



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**TOPLUM KAYNAKLI METİSİLİN DİRENÇLİ  
STAPHYLOCOCCUS AUREUS (CA-MRSA)  
SUŞLARINDA KROMOZOMAL KASET TİPLERİNİN  
POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR)  
YÖNTEMLERİ İLE ARAŞTIRILMASI**

**Saeid BARKAR**

**MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. A. Murat AKSOY**

**2009-ANKARA**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TOPLUM KAYNAKLI METİSİLİN DİRENÇLİ  
STAPHYLOCOCCUS AUREUS (CA-MRSA)  
SUŞLARINDA KROMOZOMAL KASET TİPLERİNİN  
POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR)  
YÖNTEMLERİ İLE ARAŞTIRILMASI**

**Saeid BARKAR**

**MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. A. Murat AKSOY**

**2009-ANKARA**

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**Mikrobiyoloji Doktora Programı**

çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından  
Doktora **Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 02.03.2009

Jüri Başkanı

**Prof. Dr. A. Murat AKSOY**  
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji  
Anabilim Dalı

**Prof. Dr. F. Alper. TEKELİ**  
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji  
Anabilim Dalı

**Doç. Dr. Meltem YALINAY ÇIRAK**  
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji  
Anabilim Dalı

**Doç. Dr. Ayşe KALKANCI**  
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji  
Anabilim Dalı

**Doç. Dr. Z. Ceren. KARAHAN**  
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji  
Anabilim Dalı

## İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	xi
Çizelgeler	xii
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1. Genel Bilgiler	3
1.1.1. Stafilocoklar	3
1.1.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	5
1.1.2.1. Patogenez ve Patofizyoloji	6
1.1.2.2. Virulans Faktörleri	7
1.1.2.2.1. Kapsül	8
1.1.2.2.2. “Slime” Tabakası	9
1.1.2.2.3. Peptidoglikan ve Teikoik Asit	10
1.1.2.2.4. Stafilocoksik protein-A (SpA)	13
1.1.2.2.5. Enzimler	14
1.1.2.2.5.1. Katalaz	14
1.1.2.2.5.2. Koagülaz	14
1.1.2.2.5.3. Hiyaluronidaz	15
1.1.2.2.5.4. Fibrinolizin	15
1.1.2.2.5.5. Lipaz	15
1.1.2.2.5.6. DNaz	16
1.1.2.2.5.7. Isıya-Dayanıklı Nükleaz (Heat-Stable Nuclease)	16
1.1.2.2.5.8. Fosfatidilinozitol-Spesifik Fosfolipaz C	16
1.1.2.2.5.9. Beta Laktamaz	17
1.1.2.2.6. Sitolitik Toksinler	17
1.1.2.2.6.1. Alfa Toksin	17
1.1.2.2.6.2. Beta Toksin	18
1.1.2.2.6.3. Gamma Toksin	18
1.1.2.2.6.4. Delta Toksin	18
1.1.2.2.6.5. Lökosidin	19
1.1.2.2.6.6. Eksfoliyatif Toksin	19
1.1.2.2.6.7. TŞST-1	20
1.1.2.2.6.8. Enterotoksinler	20
1.1.2.2.7. Süperantijenler (SAgs)	21
1.1.2.3. <i>S. aureus</i> Enfeksiyonları	21
1.1.2.4. <i>S. aureus</i> 'un Epidemiyolojik Özellikleri	22
1.1.2.5. <i>S. aureus</i> Enfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısı	23
1.1.2.5.1. Mikroskopik	23
1.1.2.5.2. Kültür	24
1.1.2.5.3. Seroloji	24
1.1.2.5.4. İdentifikasyon	25
1.1.2.6. <i>S. aureus</i> Suşlarında Antimikrobiyal Direnç	26

1.1.2.7. Metisilin Dirençli <i>S. aureus</i> (MRSA)	27
1.1.2.7.1. Stafilokoklarda Metisilin Direnci Mekanizmaları	27
1.1.2.7.2. Metisilin Dirençli <i>S. aureus</i> 'un Genom Yapısı	29
1.1.2.7.2.1. SCCmec Yapısı	30
1.1.2.7.2.2. SCCmec Tipleri	32
1.1.2.7.3. <i>S. aureus</i> Suşlarında Metisilin Direncinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler	33
1.1.2.7.3.1. Oksasilin Disk Difüzyon Yöntemi	33
1.1.2.7.3.2. Sefoksitin Disk Difüzyon Yöntemi	34
1.1.2.7.3.3. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi	34
1.1.2.7.3.4. Oksasilin Tuz Tarama Agar Testi	34
1.1.2.7.3.5. E-test Yöntemi	35
1.1.2.7.3.6. Lateks Aglutinasyon	35
1.1.2.7.3.7. Moleküler Yöntemler	35
1.1.2.7.3.8. Kromojenik Yöntemler	36
1.1.2.7.4. Toplum Kaynaklı Metisilin Dirençli <i>S. aureus</i> (TK-MRSA) ve Hastane Kaynaklı Metisilin Dirençli <i>S. aureus</i> (HK-MRSA) Suşların Moleküler Epidemiyolojisi	36
1.1.2.7.5. HK-MRSA ve TK-MRSA Klonlarının Virulans Faktörleri	38
1.1.2.7.6. TK-MRSA ve HK-MRSA'ların Karşılaştırılması	40
<b>2. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	43
2.1. Gereçler	43
2.1.1. Besiyerleri	43
2.1.2. Kimyasal Malzemeler	43
2.1.3. Araçlar	45
2.1.4. Tampon ve Çözeltiler	45
2.1.5. Biyokimyasal Testler ve Ayıraçlar	47
2.1.6. Diğer	48
2.1.7. Besiyerlerinin Hazırlanması	49
2.2. Yöntemler	56
2.2.1. Çalışma Grupları	56
2.2.2. Çalışmada Dikkate Alınan Kriterler	56
2.2.3. <i>S. aureus</i> İzolasyonu ve İdentifikasyonu	58
2.2.3.1. Katalaz Testi	59
2.2.3.2. Koagülaz Testi	60
2.2.3.3. Mannitol Tuz Agar (MTA)	61
2.2.3.4. DNaz Testi	61
2.2.3.5. Tüpte DNaz Testi	61
2.2.4. Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi	62
2.2.4.1. Metisilin Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> Suşlarının Belirlenmesi	62
2.2.4.1.1. Sefoksitin Disk Difüzyon Testi	62
2.2.4.1.2. Oksasilin Tuz Tarama Agar Testi	63
2.2.4.1.3. Oksasilin Direnç Tarama Agar Besiyeri (ORSAB)	63
2.2.4.1.4. TK-MRSA'ların Genotipik Yöntemler ile Tanımlanması	63
2.2.4.1.4.1. Bakteriyel Genomik DNA Ekstraksiyonu	64
2.2.4.1.4.2. <i>mecA</i> Geni Tayini	65
2.2.4.1.4.3. SCCmec Tiplerinin Multipleks PZR ile Tayini	67
2.2.4.1.4.4. SCCmec Multipleks PZR Amplifikasyonu	67

2.2.4.1.4.5. Kaset Kromozom Rekombinaz ( <i>ccr</i> ) Tip Tayini	70
2.2.4.1.4.5.1. <i>ccr</i> Gen Kompleksi	70
2.2.4.1.4.5.2. <i>ccrC</i> Gen Kompleksi	72
2.2.4.1.4.5.3. <i>mec</i> Gen Kompleksi	74
2.2.4.1.4.6. PVL Geni Tayini	78
2.2.4.2. TK-MRSA'ların Çeşitli Antibiyotiklere Duyarlılık Profilleri	80
2.2.4.3. TK-MRSA'ların iMLSB Fenotipleri	81
2.2.5. Gram Negatif Suşların İzolasyonu ve İdentifikasyonu	82
2.2.5.1. Üç Şekerli Demir (TSI) Besiyeri	82
2.2.5.2. Üreaz Testi	83
2.2.5.3. Sitrat Testi	84
2.2.5.4. Voges-Proskauer (VP) Testi	84
2.2.5.5. Metil kırmızısı (MR) Testi	85
2.2.5.6. İndol Testi	85
2.2.5.7. Craigie Besiyeri	85
2.2.6. Gram Negatif Suşların Çeşitli Antibiyotiklere Duyarlılık Profilleri	86
2.2.6.1. Gram Negatif Suşlarında ESBL Tayini	87
2.2.6.1.1. Gram Negatif Suşlarında ESBL Tarama Testi	87
2.2.6.1.2. Gram Negatif Suşlarında ESBL Doğrulama Testi	87
2.2.6.1.3. Gram Negatif Suşlarda ESBL Çift Disk Sinerji Testi	88
2.2.7. Mantar Suşlarının İzolasyonu ve İdentifikasyonu	88
2.2.7.1. Germ Tüp Oluşumu	88
2.2.7.2. (Biomerieux, Fransa) Testi	89
2.2.8. İstatistiksel Analiz	89
<b>3. BULGULAR</b>	90
3.1. Enfeksiyon Etkeni Olan ve Olmayan TK-MRSA Suşlarının Dağılımı	92
3.2. PZR Bulguları	104
3.2.1. TK-MRSA Suşlarının SCC <i>mec</i> Tiplendirmesi	104
3.2.2. TK-MRSA Suşlarında PVL Tayini	110
3.3. Sağlıklı Bireyden Burun ve Koltuk Altı Örneklerinde Gram Negatif Suşların Dağılımı	112
3.4. Gram Negatif Suşların Antimikrobiyal Duyarlılık Profilleri ve ESBL Tayini	113
3.5. Mantar İzolatlarının Dağılımı	118
<b>4. TARTIŞMA</b>	119
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	139
<b>ÖZET</b>	144
<b>SUMMARY</b>	146
<b>KAYNAKLAR</b>	148
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	155

## ÖNSÖZ

Bu çalışmada toplum kaynaklı metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarında kromozomal kaset tipleri polimeraz zincir reaksiyonu yöntemleri ile araştırılmış; enfeksiyon etkeni olan ve olmayan metisilin dirençli *S. aureus* suşlarının fenotipik ve genotip özelliklerine ve PVL dağılımına bakıldığında, önemli farklılıklar bulunduğu sonucuna varılmıştır.

Doktora eğitimimin ve tez çalışmalarımın her aşamasında bana yardımlarını, desteğini ve dostluğunu hiçbir zaman esirgemeyen ve yetişmemde büyük emeği geçen tez danışmanım Prof. Dr. A. Murat AKSOY'a; tez çalışmalarım boyunca bana her zaman destek olan, başta Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Aydın KARAARSLAN, Prof. Dr. Alper TEKELİ, Doç. Dr. Z. Ceren KARAHAN, Doç. Dr. Fikret ŞAHİN olmak üzere, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın tüm değerli hocalarıma; destek ve yardımları ile her zaman yanımda olan Uzm. Dr. Ebru US, Uzm. Dr. Gülay AKARSU, Dr. Djursun KARASARTOVA, Dr. Derya BİRİKEN, Dr. Kerem YAMAN, Dr. M. Emre VURAN, Dr. Begüm SARAN, Dr. Sevinç YENİCE, Dr. Evrim AKSU, Dr. Derya ÇÖLOĞLU, Dr. Nevin ERTEKİN, Dr. Havva AYGÜN, Dr. Emel ELYÜREK, Dr. M. Kerem ÇALGIN, Bio.Canan KIZILKAYA AKYÜREK ve tüm Anabilim Dalı personeline;

Başarılarımın esas kaynağı olan ve bu günlere gelmem için her türlü fedakarlığı yapan sevgili anneme, babama ve kardeşlerime; destek ve sabırları için sevgili eşime, oğluma ve kızıma teşekkür ederim.

## SİMGELER VE KISALTMALAR

$\alpha$	Alfa
<b>ABD</b>	Antibakteriyel duyarlılık
<b>AB-SDA</b>	Antibiyotikli Sabouraud dekstroz agar
<b>AC</b>	Amoksisilin
<b>AM</b>	Ampisilin
<b>AMC</b>	Amoksisilin/klavulanik asit
<b>AMS</b>	Ampisilin/sulbaktam
<b>AN</b>	Amikasin
<b>ARDS</b>	Erişkin tip solunum zorluğu sendromu
<b>ATM</b>	Aztreonam
$\beta$	Beta
<b>BHI</b>	Brain heart infusion
<b>BHIB</b>	Brain heart infusion broth
<b>Bp</b>	Baz çifti
<b>C</b>	Kloramfenikol
<b>C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>OH</b>	İzoamil alkol
<b>C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NO</b>	$\rho$ -Dimetilaminobenzaldehit
<b>cAMP</b>	Cyclic adenosine monophosphate
<b>TK-MRSA</b>	Toplum kaynaklı metisiline dirençli <i>S. aureus</i>
<b>CC</b>	Klindamisin
<b>ccr</b>	Kaset kromozom rekombinaz geni
<b>CCs</b>	Kompleks klon
<b>CDC</b>	Centers for disease control and prevention
<b>CIP</b>	Siprofloksasin
<b>cm</b>	Santimetre
<b>cMLSB</b>	Yapısal makrolid, linkozamid ve streptogramin B direnç fenotipi
<b>CN</b>	Gentamisin
<b>CRF</b>	Coagulase-Reacting factor
<b>CRO</b>	Seftriakson
<b>CTX</b>	Sefotaksim
<b>CZC</b>	Seftazidim/klavulanik asit
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	Distile su
<b>DIC</b>	Yaygın damar içi koagülopati
$\delta$	Delta
<b>dk</b>	Dakika
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik asit
<b>DNaz</b>	Deoksiribonükleaz
<b>dNTP</b>	Deoksiribonükleotid trifosfat
<b>E</b>	Eritromisin
<b>EcoRI</b>	<i>E. coli</i> restriksiyon enzimi
<b>EDTA</b>	Etilendiamin tetraasetik asit
<b>egc</b>	Enterotoksin gen kompleks
<b>EMB</b>	Eosin methylene blue
<b>EMRSA-16</b>	Epidemik MRSA-16
<b>ESBL</b>	Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz

<b>ET</b>	Eksfoliyatif toksin
<i>eta</i>	Eksfoliyatif toksin A geni
<b>ET-A</b>	Eksfoliyatif toksin A
<i>etb</i>	Eksfoliyatif toksin B geni
<b>ET-B</b>	Eksfoliyatif toksin B
<b>ET-D</b>	Eksfoliyatif toksin D
<b>Fab</b>	Antijen bağlayan fragman
<b>Fc</b>	Kristalize olabilen fragman
<b>femA</b>	Factor essential for expression of methicillin resistance
<b>FEP</b>	Sefepim
<b>FOX</b>	Sefoksitin
<b>FTS</b>	Fizyolojik tuzlu su
<b>G</b>	Guanin
<b>g</b>	Gram
$\gamma$	Gamma
<b>GlcNAc</b>	N-asetil-glikozamin
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Hidrojen peroksit
<b>H<sub>2</sub>S</b>	Hidrojen sülfid
<b>HK-MRSA</b>	Hastane kaynaklı metisilin dirençli <i>S. aureus</i>
<b>HCl</b>	Hidroklorik asit
<b>HIV</b>	İnsan immünyetmezlik virusu
<b>I</b>	Orta dirençli
<b>IMP</b>	İmipenem
<b>IMVIC</b>	İndol, metil kırmızısı, voges proskauer, sitrat
<b>İg</b>	İmmünglobulin
<b>iMLS<sub>B</sub></b>	İndüklenebilir makrolid linkozamid streptogramin B
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Dipotasyum fosfat
<b>kb</b>	Kilo baz
<b>KBP</b>	Kollajen bağlayan protein
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>KNS</b>	Koagülaz negatif stafilokok
<b>KOH</b>	Potasyum hidroksit
<b>l</b>	Litre
<b>LA</b>	Lateks aglutinasyon
<b>LT-B4</b>	Lökotrien B4
<b>M</b>	Molar
<b>MHA</b>	Mueller-Hinton agar
<b>MHC</b>	Major histokompatibilite kompleks
<b>µg</b>	Mikrogram
<b>MİK</b>	Minimum inhibisyon konsantrasyonu
<b>ml</b>	Mililitre
<b>MLS</b>	Makrolid linkozamid streptogramin
<b>MLS<sub>B</sub></b>	Makrolid linkozamid streptogramin B
<b>MLST</b>	Multilokus sekans tiplendirme
<b>mm</b>	Milimetre
<b>mM</b>	Milimolar
<b>µm</b>	Mikrometre
<b>mol</b>	Mol

<b>MR</b>	Metil kırmızısı
<b>MR-KNS</b>	Metisiline dirençli koagülaz negatif stafilokoklar
<b>MRSA</b>	Metisiline dirençli <i>S. aureus</i>
<b>MS</b>	Makrolidlere ve streptogramin karşı direnç fenotipi
<b>MTA</b>	Mannitol tuz agar
<b>MSSA</b>	Metisiline duyarlı <i>S. aureus</i>
<b>MurNAc</b>	N-asetil-muramik asit
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	Sodyum karbonat
<b>NaCl</b>	Sodyum klorid
<b>ng</b>	Nanogram
<b>nm</b>	Nanometre
<b>NTED</b>	Neonatal toksik şok sendromu benzeri egzantematöz hastalık
<b>ORSAB</b>	Oksasilin direnç tarama agar besiyeri
<b>OX</b>	Oksasilin
<b>PBP</b>	Penisilin bağlayan protein
<b>PZR</b>	Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>PFGE</b>	Pulsed field gel electrophoresis
<b>PI</b>	Fosfatidilinozitol
<b>PI-PLC</b>	Fosfatidilinozitol-spesifik fosfolipaz C
<b>PMN</b>	Polimorfonükleer nötrofil
<b>pmol</b>	Pikomol
<b>PVL</b>	Panton-Valentin lökosidini
<b>R</b>	Dirençli
<b>RNA</b>	Ribonükleik asit
<b>rpm</b>	Devir/dakika
<b>rRNA</b>	Ribozomal ribonükleik asit
<b>S</b>	Duyarlı
<b><i>S. aureus</i></b>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<b>SAGs</b>	Süperantijenler
<b>SAK</b>	Stafilokinaz
<b>SCC<i>mec</i></b>	Stafilokoksik kromozomal kaset <i>mec</i>
<b>SDA</b>	Sabouraud dekstroza agar
<b>SDS</b>	Sodyum dodesil sülfat
<b>SEA</b>	Stafilokoksik enterotoksin A
<b>SpA</b>	Stafilokoksik protein-A
<b>SSSS</b>	Stafilokoksik haşlanmış deri sendromu
<b>SXT</b>	Trimetoprim/sulfametoksazol
<b>T</b>	Tetrasiklin
<b><i>Taq</i></b>	<i>Thermus aquaticus</i>
<b>TE</b>	Tris-EDTA
<b>TEC</b>	Teikoplanin
<b>TNase</b>	Termonükleaz
<b>TSI</b>	Üç şekerli demir
<b>TSS</b>	Toksik şok sendromu
<b>TSSST-1</b>	Toksik şok sendromu toksini-1
<b><i>tst</i></b>	Toksik şok sendromu toksin geni
<b>Ü</b>	Ünite
<b>UV</b>	Ultraviyole

<b>V</b>	Vankomisin
<b>VISA</b>	Vankomisine orta düzeyde dirençli <i>S. aureus</i>
<b>VP</b>	Voges-Proskauer
<b>VRSA</b>	Vankomisin dirençli <i>S. aureus</i>
<b>V<sub>β</sub></b>	Değişken bölge
<b>w/v</b>	Weight/volume

## ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	Gram pozitif bakterilerin hücre duvar yapısı	11
Şekil 1.2.	<i>S. aureus</i> 'un peptidoglikan yapısı	12
Şekil 1.3.	Gram pozitif bakterilerde teikoik asit yapısı	12
Şekil 1.4.	<i>mec</i> geni kompleksinin sınıflandırılması	31
Şekil 1.5.	SCC <i>mec</i> kaset gen tiplerinin yapısal görüntüsü	32
Şekil 2.1.	Enfeksiyon etkeni olmayan, TK-MRSA hasta grubu anket formu	58
Şekil 2.2.	DNA varlığının % 1'lik agaroz jel elektroforezinde görüntüsü	65
Şekil 2.3.	EMB besiyerinde gram negative bakterilerin görüntüleri	82
Şekil 3.1.	Mannitol fermentasyon testi	91
Şekil 3.2.	<i>S. aureus</i> ve KNS'ların DNaz agar test görüntüleri	91
Şekil 3.3.	Tüpte DNaz Testinin ilk 2 saatta ve 8 saatta jel görüntüleri	92
Şekil 3.4.	Sefoksitin (30 µg) disk difüzyon testi	99
Şekil 3.5.	Oksasilin Tuz Tarama Agar Testi	99
Şekil 3.6.	ORSAB testi	100
Şekil 3.7.	Enfeksiyon etkeni olan ve enfeksiyon etkeni olmayan TK-MRSA suşlarının D-testi ile iMLSB fenotipi tayini	102
Şekil 3.8.	MRSA suşlarının <i>mecA</i> genlerinin jel görüntüleri	104
Şekil 3.9.	Enfeksiyon etkeni olmayan TK-MRSA suşlarının SCC <i>mec</i> tiplerinin jel görüntüleri	105
Şekil 3.10.	Enfeksiyon etkeni olan TK-MRSA suşlarının SCC <i>mec</i> tiplerinin jel görüntüleri	105
Şekil 3.11.	TK-MRSA suşlarının <i>ccr</i> gen komplekslerinin jel görüntüleri	106
Şekil 3.12.	TK-MRSA suşlarının <i>ccrC</i> gen komplekslerinin jel Görüntüleri	106
Şekil 3.13.	TK-MRSA suşlarının class C <i>mec</i> genlerinin jel görüntüleri	107
Şekil 3.14.	TK-MRSA suşlarının class B <i>mec</i> genlerinin jel görüntüleri	108
Şekil 3.15.	TK-MRSA suşlarının class B <i>mec</i> genlerinin jel görüntüleri	108
Şekil 3.16.	TK-MRSA suşlarının PVL jel görüntüleri	110
Şekil 3.17.	Gram negatif suşların ESBL tayininde kullanılan yöntemler	117
Şekil 3.18.	Antibiyotikli-SDA besiyerinde maya mantarlarının görünüşleri	118
Şekil 3.19.	Maya mantarların API 20 C AUX ile yapılan tür tayini	118

## ÇİZELGELER

<b>Çizelge 1.1.</b>	<i>S. aureus</i> 'un virulans faktörleri ve bunları kontrol eden genler	8
<b>Çizelge 1.2.</b>	<i>ccr</i> ve <i>mec</i> taşıyan <i>SCCmec</i> kaset gen tipleri	31
<b>Çizelge 1.3.</b>	<i>SCCmec</i> gen kaset tiplerinin özellikleri	33
<b>Çizelge 1.4.</b>	TK-MRSA ve HK-MRSA arasındaki mikrobiyolojik ve klinik farklılıklar	41
<b>Çizelge 2.1.</b>	<i>S. aureus</i> idantifikasyon şeması	59
<b>Çizelge 2.2.</b>	<i>mecA1</i> ve <i>mecA2</i> primerlerinin dizisi	65
<b>Çizelge 2.3.</b>	<i>SCCmec</i> tip tayininde kullanılan primer dizileri	67
<b>Çizelge 2.4.</b>	<i>SCCmec</i> tipilerinin ampikon büyüklükleri	69
<b>Çizelge 2.5.</b>	<i>ccr</i> Gen Kompleksinde kullanılan primer dizileri	70
<b>Çizelge 2.6.</b>	<i>ccr</i> gen komplekslerinin ampikon büyüklükleri	72
<b>Çizelge 2.7.</b>	<i>ccrC</i> gen kompleksin primerleri ve ampikon büyüklükleri	72
<b>Çizelge 2.8.</b>	<i>mec</i> gen kompleksinin primer dizileri ve ampikon büyüklükleri	74
<b>Çizelge 2.9.</b>	<i>luk-PV1</i> ve <i>luk-PV2</i> primerlerinin dizisi	79
<b>Çizelge 2.10.</b>	CLSI'ye göre <i>S. aureus</i> suşlarının antibiyotik duyarlılık zon çaplarının değerlendirilmesi	81
<b>Çizelge 2.11.</b>	Gram negatif suşların CLSI'de antibiyotik duyarlılık zon çapları	86
<b>Çizelge 2.12.</b>	ESBL tarama testi	87
<b>Çizelge 3.1.</b>	Erkek ve kadınlarda <i>S. aureus</i> ve TK-MRSA taşıyıcılığı dağılımları	93
<b>Çizelge 3.2.</b>	<i>S. aureus</i> taşıyıcılarında burun ve koltuk altı taşıyıcılığı dağılımı	94
<b>Çizelge 3.3.</b>	TK-MRSA taşıyıcılarında burun ve/veya koltuk altı dağılımı	94
<b>Çizelge 3.4.</b>	<i>S. aureus</i> taşıyıcılarının yaş dağılımı	95
<b>Çizelge 3.5.</b>	<i>S. aureus</i> ve MRSA taşıyıcısı olanların risk faktörlerinin dağılımı	96
<b>Çizelge 3.6.</b>	Klonize olmayanlar ile <i>S. aureus</i> ve MRSA taşıyıcısı olanların özellikleri	97
<b>Çizelge 3.7.</b>	Enfeksiyon etkeni olmayan TK-MRSA grubunda <i>S. aureus</i> ve MRSA taşıyıcılığı dağılımı	98
<b>Çizelge 3.8.</b>	MRSA suşların tayininde kullanılan testlerin sonuçları	99
<b>Çizelge 3.9.</b>	Enfeksiyon etkeni olmayan TK-MRSA suşların saptanmasında kullanılan yöntemlerin sonuçları	100
<b>Çizelge 3.10.</b>	Enfeksiyon etkeni olmayan TK-MRSA suşlarının antimikrobiyal duyarlılık profilleri	101
<b>Çizelge 3.11.</b>	Enfeksiyon etkeni olan TK-MRSA suşlarının antimikrobiyal duyarlılık profilleri	102
<b>Çizelge 3.12.</b>	Enfeksiyon etkeni olan TK-MRSA suşlarında iMLS <sub>B</sub> direnci	103
<b>Çizelge 3.13.</b>	Enfeksiyon etkeni olmayan TK-MRSA suşlarında iMLS <sub>B</sub> direnci	103
<b>Çizelge 3.14.</b>	Enfeksiyon etkeni olmayan TK-MRSA suşlarında <i>SCCmec</i> tiplerinin dağılımı	109
<b>Çizelge 3.15.</b>	Enfeksiyon etkeni olan TK-MRSA suşlarında <i>SCCmec</i> tiplerinin dağılımı	109
<b>Çizelge 3.16.</b>	Enfeksiyon etkeni olan ve enfeksiyon etkeni olmayan TK-MRSA suşlarının özellikleri	111

<b>Çizelge 3.17.</b>	Sağlıklı bireyden burun ve koltuk altı örneklerinde gram negatif suşların dağılımı	112
<b>Çizelge 3.18.</b>	Sağlıklı bireyden burun ve koltuk altı örneklerinde gram negatif suşların dağılımı	112
<b>Çizelge 3.19.</b>	Gram negatif suşların antimikrobiyal profilleri	113
<b>Çizelge 3.20.</b>	<i>Enterobacter</i> spp.'nin antimikrobiyal duyarlılık profilleri	114
<b>Çizelge 3.21.</b>	<i>Proteus</i> spp.'nin antimikrobiyal duyarlılık profilleri	114
<b>Çizelge 3.22.</b>	<i>Escherichia</i> spp.'nin antimikrobiyal duyarlılık profilleri	115
<b>Çizelge 3.23.</b>	<i>Citrobacter</i> spp.'nin antimikrobiyal duyarlılık profilleri	115
<b>Çizelge 3.24.</b>	<i>Klebsiella</i> spp.'nin antimikrobiyal duyarlılık profilleri	116
<b>Çizelge 3.25.</b>	<i>Pseudomonas</i> spp.'nin antimikrobiyal duyarlılık profilleri	116
<b>Çizelge 3.26.</b>	<i>Serratia</i> spp.'nin antimikrobiyal duyarlılık profilleri	117
<b>Çizelge 4.1.</b>	MRSA suşlarının idantifikasyonu ve tiplendirilmesi	126
<b>Çizelge 4.2.</b>	Enfeksiyon etkeni olan ve olmayan TK-MRSA suşlarında direnç fenotipleri	132
<b>Çizelge 4.3.</b>	Maya mantarların risk faktör özellikleri	138

# 1. GİRİŞ

Enfeksiyon hastalıkları, neden oldukları mortalite ve morbidite ve yüksek tedavi maliyetleri nedeniyle, sadece gelişmekte olan ülkelerde değil, gelişmiş ülkelerde de temel bir toplum sağlığı problemi oluştururlar. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) insanlarda en sık görülen enfeksiyon etkenlerinden birisi olarak karşımıza çıkmaktadır. Cilt ve yumuşak doku enfeksiyonlarından, yaşamı tehdit eden invaziv enfeksiyonlara kadar, çok sayıda farklı klinik tabloya yol açabilir. Antibiyotik tedavisi *S. aureus*'a bağlı mortalite oranlarını %80'lerden %20'lere düşürmüş olmasına rağmen, hızlı antibakteriyel direnç gelişimi nedeniyle, sadece hastane kökenli değil, toplum kökenli *S. aureus* suşlarının yol açtığı enfeksiyonlar da ciddi bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Bu gibi hastalıkların kontrolü ise toplumda ve hastanelerde *S. aureus* taşıyıcılık oranlarının belirlenmesine, izole edilen *S. aureus* suşlarının moleküler epidemiyolojik yöntemlerle tanımlanmasına ve oluşturdukları enfeksiyonların patogeneğinde rol oynayan mekanizmaların aydınlatılmasına bağlıdır. Epidemiyolojik inceleme ve epideminin kaynağının bulunması, alınacak önlemlerin belirlenmesi ve epidemilerin sonlandırılması açısından oldukça önemlidir. Epidemiyolojik incelemeler suşları birbirinden ayırd edebilecek ya da aralarındaki benzerlikleri ortaya koyabilecek yöntemler kullanılarak ve suşlar arasındaki fenotipik ve genotipik farklılıklar esas alınarak gerçekleştirilir. Bu nedenle, konak savunma sistemleri ile etkileşimlerinde rol oynayan çeşitli bileşenlerin tanımlanması ve patojenik mekanizmalarının ortaya konması için büyük çaba sarf edilmekte, ancak bu konuda halen cevap bekleyen birçok soru bulunmaktadır (Lowy, 1998; Oliveira, 2002; Gonzalez, 2005).

Bu çalışmanın amacı, konvansiyonel ve moleküler yöntemler kullanılarak toplum kaynaklı metisiline dirençli *S. aureus* (TK-MRSA) ve metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA) taşıyıcılık oranlarının tespit edilmesi; izole edilen metisiline dirençli suşlarının kaset tiplerinin ve antibakteriyel duyarlılık paternlerinin ortaya konması ve *S. aureus* izolatlarının epidemiyolojik özelliklerinin araştırılmasıdır. Ayrıca, klindamisin ve eritromisine karşı dirençli suşlarda yapısal ve indüklenebilir makrolid

linkozamid streptogramin B (iMLS<sub>B</sub>) direncinin araştırılması da hedeflenmiştir. Çeşitli virulans faktörlerinin ortaya konması amacıyla, izole edilen tüm MRSA, MSSA suşlarından deoksiribonükleik asit (DNA) izolasyonunu takiben, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile “Panton-Valentin lökosidin” (PVL [*lukS*-PV ve *lukF*-PV], kaset kromozom rekombinaz (*ccr*) ve *mec* tipi tayini yapılarak SCC*mec* tipleri belirlenmiştir.

## 1.1. Genel Bilgiler

### 1.1.1. Stafilokoklar

*Staphylococcus* cinsi, *Micrococcaceae* ailesi içerisinde incelenir. Bu ailede *Planococcus*, *Stomatococcus*, *Micrococcus* ve *Staphylococcus* olmak üzere 4 cins yer almaktadır. *Planococcus* cinsi hareketli, gram-pozitif koklardan oluşur ve insanlardan izole edilmemiştir. *Micrococcus* türleri ise genellikle laboratuvar kontaminantı olarak izole edilirler. İnsan ağız florasının normal bir üyesi olarak bulunan *Stomatococcus mucilaginosus* ile meydana gelen enfeksiyonlar pek sık görülmemekle birlikte, immünkompromize hastalarda nadiren bildirilmektedir. *Staphylococcus* cinsinde yer alan türler ise belirgin insan patojenleridir ve yüzeysel cilt enfeksiyonlarından, hayatı tehdit eden sistemik enfeksiyonlara kadar değişen, çok geniş bir hastalık spektrumuna sahiptirler. DNA'daki G+C oranları, genom yapıları ve hücre duvarı yapıları arasında farklılıklar olmasına karşın, nükleik asit hibridizasyon deneyleri ve 16S rRNA sekanslarının incelenmesi sonucunda bu dört cins aynı aile içerisinde toplanmıştır (Koneman, 2006; Forbes, 2007).

*Micrococcaceae* ailesinin tüm üyeleri düzgün veya düzensiz kümeler oluşturan, gram pozitif boyanma özelliği gösteren, genellikle hareketsiz, aerop veya fakültatif anaerob, kemoorganotrof koklardan oluşur. Boyutları 0,5 ile 1,5 µm arasında değişir. %5'lik koyun kanlı agar ve çikolata agarda iyi ürerken, MacConkey agarda üremezler (Wenzel, 1998; Bannerman, 2003; Koneman, 2006; Forbes, 2007).

Stafilokokların DNA'larındaki G+C oranları %32,8-32,9 mol iken, mikrokoklarda bu oran %66-75 mol'dur. Ayrıca fakültatif anaerob olmaları, 0,04 Ü basitrasine dirençli, furazolidon ve lizostafine duyarlı olmaları ve mikrodaz-negatif olmaları ile; aerob, 0,04 Ü basitrasine duyarlı, furazolidon ve lizostafine karşı dirençli ve mikrodaz-pozitif olan mikrokoklardan kolaylıkla ayırd edilebilirler (Koneman, 2006; Forbes, 2007).

*Staphylococcus* ismi Yunanca'dan köken alır ve üzüm-benzeri kok anlamına gelir. Bu şekilde isimlendirilmelerinin nedeni, hücresel dizilişlerinin üzüm

kümelerini andırmasıdır. Bu özellik agarda üreyenlerde daha belirgin olarak görülürken, klinik örneklerden izole edilen organizmalar tek tek, ikişerli veya kısa zincirler şeklinde görülebilir (Koneman, 2006; Forbes, 2007).

*Staphylococcus* cinsi içerisinde 35 tür ve 17 alt tür saptanmış, 21 tür insanlarda enfeksiyon etkeni olarak tanımlanmıştır. Normalde insan, diğer memeliler ve kuşların cilt ve müköz membranlarında bulunurlar. İnsanlarda enfeksiyon etkeni olarak en sık izole edilen türler *S. aureus* (en virulan ve en iyi bilinen tür), *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*), *Staphylococcus haemolyticus* (*S. haemolyticus*), *Staphylococcus lugdunensis* (*S. lugdunensis*), *Staphylococcus saprophyticus* (*S. saprophyticus*) ve *Staphylococcus schleiferi* (*S. schleiferi*)'dir. (Koneman, 2006; Forbes, 2007).

Stafilokoklar gram pozitif, hareketsiz, 0,5-1,5 µm çapında, fakültatif anaerob (*S. saccharolyticus* anaerob ürer), katalaz pozitif, oksidaz negatif koklardır. Spor oluşturmazlar ve hareketsizdirler. İnvitro ortamda üretilen stafilokoklarda nadiren gevşek, polisakkarid yapısında bir kapsül bulunur, ancak invivo şartlarda bu kapsülün daha sık bulunduğu düşünülmektedir. Bu kapsül kemotaksisi, fagositozu ve mononükleer hücrelerin proliferasyonunu engelleyerek bakteriyi korur. Ayrıca bakterinin kateter ve başka sentetik materyallere (ör. greft, prostetik kapak ve eklemler, şantlar) adheransını kolaylaştırır (Koneman, 2006; Forbes, 2007).

Tüm stafilokoklar katalaz enzimi üretirler ve bu özellikleri ile streptokoklar'dan kolayca ayrılırlar. Bazıları %10 NaCl içeren ortamlarda üreyebilir. Başta glukoz olmak üzere birçok karbonhidratı fermente ederler ve son ürün olarak laktik asit oluşturur, ancak gaz oluşturmazlar. *S. aureus* mannitolu parçalarken, diğerlerinin bu şekere karşı etkileri değişkendir. Bu nedenle Mannitol Tuz Agar (MTA), *S. aureus* izolasyonu için selektif besiyeri olarak kullanılmaktadır (Koneman, 2006; Forbes, 2007).

Stafilokoklar geniş bir sıcaklık aralığında (6,5C°-45C°) üreyebilen bakterilerdir, ancak optimal üreme sıcaklıkları 30-37C°'dir. pH 7-7,5 civarında daha iyi ürerler. Stafilokoklar birçok besiyerinde üreyebilir. %5'lik koyun kanlı agarda, 18-24 saatlik inkübasyonu takiben tipik olarak yuvarlak, düzgün kenarlı, kabarık,

mat, 1-4 mm çapında, “Smooth” S tipi koloniler oluştururlar. *S. aureus* kolonilerinin çoğunda sarı pigment ve beta hemoliz görülürken, *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus*'un bazı kökenleri de sarı veya turuncu pigment ve hemoliz oluşturabilir (Koneman, 2006; Forbes, 2007).

Stafilokoklar gliserol monofosfat gibi yağ asitleri ile zenginleştirilmiş besiyerlerinde 37C° de ve aerop ortamda ürediklerinde, ortamdaki keratenoidlerden dolayı pigment oluştururlar. Anaerop koşullarda ve buyyonda ürediklerinde pigment oluşturmazlar. *S. aureus* altın sarısı, *S. epidermidis* tebeşir beyazı (porselen beyazı) renginde koloniler oluşturur. *Staphylococcus simulans* (*S. simulans*), *Staphylococcus intermedius* (*S. intermedius*) ve *Staphylococcus hyicus* (*S. hyicus*) pigment oluşturmaz. Genel olarak pigment oluşumu için oksijen gereklidir (Koneman, 2006; Forbes, 2007).

Stafilokoklar sporsuz olmalarına rağmen kuruluğa karşı son derece dayanıklıdır. Fakat kristal viyole ve malaşit yeşili gibi boyaların düşük konsantrasyonlarında bile çok çabuk harab olurlar. Stafilokoklar 30'dan fazla antijenik maddeye sahiptirler. Stafilokokların en önemli antijenik maddelerinden birisi hücre duvarlarında bulunan ve aşırı duyarlılık reaksiyonlarında rol oynayan teikoik asittir (Kloss, 1995; Bannerman, 2003; Koneman, 2006; Forbes, 2007).

