanılan MLEE yönteminden geliştirilmiştir. MLEE, protein ekstraksiyonundan sonra, elektroforeze tabi tutulan enzimlerin substratları aracılığıyla jel üzerinde görünür hale gelmeleri ve verdikleri profillere göre alellerinin belirlenmesi esasına dayanır. Oluşan bir mutasyona bağlı amino asit değişikliği enzimin elektroforetik profilinde değişikliğe yol açacağından farklı bir alel olarak tanımlanır. Elektroforez profilleri birçok enzim için değerlendirildiğinde tüm enzimler için aynı profili veren suşlar aynı elektroforetipe (ET) sahip olurken farklı alelik yapı farklı ET'yi yani farklı bir klonu gösterir. Ancak tüm mutasyonların amino asit değişikliği yapmaması ve oluşan tüm amino asit farklılıklarının elektroforetik değişikliğe yol açmaması MLEE yöntemini sınırlandırmaktadır (Bozdoğan, 2008).

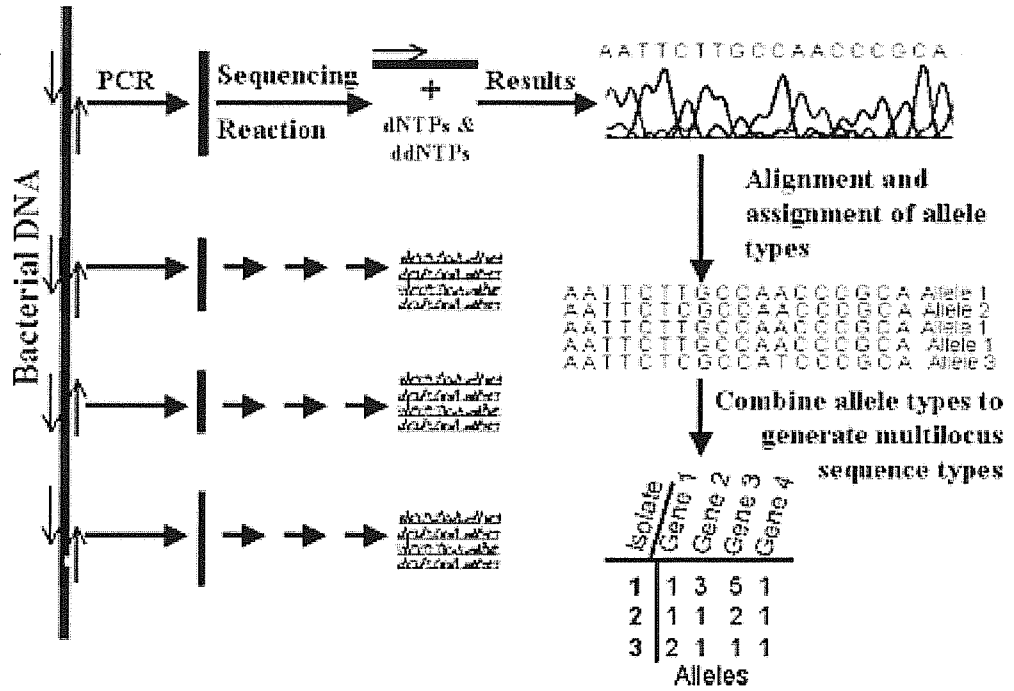
MLST, çok sayıdaki "housekeeping" lokustaki genetik varyasyonları, gen ürünlerinin elektroforetik hareketlerinden ziyade nükleotid dizileri ile ortaya koyar (Maiden ve ark., 1998). Seçici nötral olduğu düşünülen yedi "housekeeping" genin 450-500 bp uzunluğundaki iç fragmentlerinin DNA dizileri belirlenmiştir. Her gen fragmentindeki her farklı dizi farklı bir alel numarası ile numaralandırılır ve her izolat yedi genin alelleri ile alelik profil veya sekans tipi (ST) olarak tanımlanır. PCR ile çoğaltılıp her iki yönde sekanslanarak elde edilen sekans sonuçları veritabanındaki alellerle karşılaştırılır (Witte ve ark., 2006; Deurenberg ve ark., 2007). MLEE'den farklı olarak alel tipleri değişmezdir ve laboratuvarlar arası taşınabilir. DNA dizi analizi, bir lokustaki her türlü değişimi gösterir ve MLST yönteminde her lokusta MLEE yönteminden daha fazla sayıda alel elde edilir. Aleller tek bir nükleotid veya çok sayıda nükleotid farklılıkları ile farklı kabul edilir. Birçok bakteri türü, her lokustaki alellerde çok sayıda değişim içermektedir ve bu 7 lokus ile milyonlarca muhtemel alelik profiller ayırt edilebilir (Maiden ve ark., 1998; Enright ve Spratt, 1999; Spratt, 1999). Aynı alelik profile sahip iki izolat çok yakın ilişkili kabul edilir, aynı klona dahil edilir. Benzer alelik profile sahip izolatlar ortak bir atadan gelen minör değişim göstermiş, aynı klonal komplekse dahil izolatlar olarak değerlendirilir. İlişkisiz iki izolataın şans eseri aynı

alelik profile sahip olması çok düşüktür. MLST bu nedenle yüksek oranda ayırıcıdır (Hanage ve ark., 2006). Verilerin değişmez olması internetin suşların tiplendirilmesinde kullanımını sağlamaktadır (Spratt, 1999). Farklı bölgelerdeki araştırmacılar merkezi veri tabanı olarak kullanılan MLST web sitesine (<http://www.mlst.net>) girerek sonuçlarını karşılaştırabilirler (Maiden ve ark., 1998). MLST şemaları, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Campylobacter jejuni*, *S. aureus*, *Burkholderia pseudomallei*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli* ve *Helicobacter pylori* için geliştirilmiştir (Hanage ve ark., 2006).



Şekil 1. mlst. net web sayfası





Şekil 2. MLST prosedürünün şematik sunumu (Singh ve ark., 2006)

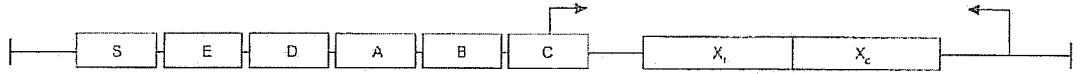
MLST verilerini gösteren (BURST [Based upon related sequence types]) Ed Feil tarafından planlanan klonal kompleksleri, atasal genotipleri ve gelişimsel paternleri içeren bir algoritma bulunmaktadır. Algoritma ilk olarak MLST verisi üzerinde izolat gruplarını aynı atadan gelen ilişkili genotipler (klonal kompleks) ile düzenleyerek her klonal kompleksin varsayılan atasını saptamaya yönelir. BURST, alelik profilleri en az 5 ortak aleli olan klonal komplekslere ayırır. Yöntem farklı klonal kompleksler arasındaki ilişkiyi göstermez, çünkü bu birçok bakteri türü için anlamsızdır. İlişkili izolatlar grubu bir veri setinde grup içinde en az bir başka izolatla seçilen benzerlik seviyesinde ilişkili izolatlar olarak tanımlanır. Varsayılan benzerlik değeri, yedi lokus içinden altı veya daha fazlasında eş dizilerin (alellerin) varlığıdır ancak grup tanımı için yedi lokusta ortak beş veya daha fazla alel yeterlidir. Ortak beş veya daha fazla alel ile tanımlanan grup bazı ortak atadan gelmeyenleri de içerir ve büyük veri setlerinde çok büyük gruplar ortaya çıkmış olur. Bir dizi tipindeki yedi lokustan bir lokus farkı olan izolatlar "single locus variant" (SLV) olarak, iki lokus farkı olanlar "double locus variant" (DLV) olarak adlandırılır. Bir klonal kompleks içindeki en fazla SLV'ye sahip olan dizi tipi (ST), atasal genotiptir (Hanage ve ark., 2006). Atasal genotipin sahip olduğu, artmış kolonizasyon potansiyeli veya antibiyotik direnci gibi bazı özellikler bu klonun baskın olmasında etkilidir. Zaman içinde ortaya çıkan mutasyonlar ve

rekombinasyon olayları sonucunda atasal genotipte çeşitlilik meydana gelir (Saunders ve Holmes, 2007). BURST bu ST'yi tanımlar ve klonal kompleksteki diğer izolatların ondan köken aldığını farz eder ve sonuçları boğa gözü diyagramı ile gösterir; SLV'ler atasal genotipin çevresinde eş merkezli olarak dizilmiş şekilde, DLV'ler bir dış halkada gösterilir. Tipik olarak atasal genotip olarak tanımlanan ST aynı zamanda klonal kompleks içerisinde en sık rastlanan ST'dir. Atasal ST'nin SLV ve DLV'si olmayan, ancak klonal kompleks içindeki diğer izolatların SLV ve DLV'si olan ST'ler uydu olarak adlandırılırlar ve BURST diyagramına, en benzer ST'ler ile bağlanırlar (Hanage ve ark., 2006; Witte ve ark., 2006).

#### 2.4.2. *spa* Tiplendirme

Tek lokus dizi tiplendirme (SLST) yöntemleri arasında en umut verici olanı stafilokokal protein A (*spa*) geninin, tekrar bölgelerindeki dizi polimorfizmine göre yapılan tiplendirme. Protein A geninin X bölgesi; nokta mutasyonlar, delesyonlar, duplikasyonlar ve insersiyonlara bağlı olarak yoğun polimorfizm gösteren tekrarlardan oluşur. *spa* geninin polimorfik X bölgesindeki tekrarlar hem tekrar sayısı hem de dizi açısından farklı olduğu için tiplendirme amacıyla kullanılmakta ve klonal soylar saptama ve tekrarlanabilirlik açısından MLST'ye eşdeğer sonuçlar vermektedir (Strommenger ve ark., 2006; Singh ve ark., 2006; Gülay, 2008). Bu, polimorfik X bölgesi, temelde 24 bp uzunluğundaki tekrarlardan oluşmuştur ve çeşitliliği büyük ölçüde tekrar bölgelerinin delesyonları ve duplikasyonlarından nadiren de nokta mutasyonlardan ileri gelmektedir. Farklı tekrarlar alfanumerik karakterlerle gösterilir ve tekrarların sırasına göre *spa* tipleri belirlenir. MRSA izolatlarının *spa* tiplendirme ve diğer tiplendirme teknikleri ile yapılan klonal gruplamaları uyumlu bulunmuştur. MLST'ye göre asıl avantajı basitliğidir; sadece tek bir lokus sekanslanır. MLST, *S. aureus* türlerinin önemli klonal gruplarını ayırt eder ancak ayırıcı gücü, yerel salgınların epidemiyolojik araştırmalarında klonal bir grup içerisindeki suşları ayırt etmede yeterli değildir. *spa* tiplendirmenin ayırıcı gücü PFGE ve MLST arasındadır (Deurenberg ve ark., 2007). MLST ve *spa* tiplendirme ile belirlenen klonal gruplar arasında iyi bir korelasyon vardır. Bir sekans tipindeki *spa* geninin tekrar sayısı bazen *spa* tiplendirme ile MLST'den daha iyi çözünürlük sağlayacak derecede çeşitlidir. Yine de PFGE'nin ayırıcı gücünün *spa* tiplendirme ve MLST'den üstün olduğu görüşü hakimdir. *S.*

*aureus*'ta nokta mutasyonlar rekombinasyonlardan daha sık görüldüğünden ve dünya çapında dolaşan az sayıda MRSA klonal grubu olduğundan *coa* (koagülaz) geninin ve *spa* geninin tekrar bölgelerinin sekanslanmasıyla tek lokus DNA analizi MRSA'nın tiplendirilmesinde güvenle kullanılabilir. MRSA'nın hızlı tiplendirilmesinde *spa* tiplendirmenin daha çok kullanılmasının sebebi *coa* tiplendirmeden daha iyi çözünürlük sunmasıdır (Harmsen ve ark., 2003). MRSA'nın hem moleküler evrimi hem de hastane salgınları *spa* tiplendirme ile araştırılabilir. *spa* dizilerinin analizi için Ridom StaphType software version 1.3 (Ridom GmbH, Würzburg, Germany) yazılımı kullanılmaktadır. *spa* tiplendirme verileri enfeksiyon kontrolüne ve MRSA'nın endemik olduğu bölgelerde MRSA salgınlarının otomatik olarak saptanması için erken-uyarı algoritmaları geliştirilmesine olanak verir. Tekrar dizilerine dayalı grup algoritmasının (BURP [Based upon related patterns]), StaphType yazılımına uygulanması ile *spa* tiplendirme verilerine (*spa* klonal kompleksleri) dayalı grup analizi gerçekleştirilir (Witte ve ark., 2006; Deurenberg ve ark., 2007).



**Şekil 3.** Protein A geninin haritası (Shopsin ve ark., 1999)

## 2.5. PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis)

DNA, nötral pH'da negatif yüklü olup elektroforetik bir alandaki göçü moleküler ağırlığına bağlıdır. 50 kb'dan küçük moleküller bir agaroz matriksinde elektrik akımına tutulduğunda büyüklükleriyle ters orantılı olarak hareket ederler; büyük DNA parçaları daha yavaş göç eder. Ancak 50 kb'dan büyük moleküller, ağırlıktan bağımsız olarak hareket ederler. Bakteri kromozomları birkaç mega baz çifti büyüklüğünde olduğu için mikrobiyal analizde konvansiyonel elektroforez kullanılamaz.