### **1.1.2. *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* türleri doğada yaygın bulunan 0,5-1,5 µm çapında, üzüm salkımı şeklinde kümeler oluşturan, gram pozitif, fakültatif anaerob koklardır. Hareketsizdirler ve spor oluşturmazlar. Katı besiyerlerinde S tipi koloni oluştururlar. Katalaz ve koagülaz pozitif, oksidaz negatif özellik gösterirler. Eskülini hidrolize etmez, D-mannitol, D-mannoz, sükroz, maltoz ve trehalozu fermente ederler. Novobiyosin'e duyarlı ve lizozime karşı dirençlidirler. Enterotoksinler, toksik şok sendromu toksin-1 (TŞST-1), ekfoliyatif toksin, lökosidin, koagülaz, fibrinolizin, hiyalüronidaz, çeşitli proteazlar, nükleazlar ve lipazlar gibi çok sayıda toksinler ve enzimler sentezlerler. *Staphylococcus* cinsi içinde *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. hyicus*

ve *S. schleiferi* subsp. *coagulans* koagülaz pozitif türler olarak tanımlanmıştır. *S. aureus* adi jeloz besiyerinde ürese de, %5'lik koyun kanlı agarda, 37C°de ve pH 7,4'te daha iyi ürer ve kolonilerin etrafında tam bir hemoliz alanı görülür. Yuvarlak ve düzgün kenarlı, mat, kabarık, parlak yüzeyle, S tipinde ve 1-2 mm çapında koloniler oluşturur. *S. aureus* ayrıca altın sarısı renginde pigment oluşturur. Kolonilere altın sarısı rengini veren karotenoid pigmentleridir. *S. aureus* ısıya ve kuruluğa karşı dayanıklıdır. Antibiyotiklere karşı da diğer birçok bakteriye göre daha dirençli oldukları gibi, genel olarak kemoterapötiklere karşı süratle direnç geliştirirler (Bannerman, 2003; Koneman, 2006; Forbes, 2007).

### 1.1.2.1. Patogenez ve Patofizyoloji

*S. aureus* enfeksiyonlarının patogenezinde yüzey proteinleri, kapsüler polisakkaritler, sitotoksinler, süperantijenler ve enzimler gibi çok sayıda faktör rol oynar. Spesifik stafilokoksik yüzey proteinleri, fibronektinin “arginin-glisin-aspartat” dizinine bağlanır (Koneman, 2006).

*S. aureus* üç major mekanizma ile hastalığa yol açar: (1) ürettiği ekzoenzimlerin direkt doku hasarına yol açması; (2) ekzotoksinlerin dolaşıma girerek intoksikasyon semptomlarına yol açması; (3) süperantijenlerin ekspresyonu ile T hücre aktivasyonu ve sitokin salınımı ile multisistem tutulumu. *S. aureus*'un konak dokusuna adezyonunda fibronektin, fibrinojen, vitronektin, laminin ve kollajen olmak üzere beş protein rol oynar. Fibronektin hem dokularda hem de kanda bulunan bir glikoproteindir. İnvaziv *Staphylococcus* türlerinin diğer türlere göre, fibronektine daha fazla bağlandığı bildirilmektedir. Trombositlerden salgılanan trombospondin de *S. aureus*'un adezyonunda rol oynar. Adezyondan sonra mikroorganizma mukozal veya epiteliyal yüzeylere penetre olarak konağa invaze olur. Kemotaksis, opsonizasyon ve fagositozun başlamasından sonra intrasellüler stafilokoklar çok çekirdekli lökositler tarafından hızla öldürülürler. Yabancı cisim enfeksiyonlarında ise yabancı cismin konağın plazma ve matriks proteinleriyle kaplanması ve bakterinin bunlara yapışması enfeksiyonun ortaya çıkmasına yol açar (Moreillon, 2005; Koneman, 2006).

### 1.1.2.2. Virulans Faktörleri

*S. aureus*'un virulans faktörleri bir veya birden çok gen tarafından kontrol edilmektedir. Çizelge 1.1'de *S. aureus* enfeksiyonlarının patogenezindeki rol onayan başlıca virulans faktörleri ve bunları kontrol eden genler görülmektedir.

Koagülaz, hemolizinler, deoksiribonükleaz (DNaz), hyaluronidaz, fosfataz ve Protein-A virulansla ilgili bulunmuştur. Adezinler, kolonizasyonda rol oynarlar. Stafilokinaz ve diğer ekstraselüler enzimler (proteaz, lipaz, kollajenaz, elastaz) invazyonda; koagülaz, lökositin ve kapsül yapısı fagositoza karşı direnci sağlamada etkilidir. Koagülaz immün cevaba karşı etkin bir savunma rolü üstlenirken, hemolizin ve lökositin de sitotoksik etki gösterir. Lökositin, ayrıca virulansı artırmaktadır. Hayvanlarda uygulanan deneysel sepsis modelinde kapsül polisakariti tip 5 ve tip 8'e karşı geliştirilen antikörlerin koruyucu etkisi gösterilmiştir ve tip 5 ve tip 8 kapsüller polisakarite karşı geliştirilmiş konjuge aşının hemodiyaliz uygulanan hastalarda faydalı olduğu ortaya konulmuştur (Bannerman, 2003; Koneman, 2006; Forbes, 2007).

**Çizelge 1.1.** *S. aureus*'un virulans faktörleri ve bunları kontrol eden genler (Pragman, 2004; Iwatsuki, 2006)

Gen	Ürün	Fonksiyon
<i>spa</i>	Protein-A	Antifagositoz
<i>can</i>	Kollajen Bağlayan Protein (KBP)	Kollajenin bağlanması
<i>fnba</i>	Fibronektin BPA	Fibronektinin bağlanması
<i>fnbb</i>	Fibronektin BPB	Fibronektinin bağlanması
<i>clfa</i>	Clumping factor A	Fibronektinin bağlanması
<i>clfb</i>	Clumping factor B Laktoferrin BP	Fibronektinin bağlanması Laktoferrinin bağlanması
<b>Kapsüler polisakkaritler</b>		
<i>cap5</i>	Polisakkarit kapsül tip 5	Anti-fagositoz
<i>cap8</i>	Polisakkarit kapsül tip 8	Anti-fagositoz
<b>Sitotoksinler</b>		
<i>hla</i>	Alfa-hemolizin	Hemolizin, sitotoksin
<i>hlb</i>	Beta-hemolizin	Hemolizin, sitotoksin
<i>hld</i>	Gama-hemolizin	Hemolizin, sitotoksin
<i>hlg</i>	Delta-hemolizin	Hemolizin, sitotoksin
<i>luks/f</i>	Panton Valentin lökositidin	Lökölizin
<b>Süperantijenler</b>		
<i>tst</i>	Toksik şok sendrom toksin-1	Toksik şok sendromu (TŞS)
<i>sea</i>	Enterotoksin A	Besin zehirlenmesi, TŞS
<i>seb</i>	Enterotoksin B	Besin zehirlenmesi, TŞS
<i>sec</i>	Enterotoksin C	Besin zehirlenmesi, TŞS
<i>sed</i>	Enterotoksin D	Besin zehirlenmesi, TŞS
<i>eta</i>	Eksfoliatin A	Haşlanmış deri sendromu
<i>etb</i>	Eksfoliatin B	Haşlanmış deri sendromu
<b>Enzimler</b>		
<i>plc</i>	Fosfolipaz C	Yağ asiti esterifikasyonu
<i>nuc</i>	Nükleaz	Beslenme
<i>hys</i>	Hiyaluronidaz	Yayıma faktörü
<i>coa</i>	Koagülaz	Fibrinojeni fibrine çevirme
<i>sak</i>	Stafilokinaz	Plazminojen aktivatörü

#### 1.1.2.2.1. Kapsül

*S. aureus*'un özellikle mukoid koloni oluşturan kökenleri, polisakkarit yapısında bir kapsüle sahiptir. Kapsül yapısı elektron mikroskopik araştırmalar sonucunda, özellikle enfekte kalp pilleri, peritonit ve intravenöz kateter enfeksiyonlarından izole edilen *S. aureus* kökenlerinde gösterilmiştir. *S. aureus*'un kapsül antijenlerinden iki

tanisi kimyasal olarak tanımlanmıştır. “Wilky suşu” olarak isimlendirilen ilk antijen glutamik asit, lizin, alanin ve glisinden oluşmuştur. “Smith suşu” olarak isimlendirilen diğeri ise, 2-amino-2-deoksi-D-glukronik asidin bir polimeridir. Klinik laboratuvarlardan izole edilen *S. aureus*’ların %90’ından fazlası kapsülsüzdür. Kapsüllü *S. aureus*’ların 11 serolojik serotipi bulunmuş ve klinik izolatlarında 5. ve 8. serotipler en baskın (%70-80) tipler olarak tanımlanmıştır. Bu serotiplerden serotip 8, *S. aureus*’un toksik şok sendromu toksini ile ilişkilidir. Ek olarak özellikle oksasilin dirençli *S. aureus* suşlarında, serotip 5’e ait kapsül polisakkarid yapısının varlığı gösterilmiştir (Branger, 1990; Koneman, 2006).

#### 1.1.2.2.2. “Slime” Tabakası

Slime maddesi bir ekzopolisakkarit olup amorf kapsül yapısındadır. Bazı koagülaz negatif stafilokoklar (KNS) tarafından salgılanan, %40’ı karbonhidrat ve %27’si protein yapısında olan bir maddedir. Bakterilerin plastik ve metal gibi yüzeylere tutunmasını sağlar. Biyofilm ve slime terimleri sıklıkla birbirlerinin yerine kullanılmaktadır. Slime tabakası hücrel immün yanıtı baskılar, bakteriyi fagositoz ve degranülasyondan korur, kemotaksis ve opsonizasyonu önler ve lenfosit aktivitelerini azaltır. Slime oluşturan bakteriler, oluşturmaya göre, tedavisi daha güç olan enfeksiyonlara neden olur. Slime tabakasının antibiyotiklerin etkisini de önleyici fonksiyonu olduğu bildirilmektedir. Slime maddesini eradike etmek son derece güçtür. Slime oluşturan *S. aureus* ve KNS’lar, oldukça inatçı enfeksiyonlara yol açarlar. Biyofilm oluşturan bakteriler antimikrobiyal maddelere, yüzey gerilimini değiştiren ajanlara, sıcaklığa, fagositoza, toksik oksijen radikallerine, proteazlar gibi çeşitli enzimlere karşı direnç geliştirirler. Tabakalı dizilim sonucu, yüzeyde bulunan bakteriler hem mekanik bir kalkan oluşturarak, hem de katalaz, proteaz, lipaz gibi enzimler sentezleyerek, daha iç yüzeyde bulunan bakterileri antimikrobiyallere ve konak savunmasına karşı korurlar. Antimikrobiyal ajanların bakteriye etki edebilmesi için biyofilm tabakasına yayılmaları gerekir (Fidan, 2005; Koneman, 2006).

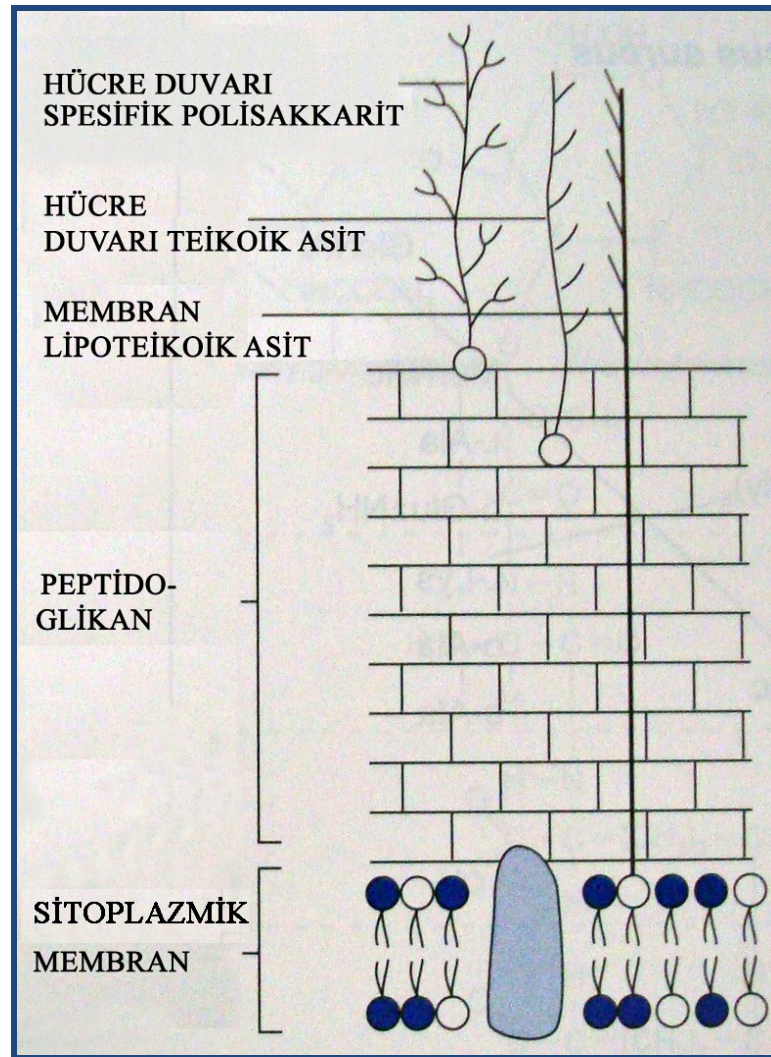
### 1.1.2.2.3. Peptidoglikan ve Teikoik Asit

Stafilokokların hücre duvarı; peptidoglikan, teikoik asit ve protein-A olmak üzere üç ana bileşenden oluşur. *S. aureus*'un hücre duvarının esas bileşeni, hücre duvarı ağırlığının yaklaşık %50'sini oluşturan peptidoglikan (murein, mukopeptid, glikopeptid) tabakasıdır. Peptidoglikanın yapısında *N*-asetil-glikozamin (GlcNAc) ve *N*-asetil-muramik asit (MurNAc) bulunmaktadır. Kalınlığı bakteri türüne göre değişiklik gösterebilmekle birlikte, yaklaşık, 10-12 nm civarındadır. Bu yapı bakteriye karakteristik şeklini verdiği gibi, hücreye esneklik ve sağlamlık da kazandırır (Bannerman, 2003; Koneman, 2006).

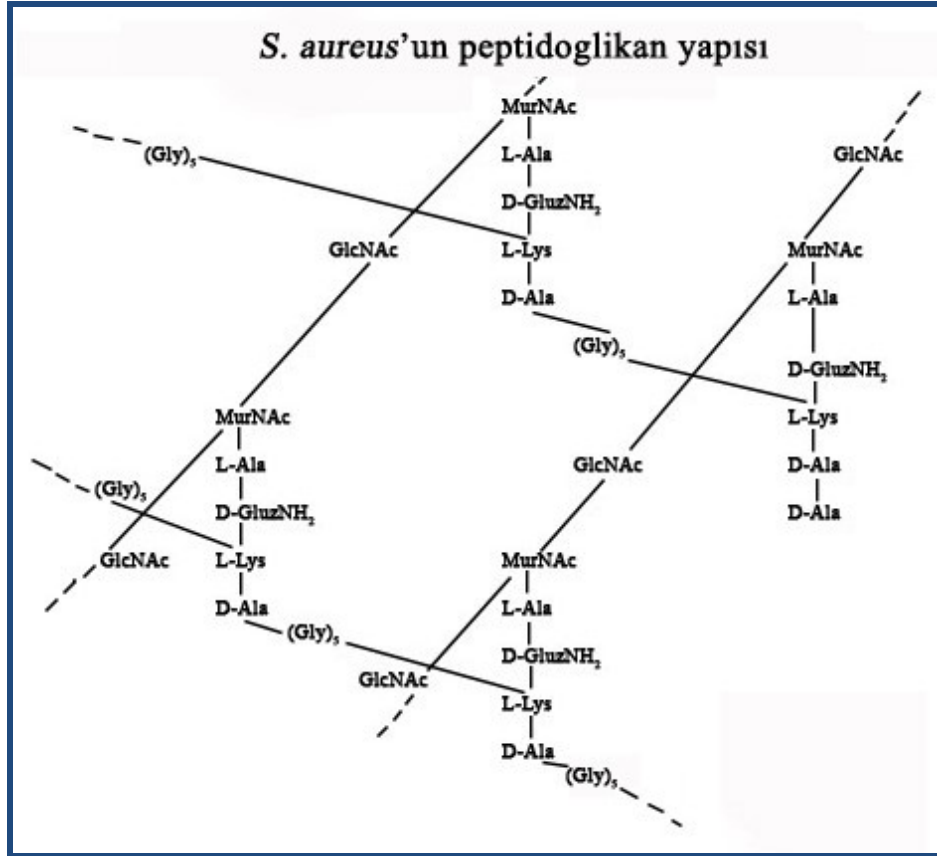
Hücre duvarının bir diğer önemli bileşeni de, hücre duvarı ağırlığının yaklaşık %40'ını oluşturan teikoik asitlerdir. Teikoik asit; ya 5-karbonlu ribitol ya da 3-karbonlu gliserol birimlerden meydana gelmiş bir polimerdir. Bu polimer, ribitol veya gliserol moleküllerin fosfodiester bağları ile bağlanarak ribitol teikoik asiti ya da gliserol teikoik asiti oluşturur. Ribitol teikoik asit hücre duvarına bağlanırken, gliserol teikoik asit hücre membranına bağlanmaktadır. Ribitol teikoik asit peptidoglikan tabakasındaki *N*-asetil-muramik asit (MurNAc) molekülün C6 karbonuna bağlanırken, gliserol teikoik asit hücre zarında bulunan glikolipidlere bağlanır. Sadece gram pozitif bakterilerin hücre duvarında bulunan bu yapı, hücre yüzeyine negatif yük vererek çeşitli metal iyonlarının, katyonların lokalizasyonunda ve otolitik enzimlerin aktivasyonunda rol oynar. Teikoik asitler buldukları yerlere göre, hücre duvarı ve hücre zarı teikoik asitleri olarak başlıca ikiye ayrılırlar. Hücre duvarı teikoik asitleri, gram pozitif bakterilerde peptidoglikan tabakasına bağlanmış olup, temel yapısında poliribitol fosfat (*S. aureus*) veya poligliserol fosfat (*S. epidermidis*) bulunur. Membran teikoik asitleri ise sitoplazmik membranın dış yüzeyinde lokalize olmuştur. Hücre duvarı teikoik asitlerine benzer kimyasal yapıya sahip olmakla beraber, gliserol fosfat molekülleri hakim durumdadır. Peptidoglikan ve teikoik asit başka birçok biyolojik aktiviteye daha sahiptir. Bunlar arasında komplemanın aktive edilmesi, polimorfonükleer hücrelerin atraksiyonu ve kemotaksis, monositler ve makrofajlar tarafından interlökin-1 sentezinin ve opsonizasyonda rol oynayan antikorların üretiminin stimüle edilmesi sayılabilir.

Teikoik asit mukozalarda bulunan spesifik reseptörler aracılığı ile stafilokokların konak hücrelerine tutunmasını da sağlar. Ayrıca hücre duvarının sertliğini ve esnekliğini de destekler (Bannerman, 2003; Koneman, 2006).

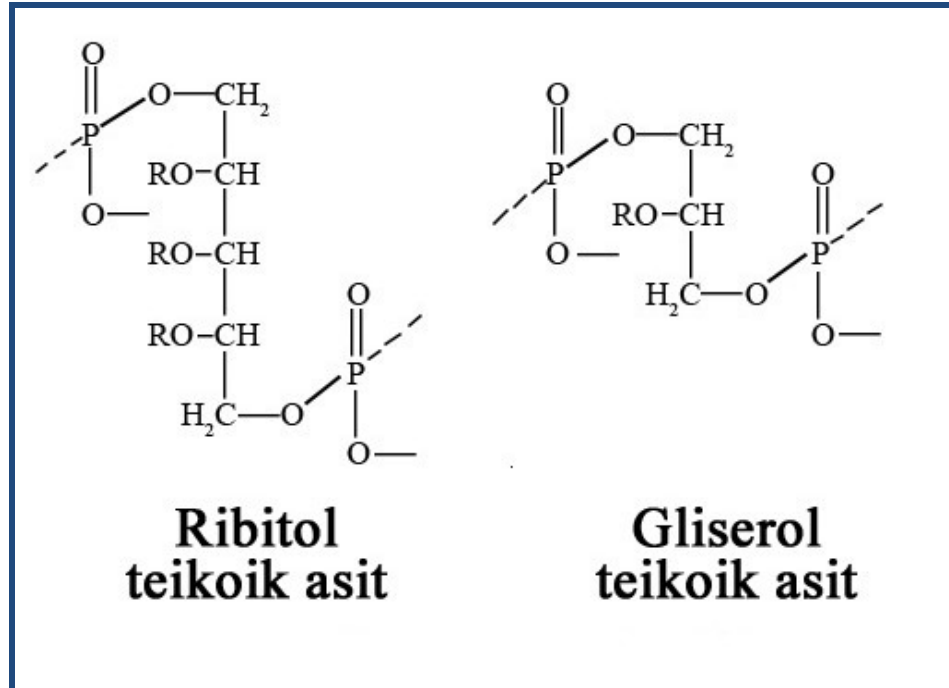
Şekil 1.1’de gram pozitif bakterilerin hücre duvarı yapısı, şekil 1.2’de *S. aureus*’un peptidoglikan yapısı ve şekil 1.3’te gram pozitif bakterilerin teikoik asit yapısı görülmektedir.



Şekil 1.1. Gram pozitif bakterilerin hücre duvar yapısı (Koneman, 2006)



Şekil 1.2. *S. aureus*'un peptidoglikan yapısı (Koneman, 2006)



Şekil 1.3. Gram pozitif bakterilerde teikoik asit yapısı (Koneman, 2006)

#### 1.1.2.2.4. Stafilokoksik protein-A (SpA)

Çoğu *S. aureus* suşlarında protein A bulunur. Hücre duvarında bulunan ve gruba özel bir antijen olan protein-A, 1940 yılında Werveby tarafından tanımlanmış önemli bir virulans faktörüdür. Bu yapı peptidoglikan tabakasının en dışında yer alır ve hücre duvarının yaklaşık %7'sini oluşturur. Molekül ağırlığı 42 kDa olan küçük bir proteindir. İki tip SpA tanımlanmıştır: Serbest protein-A ve hücre duvarına bağlı protein-A. Bağlı protein-A, *S. aureus*'un hücre duvarının bir bileşenidir ve büyük bir kısmı peptidoglikan'a kovalen olarak bağlanmıştır. Serbest protein-A ise hücre dışı ortama salınmaktadır. SpA komplemanı aktive ettiği gibi antifagositik, kemotaktik ve immünolojik etkiler de gösterir. *S. aureus*, protein-A aracılığıyla, immünglobulin G<sub>1</sub> (İgG<sub>1</sub>), İgG<sub>2</sub> ve İgG<sub>4</sub> moleküllerinin Fc (fragment crystallizable [kristalize olabilen fragman]) bölgelerine bağlanarak, bakterilerin antikor aracılığı ile ortadan kaldırılmasını etkin olarak engeller. Hücre dışı protein-A da antikorları bağlayabilir ve immün kompleksler oluşturarak, kompleman bileşenlerinin fazla miktarda tüketimine neden olur ve bakteriyi komplemana bağlı vücut savunmasından korur. SpA ayrıca, bakterinin antibiyotiklere karşı duyarlılığını azaltması nedeniyle de, önemli bir patojenite determinantı olarak kabul edilmektedir (Bannerman, 2003; Koneman, 2006; Forbes, 2007).

Antikorların Fc bölgesini bağlayabilme özelliğinden dolayı protein A'dan, streptokoksik ve gonokoksik enfeksiyonlar gibi bazı enfeksiyonların tanısı amacıyla serolojik testlerde yararlanılmaktadır. Bu testlerde stafilokoksik protein A ile kaplı partiküller, başka antijenlere karşı oluşmuş antikorlar için non-spesifik taşıyıcı olarak kullanılır. Protein-A antikorların Fc bölgeleri ile bağlandığında, özgül bağlanma bölgeleri olan Fab (antijen bağlayan fragman) bölgeleri serbest kalır. İncelenen örneklerde aranan antijen varsa, meydana gelen antijen-antikor kompleksi gözle görülür kümelerin oluşmasına yol açar. Buna koaglutinasyon adı verilir (Bannerman, 2003; Koneman, 2006; Forbes, 2007).

### 1.1.2.2.5. Enzimler

#### 1.1.2.2.5.1. Katalaz

Tüm stafilokoklar katalaz enzimi üretirler. Katalaz, hidrojen peroksiti su ve oksijene ayrıştırır. Dolayısıyla, toksik hidrojen peroksit ve serbest radikallerini inaktive ederek mikroorganizmayı konağın savunma mekanizmalarına karşı korur. Eritrositlerde de katalaz enzimi bulunduğundan dolayı, test kan içermeyen besiyerlerinde üretilmiş bakterilerde yapılır (Bannerman, 2003; Koneman, 2006; Forbes, 2007).

#### 1.1.2.2.5.2. Koagülaz

Ekstrasellüler bir proenzimdir. “Coagulase-Reacting factor” (CRF) ile reaksiyona girerek aktif duruma geçer ve plazmayı pıhtılaştırır. Koagülaz testi *S. aureus* için standart bir belirleyicidir. *S. aureus* suşları bağlı koagülaz (clumping factor = kümeleştirici faktör) ve serbest koagülaz olmak üzere iki tip koagülaz enzimi üretir. Bunlar immünolojik olarak farklı olduğu gibi, etki mekanizmaları da farklıdır. Hücre duvarında bulunan bağlı koagülaz direkt olarak fibrinojeni çözülemez fibrine dönüştürür. Bunun sonucunda hücre yüzeyinde fibrin presipitasyonu meydana gelir ve stafilokokların kümeleşmelerine yol açar. Serbest koagülaz da bir globülin plazma faktörü CRF ile reaksiyona girerek trombin benzeri bir faktör (stafilotrombin) oluşturmak sureti ile yine stafilokokların kümeleşmesine yol açar. Bu faktör fibrinojenin, çözülemez fibrine dönüşümünü katalizler (Koneman, 2006; Forbes, 2007).

Koagülaz *S. aureus* için bir virulans faktörüdür. Koagülaz pozitif stafilokokların üzerinde oluşan fibrin tabakası mikroorganizmayı fagositoza karşı koruyarak patojenitesini artırır. Stafilokoksik absenin etrafında bir fibrin tabakasının oluşmasını sağlayarak enfeksiyonu lokalize edebilir ve organizmaları fagositozdan, ve immün sistemin diğer hücrel ve humoral savunma mekanizmalarından koruyabilir (Bannerman, 2003; Koneman, 2006; Forbes, 2007).

#### 1.1.2.2.5.3. Hiyaluronidaz

*S. aureus* suşlarının %90'ı hiyaluronidaz üretir. Bu enzim bağ dokusunun matriksinde bulunan mukopolisakkarid yapısındaki hiyaluronik asidleri hidrolize eder ve mikroorganizmanın kolayca yayılmasını sağlar (Franklin, 1998; Koneman, 2006; Iwatsuki, 2006).

#### 1.1.2.2.5.4. Fibrinolizin

Stafilokinaz adı da verilen bu enzim tüm *S. aureus* suşları tarafından oluşturulur ve fibrin pıhtılarını çözer. Fibrin kılıflarının yıkımı enfeksiyonun dokularda daha kolay yayılmasına yol açar. Stafilocoklar tarafından salınan kinazlar, plazmada bulunan plazminojeni aktive ederek plazmin oluşturur. Fibrinolitik etki bu madde aracılığıyla oluşur. Stafilokinaz *sak* geni tarafından kodlanır. Enzimin üretimi bazı suşlarda bir faj genomunun kontrolü altındayken, diğer suşlarda kromozomal genler tarafından kontrol edilir. Stafilokinaz ayrıca İgG'yi ve kompleman C3b bileşenini parçalayarak bakteriyi fagositoya karşı korur (Bokarewa, 2006).

#### 1.1.2.2.5.5. Lipaz

Tüm *S. aureus* suşları ve KNS'ların %30'undan fazlası çeşitli lipazlar oluşturur. Bu enzimler stafilocokların vücudun sebace bölgelerinde yaşayabilmeleri için gereklidir ve lipidleri hidrolize ederek stafilocokların cilt ve cilt altı dokularda yayılmasını kolaylaştırır. Ayrıca yüzeysel cilt enfeksiyonlarının gelişmesinde önemli rol oynadıkları düşünülmektedir (Murray, 2005).

#### 1.1.2.2.5.6. DNaz

DNaz ve ısıya dayanıklı stafilokoksik nükleaz (Termonuclease [TNase]), endo ve ekzo nükleolitik aktivite gösteren enzimler olarak sentezlenir. Her ikisi de DNA ve RNA'yı nükleotidlere parçalar. DNaz *S. aureus*'ların %90'dan fazlasında bulunan, hücre dışı bir enzimdir. Bu nedenle DNaz testi, laboratuvarında *S. aureus* suşlarının ayırıcı tanısında kullanılabilir. *S. aureus*, *S. schleiferi*, *S. intermedius* ve *S. hyicus* suşlarının çoğu DNaz oluştururken, *S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. carnosus* çok zayıf DNaz aktivitesine sahiptirler. Test, ticari olarak mevcuttur (DNaz test agar, metil yeşili içeren DNaz test agar, toluidin mavisi içeren DNaz test agar) ve sonuçlar 35C°'de 13-24 saatlik inkübasyondan sonra değerlendirilir (Bannerman, 2003; Forbes, 2007).

#### 1.1.2.2.5.7. Isıya-Dayanıklı Nükleaz (Heat-Stable Nuclease)

TNaz nükleaz (*nuc*) geni tarafından kodlanır, DNA'yı nükleotidlere parçalar. *S. aureus*, *S. schleiferi*, *S. intermedius* ve *S. hyicus* suşlarının çoğu TNaz oluştururken, *S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. carnosus* çok zayıf TNaz aktivitesine sahiptirler. *S. aureus* TNaz aktivitesini diğerlerinden ayırd etmek için (*nuc* geni) PZR ve seroinhibitör testleri kullanılır. Bu amaçla DNaz test besiyerleri (DNaz test agar, toluidin mavisi içeren DNaz test agar) kullanılarak üzerinde 3 mm çapında bir delik açılır ve test edilen organizmanın sıvı besiyerinde üretilen kültürü, 15 dakika kaynatılarak deliğe aktarılır ve sonuç 35C°'de 4 saatlik inkübasyondan sonra değerlendirilir (Bannerman, 2003).

#### 1.1.2.2.5.8. Fosfatidilinozitol-Spesifik Fosfolipaz C

*S. aureus* suşları fosfatidilinozitol (PI)-spesifik fosfolipaz C (PI-PLC) sentezleyerek, ökaryotik hücrelerin fosfolipid inositol içeren zarlarını hidrolize eder ve bozulmalarına neden olur. PI-PLC özellikle erişkin tip solunum zorluğu sendromu

(ARDS) ve yaygın damar içi koagülopatisi (DIC) bulunan hastalardan izole edilen suşlarda bulunan bir enzimdir (Daugherty, 1993; Koneman, 2006).

#### **1.1.2.2.5.9. Beta Laktamaz**

Bu enzimi sentezleyen suşlar, özellikle penisilin ve sefalosporinler gibi beta laktam halkası bulunan hücre duvarı inhibitörlerine karşı dirençlidirler. Bu suşlarda aynı zamanda eritromisin ve tetrasiklin gibi çok sayıda antibakteriyel ajanlara karşı direnç de sık görülür. Bu enzimler plazmid kontrolünde sentezlendiklerinden dolayı, konjugasyon, transformasyon ve transdüksiyon yoluyla bakteriler arasında yayılım oldukça yaygındır (Koneman, 2006).

#### **1.1.2.2.6. Sitolitik Toksinler**

*S. aureus* çok sayıda virulans faktörüne sahiptir. En azından 5 sitolitik toksin (alfa-, beta-, gamma-, delta-toksin ve lökositin), ekfoliyatif toksin, toksik şok sendromu toksini-1 ve 5 farklı enterotoksin bulunur. Sitolitik toksinler, hemolizinler olarak da tanımlanmıştır, fakat ilk dört toksinin aktivitesi eritrositlerle sınırlı değildir, ayrıca lökositin eritrositler üzerine etki etmemektedir (Bannerman, 2003; Forbes, 2007).

##### **1.1.2.2.6.1. Alfa Toksin**

Alfa toksin ( $\alpha$ -hemolizin) 33 kDa moleküler ağırlığında bir ekzotoksindir. Etki mekanizması tam bilinmemekle birlikte, hücre membranlarının bütünlüğünü bozduğu düşünülmektedir. Bu toksin eritrosit, lökosit, hepatosit, trombosit, insan diploid fibroblastları, HeLa hücreleri, ve “Ehrlich ascites” karsinoma hücreleri gibi çok çeşitli hücre tipleri için sitotoksik özellik gösterir. Aynı zamanda kan damarlarındaki düz kasları harab eder. Alfa toksin, genetik olarak hem bakteriyel kromozomda hem de bir plazmidde kodlanır (Bannerman, 2003; Forbes, 2007).

#### 1.1.2.2.6.2. Beta Toksin

$\beta$ -hemolizin veya sfingomiyelinaz C olarak da isimlendirilen bu toksin, 35 kDa molekül ağırlığına sahip, ısıya duyarlı bir proteindir. Eritrosit, lökosit, makrofaj ve fibroblastlar dahil birçok hücre için toksik özellik gösterir. Beta toksin ve alfa toksinin beraberce, stafilokoksik hastalıklarda karakteristik olan doku yıkımı ve abse oluşumundan sorumlu olduğu düşünülmektedir (Bannerman, 2003; Forbes, 2007).

#### 1.1.2.2.6.3. Gamma Toksin

Gama toksin ( $\gamma$ -hemolizin) moleküler ağırlıkları 32 ile 35 kDa arasında değişen üç ayrı proteinden oluşmaktadır. Bu proteinlerden birisi, molekül ağırlığı 32 ve 34 kDa olan PVL proteinleriyle birleşerek, PVL toksinini oluşturur. İnsan, koyun, tavşan gibi farklı türlerin eritrositlerini ve ayrıca insan lenfoblastik hücrelerini parçalayabilme yeteneğine sahiptir. Belirgin hemolitik aktivitesi olmasına rağmen etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir (Bannerman, 2003; Forbes, 2007).

#### 1.1.2.2.6.4. Delta Toksin

Delta toksin ( $\delta$ -hemolizin), molekül ağırlığı 3 kDa olan termostabil bir proteindir. *S. aureus* suşlarının %97'si ve KNS'ların %50-70'i bu enzimi sentezler. Geniş bir sitolitik aktivite spektrumuna sahiptir. Hücre membranını deterjan benzeri bir etkiyle parçaladığı düşünülmektedir. Aynı zamanda adenilat siklazı aktive ederek siklik adenozin monofosfat (cAMP) salınımına neden olur. Bu enzimatik aktivite stafilokoksik toksik şok sendromunda ve stafilokoksik besin zehirlenmelerinde görülen ishalin patogeneğinde rol oynar (Bannerman, 2003; Forbes, 2007).

#### 1.1.2.2.6.5. Lökosidin

*S. aureus* tarafından salgılanan toksin sadece granülosit ve makrofajların üzerinde litik etkiye sahiptir. Elektroforetik olarak birbirinden ayrılan F (Fast) ve S (Slow) olmak üzere iki bileşenden oluşmuştur. Bu bileşenlerden her biri iyi antijenik özelliğe sahiptir ve toksoid oluştururlar. Bileşenlerden hiçbiri tek başına lökosit membranında toksik etkiye neden olmaz. Ancak iki molekülün kombinasyonu hücre membranında yapısal değişikliğe, por oluşumuna ve özellikle potasyum ve diğer katyonlara karşı permeabilite artışına yol açarak degranülasyona neden olur. Lökosidin üreten bakteriler fagositoza karşı artmış bir direnç gösterirler (Lina, 1999; Gillet, 2002; Koneman, 2006).

*S. aureus*'un PVL,  $\gamma$ -hemolizin, LukE ve LukD gibi toksinleri konak hücre zarı üzerinde sinerjik etki gösterirler. Bu toksinlere sinergohimenotropik toksinler denir. İnvitro ve invivo şartlarda tek doz enjeksiyonla geriye dönüşümlü lökopeni oluşur ve 60 dakika içinde membranlara hasar verici etki mikroskopik olarak görülebilir hale gelir (Lina, 1999; Gillet, 2002; Koneman, 2006).

#### 1.1.2.2.6.6. Eksfoliyatif Toksin

Eksfoliatin veya epidermolitik toksin olarak da bilinen eksfoliyatif toksin, ciltte yaygın büller ve cildin soyulmasıyla karakterize bir klinik tablo olan stafilokoksik haşlanmış deri sendromu (staphylococcal scalded skin syndrome; SSSS)'na yol açar. SSSS en sık bebeklerde ve küçük çocuklarda görülürken, büyük çocuklarda ve erişkinlerde son derece nadirdir. Bunun nedeni muhtemelen koruyucu antikorların varlığı veya erişkin cildinin toksine karşı duyarsızlığıdır. Hastalık ateş, ciltte hassasiyet ve kızıl tipi döküntülerle seyreder. Ardından, oluşan geniş büller parçalanır ve cilt tabakaları ayrılır. Cildin sağlam görülen bölgeleri hafif bir sürtünmeyle soyularak aşınmış bölgeler ortaya çıkar (Nikolsky bulgusu).

Eksfoliyatif toksinin ET-A ve ET-B olmak üzere iki farklı şekli tanımlanmıştır. Her ikisinin de molekül ağırlıkları 23 kDa ve biyolojik aktiviteleri aynı olsa da,

antijenik ve biyokimyasal özellikleri bakımından farklılık gösterirler. ET-A ısıya dirençli, ET-B ise ısıya duyarlıdır. ET-A kromozomal genlerde kodlanırken, ET-B sentezi plazmid genlerinin kontrolü altındadır. Bu toksinler cildin epidermis tabakasının matriksindeki mukopolisakkaritlerini hidrolize ederek granüler kattaki hücreleri birbirinden ayırır, fakat primer olarak hücre ölümüne sebep olmaz (Plano, 2004; Koneman, 2006).

#### **1.1.2.2.6.7. TŞST-1**

Toksik şok sendromu (TŞS); ateş, hipotansiyon, döküntüler ve çok sayıda organ tutulumu ile karakterize, TŞST-1'in yol açtığı bir hastalıktır. TŞST-1 *tet* geni tarafından kodlanır ve TŞS'nun yanısıra, stafilokoksik kızıl hastalığından da sorumludur. Daha önceleri pirojenik ekzotoksin C ve enterotoksin F olarak da isimlendirilen TŞST-1, birçok *S. aureus* suşları tarafından salınan bir ekzotoksindir. TŞST-1, 22 kDa'luk molekül ağırlığına sahip bir süperantijendir. T lenfosit proliferasyonu ve monositlerden İL-1 salımını uyarır. Isıya ve proteolitik enzimlere karşı dirençlidir. TŞST-1'in *S. aureus* dışındaki türlerde varlığı halen tartışma konusudur. Ancak, KNS'ların ve A grubu streptokokların da TŞS'una yol açabildikleri bilinmektedir (Iwatsuki, 2006; Koneman, 2006; Tristan, 2007).

#### **1.1.2.2.6.8. Enterotoksinler**

*S. aureus* suşlarının yaklaşık üçte biri çeşitli enterotoksinler üretir. Enterotoksinler düşük molekül ağırlığına sahip (26-34 kDa), basit zincir şeklinde, ısıya dirençli proteinlerdir. Gastrointestinal enzimler tarafından hidrolize karşı dirençlidirler ve 100C°'de 30 dk. ısıtmaya dayanabilirler. Bu nedenle enterotoksin üreten stafilokoklar besin ürünlerini kontamine eder ve toksinlerini salgılayarak, yiyeceğin yeniden ısıtılması koruyucu olmaz (Koneman, 2006).

Serolojik olarak farklı çok sayıda stafilokoksik enterotoksin tanımlanmıştır (A, B, C, D, E, H ve I). Bu toksinler *S. aureus* suşlarının yanısıra, *S. epidermidis*

suşlarında da bulunabilir. En sık saptanan enterotoksin A'dır. Enterotoksin C ve D genellikle kontamine süt ürünlerinden kaynaklanır, enterotoksin B ise stafilokoksik psödomembranöz enterokolit ile ilişkilidir. Bu toksinlerin besinlerle alınması, gastrointestinal bulgularla seyreden besin zehirlenmesi tablosuna yol açar. Enterotoksinin alınmasından 2-8 saat sonra bulantı, kusma ve bazen ishal başlar ve bulgular genellikle 24-48 saat içinde kendiliğinden geçer. Enterotoksinlerin aynı zamanda merkezi sinir sistemine de etkileri vardır (Koneman, 2006).