Mikroorganizmaların kromozomal DNA'larının birbirini izleyen iki elektrik alanına tabi tutularak büyük DNA parçalarının (40-2000 kb) agaroz jelde ayrılmasını sağlayan yöntem 1984'de Schwartz ve Cantor tarafından tanıtılmıştır. Daha sonra belirli aralıklarla akımın yönü değiştirilerek çeşitli alternatif elektroforetik konfigürasyonlar geliştirilmiştir (Tang ve Stratton., 2010).

Kromozomal restriksiyon fragment analizi, kromozomların statik olmayıp nokta mutasyonlara uğramasına ve nükleotid dizisinde değişiklikler olmasına dayanır. Nükleotid dizisindeki değişiklikler; fragmentlerin, agaroz jel üzerinde ayrıştırılmasıyla kromozomal DNA'nın restriksiyon endonükleaz paternlerinde görülür (Isenberg, 2007). PFGE, Schwarz ve Cantor tarafından geliştirilmiş bir yöntem olup kromozom boyunca birkaç bölgeyi tanıyan restriksiyon enzimleriyle bakteriyel DNA'nın kesimini sağlar (Trindade ve ark., 2003). PFGE için DNA bütün olarak gerekli olduğundan DNA izolasyonu sırasında özel dikkat gerekir. Ekstraksiyon sırasında DNA moleküllerinin kırılma riskini engellemek için her örnek low melting point agaroz içine gömülür, bu sayede hem DNA korunur hem de hücre duvarı lizisi ve hücre proteinlerinin enzimatik sindirimi için gerekli çözeltilerin serbestçe geçişi sağlanır. Agaroz gömülü mikroorganizmaların in situ lizisi ile kromozomal DNA elde edilir, agaroz içerisindeki DNA restriksiyon enzimleri ile kesilir. Ortaya çıkan büyük DNA parçaları (10-800 kb) elektrik alanlarının değişimiyle uygulanan PFGE'ye tabi tutulur. Böylelikle, total genomik DNA farklı elektroforetik mobilitelere sahip belirli sayıda restriksiyon fragmentlerine ayrıştırılmış olur (Trindade ve ark., 2003; Isenberg, 2007).

Geleneksel agaroz jel elektroforezinde, 40-50 kb'dan büyük DNA moleküllerinin göçü yeterli olmaz. DNA'nın ayrıştığı elektrik alanının yönünün jel boyunca periyodik olarak değiştirilmesiyle, PFGE 1000 kbp'in üzerindeki DNA moleküllerinin ayrışmasını sağlar. Bir salgın suşunu temsil eden PFGE izolatları birbirinin aynıdır ve epidemiyolojik olarak ilişkisiz suşlardan tamamen farklıdır, bu durumda salgını belirlemek kolaydır. PFGE ve diğer tiplendirme metodları ile yapılan çalışmalar göstermiştir ki, iyi tanımlanmış birkaç aylık bir salgın sürecinde dahi DNA insersiyonu ve delesyonu ya da yeni bir restriksiyon endonükleaz bölgesi oluşturan tek bir genetik olay ortaya çıkabilir. Nokta mutasyonlar ya da insersiyon ve delesyonlar gibi rastgele genetik olaylar, salgın sırasında elde edilen restriksiyon profilini değiştirebilir. (Trindade ve ark., 2003; Singh ve ark., 2006)

PFGE sonucunda elde edilen bant sayısının nispeten az olmasına karşın özellikle laboratuvarlar arası çalışmalarda sonuçların yorumlanmasında sorunlar vardır. Elektroforez koşullarındaki küçük farklar dahi her bantın jel üzerinde katettiği mesafeyi değiştirdiğinden farklı jel görüntülerinin karşılaştırılması komplike hale gelir. Buna rağmen PFGE, salgınların belirlenmesinde kullanılan önemli bir tekniktir; tekrarlanabilirliği ve ayırt ediciliği en iyi olan tiplendirme yöntemlerinden biridir, salgınlar ve hastaneler arası geçişlerin araştırılmasında sıkça kullanılır (Trindade ve ark., 2003; Singh ve ark., 2006; Deurenberg ve ark., 2007). Yüksek ayırıcı gücünden dolayı, MRSA tiplendirmede halen altın standarttır, endemik ve epidemik MRSA suşlarının epidemiyolojisinin anlaşılmasında yoğun olarak kullanılır (Trindade ve ark., 2003). MRSA'nın PFGE tiplendirmesinde; saflaştırılmış kromozomal DNA restriksiyon enzimi SmaI ile kesilir ve agaroz jel elektroforeze tabi tutulur. PFGE paternleri, Dice katsayısı ve UPGMA ile Tenover kriterlerine göre analiz edilir (Deurenberg ve ark., 2007).

### 2.5.1. Tenover Kriterleri, modifiye Tenover ve ESGEM Kriterleri

Tenover ve ark., suşlar arasındaki genetik ilişkinin saptanması için jel üzerindeki bant farkı sayısına bakarak standardize yorumlama kriterleri ileri sürmüşlerdir. Bu kriterlere göre:

- **Aynı PFGE profiline sahip izolatlar; ayırt edilemez.**
- **1-3 bant farkına sahip izolatlar; yakın ilişkili olup tek bir genetik değişikliği yansıtır.**
- **4-6 bant farkına sahip izolatlar; muhtemel ilişkili olup birbirinden bağımsız iki genetik olayın sonucudur.**
- **6 veya daha fazla bant farkına sahip izolatlar; ilişkisiz olup üç ya da daha fazla genetik değişikliğin sonucudur (Tang ve Stratton., 2010).**

Aralarında 3 banta kadar fark olan izolatlar aynı suşun epidemiyolojik olarak ilişkili alt tiplerini temsil edebilir; bunun aksine aralarında 3 banttan fazla fark olan izolatlar daha belirsiz bir epidemiyolojik ilişki sergiler. Bu kriterler, genetik çeşitliliğin sınırlı olduğu 1-3 ay gibi kısa zaman aralığında toplanan az sayıdaki izolatların analizi için uygundur; bir yıldan daha uzun sürede toplanan büyük koleksiyonlar için uygun değildir (Trindade ve ark., 2003; Singh ve ark., 2006).

#### Modifiye Tenover Kriterleri

Goering, Tenover ölçütlerini 1998’de kuramsal olarak modifiye ederek tek genetik olguyla (GE) oluşabilecek bant farkının 0-4 arasında değişebileceğini göstermiştir. Bu durumda epidemiyolojik ilişkiye karar vermek için kullanılan ölçütlerde değişiklik olmuştur. Goering’ e göre modifiye kriterler:

- **0 GE; 0 bant farkı=özdeş =Epidemiyolojik İlişkili (Eİ)= “Ayırt edilemedi”**
- **1 GE ; 0-4 bant farkı olasılığı = yakın E.İ.**
- **2 GE ; 0-8 bant farkı olasılığı = olası yakın E.İ.**
- **3 GE ; 0-12 bant farkı olasılığı = E. İlişkısiz = “Farklı” (Goering, 1998; Acuner, 2008)**

### ESGEM Kriterleri

Epidemiyolojik ilişkinin belirlenmesi için uygulamada doğrudan doğruya Tenover kriterleri değil, yazılımlar aracılığıyla ve çeşitli benzerlik indeksleriyle elde edilen verilerle oluşturulan benzerlik matrisleri ve buna dayalı UPGMA dendrogramları ve karar eşikleri kullanılmaktadır. ESGEM, 2007’de yayınladığı kılavuzda bu karmaşıklığın giderilmesi için

- **En az 2 GE varlığını göstermesi nedeniyle  $\geq 5$  bant ölçütünü kesim değeri olarak önermiştir.**
- **Buna göre, 1-4 bant farklılığı “aynı tipin alt-tipleri” olarak yorumlanmaktadır.**
- **Ek olarak, eğer diğer epidemiyolojik verilerle destekleniyorsa  $\geq 5$  bant farkının da “benzerlik kümeleri” olarak değerlendirilebileceği belirtilmiştir.**
- **Ancak, bu öneri, 1-4 bant aralığında kalan,  $> 2GE$  olasılıklarını dikkate almamaktadır (van Belkum ve ark., 2007; Acuner, 2008).**

**Tablo 2.** PFGE ve PCR-tabanlı tiplendirme yöntemlerinin prosedür özelliklerinin karşılaştırılması (Tang ve Stratton., 2010)

<b>Prosedürün özelliği</b>	<b>PFGE</b>	<b>Amplifikasyon ile tiplendirme (RAPD, rep-PCR, MLST)</b>
<b>Genomik bölge</b>	Tüm kromozom	Kromozomda seçili bölge
<b>Örnek hazırlanması</b>	Hücreler agarozaya gömülür	DNA ekstraksiyonu
<b>Fragment eldesi</b>	Restriksiyon endonükleaz kesimi	DNA polimeraz amplifikasyonu
<b>Elektroforez</b>	Pulslu alan	Homojen
<b>Fragment büyüklüğü</b>	50-2000 kb	<10 kb
<b>Süre</b>	3-4 gün	2-3 gün

(RAPD: Random amplified polymorphic DNA, rep-PCR: Repetitive element palindromic PCR)

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### **S. aureus izolatlarının ve ilişkili klinik verilerin toplanması:**

OMÜ-SUVAM TPL Bakteriyoloji Subdisiplin Laboratuvarına gönderilen çeşitli klinik örneklerden Aralık 2006-Şubat 2007 tarihleri arasında izole edilen *S. aureus* izolatlarından, 30 gün içinde üreyen ve antibiyotik duyarlılık fenotipinde iki ve daha az değişiklik gösteren izolatlar elenerek; MRSA izolatlarının tamamı ( $n=48$ ) ve hastanemiz infeksiyon kontrol komitesi (İKK) tarafından hastane infeksiyonu etkeni olarak kabul edilen MSSA izolatları ( $n=7$ ) çalışmaya dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen MRSA izolatlarının 30'u İKK tarafından hastane infeksiyonu etkeni olarak onaylandı.

#### **3.1. S. aureus İzolatlarının Tanımlanması**

Laboratuvara gönderilen bütün klinik örnekler, %5 koyun kanlı agara ekildi. 37°C'de 18-24 saatlik inkübasyon sonunda koloni morfolojileri ve Gram boyama ile mikroskopik morfolojileri incelendi. Kanlı agarda S tipi düzgün koloniler yapan, Gram pozitif morfolojisinde boyanan, katalaz ve koagülaz testleri pozitif izolatlar *S. aureus* olarak tanımlandı. Tür identifikasyonu, VITEK2 Compact Automated Microbiology System (BioMérieux, USA) cihazında doğrulanarak antibiyotik duyarlılık testleri çalışıldı. Duyarlılık testi sonucunda; eritromisine duyarlı çıkan MRSA suşlarında PCR ile *ermA* geni araştırıldı. İzolatlar, saklama besiyerine (brain-heart infusion broth) alınarak -20°C'de donduruldu.

#### **3.2. Besiyerleri ve Tamponlar**

**Brain heart infusion broth:** 37 g toz brain heart infusion broth, 1 L distile su içinde çözüldü, 150 mL gliserol ilave edildi.

**Nutrient broth:** 8 g toz nutrient broth, 8.5 g NaCl tartılıp 1 L distile su içinde pH 7.2-7.4 olacak şekilde çözüldü.

**Triptik Soy Agar:** 40 g toz triptik soy agar, 1 L distile su içinde çözüldü.

**Lizis tamponu:** 20 mM tris, 2 mM EDTA, %1.2 Triton X-100, 1 M HCl ile hazırlandı.

**10 x Tris-Borik asit-EDTA (TBE):** 1 M tris-borik asit ve 10 mM EDTA ile hazırlanıp pH 8.0'a ayarlandı



**Yükleme tamponu:** 40 mg Na<sub>2</sub>-EDTA, 4 g sakkaroz, 4 mg brom fenol mavisi ile 10 mL distile su içinde hazırlandı.

**Hücre Süspansiyon Tamponu (HST):** 10 mM tris-HCl, 50 mM EDTA ve 20 mM NaCl ile hazırlandı ve pH 8.0'a ayarlandı.

**Hücre Lizis Tamponu I:** 10 mM tris-HCl, 50 mM NaCl, 50 mM EDTA, %0.2 sodyum deoksikolat ve %0.5 sarkozin ile hazırlandı ve pH 9.7 olarak ayarlandı.

**Hücre Lizis Tamponu II:** 250 mM EDTA ve %1 sarkozin ile hazırlandı, pH 9.49 olarak ayarlandı; kullanım sırasında 50 µg/mL proteinaz K eklendi.

**Tris-EDTA Tamponu (TE):** 10 mM tris-HCl ve 0.1 mM EDTA ile hazırlandı, pH 7.6 olarak ayarlandı.

**0.5 x TBE:** 44.5 mM trisma base, 44.5 mM borik asit ve 1 mM EDTA ile hazırlanıp pH 8.5'e ayarlandı.

### 3.3. *S. aureus* Bakteri Hücrelerinden DNA Ekstraksiyonu

*S. aureus* bakteri hücrelerinden DNA eldesi için DNeasy tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany) kullanıldı.