#### **1.1.2.2.7. Süperantijenler (SAGs)**

Süperantijenler belirli T hücre antijen reseptörlerinin beta zincirinin değişken bölgesine ( $V_{\beta}$ ) direkt olarak bağlanır ve bu reseptörleri, antijen sunucu hücrelerdeki MHC (major histokompatibilite kompleks) sınıf II molekülleri ile köprü oluşturarak, non-spesifik olarak birleştirir. Sonuç olarak antijenin, antijen sunucu hücreler tarafından işlenmesi ve sunulması gerekmeksizin, uygun  $V_{\beta}$  gen ürününü taşıyan tüm T hücreleri aktive olur. Normal şartlarda bir antijen makrofaj yüzeyinde MHC II ile kompleks oluşturmuş halde eksprese edildiğinde, sadece kendisi için özgül T hücrelerini uyarırken, süperantijenler, çok az miktarlarda bile özgül olmayan T hücrelerine bağlanarak aşırı miktarda sitokin salımına neden olur. *S. aureus* türleri tarafından sentezlenen piyojenik toksinler, başta SEA ve SEB olmak üzere stafilokoksik enterotoksinler, TŞST-1, ET-A, ET-B ve ET-D süperantijen olarak fonksiyon gösterir ve gıda zehirlenmelerine, TŞS ve SSSS hastalıklarına yol açarlar (Plano, 2004; Iwatsuki, 2006; Koneman, 2006).

#### **1.1.2.3. *S. aureus* Enfeksiyonları**

*S. aureus*'ların oluşturdukları hastalıklar toksikojenik (toksik şok sendromu, besin zehirlenmesi, haşlanmış deri sendromu, vb.) ve piyojenik (impetigo, follikülit, fronkül, karbonkül, sellülit, blefarit, mastit, cerrahi yara enfeksiyonları, endokardit, priardit, osteomyelit, septik artrit, piyomyozit, sepsis, pnömoni, idrar yolu

enfeksiyonları, metastatik abseler, intraabdominal enfeksiyonlar santral sinir sistemi enfeksiyonları, menenjit, vb.) olmak üzere iki grupta incelenebilir. İnvaziv stafilokok enfeksiyonları mikroorganizmanın kolonizasyonu ile başlar. Cilt ve müköz membran gibi bariyer sistemlerinin bozulması, invazyona zemin hazırlar. Bazen bakteriyemi gelişebilir ve olguların bir kısmında primer enfeksiyon odağı belirlenemeyebilir. Bazen de birden fazla metastatik abse odakları gelişir. Venlerdeki enfeksiyon odaklarından (septik tromboflebit gibi) akciğerlere yayılım ve metastatik abse oluşumu, *S. aureus* bakteriyemisinin önemli özelliklerinden birisidir. *S. aureus* enfekte damar içi kateter, fronkül gibi primer enfeksiyon odağından kalp kapağına, kemik, eklem, böbrek ve diğer retroperitoneal organlara, karaciğer, beyin ve meninkslere yayılabilir. Vertebra osteomyeliti ve endokardit en sık görülen metastatik komplikasyondur. *S. aureus* bakteriyemisine bağlı komplikasyon oranı %0-38 arasında değişmektedir. *S. aureus* bakteriyemisine bağlı endokardit görülme sıklığı %1,7-18, vertebra osteomyeliti görülme sıklığı ise %6-34 arasında değişmektedir (Bannerman, 2003; Koneman, 2006; Brooks, 2007).

#### **1.1.2.4. *S. aureus*'un Epidemiyolojik Özellikleri**

Metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) da dahil olmak üzere, *S. aureus*'ların ortak kaynağı insandır. Ancak nadir de olsa, enfeksiyon zincirinde diğer hayvanların da rolü vardır. *S. aureus* insanlarda başta burun ve nazofarenks olmak üzere üst solunum yollarında ve ciltte, daha nadir olarak da vajen, rektum ve perineal bölgelerde yerleşerek vücut florasının geçici veya kalıcı bir üyesi olarak bulunabilir. Yenidoğanlarda umbilikal kökte *S. aureus* kolonizasyonu yaygındır. Cilt yüzeyinde ve nazofarinksde taşındığından dolayı bakterinin yayılımı kolaydır ve bu nedenle birçok hastane kaynaklı enfeksiyondan sorumludur. Bu bölgelerdeki bakteriler insandan insana genellikle kontamine aerosoller veya direkt temas yoluyla bulaşabilir. Pürülan drenajı olan hastalar en önemli bulaş kaynaklarıdır (Eriksen, 1994; Wertheim, 2005).

Nazal taşıyıcılığın stafilokok enfeksiyonlarının gelişimindeki rolü uzun süredir bilinmektedir. Nazal *S. aureus* taşıyıcılığının hem toplumda hem de hastanelerde

sporadik enfeksiyonların ve epidemilerin gelişmesinde önemli rol oynadığını bilinmektedir. Sağlıklı bireylerde mevsimsel ve lokal epidemiyolojik faktörlere bağlı olarak %20-40 arasında değişen taşıyıcılık oranları, hastane çalışanlarında %40-50'ye kadar çıkabilmektedir (Eriksen, 1994; Wertheim, 2005).

Taşıyıcılık beyaz ırkta, erkeklerde ve yaşlılarda daha yaygındır. Erişkin kadınlarda vajinal taşıyıcılık oranı diğer yaş gruplarına göre artış göstermektedir. Yine; diyabetiklerde, böbrek yetmezliği olanlarda, hemodiyaliz ve periton diyalizi uygulanan hastalarda, kronik karaciğer hastalığı bulunanlarda, insan immünyetmezlik virusu (HIV) ile enfekte kişilerde, *S. aureus*'a bağlı lokal cilt enfeksiyonu bulunanlarda, ekzema ve psöriazis gibi cilt hastalığı olanlarda, şişmanlarda ve serebrovasküler hastalığı bulunanlarda *S. aureus* taşıyıcılığı daha yüksek oranlarda saptanmaktadır (Eriksen, 1994; Wertheim, 2005).

#### **1.1.2.5. *S. aureus* Enfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısı**

##### **1.1.2.5.1. Mikroskopi**

Stafilokoklar katı besiyerlerinde ürediklerinde üzüm salkımına benzer kümeler oluşturan, gram pozitif koklardır. Ancak, klinik materyal mikroskopik olarak incelendiğinde genellikle tek tek hücreler veya küçük gruplar şeklinde görülürler. Klinik materyalde organizmayı tespit etmek enfeksiyonun tipine ve örneklemeye bağlıdır. Abse materyali incelenirken lezyonun tabanı bir eküvyon veya küret ile kazanmalıdır. Aspire edilen cerahat primer olarak nekrotik materyal içerirken, az sayıda mikroorganizma bulunur. Bakteriyemili hastaların kanında genellikle az sayıda organizma mevcuttur (ortalama 1 organizma/ml'den az). Bu nedenle tanı amacıyla kanın gram boyaması güvenilir değildir. SSSS olan hastaların nazofarinksinde ve TŞS olanların vajeninde *S. aureus*'lar bulunur, fakat bunları bu bölgede normal şartlarda kolonize olanlardan, mikroskopik olarak ayırd etmek mümkün değildir (Bannerman, 2003; Koneman, 2006; Forbes, 2007).

##### **1.1.2.5.2. Kültür**

Klinik materyal zenginleştirilmiş, koyun kanı içeren ortamlara ekilmelidir. Karışık organizmalar içeren materyalden *S. aureus*'u selektif olarak izole etmek ve ayırd etmek için %7,5 NaCl (çoğu diğer organizmalar için inhibitördür) ve mannitol (*S. aureus* mannitolü fermente eder) içeren ortama ekim yapılabilir. Stafilokoklar non-selektif ortamlarda, hem aerob hem de anaerob şartlarda süratle üreyerek, 24 saatte büyük S tipi koloniler oluştururlar. Karotenoidlerin yol açtığı sarı pigmentasyon *S. aureus* kolonilerinde sık görülür (özellikle oda ısısında inkübe edildiğinde). Hemen tüm *S. aureus* suşları ve bazı nadir KNS suşları sitolitik toksinleri ile kanlı agarda hemolize yol açar (Bannerman, 2003; Koneman, 2006; Forbes, 2007).

#### 1.1.2.5.3. Seroloji

Stafilokok antijenlerini kanda veya klinik materyalde tespit etme girişimleri genellikle başarısız kalmıştır. Ne var ki hücre duvarı teikoik asidlerine karşı antikorlar, uzun süreli *S. aureus* enfeksiyonu bulunan birçok hastada mevcuttur (ör. endokardit, osteomyelit). Antikorlar hastalık başlamasını takiben 2 hafta içerisinde oluşur ve stafilokoksik endokarditi bulunan hastaların çoğunda pozitifdir. Antikor tespiti stafilokoksik osteomyelit olgularının tanısında daha az güvenilirdir, çünkü enfeksiyon odağı daha lokalizedir ve organizmalar sistemik hümoral immün cevabı stimüle etmeyebilir. Bakteriyemik hastalarda yükselmiş antikor titreleri bulunması uzun bir antimikrobik tedavi süresi gerektirir. Ancak, negatif seroloji hastalık ihtimalini ortadan kaldırmaz, çünkü testin duyarlılığı düşüktür (Wertheim, 2005).

#### 1.1.2.5.4. İdentifikasyon

*S. aureus*; mikroskopik morfolojisi, koloni morfolojisi ve biyokimyasal özellikleri ile diğer gram pozitif koklardan ve diğer stafilokoklardan kolayca ayrılabilir. Epidemiyolojik amaçlarla tür içi identifikasyon için stafilokokların antibiyotik duyarlılık paternleri (antibiyoqram), biyokimyasal profilleri (biyotiplendirme),

bakteriyofajlara karşı duyarlılıkları (faj tiplendirimi) incelenebilir veya nükleik asit analizi yapılabilir (Bannerman, 2003; Koneman, 2006; Forbes, 2007).

Katalaz testi, stafilokokların streptokoklardan ayırımında kullanılan önemli bir testtir. Stafilokokların dahil olduğu *Micrococcaceae* ailesi katalaz pozitifken, streptokoklar katalaz negatif özellik gösterirler. Koagülaz testi, *S. aureus*'un diğer *Stapylococcus* türlerinden ayırımında kullanılır. *S. aureus* koagülaz pozitif özellik gösterirken, enfeksiyon etkeni olarak sıklıkla karşımıza çıkan *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus* koagülaz negatif reaksiyon gösterirler. Termonükleaz testi, DNA'yı hidrolize eden deoksiribonükleaz enziminin varlığını tespit etmek amacıyla yapılır. *Stapylococcus* türleri glukozu ve mannitolü hem aerobik hem de anaerobik ortamda fermente eder. Bu şekerlerin anaerobik fermentasyonunu göstermek için, brain heart infusion (BHI) kültüründen öze ile alınan bir miktar bakteri, %0,5 glukoz ve %0,5 mannitol içeren iki ayrı karbohidrat fermentasyon ortamına inoküle edilir. Besiyerlerinin yüzeyi en az 25 mm kalınlığında olacak şekilde steril sıvı parafin ile kaplanır ve 5 gün süreyle 37C°de inkübe edilir. İnkübasyon süresinin sonunda, tüplerde anaerobik koşullarda asit oluşumuna bağlı olarak sarı rengin oluşması, *S. aureus* varlığını gösterir (Bannerman, 2003; Koneman, 2006; Forbes, 2007).

*S. aureus*'un hızlı idantifikasyonu amacıyla latex aglutinasyonu, RiboPrinter (Qualicon) mikrobiyal tanı sistemi ve toksin testleri kullanılmaktadır. RiboPrinter (Qualicon) mikrobiyal tanı sistemi ile 24-30 saat içinde *S. aureus* idantifikasyonu yapılabilmektedir. Bu sistem temel olarak genetik parmak izi yöntemini kullanmaktadır. “*E. coli* bakteri kesim enzimi” EcoRI kesim enzimi ile kesilen kromozomal DNA fragmanları boyutlarına göre ayrılıp işaretli rRNA operon problemleri ile hibridize edilir. *S. aureus*'un bilgisayar ortamında kayıtlı 252 referans moleküler büyüklük belirteci fragmanı, izolattan elde edilen fragman ile karşılaştırılarak izolatın *S. aureus* olup olmadığı tespit edilir (Bannerman, 2003; Koneman, 2006; Forbes, 2007).

### 1.1.2.6. *S. aureus* Suşlarında Antimikrobiyal Direnç

Penisilin 1928 yılında Alexander Fleming tarafından keşfedilmiş, 1940 yılında klinik kullanıma girmesiyle, stafilokoksik enfeksiyonların tedavisinde başarıyla kullanılmaya başlanmıştır. 1944 yılında *S. aureus*'ların %94'ü penisiline karşı duyarlıyken, penisilnaz genlerinin bakteriler arasında yayılması sonucu 1950'li yıllarda hızla direnç gelişmeye başlamıştır. 1960'dan itibaren penisilinaza dirençli penisilinler (oksasilin, nafsilin, metisilin, dikloksasilin ve kloksasilin) kullanılmaya başlanmış ve direnç sorunu geçici olarak ortadan kaldırılmıştır. Ancak bir yıl sonra MRSA suşları ortaya çıkmıştır. Bu suşlar çoğu zaman çoklu antibiyotik direnci göstermektedir. 1970'li yıllardan itibaren MRSA suşları, yaygın olarak kullanılan birçok antimikrobiyal ajanlara ( $\beta$ -laktam antibiyotiklerin yanı sıra kinolonlar, klindamisin, makrolid grubu antibiyotikler, kloramfenikol, tetrasiklinler, aminoglikozidler, trimetoprim/sulfametoksazol, rifampisin) karşı dirençli hale gelmeye başlamıştır (Çokça, 1998; Chang, 2003; Lowy, 2003; Delialioğlu, 2005; Wikler, 2007; Janapatla, 2007).

Glikopeptitlerin ilk temsilcisi olan vankomisin 1956 yılında kullanıma girmiş ve uzun yıllar dirençli suşların neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde başarıyla kullanılmıştır. Ancak, ilk kez 1997 yılında Japonya'dan, vankomisine ve teikoplanine orta düzeyde dirençli bir *S. aureus* (VISA) suşu bildirilmiştir. "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)", VISA için vankomisin minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değerlerini litrede 8-16 mg olarak tanımlamıştır (Wikler, 2007; Janapatla, 2007). VISA suşlarının standart disk diffüzyon, broth mikrodilüsyon, agar dilüsyon ve E-test yöntemiyle tespit edilebileceği kabul edilmiştir. ABD'nde, *vanA* geni içeren ilk vankomisin dirençli *S. aureus* (VRSA) suşu 2002 yılında bildirilmiştir. Makrolid, linkozamid, streptogramin (MLS) türevi antimikrobiyaller, makrosiklik lakton halkasından ibaret ortak bir yapıya ve benzer etki mekanizmalarına sahip oldukları için, aynı grupta incelenirler ve MLS grubu olarak isimlendirilirler. Bu grup antimikrobiyaller bakteri ribozomunun 50 S alt birimine bağlanarak, protein sentezinin elangasyon safhasında peptidil tRNA molekülünün ribozomdan ayrılmasını indükler ve bakteriyel protein sentezini inhibe ederler. Eritromisinin klinik kullanıma girmesinden bir yıl sonra ABD, Japonya ve

Avrupa'dan eritromisine karşı direnç bildirilmiştir (Çokça, 1998; Chang, 2003; Lowy, 2003; Delialioğlu, 2005; Wikler, 2007; Janapatla, 2007).

### **1.1.2.7. Metisilin Dirençli *S. aureus* (MRSA)**

Stafilokoklarda metisilin direnci ilk kez 1961'de, metisilin klinik kullanıma girmesinden kısa süre sonra İngiltere'de bildirilmiştir. Hemen ardından Japonya, Avrupa, Avustralya'ya yayılmış ve Amerika Birleşik Devletlerinde (ABD) ilk dirençli olgu 1968'de bildirilmiştir. 1970'lerin sonunda MRSA suşları klindamisin, makrolidler, kloramfenikol, tetrasiklin, rifampisin, aminoglikozidler gibi çok sayıda antibakteriyel ajana karşı direnç kazanmaya başlamıştır. 1980'li yıllardan sonra MRSA suşları tüm dünyada hastane enfeksiyonu etkenleri arasında ilk sıralardaki yerini almıştır. MRSA'lar önceleri önemli bir nozokomiyal patojen olarak kabul edilmekteyken, takip eden yıllarda, toplumda MRSA enfeksiyonlarının görülme sıklığındaki artış dikkat çekmiştir. Bugün, hastane kaynaklı *S. aureus*'ların yaklaşık %40'ında, toplum kaynaklı *S. aureus*'ların ise yaklaşık %8-20'sinde metisilin direnci saptanmaktadır (Shukla, 2005).

#### **1.1.2.7.1. Stafilokoklarda Metisilin Direnci Mekanizmaları**

Metisiline karşı direnç gelişimi üç şekilde olmaktadır:

1) İntrensek (kromozomal) metisilin direnci: Bu tip direnç en sık rastlanan dirençtir ve yeni bir penisilin bağlayan protein (PBP2a) sentezi ile oluşur. PBP'ler bakteri hücre membranında bulunan  $\beta$ -laktam antibiyotiklerin bağlandığı hedef proteinlerdir. Bu proteinler bakteriyel hücre duvarının sentezi sırasında peptidoglikan ağın birleşmesinde terminal çapraz bağlanma reaksiyonunu katalizleyen enzimlerdir. Hücre duvarı inhibitörleri de bu proteinlere bağlanarak bakteriyel hücre duvarı sentezini bozarlar. PBP2a'nın  $\beta$ -laktam antibiyotiklere afinitesi diğer PBP'lerden (PBP1, PBP2, PBP2a, PBP3, PBP4) daha düşüktür. Bu nedenle antibiyotik bakteriye

yeteri kadar bağlanamaz ve etkinliği azalır (Ünal, 1996; Lowy, 2003; Chongtrakool, 2006).

Molekül ağırlığı 78 kDa olan PBP2a, 2,1 kb'lık DNA segmentine lokalize olan *mecA* geni tarafından kodlanmaktadır. Bu gen indüklenabilir bir genidir ve transdüksiyon yoluyla dirençli suşlardan duyarlı suşlara aktarılabilir. Bakteride metisilin direncinin ortaya çıkabilmesi için *mecA* geninin eksprese olması gerekir. Ancak bu ekspresyon her bakteride aynı şekilde olmamaktadır. Bu nedenle *mecA* geni taşıdığı halde metisiline değişik düzeylerde dirençli, hatta duyarlı *S. aureus* suşları bildirilmektedir. Metisilin direnci için *mecA* geninin varlığı mutlaka gereklidir, ancak yeterli değildir. MRSA'larda *mecA* geninin ekspresyonunu etkileyerek fenotipi belirleyen bazı regülasyon mekanizmaları vardır. İntrensek metisilin direnci fenotipik olarak homojen veya heterojen direnç olmak üzere iki şekilde görülebilir. Homojen dirençte koloniyi oluşturan tüm bakteriler *mecA* genini taşırlar. Hepsinde *mecA* geni eksprese olmuştur ve yüksek düzeyde direnç gelişimine yol açar. Direnç gelişimi, ortamın pH'sı, sıcaklığı, tuz konsantrasyonu, inkübasyon süresi gibi çevresel faktörlerden etkilenmez. Ancak klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında izole edilen stafilokokların az bir kısmında homojen metisilin direnci görülmektedir (Ünal, 1996; Lowy, 2003; Chongtrakool, 2006).

Heterojen direnç, klinik uygulamada daha sık görülen, ancak çevre koşullarından etkilenmesi nedeniyle tespit edilmesi güç olan direnç tipidir. Bu tip dirençte, koloni oluşturan tüm bakteriler *mecA* geni taşımalarına rağmen, direnç ancak  $10^6$  yada  $10^8$  bakteriden birinde tespit edilebilmektedir. Bu durum muhtemelen *mecA* geninin fonksiyonunu kontrol ettiği düşünülen "metisilin direncinin ekspresyonu için esansiyel faktör (*femA*)", faktör X veya *mecR*, *mecI* gibi kontrol genlerine bağlı olarak ortaya çıkmaktadır (Ünal, 1996; Lowy, 2003; Chongtrakool, 2006).

2) Beta laktamaz üretimi: Beta laktamaz üretimi metisilin molekülündeki beta laktam halkasını kısmen parçalayarak metisilin direncine yol açar. Beta laktam antibiyotiklerin beta laktamaz inhibitörleri ile kombine edilmesi, bu tür direnç gelişimini engeller (Ünal, 1996; Lowy, 2003).

3) Mevcut PBP'lerde beta laktam antibiyotik afinitesinde azalma: Son yıllarda beta laktamaz sentezlemeyen, ayrıca *mecA* geni de taşımadıkları halde metisiline dirençli stafilokoklar tespit edilmiştir. Çok az sayıdaki bu izolatlar incelendiğinde, bu bakterilerin mevcut PBP'lerinin  $\beta$ -laktam antibiyotiklere karşı düşük afinite gösterdikleri tespit edilmiştir (Ünal, 1996; Lowy, 2003; Chongtrakool, 2006; Kılıç, 2008).

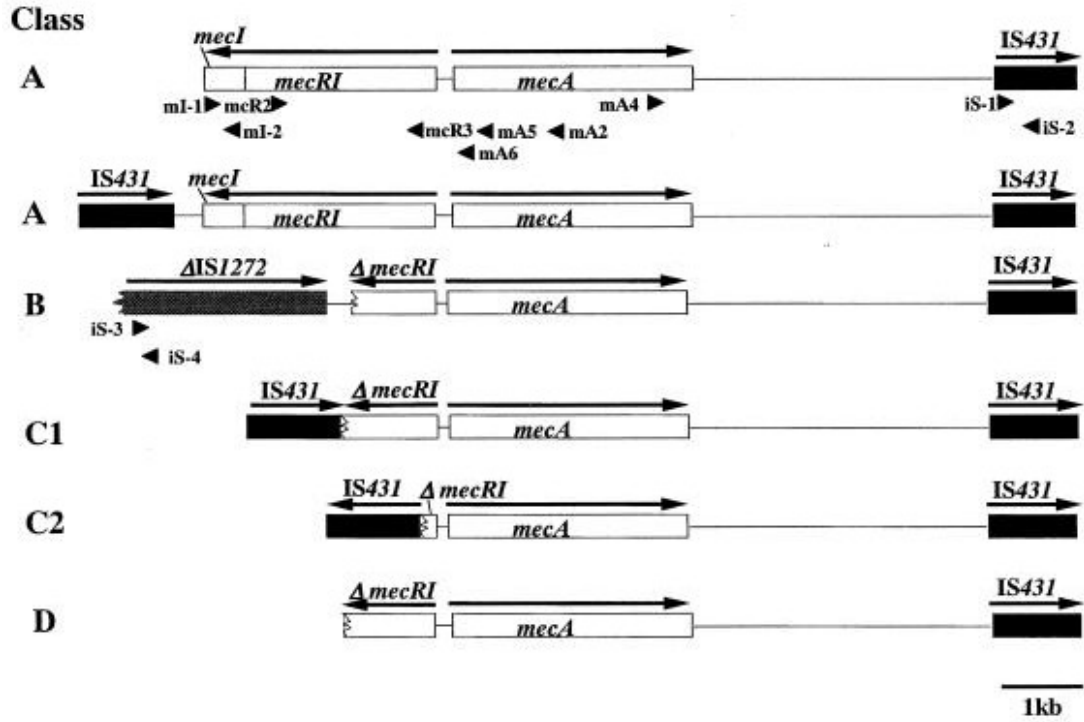
#### 1.1.2.7.2. Metisilin Dirençli *S. aureus*'un Genom Yapısı

*S. aureus*'un DNA'sındaki G+C içeriği %32,8-32,9 mol ve kromozom uzunluğu 2810-2880 kb olarak saptanmıştır. *S. aureus*'un kromozomal DNA'sı genetik altyapı ve genomik adalar olmak üzere iki kategoride incelenmektedir (Chongtrakool, 2006; Kılıç, 2008).

PBP2a (PBP2') sentezleyen tüm MRSA ve metisilin dirençli koagülaz negatif stafilokoklar (MR-KNS),  $\beta$ -laktam antibiyotiklere karşı dirençlidir. PBP2a sentezi *mecA* geni tarafından kontrol edilir. *mecA* genin ekspresyonu *mecRI* ve *mecI* genleri tarafından düzenlenir. *mecA* geni ve regülatörleri, bir genomik ada olan ve "stafilokoksik kaset kromozom *mec* (SCC*mec*)" olarak isimlendirilen, 21-67 kb uzunluğundaki mobil DNA parçaları üzerinde taşınır. SCC*mec*, virulans ve metisilin direncinin *Staphylococcus* türleri arasında genomik aktarılmasından sorumludur. SCC*mec* kasetinin kökeni hala kesin olarak bilinmemekle birlikte,  $\beta$ -laktam antibiyotiklere karşı duyarlı *Staphylococcus sciuri* suşlarında PBP'ler ile MRSA'lardaki PBP2a arasında % 87,8 oranındaki homoloji bulunması, kökenin bu bakteri olduğunu düşündürmektedir. SCC*mec*, *S. aureus* kromozomlarının replikasyon bölgesindeki *attB*SCC olarak isimlendirilen bölgede *orfX* geni ile birleşmiş olarak bulunmaktadır (Chongtrakool, 2006; Kılıç, 2008).

### 1.1.2.7.2.1. SCCmec Yapısı

*S. aureus*'un SCCmec yapısı, *mec* geni kompleksi, kaset kromozom rekombinaz (*ccr*) gen kompleksi ve J (junkyard) olmak üzere üç elementten oluşur. SCCmec, *mec* ve *ccr* gen komplekslerine göre tiplere ve J bölgelerindeki farklılıklara göre alt tiplere ayrılır. SCCmec elementleri, faj transdüksiyonu veya diğer genetik transfer sistemleri ile taşınabilmektedir. *S. aureus*'lardaki esas genetik yapı tipine göre şu ana kadar altı farklı SCCmec gen kaseti tanımlanmıştır. *ccr* gen kompleks bölgesi SCCmec gen kaset bölgesinin mobilitesinden, yani *S. aureus*'un kromozomuna girip çıkmasından sorumludur. Amino asit tipine göre *ccrA* ve *ccrB* olmak üzere iki tipi ve her bir tip için dört farklı allotipi (*ccrA* için *ccrA1*, *ccrA2*, *ccrA3* ve *ccrA4*; *ccrB* için *ccrB1*, *ccrB2*, *ccrB3* ve *ccrB4*) bulunmaktayken son zamanlarda *ccrC* olmak üzere üçüncü bir tip bildirilmiştir. *ccrA* ve *ccrB* tip I, II, III, IV ve VI SCCmec gen kaset yapısında bulunurken, *ccrC* sadece tip V SCCmec gen kaset bölgesinde bulunmaktadır. SCCmec gen kaset yapısında bulunan ikinci oluşum *mec* kompleksidir. *mec* geni kompleksi IS431*mec*, *mecA* ve regülatör genler olan *mecR1* ve *mecI*'nin bütünü veya bir parçasını taşımaktadır. Bu da 5 farklı sınıfa ayrılmaktadır (sınıf A, IS431-*mecA*-*mecR1*-*mecI*; sınıf B, IS431-*mecA*- $\Delta$ *mecR1*-IS1272; sınıf C, IS431-*mecA*- $\Delta$ *mecR1*-IS431; sınıf D, IS431-*mecA*-*mecR1* ve; sınıf E, IS431-*mecA*- $\Delta$ *mecR1*). *mec* geni kompleksinin sınıflandırılması şekil 1.4'te gösterilmiştir (Chongtrakool, 2006; Kılıç, 2008).

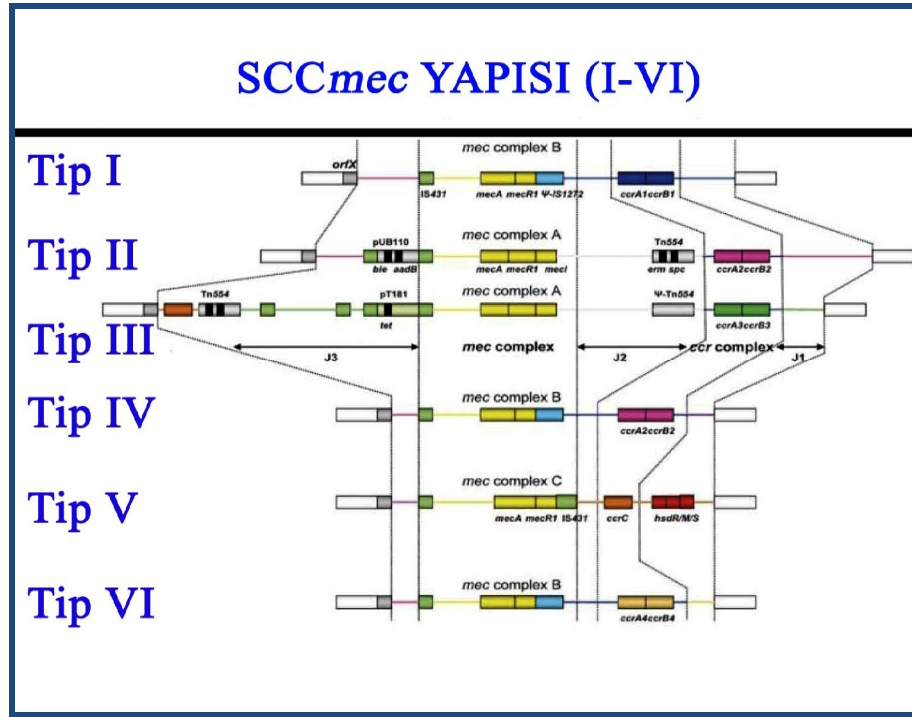


Şekil 1.4. *mec* geni kompleksinin sınıflandırılması (Katayama, 2001)

SCC*mec* gen kaset bölgesinin diğer kısımları J bölgesi; J1, J2 ve J3 olarak bilinmektedir. Bu bölge özellikle SCC*mec* gen kaset tiplerinin alt tiplendirilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Bakteri hücresi için gerekli veya yararlı ürünler içermemektedir. Sadece  $\beta$ -laktam dışındaki antibiyotiklerin direnç genlerini ve ağır metallerin direnç genlerini içermektedir. J1 kromozomun sağ birleşme bölgesi ile *ccr* kompleks arasında, J2 *mec* kompleks ile *ccr* kompleks arasında, J3 ise *mec* kompleks ile sol birleşme bölgesinde bulunmaktadır. Bu yüzden SCC*mec* kaset gen yapısı J3-*mec*-J2-*ccr*-J1 olarak özetlenebilir. Çizelge 1.2 ve şekil 1.5'te SCC*mec* tiplerinin sahip oldukları yapılar görülmektedir (Katayama, 2001; Chongtrakool, 2006; Kılıç, 2008).

Çizelge 1.2. *ccr* ve *mec* taşıyan SCC*mec* kaset gen tipleri

SCC <i>mec</i> tipi	<i>ccr</i> gen kompleksi	<i>mec</i> gen kompleksi
Tip I	Tip-1 <i>ccrA1</i> ve <i>B1</i>	Sınıf B <i>mec</i> (1B)
Tip II	Tip-2 <i>ccrA2</i> ve <i>B2</i>	Sınıf A <i>mec</i> (2A)
Tip III	Tip-3 <i>ccrA3</i> ve <i>B3</i>	Sınıf A <i>mec</i> (3A)
Tip IV	Tip-2 <i>ccrA2</i> ve <i>B2</i>	Sınıf B <i>mec</i> (2B)
Tip V	Tip-5 <i>ccrC</i>	Sınıf C <i>mec</i> (5C)
Tip VI	Tip-4 <i>ccrA4</i> ve <i>B4</i>	Sınıf B <i>mec</i> (4B)



Şekil 1.5. SCC<sub>mec</sub> kaset gen tiplerinin yapısal görüntüsü (Kılıç, 2008)

#### 1.1.2.7.2.2. SCC<sub>mec</sub> Tipleri

Tip I SCC<sub>mec</sub>, sınıf B *mec* gen kompleksi ve tip I *ccr* gen kompleksinden oluşmaktadır. 1961 yılında izole edilen en eski MRSA suşunda bulunmuştur. Tip I SCC<sub>mec</sub>'in J bölgesi bir yüzey proteinini kodlayan *pls* genini içermektedir. Bu gen fibronektine bakteriyel aderansı etkilemektedir. Bu fonksiyon *S. aureus* enfeksiyonunun başlamasında önemlidir. Tip I SCC<sub>mec</sub>, *mecA* haricinde herhangi bir antibiyotik direnç geni taşımamaktadır. Tip II SCC<sub>mec</sub>, sınıf A *mec* gen kompleksi ve tip II *ccr* gen kompleksinden oluşmaktadır. J bölgesinde pUB110 plazmidi ve Tn554 transpozonu bulunmaktadır. Tip III SCC<sub>mec</sub>, sınıf A *mec* gen kompleksi ve tip III *ccr* gen kompleksinden oluşmaktadır. pT181 plazmidi, Tn554 transpozonu ve pseudo Tn554 taşımaktadır. Taşıdıkları Tn554 transpozonu iMLS<sub>B</sub> direncinden sorumluyken; pT181 plazmidi tetrasiklinlere karşı dirençten sorumludur. SCC<sub>mec</sub> tip II ve III MRSA suşlarının önemli bir özelliği, çoklu ilaç direncine yol açmaları ve özellikle hastane ortamında sık bulunmalarıdır. Tip II ve III SCC<sub>mec</sub> kaset gen tipleri, direnç genlerinin bulunduğu geniş J (J1, J2, ve J3) bölgelerine sahiptirler. Bu

tipler taşıdıkları direnç genleri sayesinde aminoglikozidler, makrolidler, tetrasiklin gibi çeşitli antibiyotiklere ve kadmiyum, civa gibi ağır metallere karşı dirençli hale gelirler. Tip IV SCC*mec*, sınıf B *mec* gen kompleksi ve tip II *ccr* gen kompleksi içermektedir. Tip IVa ve IVb, *mecA* geni dışında herhangi bir direnç geni taşımamaktadır, zira J1 bölgesi diğer SCC*mec* tiplerine göre oldukça küçüktür, J2 bölgesi ise bulunmamaktadır (Çizelge 1.3) (Hiramatsu, 2001; Hiramatsu, 2002; Chongtrakool, 2006; kılıç, 2008).

Çizelge 1.3. SCC*mec* gen kaset tiplerinin özellikleri

Özellikler	Tip 1	Tip 2	Tip 3	Tip 4	Tip 5
<b>Uzunluk</b>	32-34 kb	52-53 kb	67 kb	21-24 kb	24 kb
<i>mecA</i> +	+	+	+	+	+
<i>mecR1-mecI</i>	Delesyon	+	+	Delesyon	+
<i>ccrA-ccrB</i>	+	+	+	+	-
<i>ccr</i> tipi 1B	2A	3A	2B	-	-
Tobramisin-kanamisin direnci (pUB110, <i>aadD</i> )	-	+	-	-	-
Tetrasiklin direnci (pT181, <i>tetK</i> )	-	-	+	-	-
iMLS <sub>B</sub> direnci (Tn554, <i>ermA</i> )	-	+	+	-	-
IS431	1	2	4	1	1
<i>ccrC</i>	-	-	-	-	+

### 1.1.2.7.3. *S. aureus* Suşlarında Metisilin Direncinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Günümüzde metisilin direncinin ortaya konmasında *mecA* geninin moleküler yöntemlerle saptanması altın standart olarak kabul edilmektedir. Ancak, özel yetişmiş personel gerektirmesi ve yüksek maliyeti nedeniyle, uygulama genellikle referans laboratuvarları ile sınırlı kalmaktadır. Bu nedenle klinik laboratuvarlarda *S. aureus* izolatlarında metisilin direncinin saptanması amacıyla çeşitli yöntemler kullanılmaktadır (Wikler, 2007; Sancak, 2007).

#### 1.1.2.7.3.1. Oksasilin Disk Difüzyon Yöntemi

Kimyasal yapısı itibarı ile penisilinazlara dirençli penisilinler içerisinde yüksek dayanıklılığa sahip olması nedeniyle, indikatör antibiyotik olarak sıklıkla oksasilin

kullanılır. Bu yöntemde MRSA izolatlarının saptanması amacıyla 1 µg oksasilin içeren antibiyogram diskleri kullanılmaktadır. CLSI tarafından belirlenen direnç sınır değerlerine göre inhibisyon zonunun çapı  $\leq 10$  mm olan izolatlar dirençli, 11-12 mm olan izolatlar orta düzeyde duyarlı,  $\geq 13$  mm olan izolatlar ise duyarlı olarak kabul edilmektedir (Wikler, 2007; Sancak, 2007).

#### **1.1.2.7.3.2. Sefoksitin Disk Difüzyon Yöntemi**

Sefalosporinler de son yıllarda, indikatörü metisilin direnç olarak üzerinde çalışılan bir diğer önemli antibiyotik grubunu oluşturmaktadır. Moksalaktam ve sefoksitin diskleri kullanılarak yapılan disk difüzyon testleri, MRSA ayırımında oldukça yüksek duyarlılığa ve özgüllüğe sahiptir. Ayrıca, sefoksitin disk difüzyon yönteminin değerlendirilmesinin, oksasilin disk difüzyon yöntemine göre daha kolay olduğu bildirilmiştir. Bu yöntemde 30 µg sefoksitin içeren antibiyogram diskleri kullanılmaktadır. CLSI tarafından belirlenen direnç sınır değerlerine göre inhibisyon zon çapı  $\leq 21$  mm olan izolatlar dirençli,  $\geq 22$  mm olan izolatlar ise duyarlı olarak kabul edilmektedir (Wikler, 2007).

#### **1.1.2.7.3.3. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi**

Bu yöntemde %2 NaCl içeren Mueller-Hinton sıvı besiyeri kullanılmaktadır. Antibiyotik olarak oksasilin tercih edilmektedir. CLSI tarafından belirlenen direnç sınır değerlerine göre MİK değeri  $\leq 2$  µg/ml olan izolatlar duyarlı,  $\geq 4$  µg/ml olan izolatlar ise dirençli olarak kabul edilmektedir (Wikler, 2007).

#### **1.1.2.7.3.4. “Oksasilin Tuz Tarama Agar” Testi**

CLSI tarafından tanımlanan “oksasilin tuz tarama agar test”, *S. aureus* izolatlarında metisiline karşı direncin belirlenmesinde özgüllüğü ve duyarlılığı oldukça yüksek bir

testtir. Bu amaçla, 6 µg/ml oksasilin ve %4 (w/v) oranında NaCl içeren Mueller Hinton agar kullanılmaktadır. Bu besiyerine mannitol eklenerek, doğrudan klinik örneklerden MRSA selektif olarak izole edilebilir (Wikler, 2007).

#### **1.1.2.7.3.5. E-test Yöntemi**

E-test yöntemi de, mikrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemlerine benzer şekilde test koşullarından etkilenmektedir. %2 NaCl içeren Mueller Hinton agar besiyerine 0,5 McFarland bulanıklığa ayarlanmış olan bakteri süspansiyonundan ekim yapılması önerilmektedir (Wikler, 2007, Sancak, 2007).

#### **1.1.2.7.3.6. Lateks Aglutinasyon**

Metisilin direncinin erken dönemde saptanması amacıyla pek çok farklı test yöntemi de geliştirilmiştir. Kolay uygulanması ve düşük maliyeti nedeniyle lateks aglutinasyon (LA) testleri bu amaçla yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu testte *mecA* geni kontrolünde sentezlenen PBP2a'nın, monoklonal antikorlarla kaplı lateks partikülleri ile verdiği aglutinasyon reaksiyonu incelenir (Wikler, 2007, Sancak, 2007).

#### **1.1.2.7.3.7. Moleküler Yöntemler**

PZR ile *mecA* geninin saptanması, metisilin direncinin tespitinde altın standart olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte, *mecA* geninin bulunduğu, ancak eksprese olmadığı, duyarlı suşların da bulunabileceği unutulmamalıdır (Wikler, 2007; Sancak, 2007).

### 1.1.2.7.3.8. Kromojenik Yöntemler

Son yıllarda MRSA'ların saptanmasında enzimatik substratlar içeren kromojenik besiyerleri denenmektedir. Bunlar arasında "oksasilin direnç tarama agar besiyeri" (ORSAB) gibi değişik kromojenik besiyerleri yer almaktadır (Sancak, 2007).

### 1.1.2.7.4. Toplum Kaynaklı Metisilin Dirençli *S. aureus* (TK-MRSA) ve Hastane Kaynaklı Metisilin Dirençli *S. aureus* (HK-MRSA) Suşların Moleküler Epidemiyolojisi

MRSA suşları önceleri sadece hastane kaynaklı enfeksiyonlara neden olurken, 1990'lı yıllardan sonra TK-MRSA enfeksiyonları da bildirilmeye başlanmıştır. SCC $mec$  kaset gen tiplendirme sistemi, hastane kaynaklı metisilin dirençli *S. aureus* (HK-MRSA) ve TK-MRSA suşlarının ayırımında bağımsız bir kriter olarak kullanılmaktadır (Katayama, 2001; Ito, 2003). HK-MRSA suşları esas olarak, 34-67 kb uzunluğunda tip I, II ve III SCC $mec$  gen kaset tipi taşıırken; iyi tanımlanmış, çoklu dirençli olmayan TK-MRSA suşları daha çok tip IV ve V SCC $mec$  kaset gen tipleri taşımaktadır. Yapılan çalışmalar, TK-MRSA suşlarında tespit edilen yeni SCC $mec$  kaset gen tiplerinin, HK-MRSA suşlarından evrimsel olarak bağımsız olduğunu göstermektedir. Bu durum, TK-MRSA suşlarının HK-MRSA suşlarından bağımsız olarak geliştiğini ve toplum kaynaklı *S. aureus* suşlarının transformasyonu sonucu ortaya çıktığını düşündürmektedir (De Lencastre, 2007; Kılıç, 2008). Tip IV SCC $mec$  kaset gen bölgesi 1970'li yıllarda *S. epidermidis* suşlarında bulunmuş ve 1980 yılında ilk kez *S. aureus*'ta bildirilmiştir. Bu durum da, 1980'li yıllarda SCC $mec$  IV'ün *S. epidermidis*'ten *S. aureus*'a transfer olduğunu düşündürmektedir. Yani *mecA* geni bir stafilokoktan diğerine vertikal olarak aktarılabilir. TK-MRSA suşları, bölgesel farklılıklar göstermekle birlikte, kloramfenikol, klindamisin ve florokinolon grubu antibiyotiklere karşı genellikle duyarlıyken, HK-MRSA suşları bu antibiyotiklere karşı genellikle dirençlidir. Bunun en önemli nedeni, hastanelerde yaygın antibiyotik kullanımının, dirençli suşların ortaya çıkmasına neden olmasıdır. Bu durum aynı zamanda, suşların hangi tip SCC $mec$  kaset gen yapısı taşıdığı ile de

ilişkilidir. Tip II ve III SCC*mec* kaset gen tipleri, direnç genlerinin bulunduğu geniş J (J1, J2 ve J3) bölgelerine sahipken, tip IV SCC*mec* kaset genleri daha kısa ve basit yapıya sahiptir. Boyutları 20-24 kb arasında değişen farklı tip IV kaset tipleri bildirilmiştir. Yapılarının kısa olmasından dolayı da *Staphylococcus* türleri arasında kolaylıkla yayılabilmektedir (muhtemelen faj transdüksiyonu yoluyla). TK-MRSA, altta yatan bir hastalığı bulunmayan, ya da uzun süre hastanede yatış öyküsü gibi herhangi bir risk faktörü taşımayan hastalardan izole edilebilmektedir. Özellikle askeri birlikler, bakım evleri, huzur evleri gibi ortamlarda yaşayan ve birbirleriyle yakın temasta bulunan bireylerde enfeksiyonlara neden olmaktadır. Birçok toplumda, TK-MRSA suşları enfeksiyon etkeni olarak, artık HK-MRSA'ların yerini almaya başlamışlardır. TK-MRSA'lar özellikle çocuklarda cilt ve yumuşak doku enfeksiyonlarına yol açmaktadır. Ancak invaziv, hızlı ilerleyen nekrotizan pnömoni, ağır sepsis, nekrotizan fasiit gibi hastalık tablolarına da neden olabilirler. Ayrıca fulminant purpura ve yaygın damariçi koagülopatisine (DIC) de yol açabilirler (Katayama, 2001; Ito, 2003; Kılıç, 2006; De Lencastre, 2007; Kılıç, 2008).

TK-MRSA'nın önemli bir özelliği de, HK-MRSA ve diğer *S. aureus* suşlarına göre daha yüksek oranda PVL geni bulundurmalarıdır. Bu nedenle daha virulan olarak kabul edilmektedir. PVL, 1932 yılında cilt ve yumuşak doku enfeksiyonuna yol açan *S. aureus* suşları tarafından sentezlenen bir lökotoxin olarak tanımlanmıştır. Daha sonraları, cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları ile nekrotizan pnömoniye yol açan MSSA suşlarında *pvl* geni ortaya konmuştur. MLST ve pulsed field gel electrophoresis (PFGE) teknikleri ile, bölgesel olarak yaygın bulunan HK-MRSA suşlarının, TK-MRSA suşlarından genetik olarak farklı oldukları da tespit edilmiştir. ABD'nde çoğu TK-MRSA suşu tip IV SCC*mec* kaset tipi taşıyan ST1/USA 400 ve ST8/USA 300 olarak tanımlanırken, yaygın HK-MRSA suşları tip II SCC*mec* kaset tipi taşıyan ST5/pulsotip USA 100 veya ST36/pulsotip 200 (EMRSA-16) olarak tanımlanmaktadır. Avrupa'da ise ST8/USA 300, ST30 (okyanus klonu, USA1100) ve ST80 TK-MRSA suşları yaygınken, en sık rastlanan HK-MRSA suşu ST36/pulsotip 200 (EMRSA-16)'dür. Kore ve Japonya'da en sık ST5-MRSA-II klonları bulunurken, diğer Asya ülkelerinde ST239 (veya ST241)-MRSA-III (veya IIIA) klonları daha yaygın olarak bulunmaktadır. Son zamanlarda kabul edilen hipotez, MSSA suşlarının PVL'yi kodlayan *lukS*-PV ve *lukF*-PV genlerinin

(*pvl*) lizojenik faj (*phiSLT*) ile alınması, daha sonra da *mecA* geni taşıyan metisilin direnç kasetlerinin (*SCCmec* IV, V) horizontal olarak PVL pozitif MSSA suşlarına transfer olması ve *phiSLT* bölgesinden başka bir bölgeye integre olmasıdır. Böylece MSSA suşları, PVL pozitif olan MRSA haline gelmektedir (Katayama, 2001; Ito, 2003; Kılıç, 2006; De Lencastre, 2007; Kılıç, 2008).

MLST yöntemi ile yapılan popülasyon genetiği çalışmalarında, MRSA klonlarının büyük bir kısmının 5 kompleks klondan (CCs) köken aldığı gösterilmiştir: CC5, CC8, CC22, CC30 ve CC45. Tüm CC5, CC22 ve CC45 MRSA klonları enterotoksin gen kompleks (*egc*) lokusunda ortaktırlar. Epidemik MRSA-16 (EMRSA-16) klonları CC30'u sunarak hem *sea* geni hem de *egc* lokusunu içerirler. Brezilya klonu şu ana kadar tüm superantijenik toksinlerden yoksun olan tek klon olarak tanımlanmıştır (Tristan, 2007; Cockfield, 2007).

#### 1.1.2.7.5. HK-MRSA ve TK-MRSA Klonlarının Virulans Faktörleri

*S. aureus* farklı klinik sendromların ortaya çıkmasında rol oynayan çok sayıda virulans faktörüne sahiptir. Virulans faktörlerinin tanımlanması, hastalıkların patogenezinde rol oynayan moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılmasına ve yeni tedavi yaklaşımlarının ortaya konmasına olanak sağlar. TK-MRSA'nın en iyi bilinen virulans faktörü PVL'dir. Bu toksin *S. aureus*'larda yaklaşık %5 oranında bulunmasına karşın, TK-MRSA'larda yaklaşık %90 oranında bulunmaktadır. TK-MRSA'lar sıklıkla PVL geni taşırlar ve *SCCmec* IV ve bazen *SCCmec* V tipinde yer alırlar. PVL pozitif TK-MRSA klonları coğrafi dağılımlarına göre isimlendirilmişlerdir. Örneğin ST80 Avrupa'da, ST8 ve ST1 Amerika'da ve ST30 Okyanusya'da saptanmıştır (Tristan, 2007; Cockfield, 2007).

*S. aureus*'un 6 farklı sitolitik toksini tanımlanmıştır. Bunlardan üçü tek bileşenli ve üçü iki bileşenlidir. Tek bileşenli toksinler ( $\alpha$ -hemolizin-HIa,  $\beta$ -hemolizin-HIb,  $\delta$ -hemolizin-HId) hemolitik etkiye sahipken, iki bileşenli toksinler ( $\gamma$ -hemolizin-HIg [*Hlg1* ve *Hlg2*], lökositin-Luk [*LukF* ve *LukS*] ve Panton-Valentin Lökositin [*LukS-PV* ve *LukF-PV*]) hemoliz yapmazlar. PVL,  $\gamma$ -hemolizin ve diğer

lökositinler ile birlikte sinerjik etki gösterir ve bibileşen sinergohimenotropik toksinler ailesinde yer alır. PVL iki farklı aktif protein olan S ve F proteinlerinden oluşmaktadır. Bu proteinler *lukS*-PV ve *lukF*-PV genleri tarafından kodlanır. PVL insan, polimorfonükleer nötrofil (PMN), monosit ve makrofaj hücrelerine karşı toksik etki gösterir. PVL kalsiyum kanallarının açılmasını indükleyerek kalsiyum akımına yol açar ve lökotrien B4 (LT-B4), IL-8 ve histamin gibi inflamatuvar mediatörlerin aşırı miktarda salınmasına yol açar (Tristan, 2007; Cockfield, 2007).

Yamaguchi ve arkadaşları (Yamaguchi, 2002) yaptıkları çalışmada, *eta* (eksfolyatif toksin A) ve *etb* geni içeren MRSA suşları izole etmişlerdir. Bu toksinler epidermal hücreleri birarada tutan desmoglein 1'e bağlanırlar, epidermolitik proteazlar gibi çalışarak, epidermiste nekroz veya inflamatuvar yanıt oluşturmaksızın haşlanmış deri sendromuna neden olurlar (Tristan, 2007; Cockfield, 2007).

*tst* geni içeren MRSA klonları 2002'de Fransa ve İsviçre'de saptanmıştır. *tst*-pozitif MRSA suşları daha yüksek virulansa sahiptirler ve TŞS'ndan süperatif enfeksiyonlara kadar çeşitli klinik tablolara da yol açabilirler. *tst*-pozitif MRSA'lar, birisi ST5 ve *agr2* içeren büyük klon, diğeri ise ST30 ve *agr3* içeren küçük klon olmak üzere, iki farklı klondan köken alırlar. Her iki *tst*-pozitif MRSA klonu da hem HK-MRSA hem de TK-MRSA enfeksiyonları ile ilişkili bulunmuştur. *tst*-pozitif MRSA klonları genellikle küçük çocuklardan izole edilmiştir. Her iki klon da SCC*mec* IV kaset tipini taşırlar. Bu klonların kökeni bilinmemektedir (Tristan, 2007; Cockfield, 2007).

*tst*-pozitif *agr2* MRSA klonları, iki pandemik nozokomiyal klon (pediyatrik klon ve New-york/Japon klonu) gibi aynı ST'ye sahiptir. Ayrıca TŞST-1 Japonya'da baskın olan ve şimdi Avrupa'da yayılmakta olan bir MRSA klonu tarafından da üretilmektedir. Bu klon nozokomiyal toksik şok sendromunun ortaya çıkmasından ve "neonatal toksik şok sendromu benzeri egzantematöz hastalıktan (NTED)" sorumludur. Bu klon Fransa'da tanımlanmıştır ve dolaşım sistemi enfeksiyonları ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. *Sea*-pozitif olan suşlar dolaşım sistemi

enfeksiyonlarına yol açtığı zaman *tst*-pozitif olan *S. aureus*'lar gibi, şoka yol açabilirler (Tristan, 2007; Cockfield, 2007).

#### **1.1.2.7.6. TK-MRSA ve HK-MRSA'ların Karşılaştırılması**

TK-MRSA ile HK-MRSA arasında, klinik, antibiyotik duyarlılık, virulans faktörleri ve moleküler özellikler bakımından farklılıklar söz konusudur. HK-MRSA enfeksiyonlarının aksine, TK-MRSA enfeksiyonu tespit edilen kişilerde tipik risk faktörleri bulunmamaktadır. TK-MRSA genellikle sporadik enfeksiyonlar oluştururken, intravenöz ilaç kullanıcılar arasında, kreş, huzurevi, kışla gibi toplu yaşanan yerlerde salgınlara yol açabilir. Toplum kökenli suşlar hastane kökenlerine göre antibiyotiklere daha duyarlıdır. Yine hastane kökenlerinde %5 civarında bildirilen PVL geni, toplum kökenli suşların %90'dan fazlasında bulunabilmektedir. TK-MRSA suşları, HK-MRSA'ya göre daha kolay kolonize olmakta ve daha sık enfeksiyonlara yol açmaktadır. Moleküler incelemeler ile hastane ve toplum kaynaklı izolatların moleküler açıdan da farklı klonlar oldukları gösterilmiştir. TK-MRSA sıklıkla cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları ve nekrotizan pnömoniye neden olurken, hastane kaynaklı suşlar daha çok bakteriyemi, pnömoni, kateter enfeksiyonu, cerrahi yara enfeksiyonu gibi klinik tablolara yol açmaktadır. TK-MRSA ile HK-MRSA arasındaki mikrobiyolojik ve klinik farklılıklar Çizelge 1.4'te gösterilmektedir (Chen, 2005; Shukla, 2005; Gupta, 2007).

Çizelge 1.4. TK-MRSA ve HK-MRSA arasındaki mikrobiyolojik ve klinik farklılıklar

	TK-MRSA	HK-MRSA
SCC <i>mec</i> tip	IV, V	I, II, III
Klasik risk faktörleri	yok	var
Cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları	%75	%25
Pnömoni	nadiren	daha sık
Çocuk ve genç erişkinlerde nekrotizan pnömoni	daha sık	nadiren
Bakteriyemi	-	+
Multipl antibiyotik direnç profili	-	+
PVL sıklığı	%90	%5
Yaşlılarda enfeksiyon	daha sık	nadiren
Gençlerde enfeksiyon	nadiren	daha sık
Klonal tip	USA100 ve 200	USA300 ve 400

Moleküler teknolojik ilerlemeler TK-MRSA enfeksiyonlarının epidemiyolojisinin belirlenmesinde büyük avantaj sağlamıştır. Birçok moleküler teknik ile MRSA tiplendirilmesi mümkün olsa da, en sık kullanılan yöntem PFGE'dir. Genetik analizler, bazı izolatların tipik hastane kaynaklı suşların klonal yayılımı ile topluma geçtiğini ve toplum kaynaklı enfeksiyonlara neden olduğunu göstermiştir. Ancak, MLST sonuçları, bazı toplum kaynaklı suşların, hastane kaynaklı suşlardan farklı genetik özelliklere sahip olduklarını göstermiştir (Chen, 2005; Shukla, 2005; Gupta, 2007).

Metisilin direncinden sorumlu olan *mecA* genini taşıyan hareketli SCC*mec* elementinin altı tipi tanımlanmıştır (tip I-VI). HK-MRSA suşları genellikle SCC*mec* tip I, II ve III'e sahiptir. Bunlar nispeten büyük moleküller olup,  $\beta$ -laktam antibiyotikler dışındaki birçok antibiyotiğe karşı direnç genlerini de taşırlar. Tip IV, SCC*mec* en küçük olan tiptir ve üzerinde  $\beta$ -laktam dışı antibiyotik direnç genlerini taşımaz. Yapılan çalışmalarda TK-MRSA suşlarında daha çok SCC*mec* tip IV geninin varlığı gösterilmiş, son yıllarda yapılan çalışmalarda tip V'in varlığı da saptanmıştır. Tip IV geni bir genetik belirleyici olarak görülmektedir. Hastane kaynaklı suşlara kıyasla daha hızlı replike olduğu anlaşılmıştır. Küçük yapısı ile daha hareketli olup, plazmid veya bakteriyofaj ile diğer klonlara transfer olabilme özelliğine sahiptir. Bazı genetik çalışmalarda ise SCC*mec* tip IV geninin MSSA'ya

horizontal transferi gösterilmiştir. Bunun yanısıra *mec* geninin hareketi ve transferi halen tam olarak anlaşılamamıştır. Bu direnç genlerinin türler arası transferinin yanısıra, floradaki stafilokok türlerine direnç adacıkları şeklinde geçişi ile de yayılımın olabileceği düşünülmektedir (Chen, 2005; Shukla, 2005; Gupta, 2007).

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. Gereçler

#### 2.1.1. Besiyerleri

Stuart Taşıma Besiyeri

Blood Agar Base (Infusion Agar), (HIMEDIA, M073)

Mannitol Tuz Agar (MTA)

Mueller-Hinton Agar (HIMEDIA, M173)

Eosin Methylene Blue (MERCK, 1.01347)

Sabouraud Dekstroz Agar (LAB M, LAB009-A)

DNaz Test Agar (SALUBRIS, MP130)

Oksasilin Tuz Tarama Besiyeri

Oksasilin Direnç Tarama Agar Besiyeri (ORSAB)

Brain Heart Infusion Broth (HIMEDIA, M210)

Trypton Soy Broth Without Dextrose (DIFCO, 0862-01-6)

Craigie Besiyeri

Triple Sugar Iron Agar (MERCK 1.03915)

MR-VP Broth (Clark-Lubs Broth)

Urea Agar Base (Christensen), (SIGMA, 1321268)

Simmons Citrate Agar (HIMEDIA, M099)

Neopepton (DIFCO, 0119-01)

Agar (LAB M, MC002-B5)

#### 2.1.2. Kimyasal Malzemeler

Tris (AMRESCO, 0497)

EDTA (MERCK, 6358898)

SDS (RIEDEL–de HAEN, 03150)

Hidroklorik Asit (SIGMA, 96208)

Alkol (MERCK, 1.00986)  
Phenol: Chloroform: Isoamyl Alc. 25:24:1 (SIGMA, 77617)  
Lizostafin (SIGMA, L4402)  
Kloroform (DOP, 0001)  
Tris-HCl (APPLICHEM, A4725)  
Borik Asit (AMRESCO, 0588)  
Agaroz (VIVANTIS, PC0701)  
Etidyum Bromid (AMRESCO, 0492-5G)  
Tavşan Koagülaz Plasması (BBL, 240658)  
Hidrojen Peroksit (MERCK, 386790)  
Oksidaz Çubuğu (OXOID, BR0064)  
 $\alpha$ -Naftol (SIGMA, N2780)  
Potasyum Hidroksit (KOH), (CHEMAPOL, 1079)  
Metil Kırmızısı (MERCK, 1.06076)  
İzoamil Alkol (C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>OH), (MERCK, 1.00979)  
4-(Dimetilamino) Benzaldehit (MERCK, 1.03058)  
D(-) Mannitol (MERCK, 1.05982)  
D(+) Glukoz (MERCK, 1.08342)  
Dipotasyum fosfat (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), (SIGMA, P5504)  
*Taq* DNA Polimeraz (FERMENTAS, EP0402)  
(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içeren 10X *Taq* Tampon (FERMENTAS, EP0402)  
25 mM MgCl<sub>2</sub> (FERMENTAS, EP0402)  
dNTP Karışımı, 2mM (FERMENTAS, R0242)  
O'RangeRuler 50 bp DNA Ladder (FERMENTAS, SM0613)  
MassRuler DNA Ladder Mix (80-10,000 bp) (FERMENTAS, SM0403)  
6X Orange DNA Loading Dye (FERMENTAS, R0631)

### 2.1.3. Araçlar

Elektroforez Tankı (THERMO, AMERİKA)  
 Elektroforez Güç Kaynağı (EC250-09, AMERİKA)  
 Termal Döngü Cihazı (TECHNE DB2A, İNGİLTERE)  
 Mikrodalga Fırın (BEKO, TÜRKİYE)  
 Mikrosantrifüj (HERMLE, ALMANYA)  
 Otomatik Pipetler (EPPENDORF, ALMANYA)  
 UV Transilluminatör (VILBER-LOURMAT TFX-20.M, FRANSA)  
 Fotoğraf Makinesi (CANON POWER SHOT G5, KANADA)  
 Vortex (VELP SCIENTIFICA, İTALYA)  
 Soğutmalı Santrifüj (HERMLE Z233 MK-2, ALMANYA)  
 Işık Mikroskobu (ZEISS, ALMANYA)  
 pH Metre (HANNA, PORTEKİZ)  
 Etüv (HERAUS, ALMANYA)  
 Pipetör (GREİNER, ALMANYA)  
 Otomatik Pipetler (TRANSFERPETTE, ALMANYA)  
 Hassas Terazî (SARTORIUS, ALMANYA)  
 Class II Güvenlik Kabini (TECHNOMER, TÜRKİYE)  
 Spektrofotometre (HİTACHİ, JAPONYA)  
 Steril PZR Tüpü 0,2 ml (AXYGEN, AMERİKA)  
 Steril Filtreli Pipet Ucu 10 µl, 200 µl, 1000 µl (CORNING, MEKSİKA)

### 2.1.4. Tampon ve Çözeltiler

#### **Tris-EDTA (TE) Tamponu (pH=8)**

- a) 10 mM Tris HCl için 315,12 mg madde tartılır, sonra distile su ile toplam hacim 200 ml'ye tamamlanır.
- b) Yukarıdaki çözelti içinde 1 mM etilendiamintetraasetik asit (EDTA) hazırlamak için 58,4 mg EDTA çözeltiye eklenir.

Maddeler iyice çözüldükten sonra pH 8,0'e ayarlanır ve otoklavda 121C°'de 15 dakika sterilize edilerek buz dolabında saklanır.

### **10×TBE (Tris- Borik Asit- EDTA) Tamponu**

Tris-HCl (pH: 8,4) .....	0,89 M (121,10 g)
Borik asit .....	0,89 M (61,83 g)
EDTA .....	0,02 M (5,84 g)

Distile su ile hacim 1000 ml'ye tamamlanır. pH 8,0'e ayarlanarak, buz dolabında saklanır.

### **0,5×TBE Tamponu**

0,5×TBE Tamponu hazırlamak için, 100 ml 10×TBE Tamponu 1900 ml distile su ile sulandırılır.

### **Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) %10**

100 g SDS, 800 ml distile suya eklenir. İyice çözülmesi için 68C°'deki su banyosunda bekletilir. Sonra hacim 1000 ml'ye tamamlanır. 1N HCl ile pH=7,2'ye ayarlanır.

### **Etidyum Bromür (10 mg/ml stok)**

10 mg etidyum bromürün 1 ml distile suda, manyetik çalkalayıcı üzerinde bir kaç saat karıştırılarak çözünmesi ile hazırlanır. Renkli şişeye konur ve şişenin etrafı alüminyum kağıt ile kapatılarak oda sıcaklığında saklanır. Hazırlanan bu çözeltiden her 100 ml agaroz jelle 5 µl etidyum bromür eklenerek (0,5 µg/ml) agaroz jelle yürütülen DNA'lar işaretlenir. Etidyum bromürün buharlaşmasını engellemek için agaroz iyice çözüldükten sonra, sıcaklığı 60C°'ye gelince etidyum bromür eklenmelidir. Eldiven ve maske ile jel hazırlanır.

**Agaroz Jel (%3)**

Agar.....	5,4 g
0,5×TBE.....	180 ml
Etidyum Bromür.....	9 µl

**Agaroz Jel (%2)**

Agar.....	3,6 g
0,5×TBE.....	180 ml
Etidyum Bromür.....	9 µl

**2.1.5. Biyokimyasal Testler ve Ayıraçlar****Voges-Proskauer (VP) Ayıracı (100 ml)**

<u>A solüsyonu:</u>	%5 α-Naftol	
	α-Naftol.....	5 g
	Etanol %99.....	100 ml

<u>B solüsyonu:</u>	%40 Potasyum Hidroksid (KOH)	
	KOH.....	40 g
	Distile su (dH <sub>2</sub> O).....	100 ml

**Metil kırmızısı (MR) Ayıracı (100 ml)**

Metil kırmızısı.....	0,2 g
Etanol %95.....	50 ml
dH <sub>2</sub> O.....	50 ml

**Kovaks Ayıracı (100 ml)**

Amil veya izoamil alkol (C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> OH).....	75 ml
ρ-Dimetilaminobenzaldehit (C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO).....	5,0 g
Hidroklorik asit (konsantre %30).....	25 ml

**1 N HCl**

İstenilen volüm (litre)×istenilen normalite×moleküler ağırlığı (g)=çözelti hacmi  
Değerlik×Dansite×Konsantrasyon (%)

$$\frac{1 \times 36,46 \times 1000}{1 \times 1,19 \times 0,30} = 102 \text{ ml } \%30\text{'luk HCl}$$

$$1000 - 102 = 898 \text{ ml dH}_2\text{O}$$

1 litre 1 N HCl hazırlamak için 102 ml %30'luk HCl çözeltisi distile su ile 1 litreye tamamlanır.

### 2.1.6. Diğer

#### Kontrol Suşları

MSSA standard suşu (*S. aureus* ATCC 95045) katalaz, koagülaz ve antimikrobiyal duyarlılık testlerinde; *S. epidermidis* standard suşu (ATCC 12228) koagülaz testinde; GRE-14, PVL ve SCC*mec* tip tayininde; HPV-107, BK-2464, HUSA-304, HCJ-216 ve HDE-288 SCC*mec* tip tayininde kontrol suşları olarak kullanılmıştır. GRE-14 tip IV'e, HPV-107 tip I<sub>A</sub>'ya, BK-2464 tip II'ye, HUSA-304 tip III'e, HCJ-216 tip III<sub>A</sub>'ya ve HDE-288 tip VI'e karşılık gelmektedir (Milheiriço, 2007).

#### Mantar İdentifikasyon Testi

API 20 C AUX (BIOMERIEUX, B20210RRP)

#### Antimikrobiyal Diskler ve Tozlar

Sefoksitin (30 µg), (BBL, 231590)

Oksasilin Diski (1 µg), (BD BBL, 231319)

Eritromisin Diski (15 µg), (BBL, 231290)

Klindamisin Diski (2 µg), (BD BBL, 231275)

Tetrasiklin Diski (30 µg), (BD BBL, 231344)

Trimetoprim/Sulfametoksazol Diski (1.25/23.75 µg), (BD BBL, 231539)

İmipenem Diski (10 µg), (BD BBL, 231645)  
 Gentamisin Diski (10 µg), (BD BBL, 231299)  
 Amikasin Diski (30 µg), (BD BBL, 231597)  
 Teikoplanin Diski (30 µg), (BD BBL, 291311)  
 Kloramfenikol Diski (30 µg), (BBL, 231274)  
 Siprofloksasin Diski (5 µg), (BD BBL, 231658)  
 Vankomisin Diski (30 µg), (BD BBL, 231353)  
 Ampisilin Diski (10 µg), (BD BBL, 231264)  
 Amoksisilin (10 µg), (BD BBL, 291370)  
 Amoksisilin/Klavulanik Asit Diski (20/10 µg), (BD BBL, 231629)  
 Ampisilin/Sulbaktam Diski (10/10 µg), (BD BBL, 231660)  
 Seftriakson Diski (30µg), (BD BBL, 231635)  
 Sefotaksim Diski (30 µg), (BD BBL, 231607)  
 Sefotaksim/Klavulanik Asit Diski (30/10 µg), (BBL, 231751)  
 Seftazidim/Klavulanik Asit Diski (30/10 µg), (BBL, 231754)  
 Oksasilin Sodyum Salt Monohydrate (SIGMA, O1002)  
 Polimiksin B (SIGMA, P1004)  
 Aztreonam (30 µg), (BD BBL, 231641)  
 Sefepim (30 µg) (BD BBL, 231696)

### 2.1.7. Besiyerlerinin Hazırlanması

#### Kanlı Agar (Blood Agar Base)

Dehidrate besiyerinin içeriği	
Beef heart infusion .....	500 g
Tryptose .....	10 g
Sodyum klorid (NaCl) .....	5 g
Agar .....	15 g

Kanlı agar hazırlamak için, 40 g dehidrate besiyeri balon içerisinde bir litre distile suda eritilmiş, pH 7,3'e ayarlanmış, 121C°'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. Besiyeri 45-50C°'ye kadar soğutulurak içerisine 50 ml

defibrine steril koyun kanı ilave edilmiş, karıştırılarak uygun sıcaklıkta ve aseptik koşullarda 4 mm kalınlığında petri kutularına aktarılmıştır.

### **Mannitol Tuz Agar (MTA)**

Dehidrate besiyerinin içeriği

Pancreatic digest of casein.....	5 g
Peptic digest of animal tissue.....	5 g
Sığır ekstraktı.....	1 g
D-Mannitol.....	10 g
Agar.....	15 g
Sodyum klorid (NaCl).....	75 g
Fenol kırmızısı.....	0,025 g

MTA besiyeri hazırlamak için, 111 g dehidrate besiyeri balon içerisinde bir litre distile suda eritilmiş, pH 7,4'e ayarlanmış, 121C°'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. Uygun sıcaklıkta ve aseptik koşullarda 4 mm kalınlığında petri kutularına aktarılmıştır.

### **Mueller-Hinton Agar (MHA)**

Dehidrate besiyerinin içeriği

Buff, infusion from.....	300,00 g
Hydrolysate kazein asit.....	17,5 g
Nişasta.....	1,5 g
Agar.....	17,0 g

MHA besiyeri hazırlamak için, 38 g dehidrate besiyeri balon içerisinde bir litre distile suda eritilmiş, pH 7,3'e ayarlanmış, 121C°'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. Uygun sıcaklıkta ve aseptik koşullarda 4 mm kalınlığında petri kutularına aktarılmıştır.

### **Eosin Methylene Blue (EMB)**

Dehidrate besiyerinin içeriği

Pepton.....	10,0 g
Laktoz.....	5,0 g
Sükroz.....	5,0 g
Di-potasyum hidrojen fosfat.....	2,0 g
Eozin Y.....	0,4 g

Metilen mavisi .....	0,07 g
Agar .....	13,5 g

EMB besiyeri hazırlamak için, 36 g dehidrate besiyeri balon içerisinde bir litre distile suda eritilmiş, pH 7,1'e ayarlanmış, 121C°'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. Uygun sıcaklıkta ve aseptik koşullarda 4 mm kalınlığında petri kutularına aktarılmıştır.

### **Antibiyotikli Sabouraud Dekstroz Agar (AB-SDA)**

Dehidrate SDA besiyerinin içeriği

Dengeli pepton .....	10,0 g
Dekstroz .....	40,0 g
Agar .....	12,0 g

Antibiyotikli Sabouraud Dekstroz Agar besiyeri hazırlamak için, 62 g dehidrate besiyeri balon içerisinde bir litre distile suda eritilmiş, pH 5,6'e ayarlanmıştır. 50 mg kloramfenikol 10 ml %95'lik etil alkolde çözülerek 50 mg/l olacak şekilde, gentamisin solüsyonu ise 100 mg/l olacak şekilde besiyerine ilave edilmiş, 121C°'de 15 dakika otoklavda sterilize edildikten sonra uygun sıcaklıkta ve aseptik koşullarda 4 mm kalınlığında petri kutularına aktarılmıştır.

### **DNaz Test Agar**

Besiyerinin içeriği

Pancreatic Digest of Casein .....	15,0 g
Papaic Digest of Soybean Meal .....	5,0 g
Deoksiribonükleik asit .....	2,0 g
Sodyum klorid .....	5,0 g
Agar .....	15,0 g

DNaz Test Agar hazır olarak alınmış ve firmanın önerileri doğrultusunda kullanılmıştır.

**“Oksasilin Tuz Tarama Besiyeri”**

Besiyerinin içeriği	
MHA .....	38,0 g
Sodyum klorid .....	40,0 g
Oksasilin .....	0,006 g

78,0 g olarak hazırlanan karışım bir litre distile su içerisinde tamamen eritilmiş, pH 7,3'e ayarlanmış, 121C°'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. Uygun sıcaklıkta ve aseptik koşullarda 4 mm kalınlığında petri kutularına aktarılmıştır.

**“Oksasilin Direnc Tarama Agar Besiyeri (ORSAB)”**

Besiyerinin içeriği	
Pepton .....	11,8 g
Maya ekstraktı .....	9,0 g
Mannitol .....	10,0 g
Sodyum klorid .....	55,0 g
Lityum klorid .....	5,0 g
Anilin mavisi .....	0,2 g
Agar .....	12,5 g
Polimiksin .....	50,000 IU
Oksasilin .....	2,0 mg

103,5 g olarak hazırlanan karışım bir litre distile su içerisinde tamamen eritilmiş, pH 7,2'ye ayarlanmış, 121C°'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. Uygun sıcaklıkta ve aseptik koşullarda 4 mm kalınlığında petri kutularına aktarılmıştır.

**“Brain Heart Infusion Broth (BHIB)”**

Dehidrate besiyerinin içeriği	
Beef infusion .....	250,0 g
Calf brain, infusion .....	200,0 g
Dekstroz .....	2,0 g
Disodyum fosfat .....	2,5 g
Proteoz pepton .....	10,0 g
Sodyum klorid .....	5,0 g

BHIB besiyeri hazırlamak için, 37 g dehidrate besiyeri balon içerisinde bir litre distile suda eritilmiş, pH 7,4'e ayarlanmış, 121C°'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. Uygun sıcaklıkta ve aseptik koşullarda 4 mm kalınlığında petri kutularına aktarılmıştır.

### **Saklama Besiyeri (%16'lık Gliserollü Buyyon)**

Gliserollü Buyyonun hazırlanması

Trypton soy broth w/o dextrose .....	1g
Glyserol .....	10 ml

Yukarıdaki kimyasal maddeler 40 ml distile su içerisinde tamamen çözülünceye kadar manyetik karıştırıcıda karıştırılmış, pH 7,2'ye ayarlanmış, 115C°'de 10 dakika otoklavlanmıştır. Steril şartlarda, yaklaşık 1,5 ml'lik miktarlarda burgu kapaklı, plastik derin dondurucu tüplerine dağıtılmıştır.

Suşların saklanması için öncelikle istenilen suşların saf kültürleri elde edilmiş, saklama besiyerine pasajlanmış, 24 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra derin dondurucuda saklanmıştır (Bannerman, 2003; Levent, 2008).

### **Craigie Besiyeri**

Dehidrate besiyerinin içeriği

Beef infusion .....	250,0 g
Calf brain, infusion .....	200,0 g
Dekstroz .....	2,0 g
Disodyum fosfat .....	2,5 g
Proteoz pepton .....	10,0 g
Sodyum klorid .....	5,0 g

Craigie besiyeri hazırlamak için, 37 g dehidrate BHIB besiyeri ve 4 g agar balon içerisinde bir litre distile suda eritilmiş, pH 7,4'e ayarlanmış, 121C°'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. Daha sonra uygun ısıda, içerisine 5 mm çapında ve 9 cm uzunluğunda ince cam tüpler yerleştirilmiş steril, 17 mm çapında, 15 cm uzunluğundaki cam tüplere aktarılmıştır.

### **Üç Şekerli Demir Besiyeri (TSI)**

Dehidrate besiyerinin içeriği

Peptone from casein .....	15,0 g
Peptone from meat .....	5,0 g
Meat extract .....	3,0 g
Yeast extract .....	3,0 g
Laktoz .....	10,0 g
Sükroz .....	10,0 g
D(+) glukoz .....	1,0 g
Ammonium iron (III) citrate .....	0,5 g
Sodyum klorid .....	5,0 g
Sodyum tiyosülfat .....	0,5 g
Fenol kırmızısı .....	0,024 g
Agar .....	12,0 g

TSI besiyeri hazırlamak için, 65 g dehidrate besiyeri balon içerisinde bir litre distile suda eritilmiş, pH 7,4'e ayarlanmış, besiyeri henüz sıvı halde iken, standart 16 X 160 mm tüplere 7'şer ml olarak dağıtılmış ve 121C°'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. Besiyerleri henüz sıvı haldeyken tüpler 1-1,5 cm yüksekliğinde bir çubuğa yatırılarak (tüpün dibinde 2-2,5 cm yüksekliğinde bir besiyeri kalınlığı olacak şekilde) besiyerinin katılaşması beklenmiştir. Hazırlanan besiyeri berrak kırmızı renklidir.

### **“MR-VP Broth (Clark-Lubs Broth)”**

Dehidrate besiyerinin içeriği

Neopepton .....	5,0 g
Glikoz .....	5,0 g
Dipotasyum fosfat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) .....	5,0 g

Clark-Lubs Broth besiyeri hazırlamak için, 15,0 g dehidrate besiyeri balon içerisinde bir litre distile suda eritilmiş, pH 7,0'ye ayarlanmış, 105C°'de 20 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. Uygun sıcaklıkta ve aseptik koşullarda steril tüplere üçer mililitre aktarılmıştır. Clark-Lubs besiyeri Metil Kırmızısı ve Voges Proskauer testlerinde kullanılmıştır.

### **Üreaz Besiyeri (Christensen üre agar)**

Dehidrate üreaz besiyerinin içeriği

Peptic digest of animal tissue .....	1,0 g
--------------------------------------	-------

Dekstroz .....	1,0 g
Sodyum klorid .....	5,0 g
Disodyum fosfat .....	1,2 g
Monopotasyum fosfat .....	0,8 g
Fenol kırmızısı .....	0,120 g
Agar .....	15,0 g

Üreaz besiyeri hazırlamak için, 24 g dehidrate besiyeri balon içerisinde 950 ml distile suda eritilmiş, pH 6,8'e ayarlanmış, 115C°'de 20 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. Sonra 50 ml distile suda %40'lık üre hazırlanmış ve filtreden geçirilerek steril edildikten sonra, 50C°'ye kadar soğutulmuş besiyerine ilave edilmiş ve iyice karıştırılmıştır. Besiyeri henüz sıvı iken steril tüplere 5 ml dağıtılmış ve 1-1,5 cm yüksekliğinde bir çubuğa yatırılarak (tüpün dibinde yaklaşık 2 cm yüksekliğinde bir besiyeri kalınlığı olacak şekilde) besiyerinin katılaşması beklenmiştir. Hazırlanan besiyeri parlak turuncu renktedir.