- -20<sup>0</sup>C'de dondurulan bakteriler koyun kanlı Mueller-Hinton agara (SB-MHA) pasajlandı.
- Tek koloni ekim yöntemiyle ekilen plaklar 37<sup>0</sup>C'de bir gece inkübe edildi.
- SB-MHA üzerinde üremiş kolonilerden bir koloni alınarak 5 mL nutrient broth içine inoküle edilerek 37<sup>0</sup>C'de çalkalamalı inkübatörde bir gece inkübe edildi.
- 1.3 mL kültür alınarak 8000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Üstteki sıvı dökülerek pellet üzerine, içine lizostafin (100 mg/L; Sigma, Taufkirchen, Germany) ilave edilen 200 µL lizis tamponu eklendi.
- Süspansiyon homojen hale gelene kadar vortekslenerek 37<sup>0</sup>C'de kuru blok ısıtıcıda 5-20 dakika inkübasyona bırakıldı.
- 200 µL AL tamponu ve 25 µL proteinaz K eklenerek vortekslendi, 70<sup>0</sup>C'de kuru blok ısıtıcıda 60 dakika inkübasyona bırakıldı.
- 200 µL %100'lük etanol ilave edilerek vortekslendi.
- Süspansiyon DNeasy spin kolona alınarak 8000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi.
- Sıvı içeren alttaki tüp atıldı ve kolon 2 mL'lik toplama tüpüne yerleştirildi.

- Spin kolon üzerine 200  $\mu$ L AW1 yıkama tamponu eklenerek tekrar 8000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi.
- Sıvı içeren alttaki tüp atıldı ve kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi
- Spin kolon üzerine 200  $\mu$ L AW2 yıkama tamponu eklenerek 14000 rpm'de 3 dakika santrifüjlendi.
- Toplama tüpü atılarak spin kolon 1.5 mL'lik kapaklı tüpe alındı, üzerine 50  $\mu$ L ultra saf su ilave edildi, 8000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi.
- Üstteki tüp atıldı, altta bulunan kapaklı tüpte 50  $\mu$ L DNA elde edildi.

### **3.3.1. DNA'nın Görüntülenmesi**

10 x TBE'den 100 mL alınıp 900 mL distile su ile karıştırılarak 1 x TBE elde edildi. 0.48 g agaroz, 60 mL 1 x TBE içinde mikrodalga fırında çözülerek %0.8'lik agaroz jel hazırlandı. Yatay elektroforez jel kabına döküldü ve soğumaya bırakıldı. 2  $\mu$ L DNA, 5  $\mu$ L yükleme tamponu ile 100 V elektrik akımı altında 90 dakika elektroforeze tabi tutuldu. Jel 1  $\mu$ g/mL etidyum bromür içeren distile suda 15 dakika boyandı. Distile suda 15 dakika dekolizasyonu takiben UV ışığı altında görüntülendi.

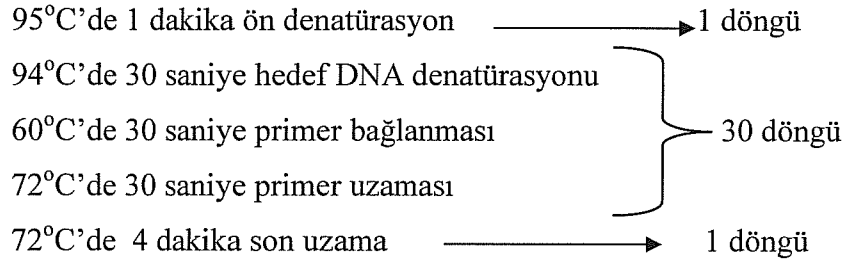
### 3.4. *spa* Tiplendirme

#### 3.4.1. PCR Yöntemiyle *spa* Geninin Amplifikasyonu

*S. aureus* izolatlarından, protein A genine (*spa*) ait polimorfik X bölgesi *spa*-1113f (5'-TAA AGA CGA TCC TTC GGT GAG C-3') ve *spa*-1514r (5'-CAG CAG TAG TGC CGT TTG CTT-3') primerleri kullanılarak amplifiye edildi. Bu amaçla, PuReTaq Ready-To-Go PCR Beads (Amersham-Pharmacia Biotech) hazır kiti kullanıldı.

İçinde stabilizörler, BSA, dNTP karışımı, Taq DNA polimeraz ve reaksiyon tamponu bulunan hazır kit üzerine 23.75 µL ultra saf su, 0.5 µL primer f (10 µM), 0.5 µL primer r (10 µM) ve 0.25 µL DNA eklenerek 25 µL'lik PCR karışımı hazırlandı. Thermal cyclers'a (MJ RESEARCH PTC-200 Peltier Thermal Cycler) yerleştirildi.

#### ***spa* Gen Bölgesi için Amplifikasyon Programı**

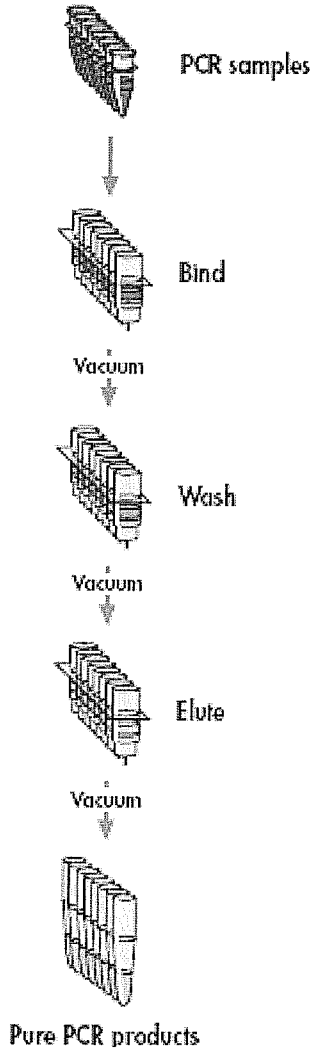


#### 3.4.2. Agaroz Jel Elektroforezi

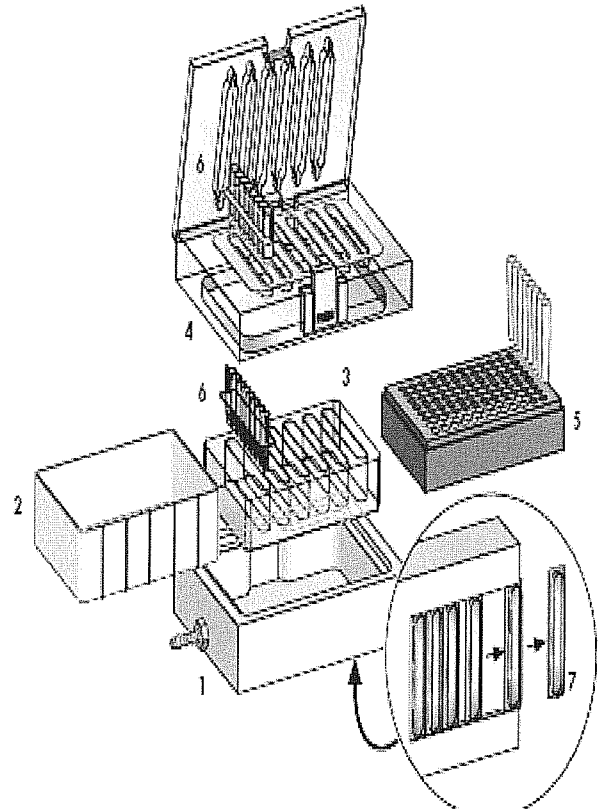
PCR ürünlerinin incelenmesi ve boyutlarının belirlenmesi için 0.84 g agaroz, 60 mL 1 x TBE içinde mikrodalga fırında çözülerek %1.4'lük agaroz jel hazırlandı. Yatay elektroforez jel kalıbına döküldü ve soğumaya bırakıldı. İlk ve son sıraya 100 bp'lik standart DNA yüklendi. 2 µL PCR ürünü, 5 µL yükleme tamponu ile 100 V elektrik akımı altında 90 dakika elektroforeze tabi tutuldu. Jel 1 µg/mL etidyum bromür içeren distile suda 15 dakika boyandı. Distile suda 15 dakika dekolorizasyonu takiben UV ışığı altında görüntüledi.

### 3.4.3. PCR Purifikasyonu

PCR ürünlerinin primerlerden, nükleotidlerden, polimerazlardan ve tuzlardan arındırılmasını sağlamak için QIAquick 8 PCR Purification Kit ve QIAvac 6S cihazı kullanılarak PCR purifikasyonu gerçekleştirildi.



Şekil 4. QIAquick 8 purifikasyon kiti prosedürü



Şekil 5. QIAvac 6S Cihazı

### 3.4.4. *spa* Sekans Reaksiyonları

Sekans reaksiyonları, ABI PRISM BigDye Terminator cycle sequencing ready reaction kit (Applied Biosystems, Foster City, Calif.) kullanılarak gerçekleştirildi. Bu kit içerisinde AmpliTaq DNA polimeraz, PCR için gerekli kimyasallar ve her bir bazın, her biri farklı bir floresan boya ile işaretli, eşit miktarda ddNTP'leri bulunur. PCR için kullanılan f ve r primerleri ile ayrı sekans karışımları hazırlanarak thermal cyclers'da sekans reaksiyonu gerçekleştirildi. Daha sonra örnekler otomatik DNA dizi analizi cihazı ABI 377 sequencer (Applied Biosystems, Foster City, Calif.) kapiller elektroforez sisteminde yürütülerek DNA dizileri elde edildi. *spa* tipleri, Ridom StaphType software version 1.3 (Ridom GmbH, Würzburg, Germany) ile belirlendi.

**Tablo 3.** *spa* sekans reaksiyon karışımı

BigDye reaksiyon kiti	1 $\mu$ L
Primer (0.8 $\mu$ M)	2 $\mu$ L
PCR ürünü	0.25 $\mu$ L
Ultra saf su	6.75 $\mu$ L
<b>Toplam</b>	<b>10 <math>\mu</math>L</b>

Thermal cyclers koşulları:

96°C'de 10 saniye	} 25 döngü
60°C'de 5 saniye	
60°C'de 4 dakika	

### 3.5. Multilokus Dizi Analizi

#### 3.5.1. PCR Yöntemiyle “Housekeeping” Genlerinin Amplifikasyonu

*S. aureus* izolatlarında **arc** (Carbamate kinase), **aro** (Shikimate dehydrogenase), **glp** (Glycerol kinase), **gmk** (Guanylate kinase), **pta** (Phosphate acetyltransferase), **tpi** (Triosephosphate isomerase), **yqi** (Acetyle coenzyme A acetyltransferase) genleri aşağıdaki primerler kullanılarak amplifiye edildi:

arc f - 5' TTG ATT CAC CAG CGC GTA TTG TC -3'

arc r - 5' AGG TAT CTG CTT CAA TCA GCG -3'

aro f - 5' ATC GGA AAT CCT ATT TCA CAT TC -3'

aro r - 5' GGT GTT GTA TTA ATA ACG ATA TC -3'

glp f - 5' CTA GGA ACT GCA ATC TTA ATC C -3'

glp r - 5' TGG TAA AAT CGC ATG TCC AAT TC -3'

gmk f - 5' ATC GTT TTA TCG GGA CCA TC -3'

gmk r - 5' TCA TTA ACT ACA ACG TAA TCG TA -3'

pta f - 5' GTT AAA ATC GTA TTA CCT GAA GG -3'

pta r - 5' GAC CCT TTT GTT GAA AAG CTT AA -3'

tpi f - 5' TCG TTC ATT CTG AAC GTC GTG AA -3'

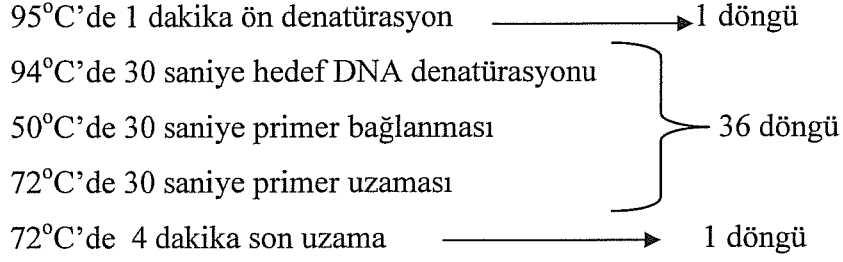
tpi r - 5' TTT GCA CCT TCT AAC AAT TGT AC -3'

yqi f - 5' CAG CAT ACA GGA CAC CTA TTG GC -3'

yqi r - 5' CGT TGA GGA ATC GAT ACT GGA AC -3'

İçinde stabilizörler, BSA, dNTP karışımı, Taq DNA polimeraz ve reaksiyon tamponu bulunan hazır kit üzerine 23.75 µL ultra saf su, 0.5 µL primer f (10 µM) , 0.5 µL primer r (10 µM) ve 0.25 µL DNA eklenerek her gen bölgesi için ayrı 25 µL'lik PCR karışımı hazırlandı, thermal cycler'a yerleştirildi.

### Housekeeping Genler için Amplifikasyon Programı



### 3.5.2. Agaroz Jel Elektroforezi

PCR ürünlerinin incelenmesi ve boyutlarının belirlenmesi için 0.84 g agaroz, 60 mL 1 x TBE içinde mikrodalga fırında çözülerek %1.4'lük agaroz jel hazırlandı. Yatay elektroforez jel kalıbına döküldü ve soğumaya bırakıldı. İlk ve son sıraya 100 bp'lik standart DNA yüklendi. 2 µL PCR ürünü, 5 µL yükleme tamponu ile 100 V elektrik akımı altında 90 dakika elektroforeze tabi tutuldu. Jel 1 µg/mL etidyum bromür içeren distile suda 15 dakika boyandı. Distile suda 15 dakika dekolorizasyonu takiben UV ışığı altında görüntülendi.

### 3.5.3. PCR Purifikasyonu

PCR ürünlerinin primerlerden, nükleotidlerden, polimerazlardan ve tuzlardan arındırılmasını sağlamak için QIAquick 8 PCR Purification Kit ve QIAvac 6S cihazı kullanılarak PCR purifikasyonu gerçekleştirildi.

### 3.5.4. MLST Sekans Reaksiyonları

ABI PRISM BigDye Terminator cycle sequencing ready reaction kit (Applied Biosystems, Foster City, Calif.) kullanarak PCR için kullanılan f ve r primerleri ile her gen bölgesi için ayrı sekans karışımları hazırlandı ve sekans reaksiyonları gerçekleştirildi. Daha sonra örnekler otomatik DNA dizi analizi cihazı ABI 377 sequencer (Applied Biosystems, Foster City, Calif.) kapiller elektroforez sisteminde yürütülerek DNA dizileri elde edildi. Sekans verileri, internet yoluyla *S. aureus* MLST veritabanında değerlendirildi.

**Tablo 4.** Housekeeping genler için sekans reaksiyon karışımı

Big Dye reaksiyon kiti	1 $\mu$ L
Primer (0.8 $\mu$ M)	2 $\mu$ L
PCR ürünü	0.25 $\mu$ L
Ultra saf su	6.75 $\mu$ L
<b>Toplam</b>	<b>10 <math>\mu</math>L</b>

Thermal cyclers koşulları:

96°C'de 10 saniye	} 25 döngü
50°C'de 5 saniye	
60°C'de 4 dakika	



### **3.6. PFGE Yöntemi ile Tiplendirme**

#### **3.6.1. İzolatların hazırlanması**

Tür düzeyinde tanımlaması yapılmış olan bakterilerden kanlı agar besiyerine tek koloni ekimi yapıldı. Bir gecelik inkübasyondan sonra kültürün saflığı kontrol edildi. Buradaki tek koloniden tekrar triptikaz soy agar besiyerine pasaj yapılarak bir gece inkübasyona bırakıldı. Saf kültür halinde üreyen koloniler plastik öze ile toplanarak, 1 mL HST içinde süspansiyon edildi. Hücre süspansiyonu, 13000 x g 4°C'de 2 dakika santrifüj edildi ve üstteki HST atıldı. HST ile bu yıkama 2 kez yapıldı. Pelletin üzerine tekrar 1 mL HST eklenerek mikropipet kullanılarak iyice homojenize edildi. Bakteri yoğunluğu, spektrofotometre yardımıyla 590 nm'de 1.5 absorbans olacak şekilde ayarlandı.

#### **3.6.2. İzolatların Agaroza Gömülmesi**

HST içerisinde %1.5 düşük erime ısıları agaroz (LMA) hazırlandı. Agaroz iyice çözülünceye kadar mikrodalgada bırakıldı, ependorf tüplere 150 µL dağıtıldı ve 45–50°C'deki kuru ısı bloğunda bekletildi. HST içinde hazırlanmış bakteri süspansiyonundan 150 µL alınarak, 50°C'de tutulan ve içerisinde 150 µL düşük erime ısıları agaroz bulunan tüpe eklendi. Üzerine 2 µL lizostafin (1 mg/mL) eklendi. Birkaç defa pipetaj yapılarak hücrelerin agaroz içinde homojen dağılması sağlandı. Bekletilmeden, hücre-agaroz karışımından 100 µL hava kabarcığı olmayacak şekilde agaroz kalıbına dağıtıldı. Kalıplar, agaroz katılaşmaya kadar +4°C'de, 10 dakika bekletildi

#### **3.6.3. Agaroz İçindeki Hücrelerin Parçalanması**

5 mL'lik steril kapaklı tüplere, 2 mL hücre lizis tamponu-1 konuldu. İçerisinde bakteri bulunan agaroz, kalıptan çıkarılarak lizis solüsyonuna yerleştirildi. 37°C'de 2 saat çalkalamalı su banyosunda, tüpler yatık durumda bekletildi. Lizis tamponu dökülerek, yerine 2 mL hücre lizis tamponu-2 konuldu. 50°C'de 2 saat çalkalamalı su banyosunda, tüpler yatık durumda bekletildi.

### 3.6.4. Agaroz Kalıpların Yıkanması

Lizis aşamasından sonra agaroz kalıbının katılaşması için tüpler buz içerisinde en az 15 dakika bekletildi ve proteinaz K solüsyonu aspire edildi. Agaroz kalıpları her biri 50°C'de 30 dakika olmak üzere altı defa, 4 mL TE tamponuyla yıkandı. Böylece içinde saflaştırılmış DNA bulunan agaroz, restriksiyon enzimi (RE) ile kesime hazır hale getirilmiş oldu.

### 3.6.5. DNA'nın RE ile Kesilmesi

DNA içeren agaroz kalıbı bir lam üzerine alınarak bir bistüri yardımıyla 1/3 oranında kesildi. Kesilen parça 200 µL 1x SmaI tamponu içine konularak çalkalamalı su banyosunda 30°C'de 10 dakika bekletildi ve sonra sıvı aspire edildi. Diğer parçalar sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere TE tamponu içinde +4°C'de saklandı. Her agaroz kalıbı için 100 µL olacak şekilde (10 µL 10x SmaI tamponu, 30 U/µL SmaI enzimi, 87 µL steril ultra saf su) karışım hazırlandı. Bu karışımın içerisine agaroz kalıbı konulup, çalkalamalı su banyosunda 30°C'de, 4 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüpler buzdolabında 15 dakika bekletildi.

### 3.6.6. Elektroforez Jelinin Hazırlanması ve Kalıpların Jele Yüklenmesi

0.5 x TBE içinde 100 mL olacak şekilde %1.1'lik agaroz (Pulsed-field Certified Agarose, BioRad) hazırlandı. Agaroz mikrodalga fırında iyice çözüldükten sonra, balon 45-50°C'lik su banyosunda bekletildi. RE ile kesilmiş olan agaroz kalıplarının her biri, tarağın dişlerinin uç kısmına yerleştirildi. Her jelde *S. aureus* NCTC 8325 referans olarak kullanıldı. Maksimum 5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra tarak agaroz dökülecek olan kaset içine yerleştirildi ve sıcaklığı yaklaşık 45-50°C olan agaroz kaset içine döküldü. Oda ısısında, gözle katılaşma ve opaklık saptanarak katılaşmaya bırakıldıktan (yaklaşık 20-30 dakika) sonra, tarak ve agaroz kasetinin çerçeveleri çıkarıldı. Tabla üzerindeki agaroz, içerisinde 1900 mL 0.5 x TBE tamponu bulunan PFGE tankına yerleştirildi.

### 3.6.7. Elektroforez

“CHEF-Mapper Pulsed-Field Gel Electrophoresis” sisteminde uygulanan elektroforez koşulları;

başlangıç vuruş süresi: 5,3 sn, bitiş vuruş süresi: 34,9 sn, vuruş açısı: 120°, akım: 6 V/cm, sıcaklık: 14°C, süre: 20 saat.

Elektroforezden sonra jel, 0.5 µg/mL etidyum bromür içeren 400 mL ultra saf su içine alındı ve 20 dakika orbital karıştırıcı üzerinde boyandı. *ChemiDoc XRS* görüntüleme aygıtı kullanılarak DNA bantları belirlendi. DNA bant profillerinin görüntüsü, TIFF (veya JPEG) formatında kayıt edildi.

### 3.7. İstatistik Analiz

#### İstatistiksel analizden dışlama ölçütleri

- ✓ MSSA suşları tekil genotiplere sahip olduğundan ve örnek sayısı küçük olduğundan analiz dışı bırakıldı.
- ✓ MRSA pulsotiplerinden tekil olanlar sporadik kabul edildiğinden analiz dışı bırakıldı.
- ✓ Verilerin listelemesinde, eldeki veri seti içinde, kümelendirme için ayırt edici bulunmadığından, olası risk faktörleri arasında bulunan; *spa*, klonal kompleks (CC) ve sekans tipleri analiz dışı bırakıldı.

#### İstatistiksel analizde içerme ölçütleri

Verilerin listelemesinde, eldeki veri seti içinde, kümelendirme için ayırt edici olabileceği düşünülen ve olası risk faktörleri arasında bulunan aşağıdaki değişkenler analize dahil edilme ölçütleri olarak belirlendi:

Klinik özellik olarak;

- ✓ İKK onaylı nozokomiyal infeksiyon tanısı olup olmama (İKK tarafından CDC ölçütlerine göre, nozokomiyal infeksiyon tanısı veya kolonizasyon tanısı almış olması) (NI/C)

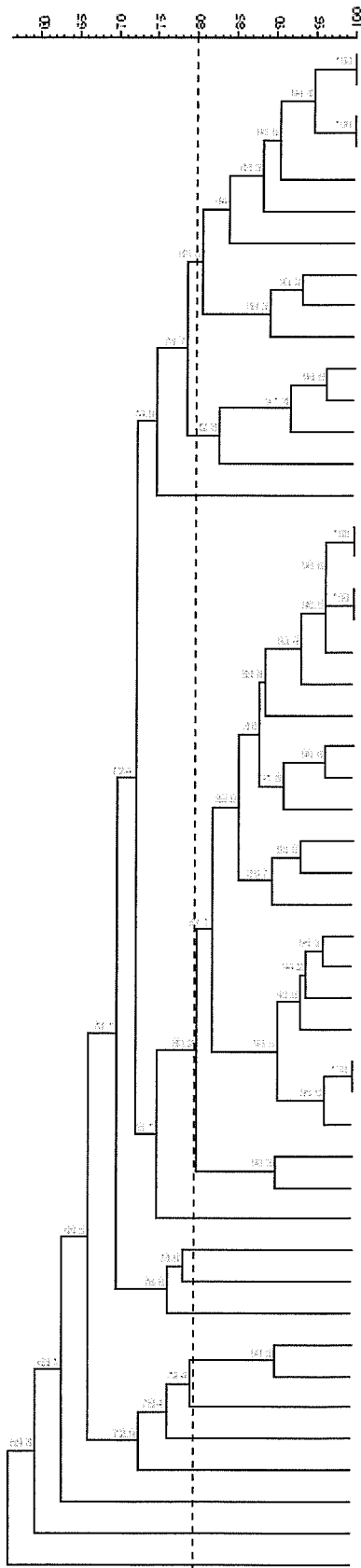
Laboratuvar özelliği olarak;

- ✓ Fenotipik özellik: Standardize antibiyotik fenotipi (SAPI)
- ✓ Genotipik özellik: Pulsotip

İzolatlar NI/C, SAPI ve pulsotip özellikleri bakımından oluşan özgül paternlerine göre özdeş patern gruplarında kümelendirildi. Nonparametrik bir test olan ki-kare testi kullanıldı. %99 güven aralığında  $p < 0.001$  ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

#### 4. BULGULAR

Çalışmamızda kullanılan suşlar, MRSA ve MSSA olarak iki ana grup altında incelendi. Her iki gruptaki izolatların *spa* tipleri belirlendi. Farklı *spa* tiplerine ait izolatlar seçilerek MLST uygulandı. Tüm izolatların PFGE ile SmaI makrorestriksiyon fragment profili belirlendi; MRSA sonuçları BioNumerics yazılım programı (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) ile değerlendirildi. İntra- ve interjel mukayeseleri %0.5 optimizasyon ve %1 tolerans ile gerçekleştirildi. PFGE tipleri ve alttipleri, UPGMA ile çizilen dendrogram üzerinde Dice %80 benzerlik eşik değerinde oluşturulan gruplarla tanımlandı. Dendrogramda ilk izolattan başlanarak kümeler içinde farklı pulstotipler numaralandırıldı. PFGE sonuçlarının analizi ile MRSA izolatlarında 14 farklı pulstotip ortaya çıktı. MSSA'nın PFGE ile elde edilen bant profilleri gözle değerlendirildi, izolatların her birinin ayrı bir paterne sahip olduğu görüldü. Seçilen izolatların SCC*mec* tipleri multiplex PCR ile tip III olarak belirlendi.