### **Sitrat Besiyeri**

Dehidrate Simmons sitrat agar besiyerinin içeriği

Magnezyum sülfat .....	0,2 g
Amonyum dihidrojen fosfat .....	1,0 g
Dipotasyum fosfat .....	1,0 g
Sodyum sitrat .....	2,0 g
Sodyum klorid .....	5,0 g
Bromtimol mavisi .....	0,08 g
Agar .....	15,0 g

Simmons sitrat agar besiyeri hazırlamak için, 24,28 g dehidrate besiyeri balon içerisinde bir litre distile suda eritilmiş, pH 6,8'e ayarlanmış ve 5'er ml tüplere dağıtılmıştır. Tüpler 121C°'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. Besiyeri henüz sıvı iken steril tüplere 5 ml dağıtılmış ve 1-1,5 cm yüksekliğinde bir çubuğa yatırılarak (tüpün dibinde yaklaşık 2 cm yüksekliğinde bir besiyeri kalınlığı olacak şekilde) besiyerinin katılaşması beklenmiştir. Hazırlanan besiyeri yeşil renktedir.

## 2.2. Yöntemler

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yürütülmüştür. Çalışma için Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul'unun 3 Kasım 2008 tarihli ve 140-4164 sayılı kararı ile onay alınmış, tüm hastalar çalışma ile ilgili bilgilendirilmiş ve yazılı onayları alınarak çalışmaya dahil edilmiştir.

### 2.2.1. Çalışma Grupları

Enfeksiyon etkeni olmayan TK-MRSA grubu ve enfeksiyon etkeni olan TK-MRSA grubu olmak üzere iki farklı çalışma grubu oluşturulmuştur.

Enfeksiyon etkeni olmayan TK-MRSA suşlarının elde edilmesi amacıyla, Ekim 2007-Mayıs 2008 tarihleri arasında 1040 sağlıklı bireyden burun ve koltuk altı örnekleri alınmıştır. Enfeksiyon etkeni olan TK-MRSA suşları, 2004-2005 yılları arasında İstanbul Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nin çeşitli polikliniklerine başvuran hastalardan alınan örneklerden (idrar, üretral akıntı, burun, püy, yara, eklem sıvısı) enfeksiyon etkeni olarak izole edilmiştir.

Tüm izolatların biyokimyasal idantifikasyonları yapılmış, antibiyotik duyarlılık paternleri incelenmiş, PZR ve multipleks PZR yöntemleri ile moleküler epidemiyolojileri ve genotipik özellikleri araştırılmıştır.

### 2.2.2. Çalışmada Dikkate Alınan Kriterler

Örneklerin toplandığı sağlıklı bireyler ve hastalar "Centers for Disease Control and Prevention (Hastalık Kontrol ve Engelleme Merkezleri; CDC)" kriterleri esas alınarak seçilmiştir (Buck, 2005).

Enfeksiyon etkeni olmayan TK-MRSA grubu için, risk faktörü bulunmayan, sağlıklı bireyler seçilmiştir.

**Çalışmaya Alınmama Kriterleri:**

- Halen hastanede yatmakta olması
- Son 14 gün içerisinde hastanede 48 saatten daha uzun süre yatış öyküsü bulunması
- Önceki dönemlere ait MRSA enfeksiyonu veya kolonizasyonu öyküsü bulunması
- Kalıcı kateter veya transdermal medikal alet bulunması
- Beta laktam antibiyotiklere ve klindamisine karşı aşırıduyarlılığı bulunması
- Kazanılmış veya kalıtsal immün yetmezliği bulunması
- Sürekli antibiyotik tedavisi görüyor olması

Enfeksiyon etkeni olmayan TK-MRSA grubu için, örneklerin alınacağı sağlıklı bireyler için hazırlanmış olan anket formları doldurularak bilgileri alınmıştır (Şekil 2.1).

TOPLUM KAYNAKLI MRSA TAŞIYICILIĞININ ANKET FORMU			
Adı, Soyadı :		Tarih :	... / ... / 200...
Yaşı :	Cinsiyeti : <input type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/> E	Protokol No. :	
Adres :	Telefon no. :		
-----			
Mesleği :	<input type="checkbox"/> Öğrenci	<input type="checkbox"/> Öğretmen	<input type="checkbox"/> Personel <input type="checkbox"/> Diğer .....
-----			
Alınan örnek :	<input type="checkbox"/> 1. Burun	<input type="checkbox"/> 2. Koltuk altı	<input type="checkbox"/> 3. Yara <input type="checkbox"/> Diğer .....
-----			
Son 6 ay içinde hastanede yatış öyküsü var mı?	<input type="checkbox"/> Evet	<input type="checkbox"/> Hayır	
-----			
Son 3 ay içinde antibakteriyel ajan kullandı mı?	<input type="checkbox"/> Evet	<input type="checkbox"/> Hayır	
-----			
Son 2 hafta içinde herhangi bir akut hastalık öyküsü var mı?	<input type="checkbox"/> Evet	<input type="checkbox"/> Hayır	
-----			
Kronik hastalık öyküsü var mı?	<input type="checkbox"/> Evet	<input type="checkbox"/> Hayır	
-----			
Deri veya yumuşak doku enfeksiyonu öyküsü var mı?	<input type="checkbox"/> Evet	<input type="checkbox"/> Hayır	
-----			
Formu dolduran :	İmza :		

Şekil 2.1. Enfeksiyon etkeni olmayan, TK-MRSA hasta grubu anket formu

### 2.2.3. *S. aureus* İzolasyonu ve İdentifikasyonu

Sağlıklı taşıyıcı grubundan steril nemlendirilmiş eküvyonlar kullanılarak alınan burun ve koltuk altı sürüntü örnekleri Stuart taşıma besiyeri içerisinde alınarak, en fazla 8 saat içerisinde Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Laboratuvarına ulaştırılmıştır. Örnekler %5 koyun kanlı agara, EMB besiyeri ve antibiyotikli-SDA besiyerlerine inoküle edilmiştir. Kanlı agar ve EMB besiyerine inoküle edilen örnekler 37C°'de 24-48 saat, antibiyotikli-SDA besiyerine inoküle edilen örnekler 30C°'de 48-72 saat aerobik şartlarda inkübe edilmiştir. Kanlı agarda beta hemoliz oluşturan S tipi kolonilerden gram boyalı preparat hazırlanarak, mikroskopik morfolojileri ve dizilişleri *S. aureus*'u düşündüren gram pozitif koklardan katalaz, koagülaz ve tüpte koagülaz testleri yapılmış, katalaz ve koagülaz testleri pozitif bulunan kolonilerden mannitol salt agara pasaj yapılmış, mannitolü fermente ederek sarı-turuncu koloniler oluşturan koloniler seçilmiştir. Daha sonra bu suşların DNaz aktiviteleri incelenmiş ve DNaz

pozitif bulunanlar *S. aureus* olarak tanımlanmıştır. *S. aureus*'un idantifikasyon şeması Çizelge 2.1. de verilmiştir (Bannerman, 2003).

Çizelge 2.1. *S. aureus* idantifikasyon şeması

ÖRNEK	Kanlı agada β-hemoliz	Gram boyası	Katalaz	Koagülaz	Tüp koagülaz	Mannitol ferment. (MTA)	DNaz agar testi	Tüpte DNaz testi	SONUÇ
Burun									<input type="checkbox"/> <i>S. aureus</i> <input type="checkbox"/> KNS
Koltuk altı									<input type="checkbox"/> <i>S. aureus</i> <input type="checkbox"/> KNS
Yara									<input type="checkbox"/> <i>S. aureus</i> <input type="checkbox"/> KNS
Diğer									<input type="checkbox"/> <i>S. aureus</i> <input type="checkbox"/> KNS

İzole edilen mikroorganizmalardan saf kültür elde edilerek %16 gliserollü buyyona inoküle edilmiş, 24 saat 37C°'de inkübasyona bırakılmış ve yapılması planlanan çalışmalar için -20C°'de saklanmıştır.

### 2.2.3.1. Katalaz Testi

Katalaz, hidrojen peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)'i parçalayarak su ve oksijene dönüştüren enzimdir. İzole edilen *S. aureus* suşlarında katalaz aktivitesini araştırmak için, bakteri kolonisinden alınan bir parça, temiz bir lam üzerinde bir damla fizyolojik tuzlu su (FTS) içerisinde süspansedilmiş ve üzerine 1-2 damla taze hazırlanmış %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> damlatılmıştır. Oksijen kabarcıklarının oluşması testin pozitif olduğunu göstermiştir. Eritrositlerde de katalaz enzimi bulunduğundan dolayı, test edilecek bakteri kan içermeyen bir besiyerinden alınmıştır. *Staphylococcus* türleri katalaz pozitif, *Streptococcus* türleri katalaz negatiftir. Pozitif kontrol olarak *S. aureus* standard suşu kullanılmıştır (Arda, 2000; Forbes, 2007).

### 2.2.3.2. Koagülaz Testi

Lam deneyinde, kültür filtratına geçmeyen ve bakteri hücresi yüzeyinde bulunan “bağlı koagülaz” (clumping factor = kümeleştirici faktör) araştırılmıştır. Bakteri yüzeyindeki faktörün plazmadaki fibrinojeni pıhtılaştırması bakterilerin kümeleşmesine yol açmaktadır. Lam testinde temiz bir lamın uç kısımlarına birer damla distile su damlatılmış, kolonilerinden öze ile bir miktar alınarak homojen süspansiyonlar elde edilmiş ve elde edilen bu süspansiyonların birisinin üzerine bir damla EDTA’lı tavşan plazması, diğerinin üzerine bir damla FTS damlatılmıştır. Tavşan plazması damlatılan tarafta 5-10 saniye içerisinde gözle görülür kümelerin oluşması testin pozitif olduğunu göstermiştir (FTS damlatılan tarafta kümeleşmenin olmaması beklenir). Pozitif ve negatif kontrol olarak sırasıyla *S. aureus* ve *S. epidermidis* standard suşları kullanılmıştır (Bannerman, 2003; Koneman, 2006; Forbes, 2007).

Tüp deneyinde, bakterilerin buldukları ortama saldıkları “bağlı olmayan koagülaz” araştırılmıştır. Liyofilize halde temin edilen EDTA’lı tavşan plazması üretici firmanın (BBL) önerileri doğrultusunda önce 3 ml steril distile su ile sulandırılmış, 0,5'er ml küçük steril tüplere dağıtılmış, üzerlerine üreme olan 0,3 ml brain heart infusion broth veya katı besiyerinden öze ile alınan birkaç koloni ilave edilerek 35C°de inkübe edilmiştir. İlk 4 saatte pıhtı oluşması (süspansiyonun jel halini alması) testin pozitif olduğunu göstermiştir. Koagülaz pozitif suşların çoğu 4 saat içerisinde plazmanın pıhtılaşmasına yol açarken, pıhtı oluşmaması halinde süspansiyon oda ısısında 24 saate kadar bekletilmiştir ve pıhtılaşma oluşmayan testler negatif olarak değerlendirilmiştir (Arda, 2000; Bannerman, 2003; Koneman, 2006; Forbes, 2007).

### **2.2.3.3. Mannitol Tuz Agar (MTA)**

Mannitol fermentasyon testi için, saf kültür olarak izole edilen suşlar MTA'a inoküle edilmiş ve aerob ortamda 35C°'de 18-24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Mannitolü fermente eden suşlar besiyerinde sarı-turuncu renge koloniler oluşturmuştur (Bannerman, 2003; Koneman, 2006; Forbes, 2007).

### **2.2.3.4. DNaz Testi**

DNaz agar testi için, saf kültür olarak izole edilen suşlar DNaz Agara inoküle edilmiş ve aerob ortamda 35C°'de 13-24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra besiyerinin üzerine 1N HCl damlatılmış, üreme bölgesinin etrafında saydam bir zon oluşan koloniler DNaz pozitif olarak kabul edilmiştir. DNaz negatif kültürlerde üreme bölgesinin etrafında opak bir görünüm izlenmiştir (Bannerman, 2003; Koneman, 2006; Forbes, 2007).

### **2.2.3.5. Tüpte DNaz Testi**

DNaz aktivitesi incelenecek bakteri kolonisinden bir öze dolusu alınarak eppendorf tüpünde 100 µl BHIB besiyeri içerisinde süspanse edilmiş ve üzerine 20 µl genomik DNA ilave edilmiş, 37C°'de 2-8 saat süreyle çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra örnekler 7,000 devir/dakikada 5 dakika süreyle santrifüj edilmiş, her bir tüpten 10 µl alınarak, 1 saat 100 volt elektrik akımında %2'lik agaroz jelde yürütülmüş ve ultraviyole (UV) transilluminatör ile değerlendirilmiştir. Jelde DNA degradasyonu DNaz testinin pozitif olduğunu göstermiştir.

#### 2.2.4. Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

*S. aureus* olarak tanımlanan suşların antibakteriyel duyarlılıkları Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile, CLSI'nin önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla önce antibakteriyel duyarlılık paterni incelenecek bakterinin taze kültüründen steril FTS içerisinde, 0,5 McFarland standardına ( $10^5$  bakteri/ml) göre süspansiyonu hazırlanmış ve steril bir eküvyon yardımıyla MHA besiyerinin yüzeyine homojen olarak yayılmıştır. 10-15 dakika bekletildikten sonra standart miktarda antibakteriyel ajan içeren diskler besiyerinin yüzeyine belirli aralıklarla yerleştirilmiş, 18-24 saatlik inkübasyonu takiben oluşan inhibisyon zonları değerlendirilmiştir (Wikler, 2007).

##### 2.2.4.1. Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus* Suşlarının Belirlenmesi

Metisilin dirençli *S. aureus* suşlarının belirlenmesi amacıyla konvensiyonel olarak sefoksitin disk difüzyonu, oksasilin disk difüzyonu, oksasilin tuz tarama besiyeri ve “okasilin direnç tarama agar besiyeri (ORSAB)” testleri kullanılmıştır. Ayrıca PZR yöntemiyle, potansiyel olarak MRSA kabul edilen suşların *mecA* geninin bulunup bulunmadığı da araştırılmıştır (Wikler, 2007).

##### 2.2.4.1.1. Sefoksitin Disk Difüzyon Testi

Fenotipik metisilin direncinin araştırılması için sefoksitin disk difüzyon testi CLSI'nin önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla önce *S. aureus* olarak tanımlanan suşların taze kültüründen steril FTS içerisinde, 0,5 McFarland standardına göre süspansiyonu hazırlanmış ve steril bir eküvyon yardımıyla MHA besiyerinin yüzeyine homojen olarak yayılmıştır. 10-15 dakika bekletildikten sonra besiyerinin yüzeyine sefoksitin (30 µg) diski yerleştirilmiştir, 35C°'de 24 saat inkübasyonu takiben oluşan inhibisyon zonları değerlendirilmiştir. CLSI'nin 2007 kriterlerine göre 21 mm ve 21 mm'den küçük ( $R \leq 21$  mm) inhibisyon zonu metisilin

dirençli, 22 mm ve 22 mm'den büyük ( $S \geq 22$  mm) inhibisyon zonu ise metisilin duyarlı olarak kabul edilmiştir (Wikler, 2007).

#### **2.2.4.1.2. "Oksasilin Tuz Tarama Agar" Testi**

"Oksasilin tuz tarama agar" testi 6 µg/ml oksasilin ve %4 (w/v) NaCl içeren MHA'da, CLSI'nin önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla önce *S. aureus* olarak tanımlanan suşların taze kültüründen steril FTS içerisinde, 0,5 McFarland standardına göre süspansiyonu hazırlanmış, otomatik pipet ile 1 µl besiyerinin yüzeyine inoküle edilmiş ve inokulum öze ile 10-15 mm çapında bir alana yayılmıştır. Normal atmosfer şartlarında, 35C°de 24 saat inkübasyonu takiben, ekim alanında üremenin (tek bir koloni bile olsa) görülmesi durumunda metisiline dirençli *S. aureus* olarak değerlendirilmiştir (Wikler, 2007).

#### **2.2.4.1.3. "Oksasilin Direnç Tarama Agar Besiyeri (ORSAB)"**

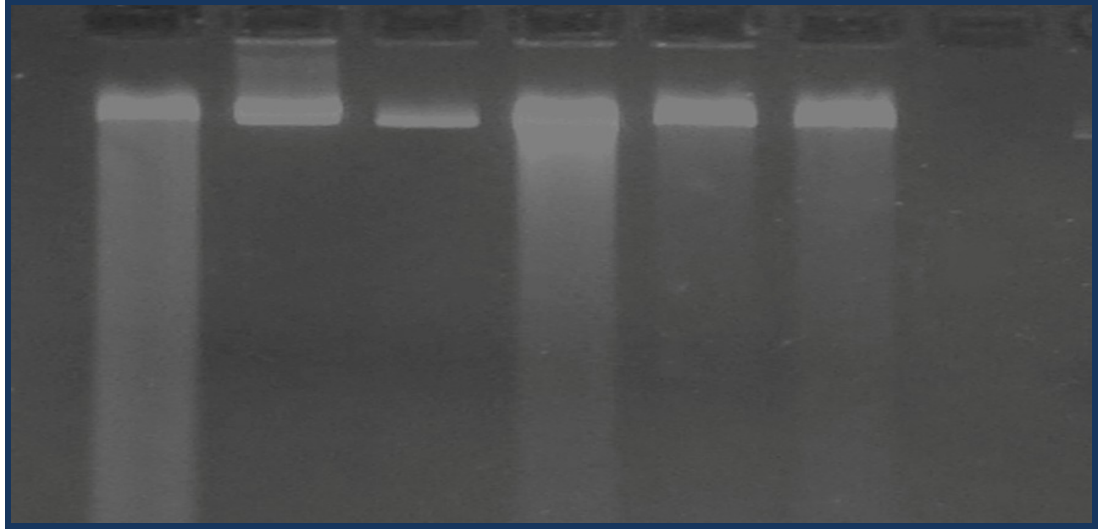
ORSAB testi 2 µg/ml oksasilin ve 50,000 Ü polimiksin B içeren %5,5 NaCl'li besiyerinde yapılmıştır. Bunun için FTS içerisinde 0,5 McFarland standardına göre bakteri süspansiyonu hazırlanmış, sonra steril eküvyonla ORSAB besiyerinin üzerine çizgi şeklinde sürülmüştür. Daha sonra normal atmosferde 35C°de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Besiyerinin üzerindeki mavi renkli koloniler, metisiline dirençli *S. aureus* olarak değerlendirilmiştir (Nahimana, 2006).

#### **2.2.4.1.4. TK-MRSA'ların Genotipik Yöntemler ile Tanımlanması**

İzolatların tanımlanmasında ve tiplendirilmesinde PZR yöntemleri kullanılmıştır.

#### 2.2.4.1.4.1. Bakteriyel Genomik DNA Ekstraksiyonu

*mecA*, *SCCmec*, *ccr* gen kompleks ve PVL (*lukS*-PV ve *lukF*-PV) tayini için *S. aureus*, izolatlarının DNA ekstraksiyonu daha önce tarif edildiği şekilde yapılmıştır (Okamoto ve ark. 1996; Ida ve ark. 2001). Bu amaçla, %5'lik koyun kanlı agarda saf kültür olarak elde edilen *S. aureus* suşları 500 µl distile suda süspanse edilmiş, 11,000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiş, süpernatant atıldıktan sonra üzerine 100 µl erime solüsyonu (20 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 5 mM EDTA [pH 8,0]) ve 250 µg (2,5 Ü) lizostafin ilave edilmiştir. Örnekler 37C°'de 4 saat inkübasyona bırakılmış, sonra 200 µl distile su ilave edilmiş ve 95C°'de 5 dakika su banyosunda bekletilerek hücreler patlatılmıştır. Üzerine 300 µl fenol: kloroform: izoamil alkol (25: 24: 1) karışımı ilave edilerek 10 dakika vortekslenmiştir. Daha sonra örnekler 10 dakika buz içerisinde bekletilmiş ve 11,000 rpm ve 4C°'de 10 dakika süreyle santrifüjlenmiştir. Süpernatant pipet yardımı ile alınarak yeni bir tüpe aktarılmış ve üzerine 500 µl kloroform eklenmiştir. Tüpler tekrar 10 dakika vortekslenmiş, tekrar 10 dakika buz içerisinde bekletilmiş ve 11,000 rpm ve 4C°'de 10 dakika süreyle santrifüjlenmiştir. Süpernatant pipet yardımı ile alınarak yeni bir tüpe aktarılmış, üzerine 1,000 µl %99'luk etil alkol ve 50 µl sodyum asetat ilave edilmiş ve bir gece -20C°'de bekletilmiştir. Sonra 11,000 rpm'de, 4C°'de 5 dakika santrifüjlenmiş, alkol dökülerek üzerine 1,000 µl %70'lik etil alkol ilave edilerek bir kez daha yıkanmıştır. Sonra tekrar 11,000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiş, süpernatant dökülmüş, tüpler kurutulduktan sonra üzerine 100 µl distile su veya TE tampon (10 mM Tris-HCl [pH 8,0], 1 mM EDTA [pH 8,0]) konularak 37C°'de 10 dakika inkübe edilmiştir. İzole edilen DNA'ların varlığı %1'lik agaroz jel elektroforezinde gösterilerek, şablon DNA olarak -20C°'de saklanmıştır (Şekil 2.2) (Okamoto ve ark. 1996; Ida ve ark. 2001'de).



**Şekil 2.2.** DNA varlığının %1'lik agaroz jel elektroforezinde görüntüsü

#### 2.2.4.1.4.2. *mecA* Geni Tayini

*mecA* geninin amplifikasyonu amacıyla, *mecA1* ve *mecA2* primerleri kullanılarak, Araj ve ark. (Araj, 1999) tarafından tanımlanan ve Johnsson ve ark. (Johnsson, 2004) tarafından modifiye edilen PZR yöntemi kullanılmıştır (Çizelge 2.2). Bu primerler ile yapılan PZR sonucunda 310 baz çiftlik ürün oluşmaktadır.

**Çizelge 2.2.** *mecA1* ve *mecA2* primerlerinin dizisi

Primer	Dizi (5'-3')	Amplikon Büyüklüğü
<i>mecA1</i>	(5'-GTAGAAATGACTGAACGTCGGATAA-3')	310 bp
<i>mecA2</i>	(5'-CCAATTCACATTGTTTCGGTCTAA-3')	

#### **PZR Yöntemi ile *mecA* Geninin Amplifikasyonu**

*mecA* geninin amplifikasyonu amacıyla, DNA örneklerinden 30 ng alınarak kalıp DNA olarak PZR karışımına eklenmiştir (Araj, 1999). PZR karışımını hazırlamak için 10X PZR tamponuna 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP, her bir primerden 50'şer pmol, 2 Ü *Taq* DNA polimeraz enzimi ve önceden hesaplanarak belirlenen miktarda distile su, son hacim 50 µl olacak şekilde ilave edilmiştir. Örnekler termal döngü cihazında ilk denatürasyon için 94C°'de 5 dakika bekletildikten sonra, her bir döngü

sırasıyla 94C°'de 30 saniye, 55C°'de 30 saniye ve 72C°'de 30 saniye olacak şekilde, 30 döngü çalışılmıştır. Son olarak örnekler 72C°'de 10 dakika bekletilerek PZR sonlandırılmıştır (Araj, 1999; Adaleti, 2008).

PZR protokolu	Master mix (MIX)	N
dH <sub>2</sub> O		×N
Tampon	10X (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	×N
dNTP	200 µM	×N
MgCl <sub>2</sub>	2,5 mM	×N
Primer F ( <i>mecA1</i> )	50 pmol	×N
Primer R ( <i>mecA2</i> )	50 pmol	×N
Taq polimeraz	2 Ü	×N
DNA	30 ng	×N

TV = 50 µl×N

#### PZR programı

Başlangıç denatürasyonu	94C°'de 5 dakika	} 30 döngü
Denatürasyon aşaması	94C°'de 30 saniye	
Primerlerin yapışması (annealing)	55C°'de 30 saniye	
Sentez (uzama) aşaması	72C°'de 30 saniye	
Son uzama	72C°'de 10 dakika	

Negatif kontrol olarak metisiline duyarlı (*S. aureus* ATCC 95045), pozitif kontrol olarak GRE-14, HPV-107, BK-2464, HUSA-304, HDE-288 ve HSJ-216 suşları kullanılmıştır. GRE-14 tip IV'e, HPV-107 tip I<sub>A</sub>'ya, BK-2464 tip II'ye, HUSA-304 tip III'e, HCY-216 tip III<sub>A</sub>'ya ve HDE-288 tip VI'e karşılık gelmektedir (Milheiriço, 2007).

#### ***mecA* PZR Ürününün Agaroz Jel Elektroforezinde Saptanması**

*mecA* ürünün saptanması amacıyla 10 µl PZR ürünü, 2 µl yükleme solüsyonu (6X Orange DNA Loading Dye) ile süspansiyon edilerek, 0,5X TBE tampon ile hazırlanan %2'lik agarozda jel elektroforezi yapılmıştır. Agaroz jelde yürütülen ampikon 0,5 µg/ml etidyum bromür ile işaretlenmiş ve 60 dakika 80 Volt elektrik akımına tabi tutulduktan sonra, UV transilluminatör ile değerlendirilmiştir (Mulvey, 2001;

Podzorski, 2004). PZR ürününün büyüklüğü moleküler büyüklük belirteci (O'RangeRuler 50 bp DNA Ladder) bantları ile karşılaştırılarak doğrulanmış ve jeller dijital fotoğraf makinesi ile görüntülenmiştir.

#### 2.2.4.1.4.3. SCCmec Tiplerinin Multipleks PZR ile Tayini

*mecA* pozitif örneklerde SCCmec I, II, III, IV, V ve VI tipleri Milheiriço ve ark.'nın multipleks PZR yöntemi kullanılarak çalışılmıştır. Bu amaçla çizelge 2.3'te görülen primerler kullanılmıştır. Bu primerler ile yapılan PZR sonucunda 162, 209, 243, 284, 311, 342, 377, 414, 449, 495 baz çiftlik ürünler oluşmaktadır (Milheiriço, 2007).

Çizelge 2.3. SCCmec tip tayinide kullanılan primer dizileri (Milheiriço, 2007)

Primer	Dizi (5'-3')	SCCmec tipi	Amplikon Büyüklüğü
<b>CIF2 F2</b> <b>CIF2 R2</b>	TTC GAG TTG CTG ATG AAG AAG G ATT TAC CAC AAG GAC TAC CAG C	I-J1 region	495 bp
<b>ccrCF2</b> <b>ccrCR2</b>	GTA CTC GTT ACA ATG TTT GG ATA ATG GCT TCA TGC TTA CC	V- <i>ccr</i> kompleks	449 bp
<b>RIF5 F10</b> <b>RIF5 R13</b>	TTC TTA AGT ACA CGC TGA ATC G GTC ACA GTA ATT CCA TCA ATG C	III-J3 region	414 bp
<b>SCCmecVJ1F</b> <b>SCCmecVJ1R</b>	TTC TCC ATT CTT GTT CAT CC AGA GAC TAC TGA CTT AAG TGG	V-J1 region	377 bp
<b>des F2</b> <b>des R1</b>	CAT CCT ATG ATA GCT TGG TC CTA AAT CAT AGC CAT GAC CG	I, II, IV, VI-J3 region	342 bp
<b>ccrB2F2</b> <b>ccrB2R2</b>	AGT TTC TCA GAA TTC GAA CG CCG ATA TAG AAW GGG TTA GC	II, IV- <i>ccr</i> kompleks	311 bp
<b>kdp F1</b> <b>kdp R1</b>	AAT CAT CTG CCA TTG GTG ATG C CGA ATG AAG TGA AAG AAA GTG G	II-J1 region	284 bp
<b>SCCmecIIIJ1F</b> <b>SCCmecIIIJ1R</b>	CAT TTG TGA AAC ACA GTA CG GTT ATT GAG ACT CCT AAA GC	III-J1 region	243 bp
<b>mecI P2</b> <b>mecI P3</b>	ATC AAG ACT TGC ATT CAG GC GCG GTT TCA ATT CAC TTG TC	II, III- <i>mec</i> kompleks	209 bp
<b>mecAP4</b> <b>mecAP7</b>	TCC AGA TTA CAA CTT CAC CAG G CCA CTT CAT ATC TTG TAA CG	İnternal pozitif kontrol	162 bp

#### 2.2.4.1.4.4. SCCmec Multipleks PZR Amplifikasyonu

*mecA* pozitif örneklerde SCCmec tip tayini amacıyla, DNA örneklerinden 5 ng alınarak kalıp DNA olarak PZR karışımına eklenmiştir (Milheiriço, 2007). PZR karışımını hazırlamak için 10X PZR tamponuna 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP, her

bir primerden protokola uygun (0,2  $\mu$ M, 0,4  $\mu$ M, 0,8  $\mu$ M), 1,25 Ü *Taq* DNA polimeraz enzimi ve önceden hesaplanarak belirlenen miktarda distile su, son hacim 50  $\mu$ l olacak şekilde ilave edilmiştir. Örnekler termal döngü cihazında ilk denatürasyon için 94C°'de 4 dakika bekletildikten sonra, her bir döngü sırasıyla 94C°'de 30 saniye, 53C°'de 30 saniye ve 72C°'de 1 dakika olacak şekilde, 30 döngü çalışılmıştır. Son olarak örnekler 72C°'de 4 dakika bekletilerek PZR sonlandırılmıştır (Milheiriço, 2007).

PZR protokolu	Master mix (MIX)	N
dH <sub>2</sub> O		×N
Tampon	10X (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	×N
dNTP	200 $\mu$ M	×N
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	×N
Primer CIF2 R2	0,4 $\mu$ M	×N
Primer CIF2 F2	0,4 $\mu$ M	×N
Primer <i>ccrC</i> F2	0,8 $\mu$ M	×N
Primer <i>ccrC</i> R2	0,8 $\mu$ M	×N
Primer RIF5 F10	0,4 $\mu$ M	×N
Primer RIF5 R13	0,4 $\mu$ M	×N
Primer SCC <i>mec</i> VJ1F	0,4 $\mu$ M	×N
Primer SCC <i>mec</i> VJ1R	0,4 $\mu$ M	×N
Primer <i>dcs</i> F2	0,8 $\mu$ M	×N
Primer <i>dcs</i> R1	0,8 $\mu$ M	×N
Primer <i>ccrB2</i> F2	0,8 $\mu$ M	×N
Primer <i>ccrB2</i> R2	0,8 $\mu$ M	×N
Primer <i>kdp</i> F1	0,2 $\mu$ M	×N
Primer <i>kdp</i> R1	0,2 $\mu$ M	×N
Primer SCC <i>mec</i> IIIJ1F	0,4 $\mu$ M	×N
Primer SCC <i>mec</i> IIIJ1R	0,4 $\mu$ M	×N
Primer <i>mecI</i> P2	0,8 $\mu$ M	×N
Primer <i>mecI</i> P3	0,8 $\mu$ M	×N
Primer <i>mecAP4</i>	0,8 $\mu$ M	×N
Primer <i>mecAP7</i>	0,8 $\mu$ M	×N
<i>Taq</i> polimeraz	1,25 Ü	×N
DNA	5 ng	×N

TV = 50  $\mu$ l×N

**PZR programı**

Başlangıç denatürasyonu .....	94C°'de 4 dakika	} 30 döngü
Denatürasyon aşaması .....	94C°'de 30 saniye	
Primerlerin yapışması (annealing) .....	53C°'de 30 saniye	
Sentez (uzama) aşaması .....	72C°'de 1 dakika	
Son uzama .....	72C°'de 4 dakika	

Negatif kontrol olarak MSSA (*S. aureus* ATCC 95045), pozitif kontrol olarak GRE-14, HPV-107, BK-2464, HUSA-304, HDE-288 ve HSJ-216 suşları kullanılmıştır. GRE-14 tip IV'e, HPV-107 tip I<sub>A</sub>'ya, BK-2464 tip II'ye, HUSA-304 tip III'e, HJ-216 tip III<sub>A</sub>'ya ve HDE-288 tip VI'e karşılık gelmektedir (Milheiriço, 2007).

**SCC<sub>mec</sub> PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Saptanması**

SCC<sub>mec</sub> ürünlerinin saptanması amacıyla 10 µl PZR ürünü, 2 µl yükleme solüsyonu (6X Orange DNA Loading Dye) ile süspansiyon edilerek, 0,5X TBE tampon ile hazırlanan %3'lük agarozda jel elektroforezi yapılmıştır. Agaroz jelde yürütülen amplikon 0,5 µg/ml etidyum bromür ile işaretlenmiş ve 2,5 saat 4 Volt/cm elektrik akımına tabi tutulduktan sonra, UV transilluminatör ile değerlendirilmiştir (Milheiriço, 2007). PZR ürününün büyüklüğü moleküler büyüklük belirteci (O'RangeRuler 50 bp DNA Ladder) bantları ile karşılaştırılarak doğrulanmış ve jeller dijital fotoğraf makinesi ile görüntülenmiştir (Çizelge 2.4).

**Çizelge 2.4.** SCC<sub>mec</sub> tipilerinin amplikon büyüklükleri

SCC <sub>mec</sub> Tipi	Amplikon Büyüklüğü (bp)
<b>Tip I</b>	162-342-495
<b>Tip II</b>	162-209-284-311-342
<b>Tip III</b>	162-209-243-414
<b>Tip IV</b>	162-311-342 (IVa, b, c, d, g, h) / 162-311 (IV E/F)
<b>Tip V</b>	162-377-449
<b>Tip VI</b>	162-342

#### 2.2.4.1.4.5. Kaset Kromozom Rekombinaz (*ccr*) Tip Tayini

- 1) *ccr* gen kompleksi (*ccr* gen kompleks [tip 1 *ccr*, tip 2 *ccr*, tip 3 *ccr*] ve *ccrC* gen kompleksi [tip V *ccr*])
- 2) *mec* gen kompleksi (*mecR1* [ms domain], *mecA*, *mecA-IS431mec*, Class C *mec* gen, Class B *mec* gen ve Class A *mec* gen).

##### 2.2.4.1.4.5.1. *ccr* Gen Kompleksi

*mecA* pozitif örneklerde tip 1, 2, 3, *ccr* gen kompleksi tip tayini Okuma ve ark.'nın (Okuma, 2002) önerdiği multipleks PZR yöntemi ile çalışılmıştır. Bu amaçla çizelge 2.5'te görülen primerler kullanılmıştır. Bu primerler ile yapılan PZR sonucunda 560, 700, 1,000, 1,600 baz çiftlik ürünler oluşmaktadır (Okuma, 2002).

Çizelge 2.5. *ccr* Gen Kompleksinde kullanılan primer dizileri (Okuma, 2002)

Primer	Dizi (5'-3')	<i>ccr</i> gen kompleksi	Amplikon Büyüklüğü
$\beta c$ ( $\beta 2$ )	ATT GCC TIG ATA ATA GCC ITC T	Tüm <i>ccrB</i> tiplerinde	
$\alpha c$	ATC TAT TTC AAA AAT GAA CCA	$\beta c$ (tüm <i>ccrA</i> tiplerinde)	560 bp
$\alpha 1$ ( $\alpha 2$ )	AAC CTA TAT CAT CAA TCA GTA CGT	$\beta c$ ( <i>ccrA</i> tip 1'de)	700 bp
$\alpha 2$ ( $\alpha 3$ )	TAA AGG CAT CAA TGC ACA AAC ACT	$\beta c$ ( <i>ccrA</i> tip 2'de)	1 kbp
$\alpha 3$ ( $\alpha 4$ )	AGC TCA AAA GCA AGC AAT AGA AT	$\beta c$ ( <i>ccrA</i> tip 3'de)	1,6 kbp

##### *ccr* Gen Komplekslerinin PZR Amplifikasyonu

*mecA* pozitif örneklerde *ccr* gen kompleks tip tayini amacıyla, DNA örneklerinden 5 ng alınarak kalıp DNA olarak PZR karışımına eklenmiştir. PZR karışımını hazırlamak için 10X PZR tamponuna 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M dNTP, her bir primerden protokola uygun [ $\alpha 1$  ( $\alpha 2$ ),  $\alpha 2$  ( $\alpha 3$ ),  $\alpha 3$  ( $\alpha 4$ ) primerden 20 pmol ve  $\beta c$  ( $\beta 2$ ) primerinden 3 $\times$ 20 pmol], 2,5 Ü *Taq* DNA polimeraz enzimi ve önceden hesaplanarak belirlenen miktarda distile su, son hacim 50  $\mu$ l olacak şekilde ilave edilmiştir. Örnekler termal döngü cihazında ilk denatürasyon için 94C°'de 5 dakika bekletildikten sonra, her bir döngü sırasıyla 94C°'de 30 saniye, 48C°'de 1 dakika ve

72C°'de 2 dakika olacak şekilde, 30 döngü çalışılmıştır. Son olarak örnekler 72C°'de 7 dakika bekletilerek PZR sonlandırılmıştır (Okuma, 2002).

PZR protokolu	Master mix (MIX)	N
dH <sub>2</sub> O		×N
Tampon	10X (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	×N
dNTP	200 µM	×N
MgCl <sub>2</sub>	2,5 mM	×N
Primer α (α2)	20 pmol	×N
Primer α2 (α3)	20 pmol	×N
Primer α3 (α4)	20 pmol	×N
Primer βc (β2)	3×20 pmol	×N
Taq polimeraz	2,5 Ü	×N
DNA	5,0 ng	×N

TV = 50 µl×N

#### PZR programı

Başlangıç denatürasyonu	94C°'de 5 dakika	} 30 döngü
Denatürasyon aşaması	94C°'de 30 saniye	
Primerlerin yapışması (annealing)	48C°'de 1 dakika	
Sentez (uzama) aşaması	72C°'de 2 dakika	
Son uzama	72C°'de 7 dakika	

Pozitif kontrol olarak GRE-14, HPV-107, HUSA-304 suşları kullanılmıştır. GRE-14 tip 2'ye, HPV-107 tip 1'e, HUSA-304 tip 3'e karşılık gelmektedir.

#### **ccr Gen Kompleks PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Saptanması**

ccr gen kompleks ürünlerinin saptanması amacıyla 10 µl PZR ürünü, 2 µl yükleme solüsyonu (6X Orange DNA Loading Dye) ile süspansiyon edilerek, 0,5X TBE tampon ile hazırlanan %1'lik agarozda jel elektroforezi yapılmıştır. Agaroz jelde yürütülen ampikon 0,5 µg/ml etidyum bromür ile işaretlenmiş ve 1,5 saat 100 volt elektrik akımına tabi tutulduktan sonra, UV transilluminatör ile değerlendirilmiştir (Katayama, 2001; Ito, 2001; Okuma, 2002). PZR ürününün büyüklüğü, moleküler büyüklük belirteci (MassRule DNA Ladder Mix [80-10,000 bp]) bantları ile

karşılaştırılarak doğrulanmış ve jeller dijital fotoğraf makinesi ile görüntülenmiştir (Çizelge 2.6).

**Çizelge 2.6.** *ccr* gen komplekslerinin amplicon büyüklükleri

<i>ccr</i> gen kompleksi	Amplicon Büyüklüğü
<b>Tüm <i>ccrB</i> tiplerinde</b>	
<b>Tüm <i>ccrA</i> tiplerinde</b>	560 bp
<b>Tip 1 <i>ccrA</i> (ccA1)</b>	700 bp
<b>Tip 2 <i>ccrA</i> (ccA2)</b>	1 kbp
<b>Tip 2 <i>ccrA</i> (ccA3)</b>	1,6 kbp

#### 2.2.4.1.4.5.2. *ccrC* Gen Kompleksi

*mecA* pozitif örneklerde *ccrC* gen kompleksi tip tayini Ito ve ark.'nın önerdiği PZR yöntemi ile çalışılmıştır. *ccrC* sadece tip V'te bulunmaktadır. Bu amaçla çizelge 2.7'de görülen primerler kullanılmıştır. Bu primerler ile yapılan PZR sonucunda 520 baz çiftlik ürün oluşmaktadır (Ito, 2004).

**Çizelge 2.7.** *ccrC* gen kompleksin primerleri ve amplicon büyüklükleri

Primer	Dizi (5'-3')	Tip	Amplicon Büyüklüğü
<i>ccrCF</i>	CGT CTA TTA CAA GTA GTT AAG GAT AAT	Sadece tip V	520 bp
<i>ccrCR</i>	CCT TTA TAG ACT GGA TTA TTC AAA ATA T		

#### ***ccrC* Gen Kompleksin PZR Amplifikasyonu**

*mecA* pozitif örneklerde *ccrC* gen kompleks tip tayini amacıyla, DNA örneklerinden 5 ng alınarak kalıp DNA olarak PZR karışımına eklenmiştir. PZR karışımını hazırlamak için 10X PZR tamponuna 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP, her bir primerden protokola uygun 20 pmol, 1 Ü *Taq* DNA polimeraz enzimi ve önceden hesaplanarak belirlenen miktarda distile su, son hacim 25 µl olacak şekilde ilave edilmiştir. Örnekler termal döngü cihazında ilk denatürasyon için 94C°'de 5 dakika bekletildikten sonra, her bir döngü sırasıyla 94C°'de 30 saniye, 55C°'de 30 saniye ve 72C°'de 1 dakika olacak şekilde, 30 döngü çalışılmıştır. Son olarak örnekler 72C°'de 7 dakika bekletilerek PZR sonlandırılmıştır (Okuma, 2002).

PZR protokolu	Master mix (MIX)	N
dH <sub>2</sub> O		×N
Tampon		10X (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ×N
dNTP		200 µM ×N
MgCl <sub>2</sub>		1,5 mM ×N
Primer <i>ccrCF</i>		20 pmol×N
Primer <i>ccrCR</i>		20 pmol×N
<i>Taq</i> polimeraz		1 Ü×N
DNA		5 ng×N

TV = 25 µl×N

### PZR programı

Başlangıç denatürasyonu	94C°'de 5 dakika	} 30 döngü
Denatürasyon aşaması	94C°'de 30 saniye	
Primerlerin yapışması (annealing)	55C°'de 30 saniye	
Sentez (uzama) aşaması	72C°'de 1 dakika	
Son uzama	72C°'de 7 dakika	

Pozitif kontrol olarak P78, P39, P71, P58 suşları kullanılmıştır (bu suşlar, daha önceki çalışmalardan *ccrC* pozitif oldukları bilinen suşlardır) (Karahan, 2008).

### ***ccrC* Gen Kompleks PZR Ürününün Agaroz Jel Elektroforezinde Saptanması**

*ccrC* gen kompleks ürünlerinin saptanması amacıyla 10 µl PZR ürünü, 2 µl yükleme solüsyonu (6X Orange DNA Loading Dye) ile süspanse edilerek, 0,5X TBE tampon ile hazırlanan %1'lik agarozda jel elektroforezi yapılmıştır. Agaroz jelde yürütülen amplikon 0,5 µg/ml etidyum bromür ile işaretlenmiş ve 1 saat 100 volt elektrik akımına tabi tutulduktan sonra, UV transilluminatör ile değerlendirilmiştir (Okuma, 2002). PZR ürününün büyüklüğü, moleküler büyüklük belirteci (O'RangeRuler 50 bp DNA Ladder) bantları ile karşılaştırılarak doğrulanmış ve jeller dijital fotoğraf makinesi ile görüntülenmiştir.

### 2.2.4.1.4.5.3. *mec* Gen Kompleksi

*mecA* pozitif örneklerde *mec* gen kompleksi (*mecR1* [ms domain], *mecA*, *mecA-IS431mec*, Class C *mec* gen, Class B *mec* gen ve Class A *mec* gen) Ito ve ark.'nın (Ito,2004) önerdiği PZR yöntemi ile çalışılmıştır. Bu amaçla çizelge 2.8'de görülen primerler kullanılmıştır. Bu primerler ile yapılan PZR sonucunda 310, 200, 4000, 3000, 2000, 180, 320 baz çiftlik ürünler oluşmaktadır(Okuma, 2002;Ito,2004). DNA örneklerinden 10 ng alınarak kalıp DNA olarak PZR karışımına eklenmiştir (Kondo, 2007).

**Çizelge 2.8.** *mec* gen kompleksinin primer dizileri ve amplicon büyüklükleri

<i>mec</i> Gen Kompleks				
	Primer	Dizi (5'-3')	Amplicon	TiP
<i>mecR1</i> (ms domain)	<i>mecR4</i> ( <i>mecR</i> -ms domain)	GTC GTT CAT TAA GAT ATG ACG	310 bp	II
	<i>mecR3</i> ( <i>mecR</i> -ms domain)	GTC TCC ACG TTA ATT CCA TT		
<i>mecA</i>	mA1 ( <i>mecA</i> )	TGC TAT CCA CCC TCA AAC AGG	200 bp	II, IV
	mA2 ( <i>mecA</i> )	AAC GTT GTA ACC ACC CCA AGA		
<i>mecA-IS431mec</i>	mA1 ( <i>mecA</i> )	TGC TAT CCA CCC TCA AAC AGG	4000 bp	II
	IS2 ( <i>IS431mec</i> )	TGA GGT TAT TCA GAT ATT TCG ATG T		
Class C <i>mec</i> gen	mA2 ( <i>mecA</i> )	AAC GTT GTA ACC ACC CCA AGA	<3000 bp	V
	IS2 ( <i>IS431mec</i> )	TGA GGT TAT TCA GAT ATT TCG ATG T		
Class B <i>mec</i> gen	IS5 ( <i>IS1272</i> )	AAC GCC ACT CAT AAC ATA TGG AA	2000 bp	I, IV
	mA6 ( <i>mecA</i> )	TAT ACC AAA CCC GAC AAC		
Class A <i>mec</i> gen	mI4 ( <i>mecI</i> )	CAA GTG AAT TGA AAC CGC CT	180 bp	II
	mI3 ( <i>mecI</i> )	CAA AAG GAC TGG ACT GGA GTC CAAA		
	mcR2 ( <i>mecR1</i> -PB domain)	CGCTCA GAA ATT TGT TGT GC	320 bp	III
	mcR5 ( <i>mecR1</i> -PB domain)	CAG GGA ATG AAA ATT ATT GGA		

### *mec* Gen Kompleksin PZR Amplifikasyonu

*mecA* pozitif örneklerde *mec* gen kompleksin PZR amplifikasyonu, *mecR1* (ms domain), *mecA*, *mecA-IS431mec*, Class C *mec*, Class B *mec* ve Class A *mec* genleri için ayrı ayrı yapılmış ve özet olarak aşağıda verilmiştir.

### Class C *mec* Gen Kompleks

*mecA* pozitif örneklerde Class C *mec* Gen Kompleks tip tayini amacıyla, DNA örneklerinden 10 ng alınarak kalıp DNA olarak PZR karışımına eklenmiştir. PZR karışımını hazırlamak için 10X PZR tamponuna 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP, her

bir primerden protokola uygun 20 pmol, 2,5 Ü *Taq* DNA polimeraz enzimi ve önceden hesaplanarak belirlenen miktarda distile su, son hacim 25 µl olacak şekilde ilave edilmiştir. Örnekler termal döngü cihazında ilk denatürasyon için 94C°'de 5 dakika bekletildikten sonra, her bir döngü sırasıyla 94C°'de 15 saniye, 50C°'de 30 saniye ve 68C°'de 8 dakika olacak şekilde, 10 döngü çalışılmıştır. PZR'in ikinci aşamasında denatürasyon için her bir döngü sırasıyla 94C°'de 30 saniye, 50C°'de 45 saniye ve 68C°'de 12 dakika olacak şekilde, 20 döngü çalışılmıştır. Son olarak örnekler 72C°'de 5 dakika bekletilerek PZR sonlandırılmıştır.

PZR protokolu	Master mix (MIX)	N
dH <sub>2</sub> O	.....	×N
Tampon	.....	10X (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ×N
dNTP	.....	200 µM×N
MgCl <sub>2</sub>	.....	1,5 mM×N
Primer mA2	.....	20 pmol×N
Primer IS2	.....	20 pmol×N
<i>Taq</i> polimeraz	.....	2,5U×N
DNA	.....	10 ng DNA×N

TV = 25 µl×N

#### PZR programı

Başlangıç denatürasyonu	.....	94C°'de 5 dakika	
Denatürasyon aşaması	.....	94C°'de 15 saniye	} ×10 döngü
Primerlerin yapışması (annealing)	.....	50C°'de 30 saniye	
Sentez (uzama) aşaması	.....	68C°'de 8 dakika	
Denatürasyon aşaması	.....	94C°'de 30 saniye	} ×20 döngü
Primerlerin yapışması (annealing)	.....	50C°'de 45 saniye	
Sentez (uzama) aşaması	.....	68C°'de 12 dakika	
Son uzama	.....	72C°'de 5 dakika	

#### **Class B *mec* Gen Kompleks**

*mecA* pozitif örneklerde Class B *mec* Gen Kompleks tip tayini amacıyla, DNA örneklerinden 10 ng alınarak kalıp DNA olarak PZR karışımına eklenmiştir. PZR karışımını hazırlamak için 10X PZR tamponuna 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP, her bir primerden protokola uygun 20 pmol, 2,5 Ü *Taq* DNA polimeraz enzimi ve önceden hesaplanarak belirlenen miktarda distile su, son hacim 50 µl olacak şekilde ilave edilmiştir. Örnekler termal döngü cihazında ilk denatürasyon için 94C°'de 5

dakika bekletildikten sonra, her bir döngü sırasıyla 94C°'de 15 saniye, 50C°'de 30 saniye ve 68C°'de 8 dakika olacak şekilde, 10 döngü çalışılmıştır. PZR'in ikinci aşamasında denatürasyon için her bir döngü sırasıyla 94C°'de 30 saniye, 50C°'de 45 saniye ve 68C°'de 12 dakika olacak şekilde, 20 döngü çalışılmıştır. Son olarak örnekler 72C°'de 5 dakika bekletilerek PZR sonlandırılmıştır.

<u>PZR protokolu</u>	<u>Master mix (MIX)</u>	<u>N</u>
dH <sub>2</sub> O .....	.....	×N
Tampon .....	.....	10X (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ×N
dNTP .....	.....	200 µM×N
MgCl <sub>2</sub> .....	.....	1,5 mM×N
Primer IS5 .....	.....	20 pmol×N
Primer mA6 .....	.....	20 pmol×N
<i>Taq</i> polimeraz .....	.....	2,5 Ü×N
DNA .....	.....	10 ng×N

TV = 50 µl×N

#### PZR programı

Başlangıç denatürasyonu .....	94C°'de 5 dakika	
Denatürasyon aşaması .....	94C°'de 15 saniye	} ×10 döngü
Primerlerin yapışması (annealing) .....	50C°'de 30 saniye	
Sentez (uzama) aşaması .....	68C°'de 8 dakika	
Denatürasyon aşaması .....	94C°'de 30 saniye	} ×20 döngü
Primerlerin yapışması (annealing) .....	50C°'de 45 saniye	
Sentez (uzama) aşaması .....	68C°'de 12 dakika	
Son uzama .....	72C°'de 5 dakika	

#### **Class A *mec* Gen Kompleks**

##### 1) Class A *mec* (*mecI*) PZR

*mecA* pozitif örneklerde Class A *mec* (*mecI*) tip tayini amacıyla, DNA örneklerinden 10 ng alınarak kalıp DNA olarak PZR karışımına eklenmiştir. PZR karışımını hazırlamak için 10X PZR tamponuna 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP, her bir primerden protokola uygun 20 pmol, 1 Ü *Taq* DNA polimeraz enzimi ve önceden hesaplanarak belirlenen miktarda distile su, son hacim 25 µl olacak şekilde ilave edilmiştir. Örnekler termal döngü cihazında ilk denatürasyon için 94C°'de 5 dakika

bekletildikten sonra, her bir döngü sırasıyla 94C°'de 30 saniye, 56C°'de 30 saniye ve 72C°'de 1 dakika olacak şekilde, 30 döngü çalışılmıştır. Son olarak örnekler 72C°'de 7 dakika bekletilerek PZR sonlandırılmıştır.

PZR protokolu	Master mix (MIX)	N
dH <sub>2</sub> O .....		×N
Tampon .....		10X (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ×N
dNTP .....		200 µM×N
MgCl <sub>2</sub> .....		1 mM×N
Primer mI4 .....		20 pmol×N
Primer mI3 .....		20 pmol×N
Taq polimeraz .....		1 Ü×N
DNA .....		10 ng×N

TV = 25 µl×N

#### PZR programı

Başlangıç denatürasyonu .....	94C°'de 5 dakika	} ×30 döngü
Denatürasyon aşaması .....	94C°'de 30 saniye	
Primerlerin yapışması (annealing) .....	56C°'de 30 saniye	
Sentez (uzama) aşaması .....	72C°'de 1 dakika	
Son uzama .....	72C°'de 7 dakika	

#### 2) Class A *mec* (*mecR1*-PB domain) PZR

*mecA* pozitif örneklerde Class A *mec* (*mecR1*-PB domain) tip tayini amacıyla, DNA örneklerinden 10 ng alınarak kalıp DNA olarak PZR karışımına eklenmiştir. PZR karışımını hazırlamak için 10X PZR tamponuna 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP, her bir primerden protokola uygun 20 pmol, 1 Ü *Taq* DNA polimeraz enzimi ve önceden hesaplanarak belirlenen miktarda distile su, son hacim 25 µl olacak şekilde ilave edilmiştir. Örnekler termal döngü cihazında ilk denatürasyon için 94C°'de 5 dakika bekletildikten sonra, her bir döngü sırasıyla 94C°'de 30 saniye, 50C°'de 30 saniye ve 72C°'de 1 dakika olacak şekilde, 30 döngü çalışılmıştır. Son olarak örnekler 72C°'de 7 dakika bekletilerek PZR sonlandırılmıştır.

PZR protokolu	Master mix (MIX)	N
dH <sub>2</sub> O	.....	×N
Tampon	.....	10X (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ×N
dNTP	.....	200 µM×N
MgCl <sub>2</sub>	.....	1 mM×N
Primer mcR2	.....	20 pmol×N
Primer mcR5	.....	20 pmol ×N
Taq polimeraz	.....	1 Ü×N
DNA	.....	10 ng×N

TV = 25 µl×N

#### PZR programı

Başlangıç denatürasyonu	.....	94C°'de 5 dakika	
Denatürasyon aşaması	.....	94C°'de 30 saniye	} ×30 döngü
Primerlerin yapışması (annealing)	.....	50C°'de 30 saniye	
Sentez (uzama) aşaması	.....	72C°'de 1 dakika	
Son uzama	.....	72C°'de 7 dakika	

#### **mec Gen Kompleksi Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Saptanması**

*mec* gen kompleksi ürünlerinin saptanması amacıyla 10 µl PZR ürünü, 2 µl yükleme solüsyonu (6X Orange DNA Loading Dye) ile süspansiyon edilerek, 0,5X TBE tampon ile hazırlanan %1'lik agarozda jel elektroforezi yapılmıştır. Agaroz jelde yürütülen ampikon 0,5 µg/ml etidyum bromür ile işaretlenmiş ve 1,5 saat 100 Voltta elektrik akımına tabi tutulduktan sonra, UV transilluminatör ile değerlendirilmiştir (Okuma, 2002; Ito,2004). PZR ürününün büyüklüğü moleküler büyüklük belirteci [(O'RangeRuler 50 bp DNA Ladder ve MassRuler DNA Ladder Mix (80-10,000 bp)] bantları ile karşılaştırılarak doğrulanmış ve jel görüntüleri dijital fotoğraf makinesi ile görüntülenmiştir.

#### **2.2.4.1.4.6. PVL Geni Tayini**

*mecA* pozitif örneklerde PVL gen tayini Lina ve ark.'nın (Lina, 1999) önerdiği PZR yöntemi ile çalışılmıştır. Bu amaçla çizelge 2.9'da görülen *luk*-PV1 ve *luk*-PV2

primerler kullanılmıştır. Bu primerler ile yapılan PZR sonucunda 432 baz çiftlik ürün oluşmaktadır (Lina, 1999).

Çizelge 2.9. *luk*-PV1 ve *luk*-PV2 primerlerinin dizisi

Primer	Dizi (5'-3')	Amplikon
<i>luk</i> -PV1	ATC ATT AGG TAA AAT GTC TGG ACA TGA TCC A	432 bp
<i>luk</i> -PV2	GCA TCA AGT GTA TTG GAT AGC AAA AGC	

### PVL Geninin PZR Amplifikasyonu

*mecA* pozitif örneklerde PVL gen tayini için 10 ng DNA, kalıp olarak PZR karışımına eklenmiştir. PZR karışımı: 10X PZR tamponu [(750 mM Tris-HCl (25C°'de pH 8,8), 200 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, %0,1 Tween 20)], 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP, her bir primerden protokola uygun 10 pmol, 1 Ü *Taq* DNA polimeraz enziminden kullanılarak son hacim 20 µl olacak şekilde hazırlanmıştır. Örnekler termal döngü cihazında ilk denatürasyon için 94C°'de 5 dakika daha sonra 25 döngü (94C°'de 30 saniye, 58C°'de 30 saniye ve 72C°'de 1 dakika) olacak şekilde çalışılmıştır. Son olarak örnekler 72C°'de 7 dakika bekletilerek PZR sonlandırılmıştır (Lina, 1999).

PZR protokolu	Master mix (MIX)	N
dH <sub>2</sub> O		×N
Tampon		10X (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ×N
dNTP		200 µM×N
MgCl <sub>2</sub>		1,5 mM MgCl <sub>2</sub> ×N
Primer <i>luk</i> -PV1		10 pmol×N
Primer <i>luk</i> -PV2		10 pmol×N
<i>Taq</i> polimeraz		1 Ü×N
DNA		10 ng×N

TV = 20 µl×N

### PZR programı

Başlangıç denatürasyonu	94C°'de 5 dakika	} 30 döngü
Denatürasyon aşaması	94C°'de 30 saniye	
Primerlerin yapışması (annealing)	58C°'de 30 saniye	
Sentez (uzama) aşaması	72C°'de 1 dakika	
Son uzama	72C°'de 7 dakika	

Pozitif kontrol olarak GRE-14 suşu kullanılmıştır.

### **PVL Geni Ürününün Agaroz Jel Elektrofrezinde Saptanması**

PVL ürünün saptanması amacıyla 10 µl PZR ürünü 2 µl yükleme solüsyonu 6X Orange DNA Loading Dye ile süspanse edilerek 0,5X TBE tampon ile hazırlanan %2'lik agarozda jel elektroforezi yapılmıştır. Agaroz jelde yürütülen ampikon 0,5 µg/ml etidyum bromür ile işaretlenmiş ve 1 saat 100 Voltta elektrik akımına tabi tutulduktan sonra UV transilluminatör ile değerlendirilmiştir (Lina, 1999). PZR ürünün büyüklüğü moleküler büyüklük belirteci (O'RangeRuler 50 bp DNA Ladder) bantları ile karşılaştırılarak doğrulanmış ve jel görüntüleri dijital makinesi ile görüntülenmiştir.

#### **2.2.4.2. TK-MRSA'ların Çeşitli Antibiyotiklere Duyarlılık Profilleri**

Metisiline dirençli *S. aureus* suşlarının çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları, CLSI'nin önerileri doğrultusunda Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile araştırılmıştır. Bu amaçla önce *S. aureus* olarak tanımlanan suşların taze kültüründen steril FTS içerisinde, 0,5 McFarland standardına göre süspanasyonu hazırlanmış ve steril bir eküvyon yardımıyla MHA besiyerinin yüzeyine homojen olarak yayılmıştır. 10-15 dakika bekletildikten sonra besiyerinin yüzeyine oksasilin (1 µg), eritromisin (15 µg), klindamisin (2 µg), amoksisilin/klavulanik asit (20/10 µg), tetrasiklin (30 µg), trimetoprim/sulfametoksazol (1,25/23,75 µg), imipenem (10 µg), gentamisin (10 µg), amikasin (30 µg), teikoplanin (30 µg), kloramfenikol (30 µg), siprofloksasin (5 µg) ve vankomisin (30 µg) diskleri belirli aralıklarla yerleştirilmiştir. Normal atmosfer şartlarında 35C°'de inkübasyonu takiben oluşan inhibisyon zonları oksasilin ve vankomisin için 24 saat, diğerleri için 16-18 saat sonra değerlendirilmiştir (Çizelge 2.10). Tüm antibiyotik duyarlılık testlerinde kontrol suşu olarak *S. aureus* ATCC 95045 kullanılmıştır (Wikler, 2007).

**Çizelge 2.10.** CLSI'ye göre *S. aureus* suşlarının antibiyotik duyarlılık zon çaplarının değerlendirilmesi

	<b>R</b>	<b>I</b>	<b>S</b>
<b>Sefoksitin (30 µg)</b>	≤21	-	≥22
<b>Oksasilin (1 µg)</b>	≤10	11-12	≥13
<b>Eritromisin (15 µg)</b>	≤13	14-22	≥23
<b>Klindamisin (2 µg)</b>	≤14	15-20	≥21
<b>Amoksisilin/klavulanik asit (20/10 µg)</b>	≤19	-	≥20
<b>Tetrasiklin (30 µg)</b>	≤14	15-18	≥19
<b>Trimetoprim/sulfametoksazol (1,25/23,75 µg)</b>	≤10	11-15	≥16
<b>İmipenem (10 µg)</b>	≤13	14-15	≥16
<b>Gentamisin (10 µg)</b>	≤12	13-14	≥15
<b>Amikasin (30 µg)</b>	≤14	15-16	≥17
<b>Teikoplanin (30 µg)</b>	≤10	11-13	≥14
<b>Kloramfenikol (30 µg)</b>	≤12	13-17	≥18
<b>Siprofloksasin (5 µg)</b>	≤15	16-20	≥21
<b>Vankomisin (30 µg)</b>	-	-	≥15

#### 2.2.4.3. TK-MRSA'ların iMLS<sub>B</sub> Fenotipleri

*S. aureus* ve KNS'ların makrolidlere dirençli suşlarında, klindamisine karşı yapısal veya indüklenebilir direnç görülebilir (MLS<sub>B</sub> [makrolid, linkozamid ve tip B streptogramin] direnci veya sadece MS [makrolidlere ve streptogramin karşı dirençli klindamisine karşı duyarlı] olabilir). İndüklenebilir makrolid-linkozamid-streptogramin B (iMLS<sub>B</sub>) fenotipini tespit etmek için D-testi (ikili disk difüzyon testi), CLSI'nin önerileri doğrultusunda yapılmıştır. Bu amaçla, bakteri süspansiyonu daha önce anlatıldığı şekilde MHA besiyerinin yüzeyine yayıldıktan sonra, klindamisin (2 µg) ve eritromisin (15 µg) diskleri 15-26 mm arayla yerleştirilmiştir. 35C°'de 16-18 saat normal atmosfer şartlarında, inkübasyonu takiben, klindamisin'in inhibisyon zonunda düzleşme görülmeyen mikroorganizmalar klindamisine duyarlı olarak bildirilmiştir. Klindamisin diskinin eritromisin diskine bakan kenarındaki zonda bir düzleşme olması (D zonu olarak tanımlanır) indüklenebilir klindamisin direncini göstermektedir (Wikler, 2007).

### 2.2.5. Gram Negatif Suşların İzolasyonu ve İdentifikasyonu

EMB besiyerinde üreyen mikroorganizma kolonilerinden gram boyalı preparatlar hazırlanmış, mikroskopik morfolojileri gram negatif bakterilere uyan koloniler, IMVIC (indol, metil kırmızısı, voges proskauer, sitrat) testi ve Craigie besiyerinde hareket testi yapılarak tiplendirilmiştir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. EMB besiyerinde gram negatif bakterilerin görüntüleri

#### 2.2.5.1. Üç Şekerli Demir (TSI) Besiyeri

Özellikle *Enterobacteriaceae* ailesinin üyelerini tanımlamak amacıyla kullanılan bir besiyeridir. Bu besiyerinde şekerlerin fermentasyonu, şekerlerin fermentasyonu sonucu gaz oluşumu ve hidrojen sülfid ( $H_2S$ ) oluşumu olmak üzere, bakterilerin üç temel özelliği incelenir. Besiyeri glukoz, laktoz ve sükroz olmak üzere üç farklı şeker, pH indikatörü olarak fenol kırmızısı ve  $H_2S$  oluşumunun göstergesi olarak ferröz sülfat (ferrik ammonyum sülfat) içerir (Forbes, 2007).

İğne öze ile tek koloniden alınan örneklerden TSI besiyerine önce batırma, daha sonra besiyerinin yatık tarafına yüzey inokülasyonu yapılmıştır. Besiyerindeki sükroz ve laktoz miktarı, glukoz miktarının 10 katıdır. Glukozu fermente eden bakteriler 6 saatlik inkübasyonu takiben, oluşan asit ürünler nedeniyle besiyerinin

hem dip kısmının hem de yüzeyinin sarı renge dönüşmesine yol açarlar. Sınırlı miktardaki glukoz tükenince, besiyerindeki laktoz veya sükrozu kullanabilen bakteriler asit ürünler oluşturmaya devam eder, bunun sonucunda 18-24 saatlik inkübasyondan sonra besiyerinin rengi sarı kalır. Bakteriler glukoz veya laktozu kullanamıyorsa, enerji kaynağı olarak besiyerinde bulunan proteinleri ve aminoasitleri kullanırlar. Protein metabolizması primer olarak oksijenin bol olduğu besiyeri yüzeyinde meydana gelir ve ortaya çıkan alkali ürünler besiyeri yüzeyinin kırmızı renk almasına yol açarlar (Forbes, 2007).

Sonuç olarak, 35C°'de 18-24 saat inkübasyonu takiben besiyerinin dip kısmının kırmızı kalması bakterinin glukozu fermente edemediğini, dolayısıyla *Enterobacteriaceae* ailesinin üyesi olmadığını; dipte sarı, üst tarafta kırmızı renk oluşması, glukozun fermente olduğunu, ancak laktoz ve sükrozun parçalanmadığını; besiyerinin tümünün sarı renge dönüşmesi ise glukozun yanısıra laktoz ve/veya sükrozun da bakteri tarafından kullanıldığını gösterir (Forbes, 2007).

Şekerlerin fermentasyonu sonucu gaz oluşumu besiyerinin yukarıya doğru itilmesi veya besiyerinde yer yer parçalanmaların oluşması ile anlaşılır. H<sub>2</sub>S oluşturan bakteriler besiyerinin dip kısmının siyahlaşmasına yol açarlar çünkü bu madde ferröz sülfat ile reaksiyona girerek siyah renkli ferröz sülfid oluşturur (Forbes, 2007).

#### **2.2.5.2. Üreaz Testi**

Üreaz, ürenin hidrolizini katalizleyen enzimdir. Üreaz testi bakterilerin üreaz aktivitesini araştırmak için yapılmış ve bu amaçla indikatör olarak fenol kırmızısı içeren Christensen üre agar besiyeri kullanılmıştır. İğne öze ile tek koloniden alınan örneklerden besiyerine önce batırma, daha sonra besiyerinin yatık tarafına yüzey inokülasyonu yapılmış, 2-7 gün süreyle 35C°'de inkübe edilmiştir. Ürenin hidrolizi sonucu amonyak ve karbondioksit meydana gelir. Ortaya çıkan amonyak alkali bir üründür ve besiyerinin rengini kırmızıya dönüştürür. Kültürde kırmızı rengin

meydana gelmesi pozitif, renk değişikliğinin olmaması ise negatif reaksiyon olarak değerlendirilmiştir (Forbes, 2007).

### 2.2.5.3. Sitrat Testi

Bazı bakteriler karbon kaynağı olarak tek bir substrat ile yetinebilirler. Sitrat testi, tek karbon kaynağı olarak sitrat kullanabilen bakterileri ayırd etmek amacıyla yapılır. Bu amaçla sitrat ve pH indikatörü olarak bromtimol mavisi içeren Simmons sitrat agar besiyeri kullanılır. Tek karbon kaynağı olarak sitrat kullanan bakteriler, sitrataz enzimi aracılığıyla sitratı oksalasetat ve asetat'a paręalarlar. Oksalasetat daha sonra oksaloasetat dekarboksilaz enzimi tarafından piruvat ve karbon dioksit'e paręalanır. Karbon dioksit, sodyum ve su ile birleşir ve bir alkali ürün olan sodyum karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) meydana gelir. 35-37C°'de 24 saatlik inkübasyondan sonra (negatif testlerde inkübasyon süresi 4 güne kadar uzatılmıştır), oluşan alkali ürünler nedeniyle besiyerinin renginin yeşilden maviye dönüşmesi testin pozitif olduğunu göstermiştir. Pozitif kontrol olarak *Klebsiella pneumoniae*, negatif kontrol olarak ise *Escherichia coli* kullanılmıştır (Forbes, 2007).

### 2.2.5.4. Voges-Proskauer (VP) Testi

Bazı bakteriler karbonhidratları paręalayarak asetoin (asetil metil karbinol) oluşturur. Asetoin, potasyum hidroksid (KOH) varlığında okside olarak diasetil meydana getirir. Bu ürün ise alfa naftol ile reaksiyona girdiğinde kırmızı bir renk oluşturur. Asetoin oluşumunu araştırmak için, glukoz içeren 5 ml Clark-Lubs besiyerine ekim yapılır ve 35-37C°'de en az 48 saat inkübasyondan sonra (negatif testlerde inkübasyon süresi 4 güne kadar uzatılmıştır), ortama yaklaşık 0,6 ml (6 damla) %5 alfa naftol ve yaklaşık 0,2 ml (2 damla) %40 KOH ilave edilmiştir. Besiyerinin hava ile temas etmesi için çalkalandıktan sonra, 15 dakika içerisinde kırmızı renk oluşması testin pozitif olduğunu göstermiştir. Pozitif kontrol olarak *Klebsiella pneumoniae*, negatif kontrol olarak ise *Escherichia coli* kullanılmıştır (Arda, 2000; Forbes, 2007).

### 2.2.5.5. Metil kırmızısı (MR) Testi

Metil kırmızısı testi, bakterilerin glukozu fermente ederek ortamın pH'ını 4,4'ün altına düşürmeleri esasına dayanır. Bakteriler pepton ve glukoz içeren, 5 ml tamponlanmış Clark-Lubs besiyerine inoküle edilmiştir. 35-37C°'de en az 48 saat inkübasyondan (negatif testlerde inkübasyon süresi 4 güne kadar uzatılmıştır) sonra ortama 5-6 damla metil kırmızısı ayıracağı ilave edilmiştir. Bu ayıracağı pH 4,4 ve altında kırmızı, pH 6,2 ve üzerinde ise sarı renk verir, dolayısıyla kırmızı renk oluşması testin pozitif olduğunu göstermiştir. Pozitif kontrol olarak *Escherichia coli*, negatif kontrol olarak ise *Klebsiella pneumoniae* kullanılmıştır (Arda, 2000; Forbes, 2007).

### 2.2.5.6. İndol Testi

İndol, triptofan'ın triptofanaz enzimi ile parçalanması sonucu oluşan nitrojenli bir bileşiktir ve aldehidlerle reaksiyona girdiğinde kırmızı renkli bir ürün oluşturur. İncelenecek bakteri brain heart infusion broth besiyerine inoküle edilmiştir. 35C°'de 48 saat inkübasyondan sonra üzerine, tüpün kenarından yavaşça akıtılmak suretiyle, 0,5 ml Kovaks ayıracağı ilave edilmiş, besiyerinin üst kısmında 1-2 dakika içerisinde parlak kırmızı bir halka oluşması testin pozitif olduğunu göstermiştir. Pozitif kontrol olarak *Escherichia coli* kullanılmıştır (Arda, 2000; Forbes, 2007).

### 2.2.5.7. Craigie Besiyeri

Craigie besiyeri bakterilerin hareket muayenesi amacıyla kullanılan yarı katı bir besiyeridir. İnokülasyon, iğne öze yardımıyla besiyerinde bulunan iki ucu açık cam tüpün üst ucundan girilerek, besiyerinin üst kısmına yapılmış ve 37C°'de 18-24 saat inkübasyondan sonra değerlendirilmiştir. Tüm besiyerinde bulanıklık oluşması bakterinin hareketli olduğunu, sadece cam tüpün üst kısmında üreme olması ise hareketsiz olduğunu göstermiştir.

### 2.2.6. Gram Negatif Suşların Çeşitli Antibiyotiklere Duyarlılık Profilleri

Çalışmada izole edilen gram negatif bakterilerin çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları, CLSI'nin önerileri doğrultusunda Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile araştırılmıştır. Bu amaçla önce gram negatif bakteri suşlarının taze kültüründen steril FTS içerisinde, 0,5 McFarland standardına göre süspansiyonu hazırlanmış ve steril bir eküvyon yardımıyla MHA besiyerinin yüzeyine homojen olarak yayılmıştır. 10-15 dakika bekletildikten sonra besiyerinin yüzeyine ampisilin (10 µg), amoksisilin/klavulanik asit (20/10 µg), ampisilin/sulbaktam (10/10 µg), imipenem (10 µg), gentamisin (10 µg), amikasin (30 µg), tetrasiklin (30 µg), trimetoprim/sulfametoksazol (1,25/23,75 µg), kloramfenikol (30 µg), seftriakson (30 µg) ve sefotaksim (30 µg) diskleri belirli aralıklarla yerleştirilmiştir. Normal atmosfer şartlarında 35C°'de 16-18 saat inkübasyonu takiben oluşan inhibisyon zonları CLSI önerileri doğrultusunda zon çapları ölçülerek değerlendirilmiştir. Çizelge 2.11'de gram negatif suşların CLSI'de belirtilen antibiyotik duyarlılık zon çapları verilmiştir (Wikler, 2007).

**Çizelge 2.11.** Gram negatif suşların CLSI'de antibiyotik duyarlılık zon çapları

	<b>R</b>	<b>I</b>	<b>S</b>
<b>Ampisilin (10 µg)</b>	≤13	14-16	≥17
<b>Amoksisilin/klavulanik asit (20/10 µg)</b>	≤13	14-17	≥18
<b>Ampicilin/sulbaktam (10/10 µg)</b>	≤11	12-14	≥15
<b>İmipenem (10 µg)</b>	≤13	14-15	≥16
<b>Gentamisin (10 µg)</b>	≤12	13-14	≥15
<b>Amikasin (30 µg)</b>	≤14	15-16	≥17
<b>Tetrasiklin (30 µg)</b>	≤11	12-14	≥15
<b>Trimetoprim/sulfametoksazol (1,25/23,75 µg)</b>	≤10	11-15	≥16
<b>Kloramfenikol (30 µg)</b>	≤12	13-17	≥18
<b>Seftriakson (30 µg)</b>	≤13	14-20	≥21
<b>Sefotaksim (30 µg)</b>	≤14	15-22	≥23

### 2.2.6.1. Gram Negatif Suşlarında ESBL Tayini

#### 2.2.6.1.1. Gram Negatif Suşlarında ESBL Tarama Testi

ESBL (Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz) tarama testi CLSI'nin önerileri doğrultusunda Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile araştırılmıştır. Bu amaçla önce gram negatif bakteri suşlarının taze kültüründen steril FTS içerisinde, 0,5 McFarland standardına göre süspansiyonu hazırlanmış ve steril bir eküvyon yardımıyla MHA besiyerinin yüzeyine homojen olarak yayılmıştır. 10-15 dakika bekletildikten sonra besiyerinin yüzeyine seftriakson (30 µg) ve sefotaksim (30 µg) diskleri yerleştirilmiştir. Normal atmosfer şartlarında 35C°de 16-18 saat inkübasyonu takiben oluşan inhibisyon zonları CLSI önerileri doğrultusunda zon çapları ölçülerek değerlendirilmiştir. Çizelge 2.12'de ESBL tarama testi için CLSI'de belirtilen antibiyotik duyarlılık zon çapları verilmiştir (Wikler, 2007).

Çizelge 2.12. ESBL tarama testi

	R	I	S	ESBL tarama testi
Seftriakson (30 µg)	≤13	14-20	≥21	≥25
Sefotaksim (30 µg)	≤14	15-22	≥23	≥27

#### 2.2.6.1.2. Gram Negatif Suşlarında ESBL Doğrulama Testi

ESBL doğrulama testinde sefotaksim (30 µg) ve seftazidim (30 µg) hem tek başına, hem de klavulanik asit kombinasyonları (30/10 µg sefotaksim/klavulanik asit ve seftazidim/klavulanik asit) ile test edilmiştir. Klavulanik asit kombinasyonları ile elde edilen inhibisyon zonu çapı, ilacın tek başına oluşturduğu inhibisyon zonu çapından 5 mm veya daha fazla olması ESBL olarak değerlendirilmiştir (Wikler, 2007).

### 2.2.6.1.3. Gram Negatif Suşlarda ESBL Çift Disk Sinerji Testi

ESBL üreten suşlarda amoksisilin/klavulanik asit diskinin etrafına 20-30 mm aralıkla yerleştirilen seftazidim, sefotaksim, seftriakson, sefepim, aztreonam veya sefpodoksim inhibisyon zon çaplarının genişlemesi gösterilmektedir. ESBL enziminin klavulanik asit varlığında inhibe olmasıyla  $\beta$ -laktam antibiyotiğin aktivitesi artmaktadır. Bu amaçla önce gram negatif bakteri suşlarının taze kültüründen steril FTS içerisinde, 0,5 McFarland standardına göre süspansiyonu hazırlanmış ve steril bir eküvyon yardımıyla MHA besiyerinin yüzeyine homojen olarak yayılmıştır. 10-15 dakika bekletildikten sonra besiyerinin ortasına amoksisilin/klavulanik asit (20/10  $\mu$ g) diski, etrafına da 20-30 mm aralıklarla seftazidim (30  $\mu$ g), sefotaksim (30  $\mu$ g), aztreonam (30  $\mu$ g) ve sefepim (30  $\mu$ g) diskleri yerleştirilmiştir. Seftazidim, sefotaksim, aztreonam ve sefepim disklerinin etrafındaki inhibisyon zonunun amoksisilin/klavulanik asit diskinin doğru genişlemesi veya arada bakteri üremeyen bir sinerji alanının bulunması, ESBL varlığını göstermiştir (Bradford, 2001; Bannerman, 2003).

### 2.2.7. Mantar Suşlarının İzolasyonu ve İdentifikasyonu

Eküvyön ile alınan burun ve koltuk altı örnekleri antibiyotikli-SDA besiyerine inoküle edilmiş, 30C°'de, aerobik şartlarda, 3-5 gün süreyle inkübe edilmiştir. Üreyen kolonilerden lam lamel arası preparat ve gram boyalı preparat hazırlanarak mikroskopik morfolojileri değerlendirilmiştir (Bannerman, 2003).

#### 2.2.7.1. Germ Tüp Oluşumu

İzole edilen suşlar 1 ml insan serumu içerisinde, 37C°'de 3 saat süreyle inkübe edilmiş ve germ tüp oluşumu incelenmiştir. Sonuçta tüm suşların germ tüp testleri negatif bulunmuştur (Bannerman, 2003).

### **2.2.7.2. (Biomerieux, Fransa) Testi**

İzole edilen mantarların biyokimyasal profilleri API 20 C AUX karbonhidrat kullanım testi ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda değerlendirilmiştir.