İzolat No	İKK Tanısı	Servis	spa tip
07-02712	C	PIS	İ30 PT4 1.1
07-02713	NI SSI-DIS	PIS	İ30 PT7 1.1
07-02681	NI SST-DECU	IM	İ30 PT13 1.2
07-02711	NI PNEU-PNU2	TM	İ32 PT13 1.2
07-02688	NI SSI-Organ/Space	NS	İ30 PT12 1.3
07-02735	NI SSI-DIS	OrS	İ30 PT7 1.4
07-02719	C	PIS	İ30 PT16 1.5
07-02714	C	PIS	İ30 PT11 1.6
07-02724	C	IM	İ30 PT9 1.7
07-02716	C	Inf	İ30 PT8 1.8
07-02687	NI BSI-LCBI	Ped	İ30 PT8 2.1
07-02715	C	Ped	İ30 PT8 2.2
07-02718	C	PIS	İ30 PT8 2.3
07-02734	NI BSI-LCBI	Inf	İ30 PT7 2.4
07-02729	C	TM	İ30 PT15 3.1
07-02690	NI PNEU-PNU2	ICU	İ30 PT14 4.1
07-02720	C	ICU	İ30 PT14 4.1
07-02682	NI SSI-DIP	NS	İ30 PT14 4.2
07-02717	C	Ped	İ30 PT14 4.2
07-02721	C	NS	İ30 PT14 4.3
07-02684	NI PNEU-PNU2	VascS	İ30 PT14 4.4
07-02722	C	ICU	İ30 PT14 4.5
07-02693	NI BSI-LCBI	PIS	İ30 PT14 4.6
07-02694	NI PNEU-PNU3	ICU	İ30 PT14 4.7
07-02692	NI PNEU-PNU2	Ped	İ30 PT14 4.8
07-02683	NI BSI-LCBI	Ped	İ30 PT10 4.9
07-02685	NI SSI-Organ/Space	PIS	İ30 PT14 4.10
07-02731	NI PNEU-PNU2	N	İ30 PT14 4.11
07-02700	NI PNEU-PNU3	N	İ30 PT14 4.12
07-02701	NI PNEU-PNU2	N	İ30 PT14 4.13
07-02696	NI PNEU-PNU2	N	İ30 PT14 4.14
07-02702	NI PNEU-PNU2	ICU	İ30 PT14 4.15
07-02697	NI SSI-Organ/Space	NS	İ30 PT14 4.16
07-02699	NI PNEU-PNU2	ICU	İ30 PT14 4.16
07-02698	NI PNEU-PNU2	ICU	İ30 PT15 4.17
07-02691	NI SSI-Organ/Space	S	İ30 PT14 4.18
07-02703	NI PNEU-PNU3	TM	İ30 PT14 4.19
07-02689	NI PNEU-PNU2	TS	İ30 PT5 5.1
07-02686	NI SSI-Organ/Space	S	İ30 PT14 6.1
07-02730	C	TS	İ30 PT9 7.1
07-02732	C	OrS	İ59 PT15 8.1
07-02725	C	TS	İ30 PT15 9.1
07-02726	NI SSI-DIS	PIS	İ30 PT3 9.2
07-02727	C	Inf	İ30 PT4 10.1
07-02728	NI EENT-CONJ	Inf	İ30 PT14 11.1
07-02723	C	IM	İ30 PT9 12.1
07-02733	C	PIS	İ30 PT12 13.1
07-02695	NI PNEU-PNU2	IM	İ30 PT15 14.1
NCTC-83.			SS

**Şekil 6.** MRSA izolatlarının SmaI makrorestriksiyon analizi ile elde edilen DNA paternlerinin Dice benzerlik katsayısı kullanılarak çizilen dendrogramı (SSI-DIS: Derin insizyonel sekonder cerrahi alan enfeksiyonu, SST-DECU: Deri ve yumuşak doku enfeksiyonu-Dekübit ülseri, PNEU-PNU2: Spesifik laboratuvar bulguları ile tanı konan nozokomiyal pnömoni, SSI-Organ/Space: Cerrahi alan enfeksiyonu-Organ/Boşluk, BSI-LCBI: Laboratuvar tarafından kanıtlanmış bakteremi, SSI-DIP: Derin insizyonel primer cerrahi alan enfeksiyonu, PNEU-PNU3: Bağışıklık sistemi baskılanmış hastada gelişen pnömoni, EENT-CONJ: Konjunktivit, PIS: Plastik cerrahi, IM: Dahiliye, TM: Göğüs Hastalıkları, NS: Beyin cerrahisi, OrS: Ortopedi, Inf: Enfeksiyon hastalıkları, Ped: Pediatri, ICU: Yoğun bakım ünitesi, VascS: Kardiyovasküler cerrahi, N: Nöroloji, S: Genel cerrahi, TS: Göğüs cerrahisi, PT: Antibiyotik direnç fenotipi, SS: Standart suş)

**Tablo 5.** MRSA izolatlarının özellikleri

İzolat No	Servis Türü	Örnek Türü	İKK Tanısı	SCCmec	spa Tip	Sekans Tip	CC	Pulsotip
07-02681	Dahiliye	Yara	SST-DECU		t030	ST239	CC8	1
07-02711	Göğüs Hastalıkları	TAK	PNEU-PNU2	III	t632	ST239	CC8	1
07-02682	Beyin Cerrahisi	Yara	SSI-DIP		t030			4
07-02712	Plastik Cerrahi	Yara	C		t030			1
07-02683	Pediatri	Kan	BSI-LCBI		t030			4
07-02713	Plastik Cerrahi	Yara	SSI-DIS	III	t030			1
07-02714	Plastik Cerrahi	Kan	C		t030			1
07-02715	Pediatri	Kan	C		t030			2
07-02716	İnfeksiyon Hastalıkları	TAK	C		t030			1
07-02684	Kardiyovasküler Cerrahi	TAK	PNEU-PNU2		t030			4
07-02685	Plastik Cerrahi	Yara	SSI-Organ/Boşluk		t030			4
07-02717	Ped. İnfeksiyon Hastalıkları	Kan	C	III	t030			4
07-02686	Genel Cerrahi	Yara	SSI-Organ/Boşluk		t030			6
07-02687	Pediatri	Kan	BSI-LCBI	III	*	ST239	CC8	2
07-02688	Beyin Cerrahisi	BOS	SSI-Organ/Boşluk		t030			1
07-02689	Göğüs Cerrahisi	TAK	PNEU-PNU2		t030			5
07-02718	Plastik Cerrahi	Yara	C		t030			2
07-02719	Plastik Cerrahi	Yara	C		t030			1
07-02720	Yoğun Bakım Ünitesi	Kan	C		t030			4
07-02690	Yoğun Bakım Ünitesi	TAK	PNEU-PNU2		t030			4
07-02721	Beyin Cerrahisi	Kan	C		t030			4
07-02722	Yoğun Bakım Ünitesi	Yara	C		t030			4
07-02691	Genel Cerrahi	Yara	SSI-Organ/Boşluk		t030			4
07-02723	Dahiliye	TAK	C		t030			12
07-02692	Pediatri	TAK	PNEU-PNU2		t030			4
07-02724	Dahiliye	Yara	C		t030			1
07-02693	Plastik Cerrahi	Kan	BSI-LCBI		t030			4
07-02725	Göğüs Cerrahisi	Yara	C		t030			9
07-02726	Plastik Cerrahi	Yara	SSI-DIS	III	t030			9
07-02727	İnfeksiyon Hastalıkları	TAK	C	III	t030			10
07-02694	Yoğun Bakım Ünitesi	TAK	PNEU-PNU3		t030			4
07-02728	İnfeksiyon Hastalıkları	Konjunktiva Sürüntüsü	EENT-CONJ		t030			11
07-02695	Dahiliye	Balgam	PNEU-PNU2		t030			14
07-02696	Nöroloji	TAK	PNEU-PNU2		t030			4
07-02729	Göğüs Hastalıkları	Balgam	C		t030			3

07-02730	Göğüs Cerrahisi	Kan	C		t030			7
07-02731	Nöroloji	TAK	PNEU-PNU2		t030			4
07-02697	Beyin Cerrahisi	BOS	SSI-Organ/Boşluk		t030			4
07-02698	Yoğun Bakım Ünitesi	TAK	PNEU-PNU2		t030			4
07-02732	Ortopedi	Yara	C	III	t459	ST239	CC8	8
07-02733	Plastik Cerrahi	Yara	C		t030			13
07-02699	Yoğun Bakım Ünitesi	Kan	PNEU-PNU2		t030			4
07-02734	İnfeksiyon Hastalıkları	Kateter	BSI-LCBI		t030			2
07-02700	Nöroloji	TAK	PNEU-PNU3		t030			4
07-02701	Nöroloji	TAK	PNEU-PNU2		t030			4
07-02702	Yoğun Bakım Ünitesi	TAK	PNEU-PNU2		t030			4
07-02703	Göğüs Hastalıkları	TAK	PNEU-PNU3		t030			4
07-02735	Ortopedi	Yara	SSI-DIS	III	t030			1

(TAK: Trakeal aspirat kültürü, BOS: Beyin omurilik sıvısı, \*: *spa* tiplendirme ile belirlenemeyen suş)

Antibiyotik duyarlılık testi sonucuna göre fenotipte eritromisine duyarlı gözükten MRSA suşlarının bazılarında PCR ile *ermA* pozitifliği saptandı. MRSA suşlarında teikoplanine azalmış duyarlılık olduğu belirlendi.

**Tablo 6.** MRSA izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları

İzolat No	SAPI	RS	<i>ermA</i>	Eritromisin	Fosfomisin	Fusidik asit	Gentamisin	Klindamisin	Levofloksasin	Linezolid	Moksifloksasin	Nitrofurantoin	Norfloksasin	Oksasilin	Penisilin	K/D	Rifampisin	Siprofloksasin	Teikoplanin	Tetrasiklin	Tobramisin	SXT	Vankomisin	Mik-TPL
1	5194051,647	23		R	R	S	R	R	I	S	S	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	2.00
2	5194051,647	23		R	R	S	R	R	I	S	S	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	2.00
3	5386290,413	24		R	R	S	R	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	2.00
4	2240562,413	20	+	S	S	S	R	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	1.00
5	3708569,813	25		I	R	S	R	R	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	2.00
6	2677469,247	19		S	R	S	R	S	I	S	S	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	1.00
7	3988190,08	25		I	R	R	R	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	2.00
8	3289138,413	22	+	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	2.00
9	3289138,413	22		S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	2.00
10	5386290,413	24		R	R	S	R	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	4.00
11	5386290,413	24		R	R	S	R	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	4.00
12	5386290,413	24		R	R	S	R	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	4.00
13	5386290,413	24		R	R	S	R	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	4.00
14	3289138,413	22	+	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	2.00
15	4757144,813	24		R	S	S	R	R	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	2.00
16	2240563,413	21		I	S	S	R	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	1.00
17	3289138,413	22		S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	2.00
18	6085341,08	26		R	R	R	R	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	4.00
19	5386290,413	24		R	R	S	R	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	4.00
20	5386290,413	24		R	R	S	R	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	4.00



21	5386290,413	24		R	R	S	R	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	4.00
22	5386290,413	24		R	R	S	R	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	4.00
23	5386290,413	24		R	R	S	R	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	4.00
24	3289139,413	23		I	R	S	R	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	2.00
25	5386290,413	24		R	R	S	R	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	4.00
26	3289139,413	23		I	R	S	R	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	2.00
27	5386290,413	24		R	R	S	R	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	4.00
28	5805720,813	26		R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	4.00
29	1628893,247	17	+	S	S	S	R	S	I	S	S	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	1.00
30	2240562,413	20	+	S	S	S	R	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	1.00
31	5386290,413	24		R	R	S	R	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	4.00
32	5386290,413	24		R	R	S	R	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	4.00
33	5805720,813	26		R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	4.00
34	5386290,413	24		R	R	S	R	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	4.00
35	5805720,813	26		R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	4.00
36	3289139,413	23		I	R	S	R	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	2.00
37	5386290,413	24		R	R	S	R	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	4.00
38	5386290,413	24		R	R	S	R	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	4.00
39	5805720,813	26		R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	4.00
40	5805720,813	26		R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	4.00
41	4757144,813	24		R	S	S	R	R	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	2.00
42	5386290,413	24		R	R	S	R	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	4.00
43	2677469,247	19		S	R	S	R	S	I	S	S	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	1.00
44	5386290,413	24		R	R	S	R	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	4.00
45	5386290,413	24		R	R	S	R	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	4.00
46	5386290,413	24		R	R	S	R	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	4.00
47	5386290,413	24		R	R	S	R	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	4.00
48	2677469,247	19	+	S	R	S	R	S	I	S	S	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	1.00

(RS: Direnç skoru (minimum=20x0=0; maximum=20x2=40), R: Dirençli, S: Duyarlı, I: Orta duyarlı,  
*ermA*: Eritromisin ribozomal metilaz A, KD: Kinopristin/Dalfopristin,  
SXT: Trimetoprim/Sülfametoksazol, MIK-TPL: Minimum inhibitör konsantrasyon-teikoplanin)



MRSA izolatlarının çoğu trakeal aspirat (%33) ve yaradan (%33), MSSA izolatlarının çoğu kandan (%57) elde edildi.