### **2.2.8. İstatistiksel Analiz**

İstatistiksel analizlerde kategorik veriler için Ki-Kare ( $\chi^2$ ) ya da Fisher'in kesin Ki-kare testi kullanılmıştır. Bağımlı gruplarda olan karşılaştırmalarda ise McNemar testi kullanılmıştır.  $p < 0,05$  olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

### 3. BULGULAR

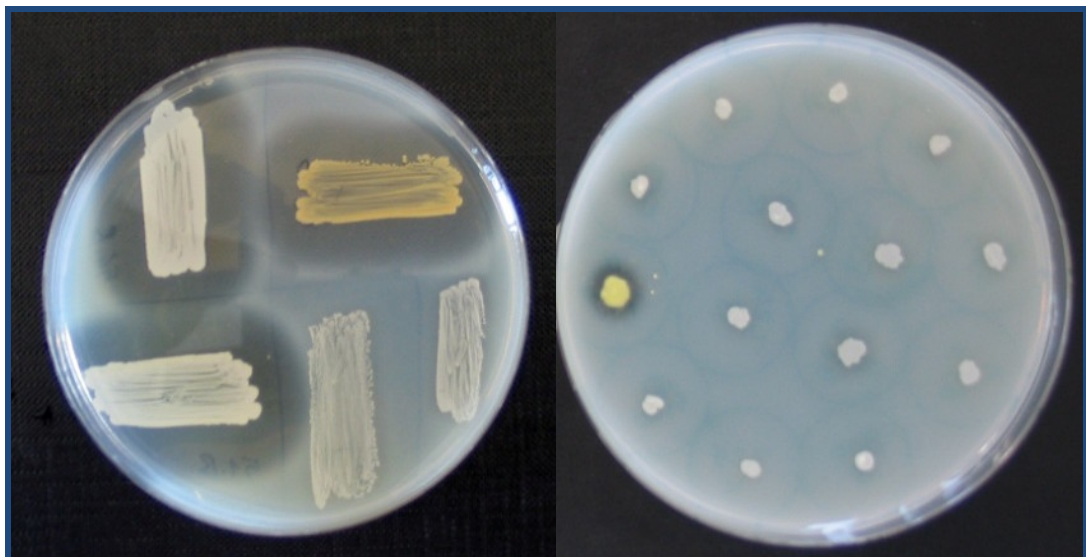
Enfeksiyon etkeni olmayan TK-MRSA grubu olarak, yaşları 4 ile 85 arasında değişen (yaş ortalaması  $29,35 \pm 13,41$ ) 564 (%54,2) erkek ve 476 (%45,8) kadın olmak üzere, toplam 1040 sağlıklı bireyden izole edilen 18 MRSA izolatları; enfeksiyon etkeni olan TK-MRSA grubu olarak ise, 2004-2005 yılları arasında İstanbul Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nin çeşitli polikliniklerine başvuran, yaşları 4 ile 76 arasında değişen (yaş ortalaması  $39,6 \pm 19,9$ ) 21 erkek (%67,7) ve 10 (%32,3) kadın hastadan izole edilmiş olan 31 MRSA izolatı kullanılmıştır.

Burun ve koltuk altı örneklerinden yapılan kültürlerde *S. aureus* suşlarının identifikasyonu amacıyla, üreyen bakterilerin koloni morfolojileri ve mikroskopik morfolojileri (gram boyama) incelenmiş, katalaz, koagülaz (lam ve tüp), DNaz (agar ve tüp) ve MTA testleri yapılmış, toplam 294 izolat *S. aureus* olarak tanımlanmıştır. 1040 sağlıklı bireyden 282'sinde *S. aureus* izole edilmiş, *S. aureus* taşıyıcılık oranı %27,1 olarak bulunmuştur.

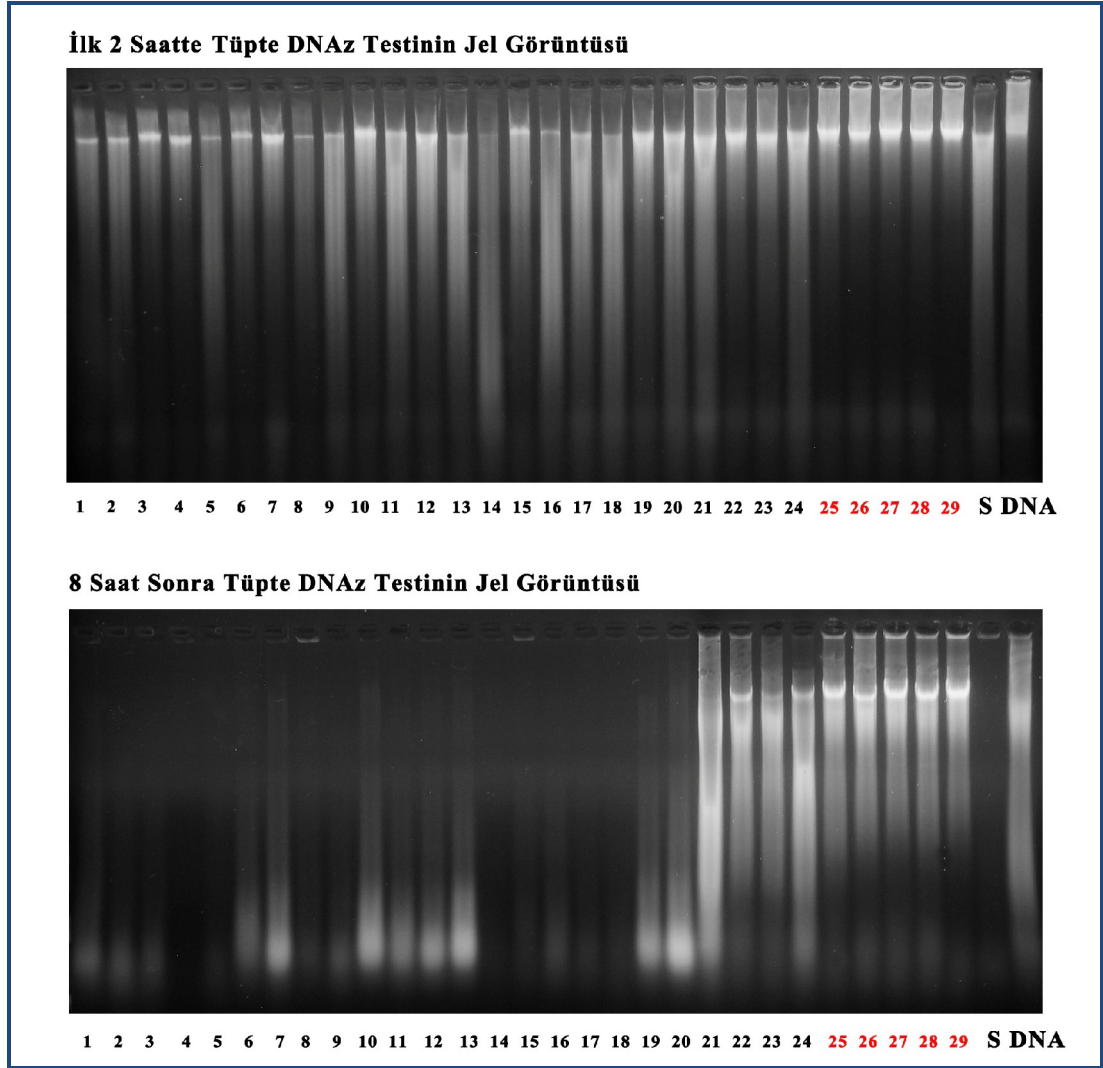
Enfeksiyon etkeni olan TK-MRSA grubu, çeşitli polikliniklere başvuran hastalardan izole edilen 31 MRSA izolatından oluşmuştur. 10'u idrar, 7'si pü, 5'i yara, 3'ü üretral akıntı, 3'ü eklem sıvısı ve 3'ü burun sürüntü örneklerinden elde edilen izolatların identifikasyonu amacıyla, koloni morfolojileri ve mikroskopik morfolojileri (gram boyama) incelenmiş, katalaz, koagülaz (lam ve tüp), DNaz (agar ve tüp) ve MTA testleri yapılmıştır. MTA, DNaz (agar ve tüp) testlerinin sonuçları şekil 3.1, 3.2 ve 3.3'te verilmiştir.



Şekil 3.1. Mannitol fermentasyon testi



Şekil 3.2. Solda DNaz agarda *S. aureus*'un oluşturduğu saydam zon, sağda ise KNS'ların opak görünümleri görülmektedir

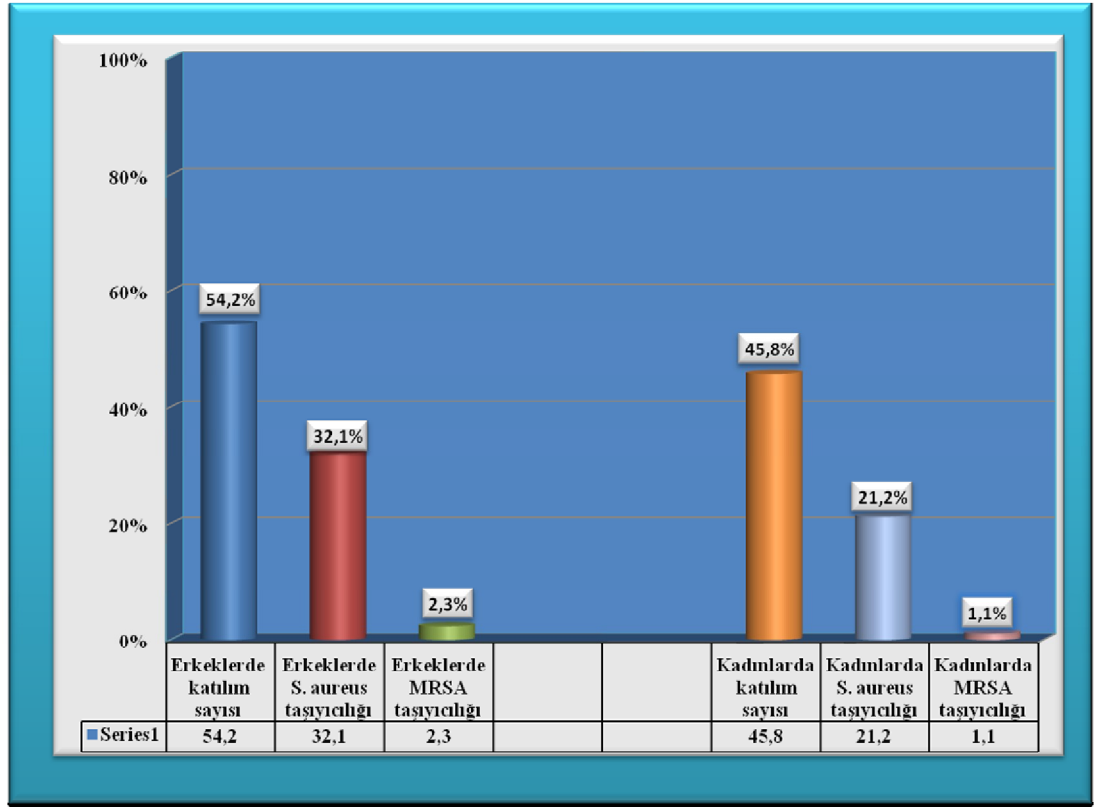


**Şekil 3.3.** Tüpte DNaz Testinin ilk 2 saatte ve 8 saatte jel görüntüleri verilmiştir (1-20: DNaz pozitif *S. aureus* suşları; 21-24: DNaz negatif *S. aureus* suşları; 25-29: KNS; S: pozitif kontrol [*S. aureus* ATCC 95045] ve DNA)

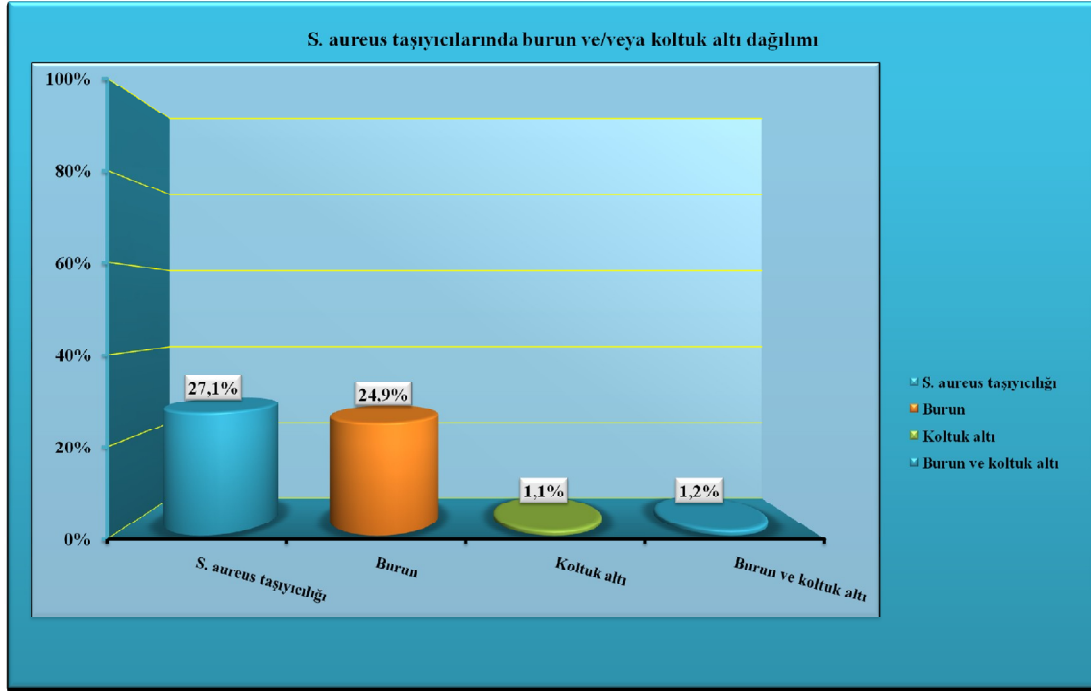
### 3.1. Enfeksiyon Etkeni Olan ve Olmayan TK-MRSA Suşlarının Dağılımı

1040 sağlıklı gönüllü üzerinde yürütülen çalışmamızda *S. aureus* taşıyıcılığı erkeklerde %32,1 (181/564) ve kadınlarda %21,2 (101/476); MRSA taşıyıcılığı ise erkeklerde %2,3 (13/564) ve kadınlarda %1,1 (5/476) olarak bulunmuştur. Çalışmamızda 259'u (%24,9) sadece burundan, 11'i (%1,1) sadece koltuk altı ve 12'si (%1,2) hem burun hem de koltuk altından olmak üzere, toplam 294 *S. aureus* suşu izole edilmiştir. Bu durumda *S. aureus* taşıyıcılarında (toplam 282 kişi) burun kolonizasyonu %91,8 (259/282), koltuk altı kolonizasyonu %3,9 (11/282), hem

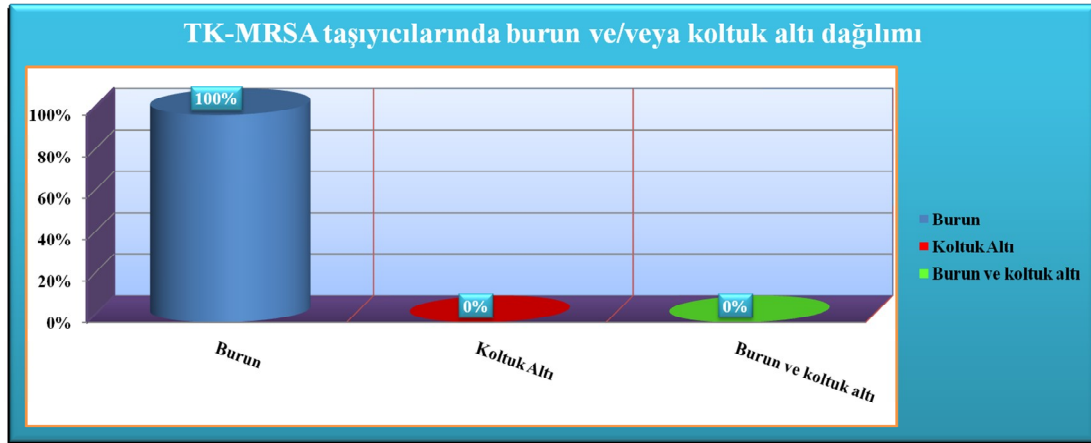
burun hem de koltuk altı kolonizasyonu %4,3 (12/282) olarak hesaplanmıştır. 18 MRSA suşunun hepsi (18/18) burundan alınan örneklerden izole edilmiş ve koltuk altından alınan örneklerden MRSA suşu izole edilmemiştir. Erkek ve kadınlarda *S. aureus* ve TK-MRSA taşıyıcılığı dağılımları çizelge 3.1; *S. aureus* ve TK-MRSA taşıyıcılarında burun ve koltuk altı taşıyıcılığı dağılımı çizelge 3.2 ve 3.3'te verilmiştir.



**Çizelge 3.1.** Erkek ve kadınlarda *S. aureus* ve TK-MRSA taşıyıcılığı dağılımları

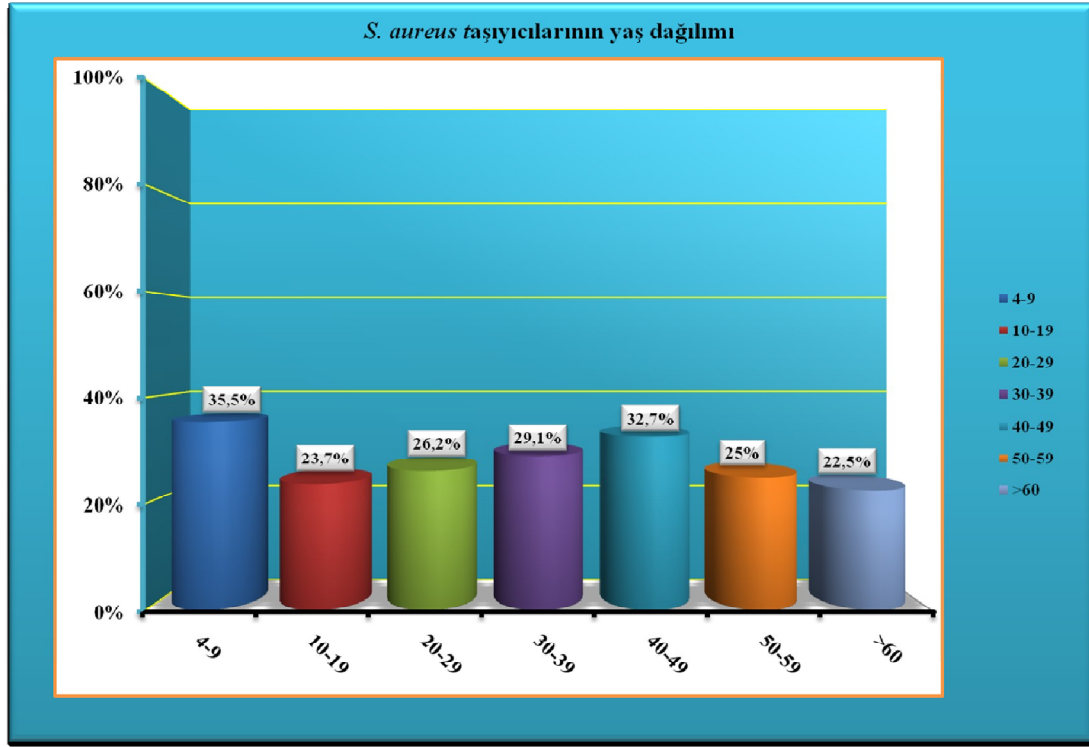


**Çizelge 3.2.** *S. aureus* taşıyıcılarında burun ve koltuk altı taşıyıcılığı dağılımı



**Çizelge 3.3.** TK-MRSA taşıyıcılarında burun ve/veya koltuk altı dağılımı

Enfeksiyon etkeni olmayan *S. aureus* taşıyıcılarında yaş dağılımına baktığımızda, *S. aureus* taşıyıcılığı 4-9 yaş grubunda %35,5 (11/31), 10-19 yaş grubunda %23,7 (46/194), 20-29 yaş grubunda %26,2 (106/405), 30-39 yaş grubunda %29,1 (51/175), 40-49 yaş grubunda %32,7 (48/147), 50-59 yaş grubunda %25,0 (12/48) ve 60 yaş üstü grubunda %22,5 (9/40) olarak bulunmuştur (Çizelge 3.4).



**Çizelge 3.4.** *S. aureus* taşıyıcılarının yaş dağılımı

Enfeksiyon etkeni olmayan TK-MRSA taşıyıcılarında 1040 sağlıklı bireyden 18’inde MRSA izole edilmiş, MRSA taşıyıcılık oranı %1,7 olarak bulunmuştur. Yaş dağılımına baktığımızda, MRSA taşıyıcılığı 4-9 yaş grubunda %3,2 (1/31), 10-19 yaş grubunda %1,5 (3/194), 20-29 yaş grubunda %2,0 (8/405), 30-39 yaş grubunda %1,1 (2/175), 40-49 yaş grubunda %2,0 (3/147), 50-59 yaş grubunda %2,1 (1/48) olarak hesaplanmış, 60 yaş üstü grubunda MRSA taşıyıcılığı saptanmamıştır (Çizelge 3.6).

Enfeksiyon etkeni olmayan *S. aureus* taşıyıcılarında risk faktörlerinin dağılımına bakıldığında; %18,1’inin son üç ay içinde herhangi bir nedenle antibiyotik kullandığı, %13,1’inde son 2 hafta içerisinde akut bir enfeksiyon belirtisi olduğu, %9,6’sının kronik hastalığı bulunduğu, %4,3’ünde deri veya yumuşak doku enfeksiyonu bulunduğu ve %5,3’ünde son 6 ay içerisinde hastanede yatış öyküsü bulunduğu görülmüştür (Çizelge 3.5).

Enfeksiyon etkeni olmayan TK-MRSA taşıyıcılarında risk faktörlerinin dağılımına bakıldığında; %22,2’sinin son üç ay içinde herhangi bir nedenle antibiyotik kullandığı, %22,2’sinin son 2 hafta içerisinde akut bir enfeksiyon belirtisi

olduğu, %5,6'sının kronik hastalığı bulunduğu, %11,1'sinin son 6 ay içerisinde hastanede yatış öyküsü bulunduğu ve deri veya yumuşak doku enfeksiyonu bulunmadığı görülmüştür (Çizelge 3.5).

Kronik hastalığı bulunan ve enfeksiyon etkeni olmayan TK-MRSA grubun *S. aureus* taşıyıcılarında en yaygın bulunan hastalık alerjik rinit %4,3 (12/282) idi. Bunu sırasıyla astım (%1,4), kronik bronşit (%1,1), hipertansiyon (%1,1), diabetes mellitus (%0,7), immünosüpresif tedavi gören hastalar (%0,7) ve idrar yolu enfeksiyonu (%0,4) takip etmiştir (Çizelge 3.5).

Enfeksiyon etkeni olmayan toplum kaynaklı MRSA taşıyıcılarında kronik hastalığı %5,6 (1/18) bulunurken en yaygın bulunan kronik hastalık alerjik rinit %5,6 (1/18) idi (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5'te *S. aureus* ve MRSA taşıyıcısı olanların risk faktörlerinin dağılımı verilmiştir.

**Çizelge 3.5.** *S. aureus* ve MRSA taşıyıcısı olanların risk faktörlerinin dağılımı

	Kolonizasyon (N=1040)			<i>S. aureus</i> 'un *P	MRSA'nın *P
	Kolonize olmayan N=758 (%)	<i>S. aureus</i> N=282	MRSA N=18		
<b>Risk faktörler</b>					
Son 6 ay içinde hastanede yatış öyküsü	59 (7,8)	15 (5,3)	2 (11,1)	0,169	0,371
Son 3 ay içinde antibakteriyel ajan kullanım öyküsü	164 (21,6)	51 (18,1)	4 (22,2)	0,209	0,775
Son 2 hafta içinde herhangi bir akut hastalık öyküsü	114 (15,0)	37 (13,1)	4 (22,2)	0,435	0,316
Deri veya yumuşak doku enfeksiyonu	34 (4,5)	12 (4,3)	0 (0,0)	0,872	1,000
Kronik hastalığı	59 (7,8)	27 (9,6)	1 (5,6)	0,351	1,000
Diabetes mellitus	1 (0,1)	2 (0,7)	0 (0,0)		
İmmünosüpresif tedavi uygulaması	2 (0,3)	2 (0,7)	0 (0,0)		
Bronşit	5 (0,7)	3 (1,1)	0 (0,0)		
Astım	7 (0,9)	4 (1,4)	0 (0,0)		
Rinit alerjik	25 (3,3)	12 (4,3)	1 (5,6)		
Hipertansiyon	10 (1,3)	3 (1,1)	0 (0,0)		
İdrar yolu enfeksiyonu	5 (0,7)	1 (0,4)	0 (0,0)		
Böbrek yetmezliği	4 (0,5)	0 (0,0)	0 (0,0)		

\*P değeri; \*P<0,05

Çizelge 3.6'da taşıyıcı olmayanlar ile *S. aureus* ve MRSA taşıyıcısı olanların özellikleri verilmiştir.

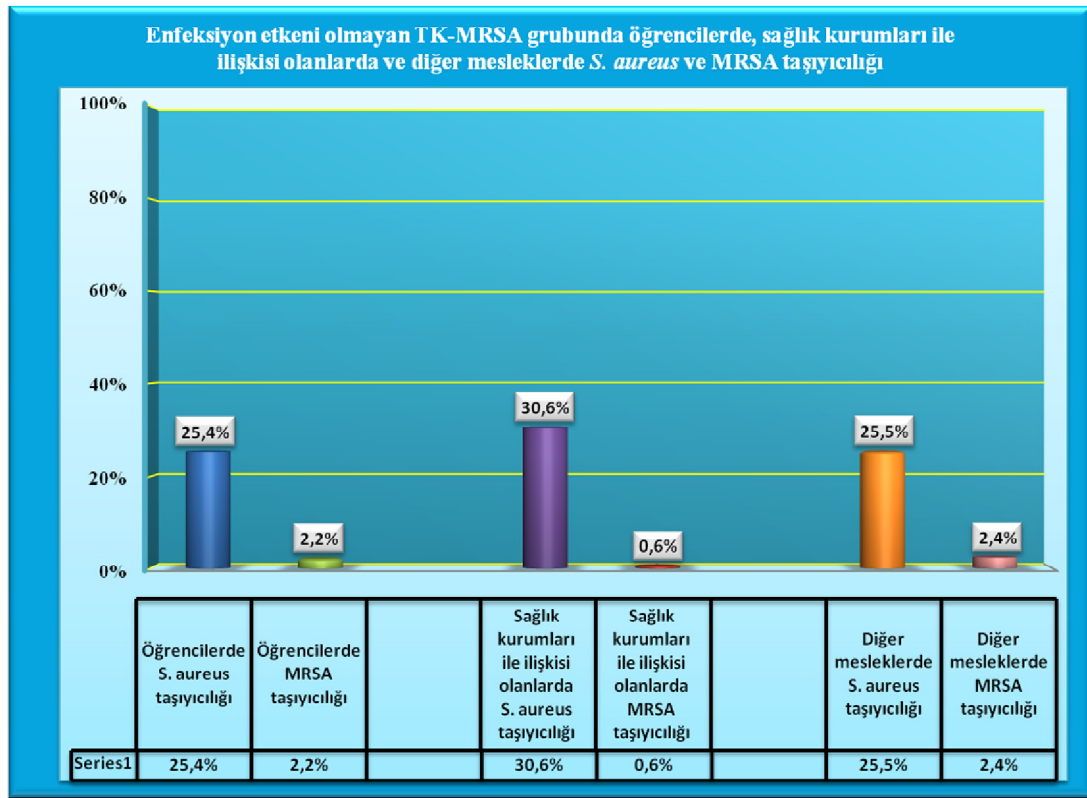
Çizelge 3.6. Kolonize olmayanlar ile *S. aureus* ve MRSA taşıyıcısı olanların özellikleri

Yaş	Grupların total sayıları (%)	Kolonizasyon (N=1040)				<i>S. aureus</i> 'ün *p	MRSA'nın *p
		Kolonize olmayan (N=758)	<i>S. aureus</i> (N=282)	MRSA (N=18)			
4-9 yaş	31 (3,0)	20 (64,5)	11 (35,5)	1 (0,1)	0,471	0,824	
10-19 yaş	194 (18,7)	148 (76,3)	46 (23,7)	4 (0,4)			
20-29 yaş	405 (38,9)	299 (73,8)	106 (26,2)	8 (0,8)			
30-39 yaş	175 (16,8)	124 (70,9)	51 (29,1)	1 (0,1)			
40-49 yaş	147 (14,1)	99 (67,3)	48 (32,7)	3 (0,3)			
50-59 yaş	48 (4,6)	36 (75,0)	12 (25,0)	1 (0,1)			
>60	40 (3,8)	31 (77,5)	9 (22,5)	0 (0,0)			
<b>Cinsiyet</b>					< 0,001 †	0,122	
Erkek	564 (54,2)	383 (67,9)	181 (32,1)	13 (2,3)			
Kadın	476 (45,8)	375 (78,8)	101 (21,2)	5 (1,1)			
<b>Alınan örnek</b>					< 0,001 †	< 0,001 †	
Burun	1040	758 (72,9)	259 (24,9)	18 (1,7)			
Koltuk altı	1040	1029 (98,9)	11 (1,1)	0 (0,0)			
Hem burun hemde koltuk altı	1040	1028 (98,8)	12 (1,2)	0 (0,0)			
<b>Meslek</b>					0,214	0,143	
Öğrenci	445 (42,8)	332 (74,6)	113 (25,4)	10 (2,2)			
Sağlık kurumları ile ilişkili meslekler	340 (32,7)	236 (69,4)	104 (30,6)	2 (0,6)			
Diğer meslekler	255 (24,5)	190 (74,5)	65 (25,5)	6 (2,4)			
<b>Risk faktörler</b>							
Son 6 ay içinde hastanede yatış öyküsü	74 (7,1)	59 (79,7)	15 (20,3)	2 (2,7)	0,169	0,371	
Son 3 ay içinde antibakteriyel ajan kullanım öyküsü	215 (20,7)	164 (76,3)	51 (23,7)	4 (1,9)	0,209	0,775	
Son 2 hafta içinde herhangi bir akut hastalık öyküsü	151 (14,5)	114 (75,5)	37 (24,5)	4 (2,6)	0,435	0,316	
Deri veya yumuşak doku enfeksiyonu	46 (4,4)	34 (73,9)	12 (26,1)	0 (0,0)	0,872	1,000	
Kronik hastalığı	86 (8,3)	59 (68,6)	27 (31,4)	1 (1,2)	0,351	1,000	
Diabetes mellitus	3 (0,3)	1 (33,3)	2 (66,7)	0 (0,0)			
İmmünoşüpresif tedavi uygulanması	4 (0,4)	2 (50,0)	2 (50,0)	0 (0,0)			
Bronşit	8 (0,8)	5 (62,5)	3 (37,5)	0 (0,0)			
Astım	11 (1,1)	7 (63,6)	4 (36,4)	0 (0,0)			
Rinit alerjik	37 (3,5)	25 (67,6)	12 (32,4)	1 (2,7)			
Hipertansiyon	13 (1,2)	10 (76,9)	3 (23,1)	0 (0,0)			
İdrar yolu enfeksiyonu	6 (0,6)	5 (83,3)	1 (16,7)	0 (0,0)			
Böbrek yetmezliği	4 (0,4)	4 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)			

\*P değeri, †P < 0,05

Enfeksiyon etkeni olmayan TK-MRSA suşlarının izole edildiği çalışma grubundaki 1040 kişiden 340'ını sağlık kurumları ile ilişkili mesleklerde çalışanlar, 445'ini öğrenciler ve 255'ini diğer meslek gruplarında çalışanlar oluşturmuştur. *S.*

*aureus* taşıyıcılığı, sağlık kurumları ile ilişkili meslelerde çalışanlarda %30,6 (104/340), öğrencilerde %25,4 (113/445) ve diğer meslek gruplarında çalışanlarda %25,5 (65/255) olarak bulunmuştur. MRSA taşıyıcılığı ise sağlık kurumları ile ilişkili meslelerde çalışanlarda, öğrencilerde ve diğer meslek gruplarında çalışanlarda sırasıyla %0,6 (2/340), %2,2 (10/445) ve %2,4 (6/255) olarak bulunmuştur (Çizelge 3.7).



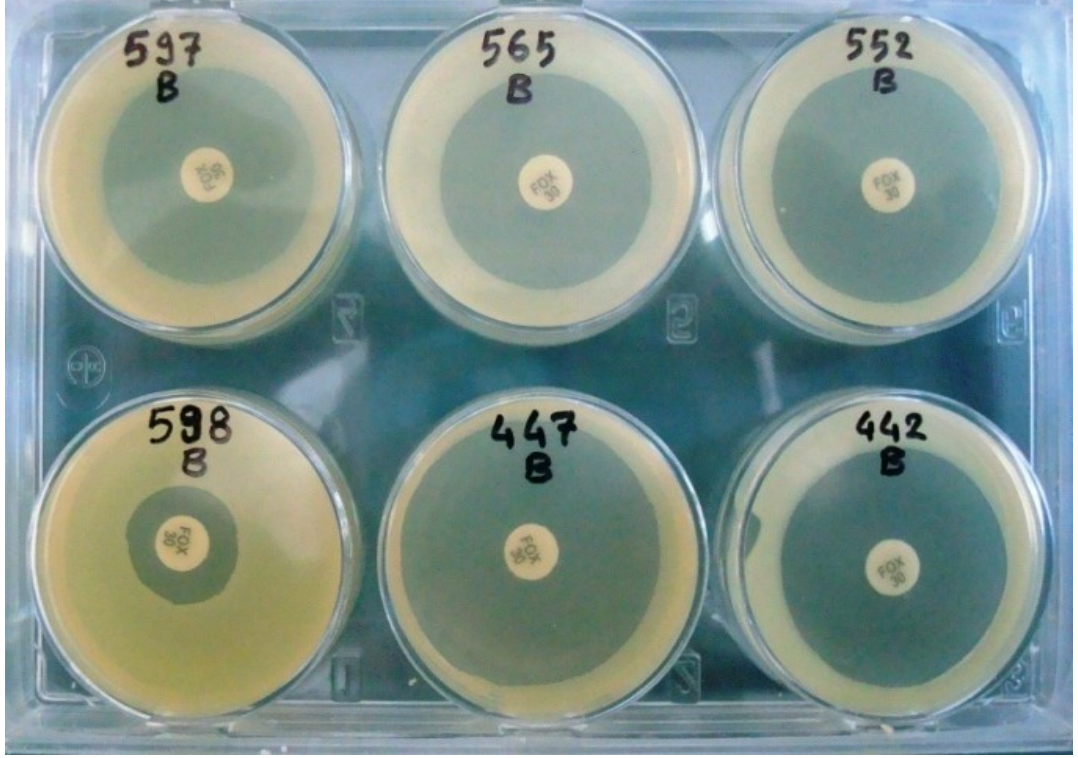
**Çizelge 3.7.** Enfeksiyon etkeni olmayan TK-MRSA grubunda *S. aureus* ve MRSA taşıyıcılığı dağılımı

İzole edilen 294 *S. aureus* suşunda fenotipik metisilin direncini ortaya koymak amacıyla sefoksitin diski (30 µg) ile disk difüzyon testi, “oksasilin tuz tarama agar” testi, ORSAB testi yapılırken, genotipik metisilin direncini ortaya koymak amacıyla PZR yöntemi ile *mecA* gen tayini yapılmıştır. Sonuçlar çizelge 3.8, 3.9 ve şekil 3.4, 3.5, 3.6’da verilmiştir.