MRSA izolatları arasında 3 farklı *spa* tipi saptandı, baskın olan tip; t30 (% 94) idi. Farklı *spa* tiplerin multilokus dizi analizi sonucunda tek sekans tipi (ST239) belirlendi. MSSA izolatları arasında 7 farklı *spa* tipi ve sekans tipi saptandı.

**Tablo 9.** Fenotip, genotip ve infeksiyon durumuna göre MRSA (sporadik olmayan) izolat grupları

<b>İzolat Numarası</b>	<b>N/C</b>	<b>SAPI</b>	<b>SAPI-kod</b>	<b>Pulsotip</b>	<b>Grup Kodu</b>
29	1	1628893,247	1	9	<b>1</b>
4	2	2240562,413	2	1	<b>2</b>
6	1	2677469,247	4	1	<b>3</b>
48	1	2677469,247	4	1	<b>3</b>
43	1	2677469,247	4	2	<b>4</b>
8	2	3289138,413	5	2	<b>5</b>
17	2	3289138,413	5	2	<b>5</b>
9	2	3289138,413	5	1	<b>6</b>
14	1	3289138,413	5	2	<b>7</b>
26	2	3289139,413	6	1	<b>8</b>
5	1	3708569,813	7	4	<b>9</b>
7	2	3988190,08	8	1	<b>10</b>
15	1	4757144,813	9	1	<b>11</b>
1	1	5194051,647	10	1	<b>12</b>
2	1	5194051,647	10	1	<b>12</b>
3	1	5386290,413	11	4	<b>13</b>
10	1	5386290,413	11	4	<b>13</b>
11	1	5386290,413	11	4	<b>13</b>
20	1	5386290,413	11	4	<b>13</b>
23	1	5386290,413	11	4	<b>13</b>
25	1	5386290,413	11	4	<b>13</b>
27	1	5386290,413	11	4	<b>13</b>
31	1	5386290,413	11	4	<b>13</b>
34	1	5386290,413	11	4	<b>13</b>
37	1	5386290,413	11	4	<b>13</b>
38	1	5386290,413	11	4	<b>13</b>
42	1	5386290,413	11	4	<b>13</b>
44	1	5386290,413	11	4	<b>13</b>
45	1	5386290,413	11	4	<b>13</b>
46	1	5386290,413	11	4	<b>13</b>
47	1	5386290,413	11	4	<b>13</b>
12	2	5386290,413	11	4	<b>14</b>
19	2	5386290,413	11	4	<b>14</b>
21	2	5386290,413	11	4	<b>14</b>
22	2	5386290,413	11	4	<b>14</b>
28	2	5805720,813	12	9	<b>15</b>
39	1	5805720,813	12	4	<b>16</b>
18	2	6085341,08	13	1	<b>17</b>

Özdeş patern grubu 13'ün izolat sayısı ( $n=16$ ) diğer sporadik olmayan MRSA izolat gruplarının sayılarından anlamlı olarak yüksek bulundu ( $p < 0.001$ ).

## 5. TARTIŞMA

Gerek dünyada gerekse ülkemizde hastane kökenli *S. aureus* izolatlarının %40-60'ı metisiline dirençlidir. Bu oranlar özellikle yoğun bakım ünitelerinde daha da yüksektir. Moleküler epidemiyolojik çalışmalar direnç artışının, direnç genlerinin toplumda sık olarak bulunan epidemik klonlarca alınmasına bağlı olduğunu göstermektedir. Bu klonlar hastane ortamına girdiğinde de özellikle sağlık çalışanlarının elleriyle ortama ve hastadan hastaya yayılmaktadır (Gülay, 2008).

MRSA'nın neden olduğu nozokomiyal infeksiyonlar oldukça sık görülür ve ciddi ekonomik yük getirir. Hastanelerde yüksek riskli hastaların MRSA kolonizasyonu açısından taranmasının faydalı olduğu bildirilmiştir. MRSA taşıyıcılığı ya da kolonizasyonu infeksiyon açısından önemli bir risk faktörüdür. Hastanelerde MRSA yayılımını kontrol altına almak için taşıyıcı potansiyeli olan kişilerin taranması, otomatik kompüterize uyarı, riskli hastalar için izolasyon gibi spesifik önlemler ve el hijyeni uyumunun geliştirilmesini içeren infeksiyon kontrol yönergelerine ihtiyaç vardır. Çeşitli uluslararası yönergeler artık hastaneye yatış sırasında potansiyel MRSA-pozitif hastaların taranmasını önermektedir, buna rağmen MRSA yayılımını kontrol altına almak zordur (Tang ve Stratton., 2010).

Rutin klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında, bakteri tiplendirmenin hastane infeksiyonlarının izlemindeki rolü büyüktür. Bunun yanında tiplendirme, toplum kökenli infeksiyonların araştırılmasında, rekürren infeksiyonlarda yeni bulaş ile kolonizasyon ayırımında ve laboratuvar kontaminasyonlarının saptanmasında önemli bir araçtır. Antibiyotik direncinin artışı, klinik laboratuvarların hastane infeksiyonları epidemiyolojisi üzerinde yoğunlaşmasını zorunlu kılmıştır (Tang ve Stratton., 2010).

*S. aureus* suşlarının epidemiyolojik analizinde kullanılan çeşitli genotiplendirme yöntemleri vardır. Bunlardan *spa* tiplendirme ve MLST gibi sekansa dayalı olan tiplendirme yöntemleri, SmaI makrorestriksiyon analizi gibi bant tabanlı yöntemlere göre uygulama kolaylığı, tekrarlanabilirlik, sonuçların taşınabilirliği ve mukayese edilebilirlik gibi avantajlara sahiptir. *S. aureus* suşlarının tiplendirilmesinde halen altın standart olan SmaI makrorestriksiyon analizi salgın araştırmalarında kullanılır ancak filogenetik analizlerde kullanımı sorgulanmaktadır (Strommenger ve ark., 2006). PFGE ile gösterilen kromozomal değişiklikler MLST ve *spa* tiplendirme ile incelenen genlerdeki mutasyonlara göre daha sık gerçekleşir (Arakere ve ark., 2005). MLST ise housekeeping genlerdeki düşük mutasyon oranına bağlı olarak *S. aureus*'un uzun dönemli popülasyon ilişkilerinin, kökeninin ve evriminin araştırılmasında çok değerli bir yöntemdir (Palavecino, 2007; Saunders ve Holmes, 2007; Vainio ve ark., 2007).

Büyük ölçüde *S. aureus*'un evriminin araştırılmasında kullanılan MLST'nin aksine *spa* tiplendirme rutin araştırmalarda kullanılmak üzere ortaya çıkmıştır. Ayrıca, MLST'den daha ayırt edici olduğu önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Strommenger ve ark., 2006). Bizim çalışmamızda da 48 MRSA suşu içinde 3 *spa* tip, 1 sekans tip ortaya çıkmıştır. *spa* tiplendirme, diğer moleküler tekniklere göre uygulanması ve yorumlanması daha kolay ve daha hızlı bir yöntemdir (Palavecino, 2007). *spa* tiplendirmenin epidemik izolatların izleminde ve sporadik olarak ortaya çıkan klonların oranının belirlenmesinde önemi büyüktür (Harmsen ve ark., 2003). Bununla birlikte tek bir polimorfik genin ayırıcı gücü sınırlıdır; *spa* dizileri stabil olduğundan farklı *spa* tiplerine ait suşlar genellikle epidemiyolojik olarak ilişkisizdir ancak aksini söylemek her zaman doğru olmaz, suşlar aynı *spa* tipine sahip olsa bile epidemiyolojik olarak ilişkisiz olabilir (Tang ve ark., 2000). Hastanelerde salgın araştırmaları için DNA dizi analizine dayalı erken uyarı sistemi olarak Ridom StaphType gibi yazılım programları kullanılmaktadır. Yazılım sistemleri aynı zamanda ortak bir tiplendirme terminolojisi de sağlar (Strommenger ve ark., 2006).

PFGE kısa dönemli lokalize salgın araştırmaları için önemli bir araç olmasına rağmen popülasyon analizinde ve yılları kapsayan uzun süreli epidemiyolojik çalışmalarda uygun değildir. Bakteriyel popülasyon içinde genomun henüz tanımlanmayan bölgeleri veya bazı lokuslar yüksek oranda değişkenlik gösterebilir sonuçta gözlenen varyasyon çeşitli genetik mekanizmalardan kaynaklanabilir, bu durum uzun dönemli salgınlar için yanıltıcı olabilir. Global olarak yayılmış tek bir MRSA klonundaki genetik değişiklikleri açıklayamadığı için PFGE uzun dönemli epidemiyolojik araştırmalarda fazla ayırt edici olabilir. Bu şartlar altında PFGE ve PCR-tabanlı bir tekniğin birlikte kullanılması mikroorganizmaların genotiplendirmesinde daha uygundur (Tang ve ark., 2000; Tang ve Stratton, 2010).

*spa* tiplendirmenin PFGE'den daha az ayırt edici olduğu düşünölmektedir. Tang ve ark. (2000) 107 haftalık bir salgın sırasında toplanan aynı *spa* tipine sahip 20 suşun, birbiriyle ilişkili fakat ayırt edilebilen, PFGE paternleri sergilediğini göstermişlerdir; *spa* tiplendirmenin yetersiz olduğu durumlarda özellikle uzun dönemli nozokomiyal salgınlarda PFGE'nin kullanılması gerektiğini ileri sürmüşlerdir.

Birbiriyle ilişkili suşların PFGE paternlerinde tek banta ait küçük değişikliklerin yorumlanması önemli bir tartışma konusudur. Peacock ve ark.'nın PFGE ve MLST'yi kıyaslayan çalışmalarında aynı hastalara ait *S. aureus* izolatlarının aralarında bir ya da iki bant değişikliği ortaya çıkmıştır. Bu bulgu tek bir PFGE bantındaki değişikliklerin fazla ayırt edici olabileceğini düşündürür (Harmsen ve ark., 2003).

Strommenger ve ark. (2006) MLST/eBURST verilerini referans olarak göstererek tiplendirme yöntemleri arasındaki uyumu değerlendirmişler: CC-121, CC-22, CC-45 klonal komplekslerine ve ST426, ST59, ST81 ve ST1 sekans tiplerine ait izolatların *spa* tiplendirme, MLST ve PFGE yöntemlerinin her üçüyle de özdeş sonuçlar verdiğini görmüşlerdir. Bu klonal komplekslerin ve sekans tiplerinin her biri, *spa* tiplendirme/BURP ve SmaI makrorestriksiyon analizi sonucunda yine ayrı bir gruba tekabül etmiştir. CC-30 için de benzer sonuçları elde etmişler; *spa* tiplendirme/BURP ile *spa* CC012, makrorestriksiyon analizi ile PFGE14 ortaya çıkmıştır ancak CC-8 ve

CC-5 içindeki sekans tipleri eBURST ve BURP ile ayrı ayrı gruplanırken PFGE tiplerinin içinde dağılarak oldukça fazla çeşitlilik göstermişlerdir. Bu sonuçlar bu veri seti için, eBURST ve BURP sonuçlarının arasında yüksek düzeyde, sekans yöntemleri ile PFGE arasında ise nispeten daha düşük düzeyde uyum olduğunu göstermiştir.

Wisplinghoff ve ark.(2005) 15 yıl boyunca izole edilen MRSA izolatlarının moleküler evrimini araştırdıkları çalışmalarında MLST, *spa* tiplendirme ve *SCCmec* tiplendirme yaptıkları izolatların ST'lerinin PFGE paternleriyle uyumlu çıktığını, ilk beş yılda toplanan izolatların %96'sının ST239-III olduğunu ve ortak bir PFGE profili gösteren diğer ST'lerin aksine, bizim sonuçlarımızdaki gibi ST239'un farklı PFGE profillerine sahip olduğunu göstermişlerdir. Robinson ve Enright'a göre ST239 ve ondan köken alanlar CC-8 içerisinde filogenetik olarak ayrı ve klinik olarak önemli olan bir kolu temsil ederler. ST239 mozaik kromozomu ata köken ST30'dan aldığı replikasyon orijini kapsayan 557-kb ve ata köken ST8'den aldığı replikasyon terminalini kapsayan 2220-kb uzunluğunda fragmentleri içerir (Wisplinghoff ve ark., 2005).

Faria ve ark. (2008) *S. aureus* için kullanılan temel tiplendirme yöntemlerinin uyumunu araştırdıkları çalışmalarında, MRSA ve MSSA gruplarının verilerini karşılaştırdıklarında *spa* tiplendirme, MLST ve PFGE tekniklerinin her üçünün de MSSA izolatları için daha ayırt edici olduğunu görmüşler ve bu durumun MSSA suşlarının MRSA suşlarından daha çok genetik çeşitliliğe sahip olduğu fikrini ve MRSA'nın, *SCCmec* elementinin kazanılmasıyla MSSA'dan türediği hipotezini desteklediğini dolayısıyla *spa* tiplendirmenin tek başına MSSA izolatları için yeterli olduğunu MRSA içinse PFGE ve *spa* tiplendirmenin kombine kullanımının daha ayırt edici olacağını ileri sürmüşlerdir.

Alp ve ark. (2009), Türkiye'deki MRSA izolatlarının prevalansını ve genetik ilişkisini araştırdıkları çok merkezli çalışmalarında; farklı bölgelerdeki MRSA prevalansının %12-75 arasında değiştiğini, baskın *spa* tipinin t30 olduğunu ve MLST uyguladıkları farklı pulstotiplerin ST239 olduğunu belirlemişlerdir.



Çalışmamızda MRSA suşlarının 3'ü hariç diğerlerinin t30 olduğu ve hepsinin ST239 olduğu belirlendi. İzolatların servislere göre dağılımına bakıldığında en sık plastik cerrahi servisinden (~%19) ve yoğun bakım ünitesinden (~%15) izole edildiği görüldü. Cerrahi servisler, MRSA enfeksiyonu için risk faktörüdür (Graffunder ve Venezia, 2002). Yoğun bakım hastaları yüksek antibiyotik kullanım oranının neden olduğu selektif baskıdan dolayı, MRSA enfeksiyonu açısından en riskli gruptur (Rijnders ve ark., 2009). Bizim çalışmamızda da MRSA izolatlarının en sık izole edildiği ikinci birim yoğun bakım ünitesidir.

Antibiyotik duyarlılık testi sonucunda eritromisine duyarlı görülen izolatların bazılarında *ermA* geni saptandı; bu durumun fenotipe yansımamasının muhtemelen bu gende ortaya çıkan bir mutasyondan kaynaklandığı düşünüldü. Bu genotip-fenotip uyumsuzluğunun dizi analizi ve gerekirse klonlama ve ekspresyon analizi ile araştırılması planlandı.

MRSA suşlarında MLST ile tek genotip, *spa* tiplendirme ile 3 genotip ve PFGE sonuçlarının analizi ile 14 farklı pulsotipin elde edilmesiyle bizim çalışmamızda da ayırıcı gücü en fazla olan yöntemin PFGE, ayırıcı gücü en az olanın ise MLST olduğu görülmüştür. Bunun nedeni daha önce belirtildiği gibi örnek grubumuzun 3 aylık bir dönemi yansıtması dolayısıyla genetik çeşitliliğin sınırlı olmasıdır. Her ne kadar MLST'nin ayırıcı gücünün yeterli olmadığı ya da ilişkisiz genotipleri aynı sekans tipi içinde topladığı düşünülse de, bu çok zayıf bir ihtimaldir şöyle ki; her lokus için ortalama 200 alel vardır, bu durumda trilyonlarca farklı ST olasılığı mümkündür ve ilişkisiz iki genotipin aynı sekans tipine sahip olması neredeyse imkansızdır (Enright ve ark., 2002; <http://www.mlst.net>). Ayrıca, PFGE bir laboratuvar içerisindeki birbiriyle ilişkili genotip gruplarının tanımlanmasında daha uygun olup laboratuvarlar arası karşılaştırmalarda ise MLST kullanılır (Enright ve ark., 2002).

Çalışmamızın sonucuna göre hastanemizde baskın olan köken ST239 klonu olup kolonizasyon potansiyeli ve antibiyotiklere karşı direnci daha fazladır. Hastanemizde baskın olan tek klonun olması hastanelerde sadece birkaç epidemik MRSA klonunun hakim olduğunu gösteren daha önceki çalışmalarla uyumludur (Cho ve ark., 2006). Sonuçlarımızdaki farklı *spa* tiplerinden t632, t30 olan suşlardan biriyle aynı PFGE paternine sahiptir; Wisplinghoff ve ark.(2005) aynı ST veya PFGE paternini gösteren fakat *spa* tipleri farklı olan suşların *spa* bölgesindeki insersiyonlar ya da delesyonların PFGE paternini etkilemediğini belirtmişlerdir.

Örnek grubumuzdaki MSSA suşlarının ise her birinin farklı bir *spa* tipi ve sekans tipi sergilemesi MSSA izolatları için *spa* tiplendirmenin ayırt ediciliğinin yeterli olduğunu desteklemektedir. İki izolatın tetrasikline bir izolatın da eritromisine dirençli olduğu ve penisilin haricindeki diğer antibiyotiklere duyarlı olduğu belirlenmiştir.

Hollanda'da yapılan bir çalışmada bölgede prevalansı en yüksek olan MSSA klonlarının CC-30 ve CC-45 olduğu gösterilmiştir (Donker ve ark., 2009).

Sporadik olmayan MRSA izolatları ( $n=38$ ) arasında izolat sayısı en çok olan grubun tamamı nozokomiyal infeksiyon etkeni olup pulsotip 4 paterninde yer almaktadır, standardize antibiyotik fenotip indeksleri ve antibiyotik direnç skorları aynıdır. Bir izolat dışında hepsi azalmış teikoplanin duyarlılığına sahiptir, hepsi eritromisine, fosfomisine ve moksifloksasine dirençli, fusidik asite ve klindamisine duyarlıdır.

MLST ile elde ettiğimiz MSSA sekans tiplerinden ST630 (12-3-1-1-4-4-3), ST239 (2-3-1-1-4-4-3)'un tek lokus varyantıdır, her ikisi de CC-8'in içinde yer alır. CC-8, dört majör epidemik HK-MRSA klonu içerir: ST8, ST239, ST247 ve ST254 (Strommenger ve ark., 2006). Bizim hastanemizde en sık görülen ST239; pandemik Macar klonudur (ST239-III). Dünya nüfusunun %60'ından fazlasına sahip olan büyük Asya bölgesindeki HK-MRSA'nın en az %90'undan ST239 sorumludur (Neela ve ark., 2010). Vorobieva ve ark. (2008) da CC-8 içinde yer alan MRSA izolatlarının bölgelerindeki dominant hastane kaynaklı klonlar olduğunu, tek lokus bakımından farklı olan suşların lokal çeşitliliği ve uzun dönemli devamlılığı gösterdiğini belirtmişlerdir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- 48 MRSA ve 7 MSSA izolatu olmak üzere toplamda 55 izolat çalışmaya dahil edildi.
- İzolatların klonal ilişkileri pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) tiplendirme, *spa* tiplendirme ve MLST ile araştırıldı.
- Antibiyotik duyarlılık testi sonucuna göre eritromisine duyarlı çıkan bazı MRSA suşlarında *ermA* pozitifliği saptandı.
- MRSA suşlarında teikoplanine azalmış duyarlılık olduğu görüldü.
- İzolatların servislere göre dağılımına bakıldığında en sık plastik cerrahi servisinden (~%19) ve yoğun bakım ünitesinden (~%15) izole edildiği görüldü.
- PFGE sonuçlarının analizi ile MRSA izolatlarında 14 farklı pulsotip ortaya çıktı. MSSA'nın PFGE ile elde edilen bant profilleri gözle değerlendirildi, izolatların her birinin ayrı bir paterne sahip olduğu görüldü.
- MRSA izolatlarında SCC*mec* tip III saptandı.
- MRSA izolatlarının çoğu trakeal aspirat (%33) ve yaradan (%33), MSSA izolatlarının çoğu kandan (%57) elde edildi.
- MRSA izolatları arasında 3 farklı *spa* tipi saptandı, baskın olan tip; t30 (%94) idi. Farklı *spa* tiplerin multilokus dizi analizi sonucunda tek sekans tipi (ST239) belirlendi.
- MSSA izolatları arasında 7 farklı *spa* tipi ve sekans tipi saptandı.
- OMÜ-SUVAM hastanesinde izole edilen *Staphylococcus aureus* kökenlerinde, zaman boyutu bakımından göreceli olarak daha kısa dönemli epidemiyolojik bilgi sağlayan PFGE ve *spa* tiplendirme tekniklerine ek olarak, özellikle uzun dönemli epidemiyolojik bilgi sağlayan MLST yöntemi kullanılarak, hastanemiz ve bölgemiz ile ilgili eksiksiz, kalıcı, taşınabilir ve karşılaştırılabilir nitelikte moleküler epidemiyolojik veri elde edilmiştir.
- MRSA kökenlerinde MLST ile tek genotip, *spa* tiplendirme ile 3 genotip ve PFGE sonuçlarının analizi ile 14 farklı pulsotipin elde edilmesi üç aylık dönemde elde edilen bu izolat grubu için ayırıcı gücü en fazla olan yöntemin PFGE, ayırıcı gücü en az olanın ise MLST olduğunu göstermiştir.

- Tek bir tiplendirme yöntemi izolatlar arasındaki ilişkinin saptanmasında yetersiz olduğunda farklı tiplendirme yöntemleri birlikte kullanılabilir.
- Farklı tiplendirme tekniklerinin sonuçlarının uyumlu çıkması izolatlar arasındaki klonal ilişkiyi destekler.
- *spa* tiplendirmenin, ayırt ediciliği iyi fakat oldukça zahmetli bir yöntem olan PFGE'nin yerini alacağı düşünülmektedir.

## Kaynaklar

- Acuner İÇ (2008). Moleküler Tiplendirme Yöntemlerinin Hastane Enfeksiyonlarının Kontrolündeki Yeri: Güncel Bilgiler Işığında Genel Bir Bakış. *5. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi*, Ankara, Program ve Bildiri Özetleri Kitabı, 28-43.
- Alcorn TM, Anderson SM (çeviri: Karahan C) (2006). Otomatize DNA Dizi Analizi. *Moleküler Mikrobiyoloji: Tanı Prensipleri ve Uygulamalar*'da, Editörler, Tekeli A, Ustaçelebi Ş, Palme Yayıncılık, Ankara, 153-159.
- Alp E, Klaassen CHW, Doğanay M, Altoparlak Ü, Aydın K, Engin A, Kuzucu Ç, Özakın C, Özinel MA, Turhan Ö, Voss A (2009). MRSA genotypes in Turkey: Persistence over 10 years of a single clone of ST239. *J Infect.*, **58(6)**, 433-438.
- Arakere G, Nadig S, Swedberg G, Macaden R, Amarnath SK, Raghunath D (2005). Genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from two hospitals in Bangalore, South India. *J Clin Microbiol.*, **43(7)**, 3198-3202.
- Bannerman TL, Peacock SJ (2007). *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: *Manual of Clinical Microbiology*, **Ninth Ed.**, Eds, Murray PR, Baron EJ, Jorgenson JH, Landry ML, Pfaller MA, ASM Press, Washington, 390-411.
- Bilgehan H (2000). Gram Olumlu Koklar. *Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları*'nda, Fakülteler Kitabevi, İzmir, 239-268.
- Borg MA, de Kraker M, Scicluna E, van de Sande-Bruinsma N, Tiemersma E, Monen J, Grundmann H (2007). Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in invasive isolates from southern and eastern Mediterranean countries. *J Antimicrob Chemother.*, **60(6)**, 1310-1315.
- Bozdoğan B (2008). Dizi Analizine Dayalı Tiplendirme Yöntemleri: SLST, MLST, SNP. *XXXIII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi*, Bodrum, Kongre Kitabı, 56-60.
- Branger C, Goulet P, Boutonnier A, Fournier JM (1990). Correlation between esterase electrophoretic types and capsular polysaccharide types 5 and 8 among methicillin-susceptible and methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.*, **28(1)**, 150-151.
- Carvalho KS, Mamizuka EM, Gontijo Filho PP (2010). Methicillin/Oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a hospital and public health threat in Brazil. *Braz J Infect Dis.*, **14(1)**, 71-76.
- Cengiz AT (1999). *Staphylococcus*. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*'de, Editörler, Ustaçelebi Ş, Cengiz AT, Güneş Kitabevi, Ankara, 339-346.

- Cho DT, Cha HY, Chang HH, Kim SW, Chung JM, Kim J, Lee YC, Seol SY, Lee JC (2006). Risk factors for specific methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in a Korean hospital. *J Antimicrob Chemother*, **57(6)**, 1122-1127.
- Cohen ML (1986). *Staphylococcus aureus*: biology, mechanisms of virulence, epidemiology. *J Pediatr*, **108**, 796-799.
- Cookson BD, Robinson DA, Monk AB, Murchan S, Deplano A, de Ryck R, Struelens MJ, Scheel C, Fussing V, Salmenlinna S, Vuopio-Varkila J, Cuny C, Witte W, Tassios PT, Legakis NJ, van Leeuwen W, van Belkum A, Vindel A, Garaizar J, Haeggman S, Olsson-Liljequist B, Ransjo U, Muller-Premru M, Hryniewicz W, Rossney A, O'Connell B, Short BD, Thomas J, O'Hanlon S, Enright MC (2007). Evaluation of molecular typing methods in characterizing a European collection of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains: the HARMONY collection. *J Clin Microbiol.*, **45(6)**, 1830-1837.
- DeLeo FR, Chambers HF (2009). Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. *J Clin Invest.*, **119(9)**, 2464-2474.
- Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE (2007). The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect*, **13**, 222-235.
- Donker GA, Deurenberg RH, Driessen C, Sebastian S, Nys S, Stobberingh EE (2009). The population structure of *Staphylococcus aureus* among general practice patients from The Netherlands. *Clin Microbiol Infect.*, **15(2)**, 137-143.
- Dovich NJ, Zhang J (2001). DNA sequencing by capillary array electrophoresis. *Methods Mol Biol.*, **162**, 85-94.
- Durmaz R (2001). *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji, İkinci Baskı*, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
- Durmaz R (2008). Bakteri Tiplendirme Çalışmaları Niçin Gerekli?. *XXXIII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi*, Bodrum, Kongre Kitabı, 27-31.
- Dündar V (2000). Metisiline Dirençli Stafilokok İnfeksiyonları. *Klimik Derg*, **13 (Özel Sayı)**, 26-27.
- Dündar V, Öztürk Dündar D (2008). Stafilokoklar. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*'nde, **Üçüncü Baskı**, Editörler, Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M, Nobel Tıp Kitabevleri, 2065-2076.
- Enright MC, Spratt BG (1999). Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol.*, **7**, 482-487.

- Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG (2002). The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci USA.*, **99(11)**, 7687-7692.
- Faria NA, Carrico JA, Oliveira DC, Ramirez M, de Lencastre H (2008). Analysis of typing methods for epidemiological surveillance of both methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol.*, **46(1)**, 136-144.
- Farley JE (2008). Epidemiology, clinical manifestations, and treatment options for skin and soft tissue infection caused by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Am Acad Nurse Pract.*, **20(2)**, 85-92.
- Feil EJ, Enright MC (2004). Analyses of clonality and the evolution of bacterial pathogens. *Current Opinion in Microbiology*, **7**, 308-313.
- Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS (2007). *Staphylococcus, micrococcus, and similar organisms*. In: *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology, Twelfth Ed.*, St Louis, Missouri, Mosby Elsevier, 254-263.
- Garza-González E, Morfin-Otero R, Llaca-Díaz JM, Rodriguez-Noriega E (2010). Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci. *Epidemiol Infect.*, **138**, 645-654.
- Goering RV (1998). The molecular epidemiology of nosocomial infection: an overview of principles, application, and interpretation. In: Specter S., Bendinell M., Friedman H. (ed.) *Rapid Detection of Infectious Agents.*, Springer.
- Gordon RJ, Lowy FD (2008). Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis.*, **1(46)**, 350-359.
- Gönüllü N (2008). Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* Ülkemizdeki Durum. *XXXIII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi*, Bodrum, Kongre Kitabı, 293-298.
- Graffunder EM, Venezia RA (2002). Risk factors associated with nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection including previous use of antimicrobials. *J Antimicrob Chemother.*, **49(6)**, 999-1005.
- Gülay Z (2008). Gram Pozitif Bakteri İnfeksiyonları: Direnç ve Epidemiyoloji. *ANKEM Derg.*, **22(Ek2)**, 276-286.
- Hanage WP, Feil EJ, Brueggemann AB, Spratt BG (çeviri: Tekeli A) (2006). Suş Karakterizasyonu, Popülasyon Biyolojisi ve Gelişimsel Nesil Paternlerinde, "Multilocus Sequence Typing" Metodu. *Moleküler Mikrobiyoloji: Tanı Prensipleri ve Uygulamalar*'da, Editörler, Tekeli A, Ustaçelebi Ş, Palme Yayıncılık, Ankara, 235-243.

- Hanning A, Westberg J, Roeraade J (2000). A liquid core waveguide fluorescence detector for multicapillary electrophoresis applied to DNA sequencing in a 91-capillary array. *Electrophoresis*, **21**, 3290-3304.
- Harmsen D, Claus H, Witte W, Rothgänger, Claus H, Turnwald D, Vogel U (2003). Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a University Hospital Setting by Using Novel Software for *spa* Repeat Determination and Database Management. *J Clin Microbiol.*, **41(12)**, 5442-5448.
- Hiramatsu K, Katayama Y, Yuzawa H, Ito T (2002). Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.*, **292**, 67-74.
- <http://www.mlst.net>.
- International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC) (2009). Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*): Guidelines for Reporting Novel SCC*mec* Elements. *Antimicrob Agents Chemother.*, **53(12)**, 4961-4967.
- Isenberg HD (2007). Chromosomal Restriction Fragment Analysis by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Application to Molecular Epidemiology. In: *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, **Second Ed.**, ASM Press, Washington.
- Jawetz E, Levinson W (çeviri: Özgünen T) (2008). Gram-Pozitif Koklar. *Tıbbi Mikrobiyoloji ve İmmünoloji*'de, **Dokuzuncu Baskı**. Güneş Tıp Kitabevleri. Ankara. 106-118.
- Jolley KA, Feil EJ, Chan MS, Maiden MC (2001). Sequence type analysis and recombinational tests (START). *Bioinformatics*, **17(12)**, 1230-1231.
- Kılıç A (2008). Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus*'un Moleküler Epidemiyolojisi. 5. *Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi*, Ankara, Program ve Bildiri Özetleri Kitabı, PNL6.
- Kılıç S, Beşirbellioğlu B, Kılıç A, Pahsa A (2005). Bir eğitim hastanesinde 2003-2004 yıllarında saptanan metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* infeksiyonları. *Gülhane Tıp Dergisi*, **47**, 195-198.
- Klug WS, Cummings MR (2000). *Concepts of Genetics*, **Sixth Ed.**, Prentice Hall Inc., New Jersey.
- Liu GY (2009). Molecular pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infection. *Pediatr Res.*, **65(5 Pt 2)**, 71-77.



- Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russel JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG (1998). Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 3140-3145.
- Manoni M, Pergolizzi R, Luzzana M, De Bellis G (1992). Dideoxy linear PCR on a commercial fluorescent automated DNA sequencer. *BioTechniques*, **12**, 48-50, 52-53.
- Maxam AM, Gilbert W (1977). A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74(2)**, 560-564.
- Mitchell LG, Merril CR (1989). Affinity generation of single-stranded DNA for dideoxy sequencing following the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 178, 239-242.
- Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA (2002). *Medical Microbiology, Fourth Ed.*, Mosby Inc., St.Louis, 202-216.
- Neela V, Ghasemzadeh Moghaddam H, van Belkum A, Horst-Kreft D, Mariana NS, Ghaznavi Rad E (2010). First report on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of Spa type T037, Sequence Type 239, SCCmec type III/IIIA in Malaysia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, **29(1)**, 115-117.
- Okuma K, Iwakawa K, Turnidge JD, Grubb WB, Bell JM, O'Brien FG, Coombs GW, Pearman JW, Tenover FC, Kapi M, Tiensasitorn C, Ito T, Hiramatsu K (2002). Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. *J Clin Microbiol.*, **40(11)**: 4289-4294.
- Palavecino E (2007). Clinical, epidemiological, and laboratory aspects of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Infections. *Methods Mol Biol.*, **391**, 1-19.
- Plata K, Rosato AE, Wegrzyn G (2009). *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. *Acta Biochim Pol.*, **56(4)**, 597-612.
- Prober JM, Trainor GL, Dam RJ, Hobbs FW, Robertson CW, Zagursky RJ, Cocuzza AJ, Jensen MA, Baumeister K (1987). A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science*, **238**, 336-341.
- Rijnders MIA, Deurenberg RH, Boumans MLL, Hoogkamp-Korstanje JAA, Beisser PS, the Antibiotic Resistance Surveillance Group, Stobberingh EE (2009). Population Structure of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Intensive Care Unit Patients in The Netherlands over an 11-Year Period (1996 to 2006). *J Clin Microbiol.*, **47(12)**, 4090-4095.

- Rubin RJ, Harrington CA, Poon A, Dietrich K, Greene JA, Moiduddin A (1999). The Economic Impact of *Staphylococcus aureus* Infection in New York City Hospitals. *Emerg Infect Dis.*, **5(1)**, 9-17.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*, **Second Ed.**, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463-5467.
- Saunders NA, Holmes A (2007). Multilocus Sequence Typing (MLST) of *Staphylococcus aureus*. *Methods Mol Biol.*, **391**, 71-85.
- Selander RK, Caugant DA, Ochman H, Musser JM, Gilmour MN, Whittam TS (1986). Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**, 873-884.
- Shopsin B, Gomez M, Montgomery SO, Smith DH, Waddington M, Dodge DE, Bost DA, Riehman M, Naidich S, Kreiswirth BN (1999). Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol.*, **37(11)**, 3556-3563.
- Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ (2006). Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clin Microbiol Rev.*, **19(3)**, 512-530.
- Spratt BG (1999). Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the Internet. *Curr. Opin. Microbiol.*, **2**, 312-316.
- Strommenger B, Kettlitz C, Weniger T, Harmsen D, Friedrich AW, Witte W (2006). Assignment of *Staphylococcus* Isolates to Groups by *spa* Typing, SmaI Macrorestriction Analysis, and Multilocus Sequence Typing. *Journal of Clinical Microbiology*, **44(7)**, 2533-2540.
- Struelens MJ (1996). Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *Clin Microbiol Infect.*, **2(1)**, 2-11.
- Struelens MJ (1998). Molecular Epidemiologic Typing Systems of Bacterial Pathogens: Current Issues and Perspectives. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **93(5)**, 581-585.
- Tang YW, Waddington MG, Smith DH, Manahan JM, Kohner PC, Highsmith LM, Li H, Cockerill III FR, Thompson RL, Montgomery SO, Persing DH (2000). Comparison of protein A gene sequencing with pulsed-field gel electrophoresis and epidemiologic data for molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 1347-1351.
- Tang YW, Stratton CW (2010). *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*, Springer, New York.

- te Witt R, van Belkum A, van Leeuwen WB (2010). Molecular diagnostics and genotyping of MRSA: an update. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, **10(4)**, 375–380.
- Trindade PA, McCulloch JA, Oliveira GA, Mamizuka EM (2003). Molecular techniques for MRSA typing: current issues and perspectives. *Braz J Infect Dis.*, **7(1)**, 32-43.
- Tünger A (2004). *Staphylococcus aureus*: Mikrobiyoloji, Patogenez ve Epidemiyoloji. *Gram-Pozitif Bakteri İnfeksiyonları*'nda, Editörler, Ulusoy S, Usluer G, Ünal S, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 9-22.
- Tünger A, Çavuşoğlu C, Korkmaz M (2005). Stafilokoklar ve Benzer Bakteriler. *Asya Mikrobiyoloji* 'de, Asya Tıp Kitabevi, İzmir, 72-81.
- Ulusoy S, Arda B (2003). Dirençli Stafilokok İnfeksiyonları ve Sağaltımı. *Hastane İnfeksiyonları* 'nda, **Birinci Baskı**, Editörler, Yüce A, Çakır N, İzmir Güven Kitabevi, 49-54.
- Ulusoy S (2009). Gram-Pozitif Mikroorganizmalar. 6. *Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi*, Antalya, Kongre Kitabı, 69-71.
- Vainio A, Kardén-Lilja M, Ibrahim S, Kerttula AM, Salmenlinna S, Virolainen A, Vuopio-Varkila J (2008). Clonality of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in Finland as defined by several molecular methods. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, **27(7)**, 545-555.
- van Belkum A (2003). High-throughput epidemiologic typing in clinical microbiology. *Clin Microbiol Infect.*, **9**, 86-100.
- van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, Fussing V, Green J, Feil E, Gerner-Smidt P, Brisse S, Struelens M (2007) . European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Study Group on Epidemiological Markers (ESGEM). Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect.*, **13(3)**, 1-46.
- Vorobieva V, Bazhukova T, Hanssen AM, Caugant DA, Semenova N, Haldorsen BC, Simonsen GS, Sundsfjord A (2008). Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from the Arkhangelsk region, Russia: antimicrobial susceptibility, molecular epidemiology, and distribution of Panton-Valentine leucocidin genes. *APMIS.*, **116(10)**, 877-887.
- Waldvogel FA (2000). *Staphylococcus aureus* (Including staphylococcal toxic shock). In: *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, **Fifth Ed.**, Eds, Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, New York: Churchill Livingstone, 2069-2092.

- Wijaya L, Hsu LY, Kurup A (2006). Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: overview and local situation. *Ann Acad Med Singapore*, **35(7)**, 479-486.
- Winn JrW, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G (2006). *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, **Sixth Ed.**, Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, 623-671.
- Wisplinghoff H, Ewertz B, Wisplinghoff S, Stefanik D, Plum G, Perdreau-Remington F, Seifert H (2005). Molecular Evolution of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in the Metropolitan Area of Cologne, Germany, from 1984 to 1998. *J Clin Microbiol.*, **43(11)**, 5445–5451.
- Witte W, Strommenger B, Werner G (2006). Diagnostics, Typing and Taxonomy. In: *Gram-Positive Pathogens*, **Second Ed.**, Eds, Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA, Rood JI, ASM Press, Washington, 371-380.
- Yücesoy M (2003). Gram Olumlu Bakterilerdeki Direncin Moleküler Temelleri. *Hastane İnfeksiyonları*'nda, **Birinci Baskı**, Editörler, Yüce A, Çakır N, İzmir Güven Kitabevi, 78-87.

**ÖZGEÇMİŞ**

1977 yılında Samsun'da doğdum. İlköğrenimimi Kocatepe İlkokulu'nda, ortaöğrenimimi Samsun Anadolu Lisesinde tamamladım. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden mezun oldum. 2003 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimime başladım. 2005'te OMÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsüne bağlı araştırma görevlisi kadrosuna atandım.