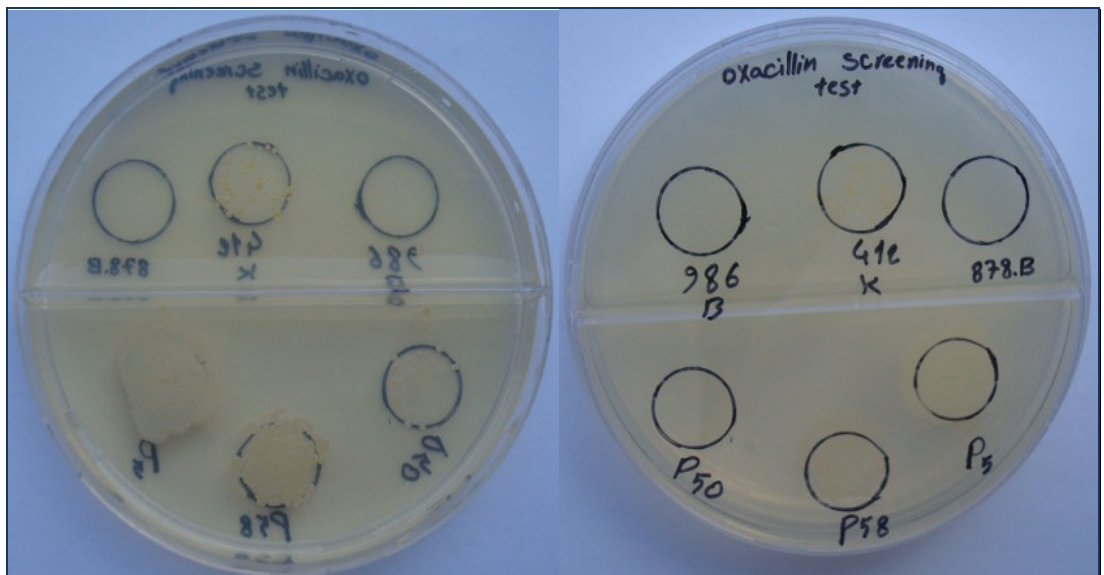
Çizelge 3.8. MRSA suşların tayininde kullanılan testlerin sonuçları

TK-MRSA grubu	İzole edilen <i>S. aureus</i>	Sefoksitin (30 µg) disk difüzyon test	Oksasilin tuz tarama agar testi	ORSAB test	<i>mecA</i>
1040	294 (28,3)†	12 (1,2)	12 (1,2)	51 (4,9)	18 (1,7)

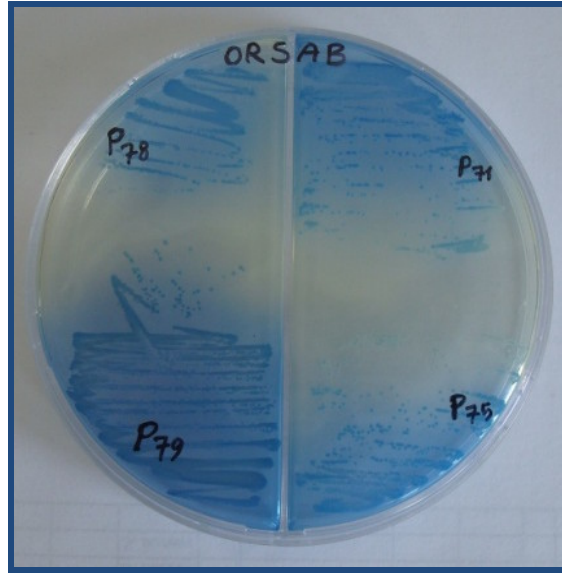
†Parantez içindeki rakamlar yüzdeleri göstermektedir



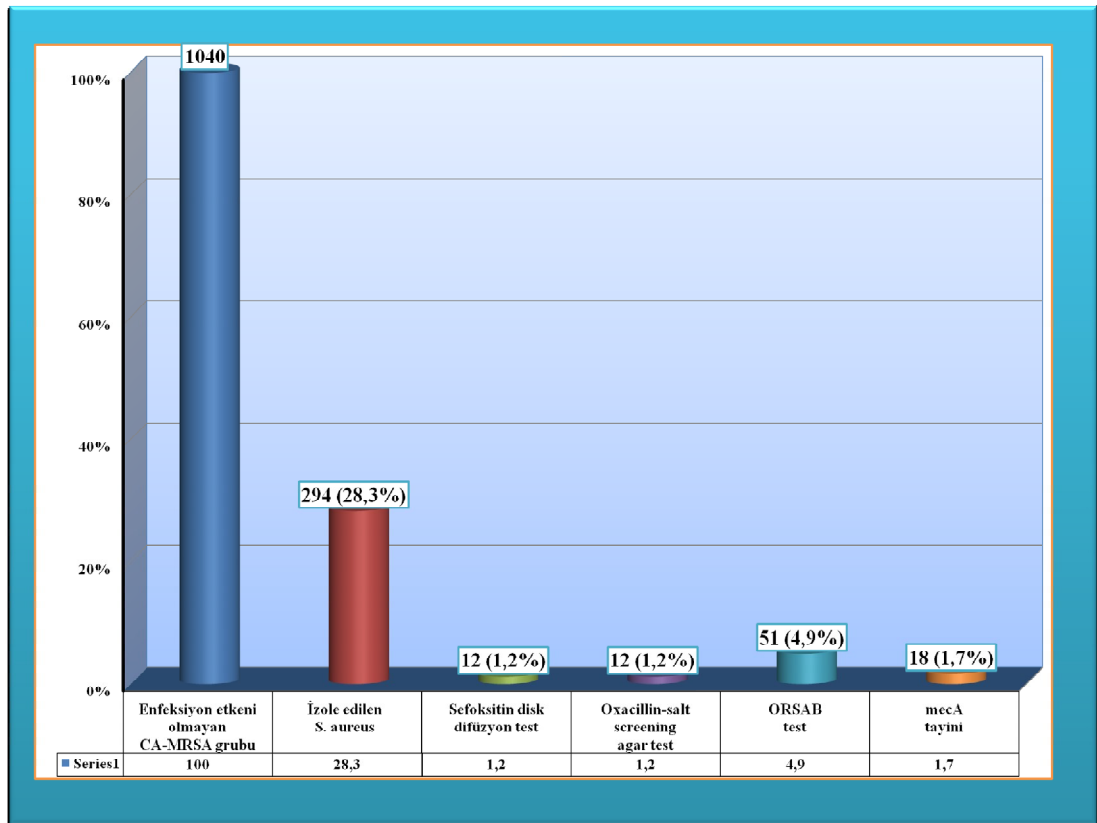
Şekil 3.4. Sefoksitin (30 µg) disk difüzyon testi



Şekil 3.5. Oksasilin tuz tarama agar testi



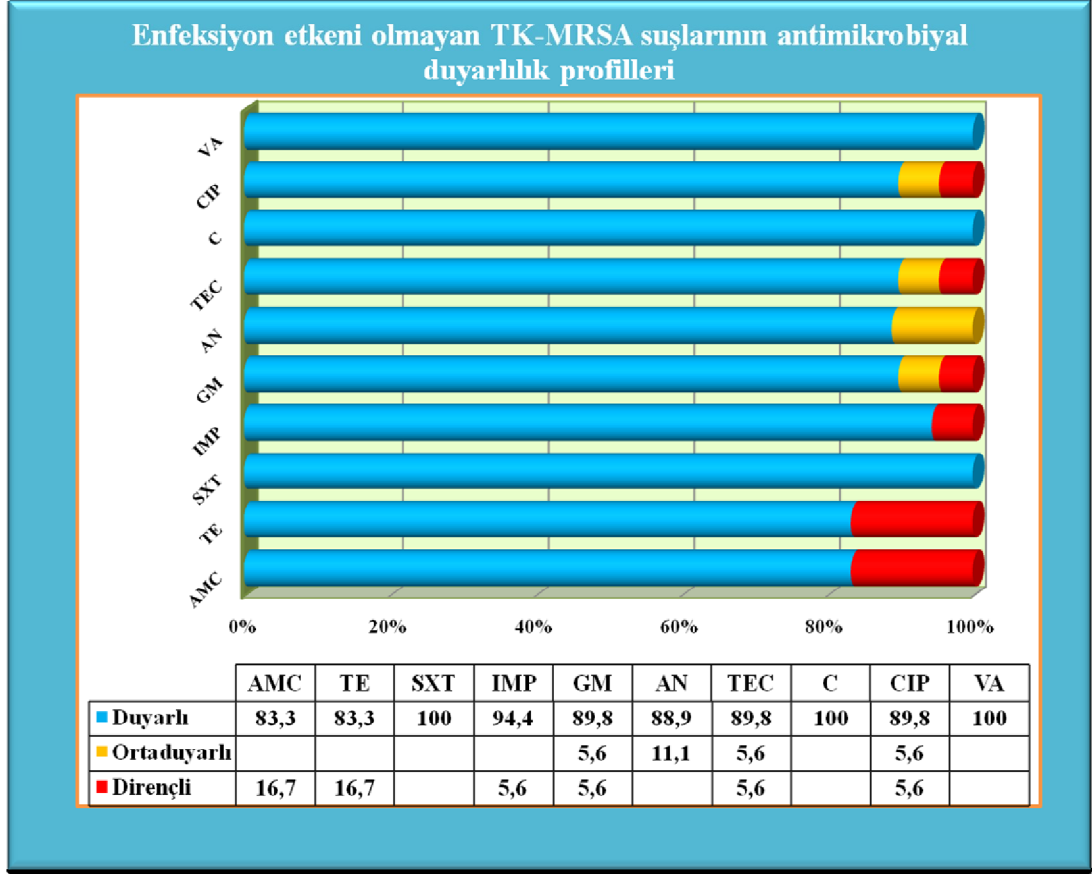
Şekil 3.6. ORSAB testi



Çizelge 3.9. Enfeksiyon etkeni olmayan TK-MRSA suşlarının saptanmasında kullanılan yöntemlerin sonuçları

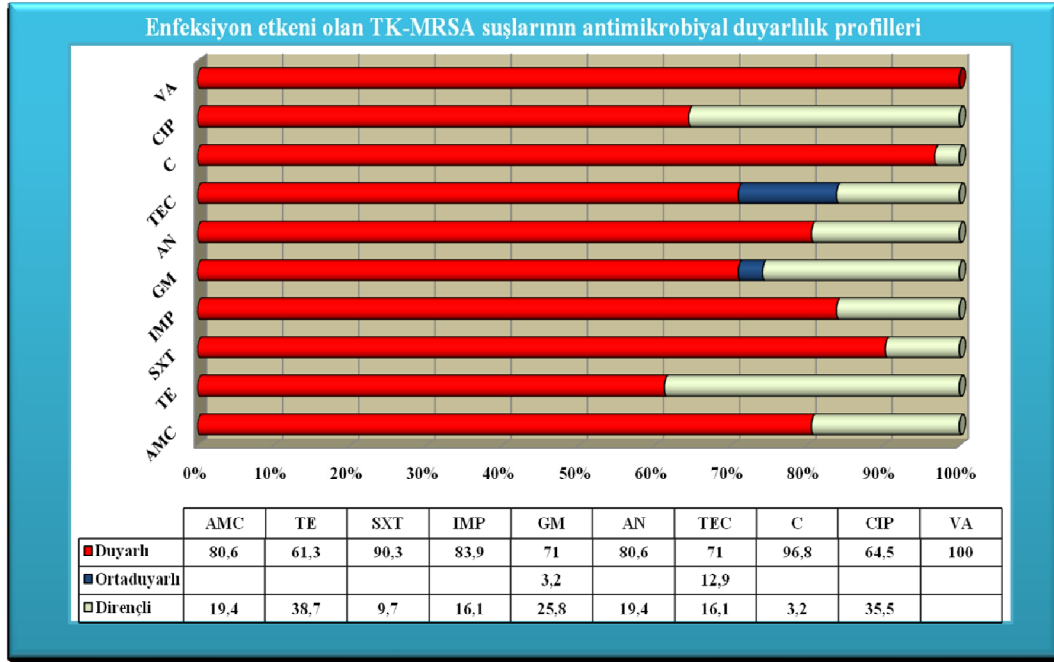
Enfeksiyon etkeni olmayan TK-MRSA suşlarının antimikrobiyal duyarlılık profilleri çizelge 3.10 ve 3.16'da verilmiştir. En duyarlı antimikrobiyaller sırasıyla

vankomisin %100 (18/18), trimetoprim/sulfametoksazol %100 (18/18) ve kloramfenikol %100 (18/18) iken, tetrasiklin %16,7 (3/18) ve amoksisilin/klavulanik asit %16,7 (3/18) en dirençli antimikrobisaller olarak bulunmuştur.



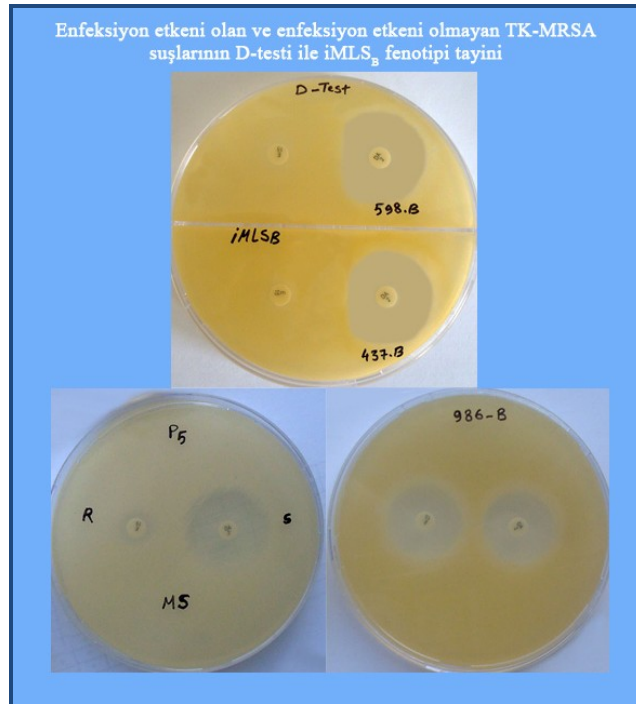
**Çizelge 3.10.** Enfeksiyon etkeni olmayan TK-MRSA suşlarının antimikrobiyal duyarlılık profilleri

Enfeksiyon etkeni olan TK-MRSA suşlarının antimikrobiyal duyarlılık profilleri çizelge 3.11 ve 3.16'da verilmiştir. En duyarlı antimikrobisaller sırasıyla vankomisin %100 (31/31) ve kloramfenikol %96,8 (1/31) iken, tetrasiklin %38,7 (12/31) ve siprofloksasin %35,5 (11/31) en dirençli antimikrobisaller olarak bulunmuştur.

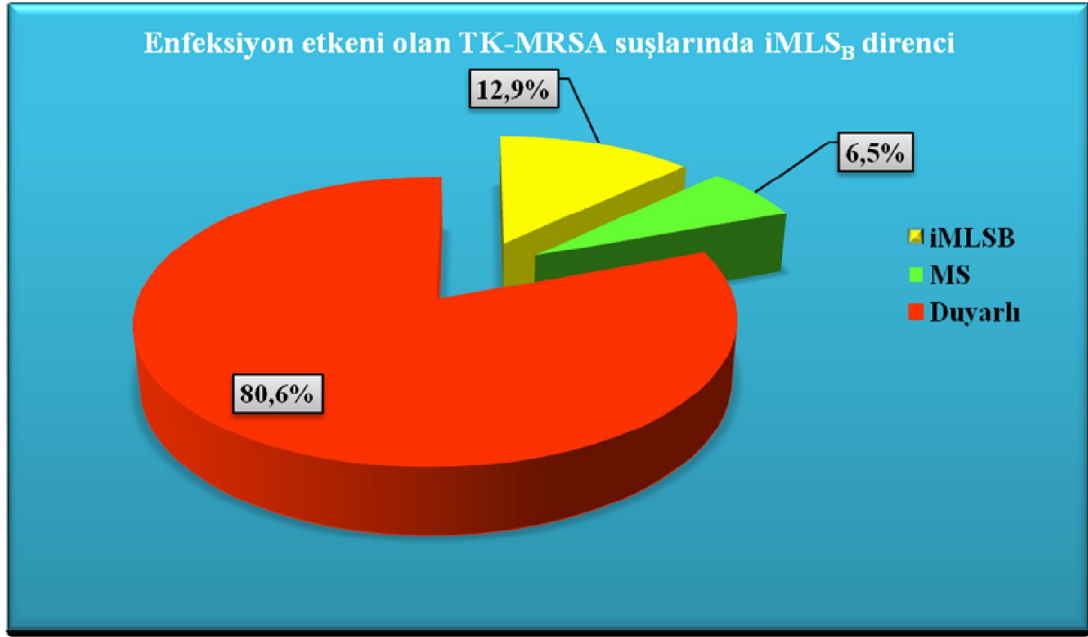


**Çizelge 3.11.** Enfeksiyon etkeni olan TK-MRSA suşlarının antimikrobiyal duyarlılık profilleri

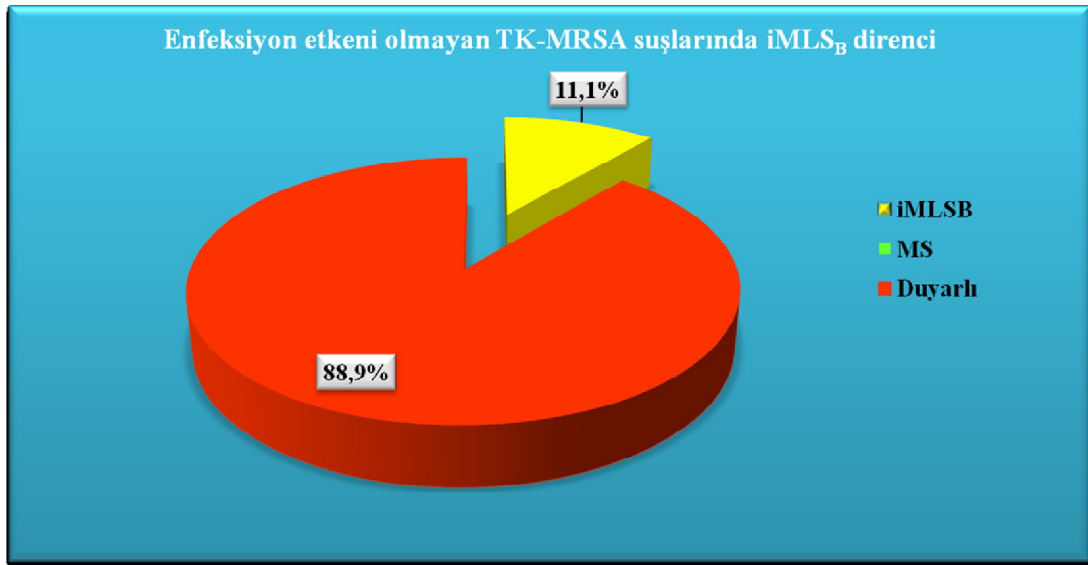
Enfeksiyon etkeni olan ve enfeksiyon etkeni olmayan TK-MRSA suşlarının iMLS<sub>B</sub> fenotipi tayini D-test ile yapılmıştır. Sonuçlar şekil 3.7, çizelge 3.9, 3.10 ve 3,16'da verilmiştir.



**Şekil 3.7.** Enfeksiyon etkeni olan ve enfeksiyon etkeni olmayan TK-MRSA suşlarının D-testi ile iMLS<sub>B</sub> fenotipi tayini



Çizelge 3.12. Enfeksiyon etkeni olan TK-MRSA suşlarında iMLS<sub>B</sub> direnci



Çizelge 3.13. Enfeksiyon etkeni olmayan TK-MRSA suşlarında iMLS<sub>B</sub> direnci

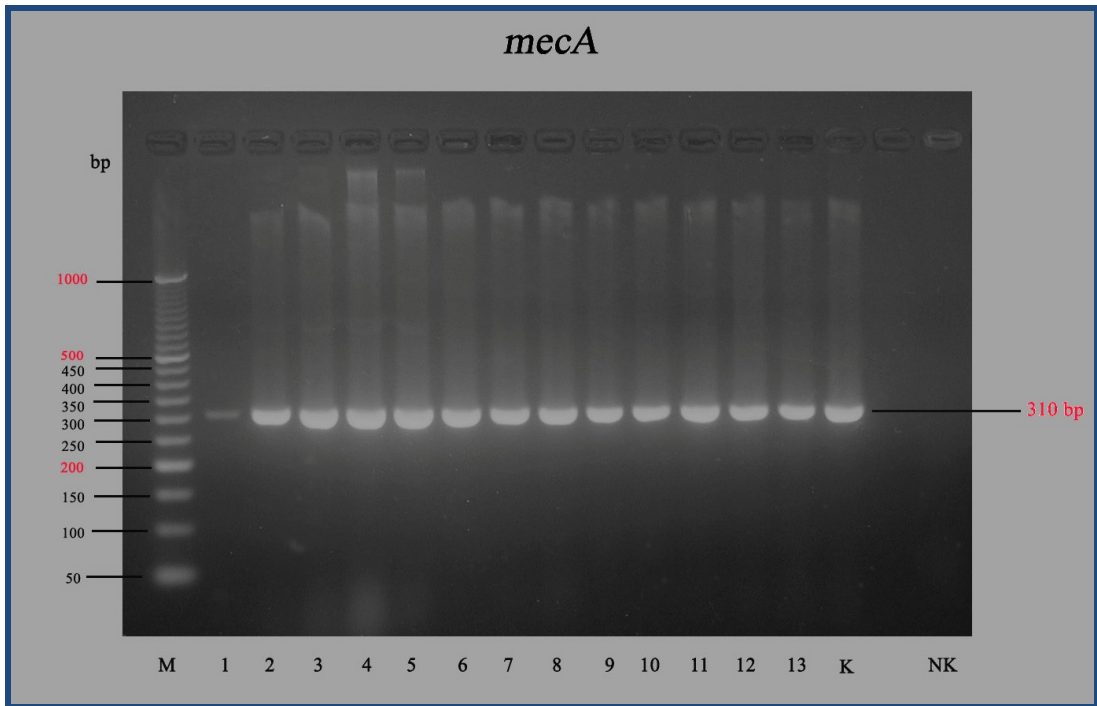
iMLS<sub>B</sub> (ER-R, C-S, D<sup>+</sup>) fenotipi enfeksiyon etkeni olan TK-MRSA suşlarında %12,9 (4/31), enfeksiyon etkeni olmayan TK-MRSA suşlarında ise %11,1 (2/18) olarak bulunmuştur. Makrolid ve streptogramin dirençliği (MS) fenotipi (ER-R, C-S, D<sup>-</sup>) enfeksiyon etkeni olan TK-MRSA suşlarında %6,5 (2/31), enfeksiyon etkeni olmayan TK-MRSA suşlarında ise %0 (0/18) olarak bulunmuştur. Eritromisin ve klindamisin duyarlılığı (S) fenotipi (ER-S, C-S) enfeksiyon etkeni olmayan TK-

MRSA suşlarında %88,9 (16/18), enfeksiyon etkeni olan TK-MRSA suşlarında ise %80,6 (25/31) olarak bulunmuştur. Yapısal makrolid, linkozamid ve strptogramin B direnç (cMLS<sub>B</sub>) fenotipi (ER-R, C-R) enfeksiyon etkeni olan ve olmayan TK-MRSA suşlarında tespit edilmemiştir (Çizelge 3.16).

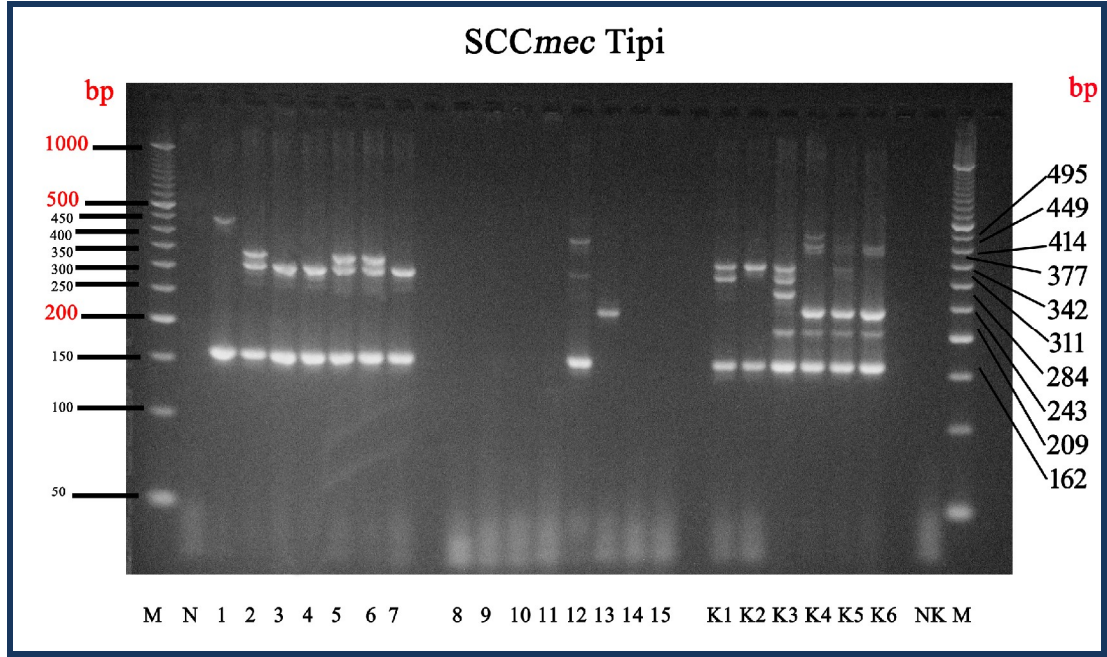
### 3.2. PZR Bulguları

#### 3.2.1. TK-MRSA Suşlarının SCC<sub>mec</sub> Tiplendirmesi

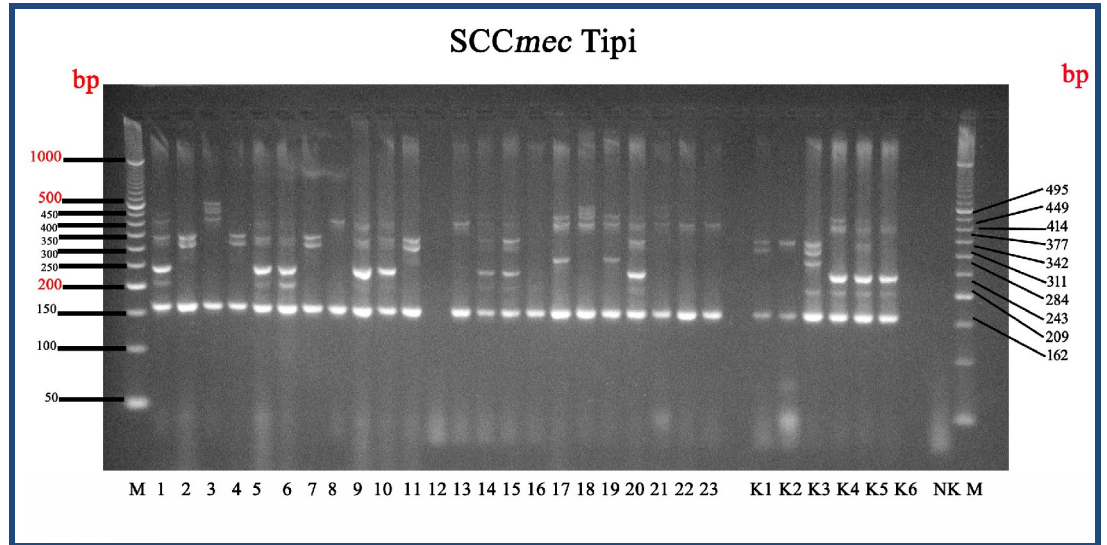
Genotipik metisilin direncini incelemek amacıyla, izole edilen 294 *S. aureus* suşunda PZR ile *mecA* geni aranmıştır. *mecA* geni pozitif bulunan, enfeksiyon etkeni olmayan 18 ve enfeksiyon etkeni olan 31 TK-MRSA suşunun tip tayini için SCC<sub>mec</sub> ve *ccr* tiplendirme yöntemleri kullanılmıştır. Elde edilen PZR sonuçları şekil 3.8, 3.9, 3.10, 3.11, 3.12, 3.13, 3.14 ve 3.15'te verilmiştir.



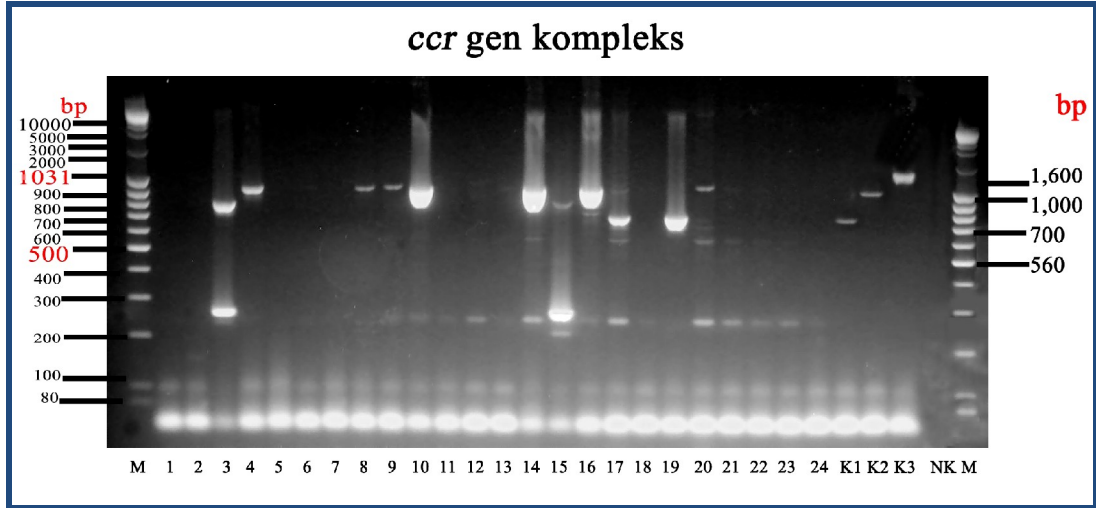
**Şekil 3.8.** MRSA suşlarının *mecA* genlerinin jel görüntüleri (M: Moleküler büyüklük belirteci, 1-13: MRSA suşları, K: Kontrol suş, NK: Negatif kontrol)



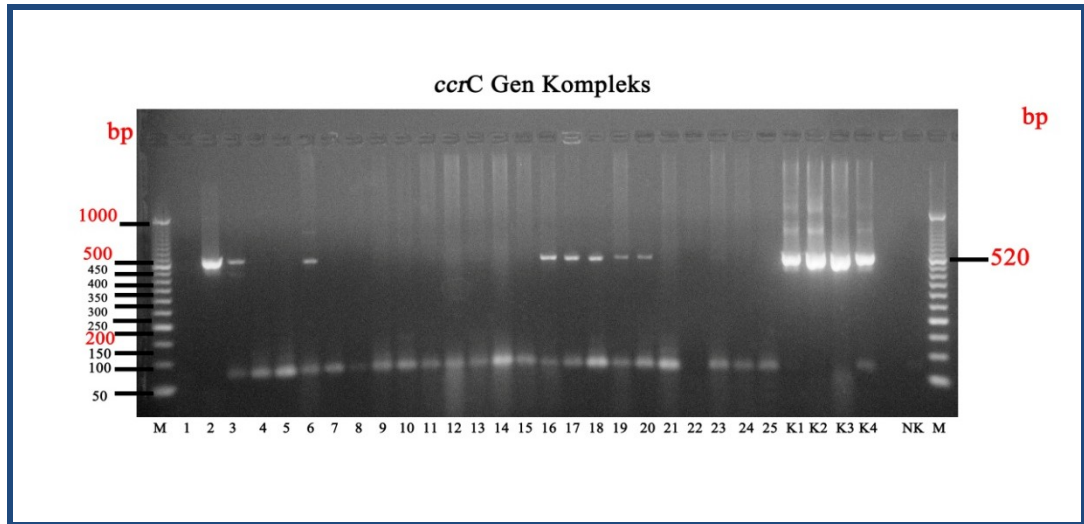
**Şekil 3.9.** Enfeksiyon etkeni olmayan TK-MRSA suşlarının SCCmec tiplerinin jel görüntüleri (M: Moleküler büyüklük belirteci, N: MSSA, 1-15: MRSA suşları, K1-K6: Kontrol suşları [K1: GRE-14, K2: HPV-107, K3: BK-2464, K4: HUSA-304, K5: HDE-288 ve K6: HSJ-216], NK: Negatif kontrol)



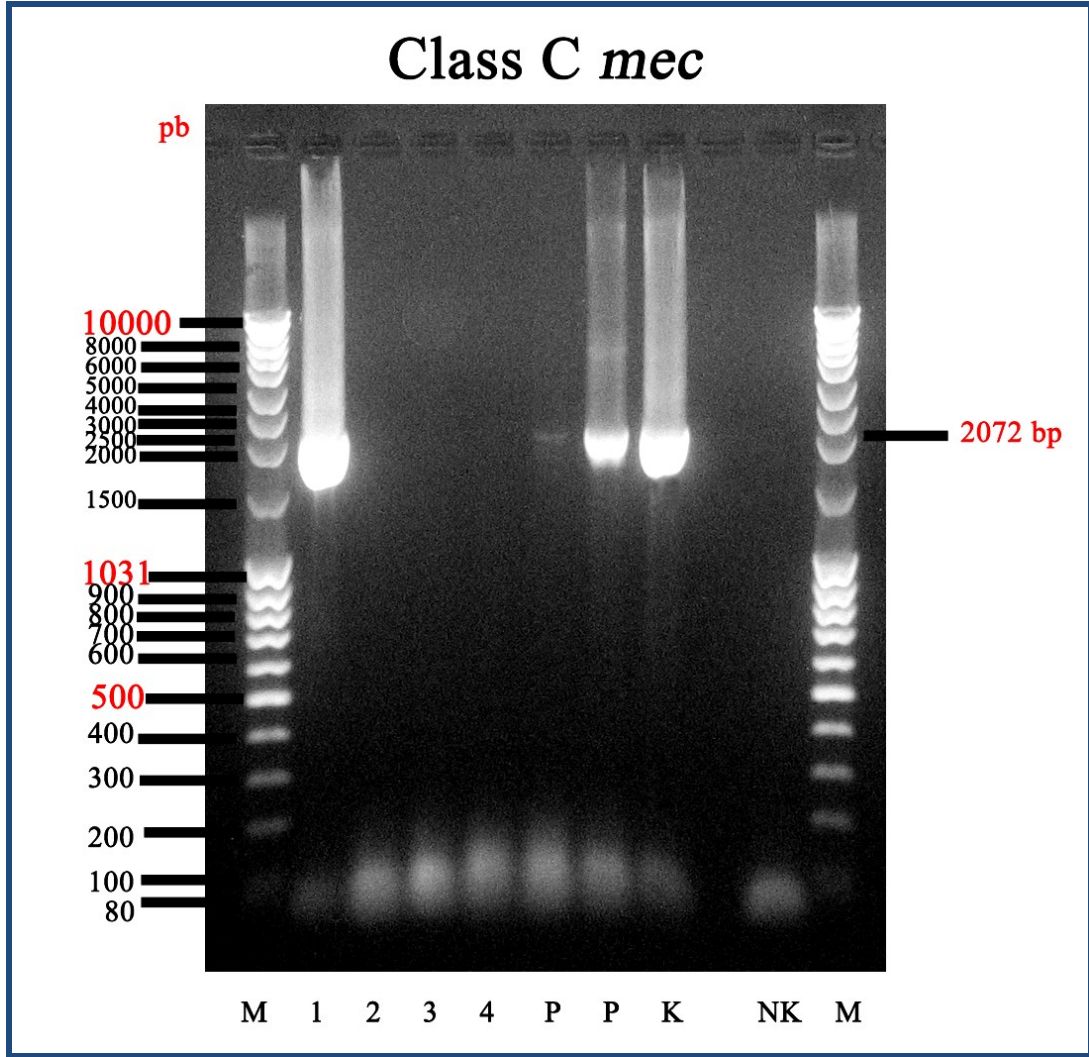
**Şekil 3.10.** Enfeksiyon etkeni olan TK-MRSA suşlarının SCCmec tiplerinin jel görüntüleri (M: Moleküler büyüklük belirteci, 1-23: MRSA suşları, K1-K6: Kontrol suşları [K1: GRE-14, K2: HPV-107, K3: BK-2464, K4: HUSA-304, K5: HDE-288 ve K6: HSJ-216], NK: Negatif kontrol)



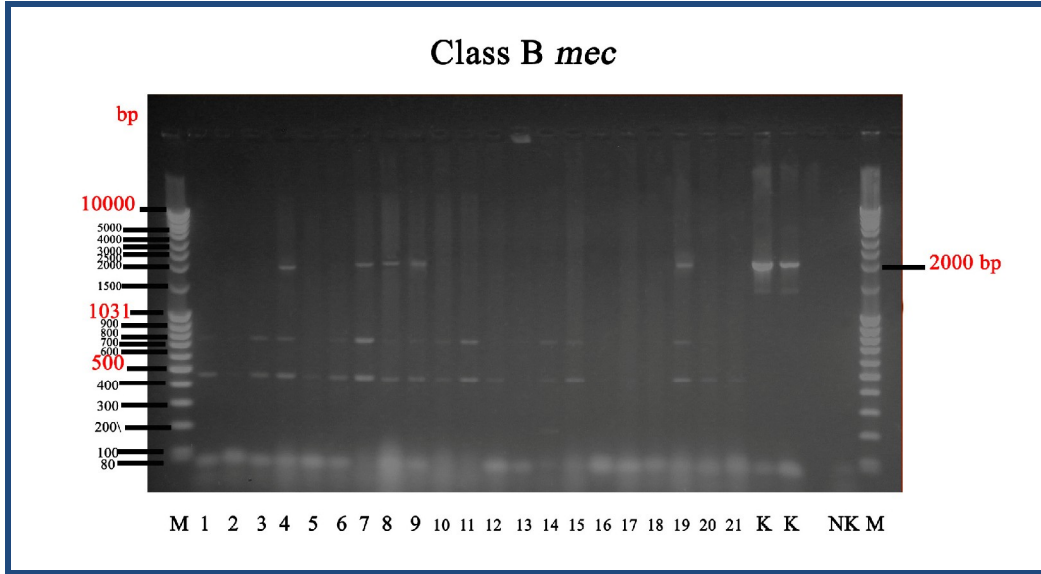
**Şekil 3.11.** TK-MRSA suşlarının *ccr* gen komplekslerinin jel görüntüleri (M: Moleküler büyüklük belirteci, 1-24: MRSA suşları, K1-K3: Kontrol suşları [K1: GRE-14, K2: HPV-107, K3: HUSA-304], NK: Negatif kontrol)



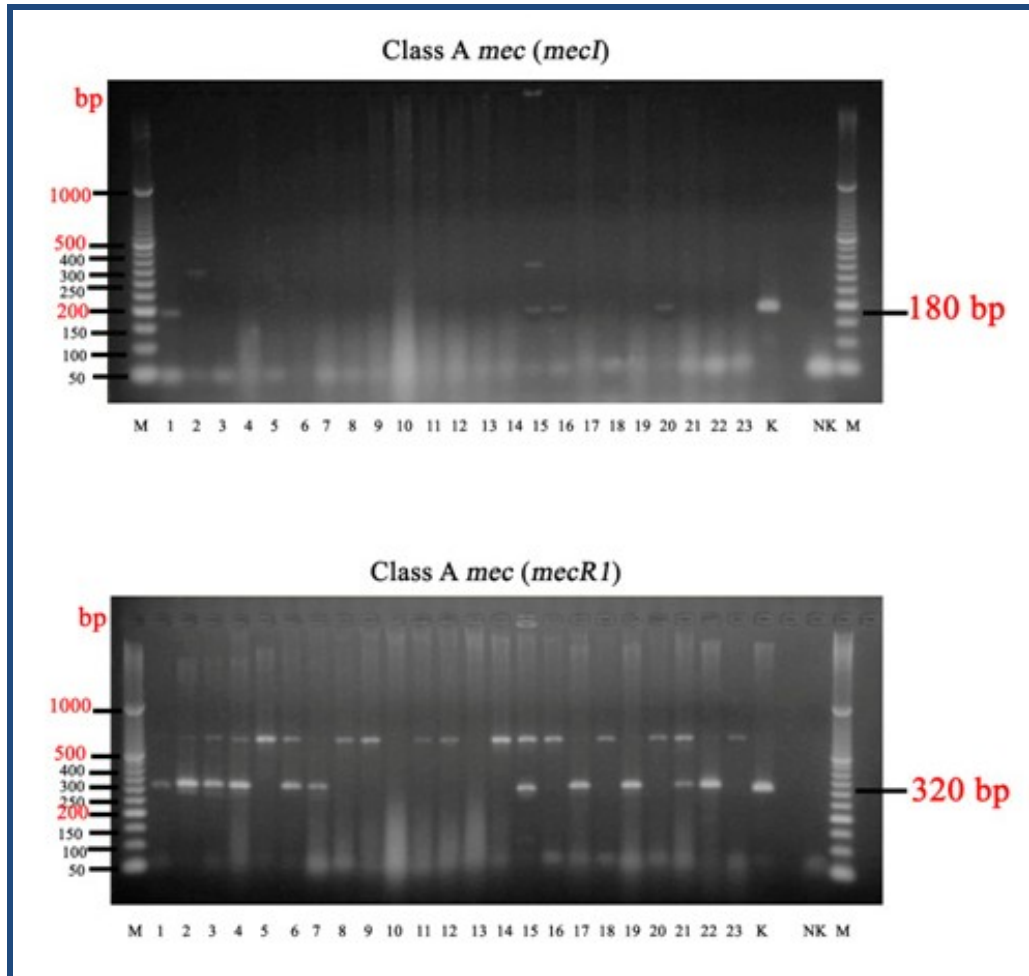
**Şekil 3.12.** TK-MRSA suşlarının *ccrC* gen komplekslerinin jel görüntüleri (M: Moleküler büyüklük belirteci, 1-25: MRSA suşları, K1-K4: Kontrol suşları [tip V], NK: Negatif kontrol)



**Şekil 3.13.** TK-MRSA suşlarının class C *mec* genlerinin jel görüntüleri (M: Moleküler büyüklük belirteci, 1-4: Enfeksiyon etkeni olmayan TK-MRSA suşları, P: Enfeksiyon etkeni olan TK-MRSA suşları, K: Kontrol suş, NK: Negatif control)

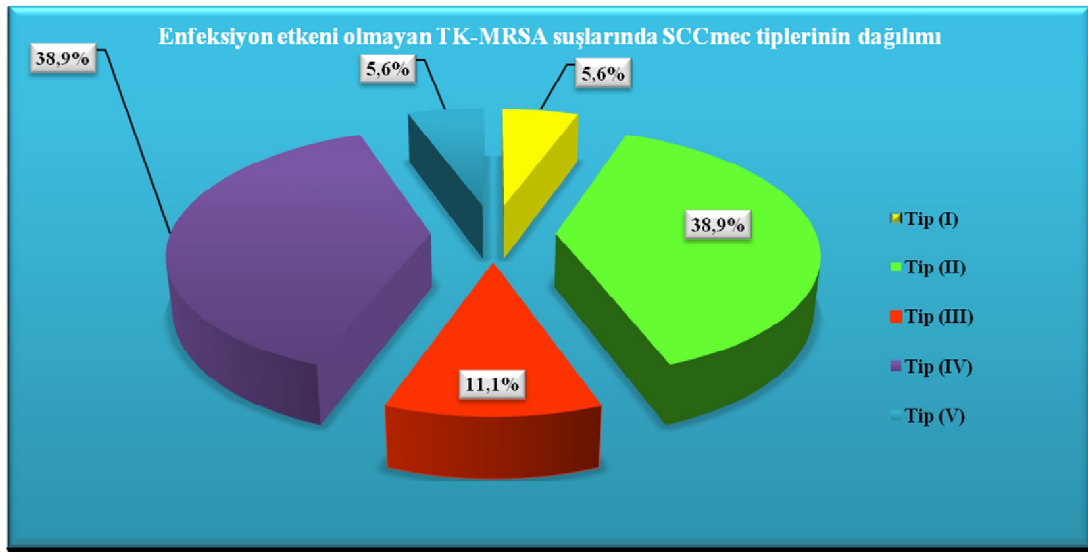


**Şekil 3.14.** TK-MRSA suşlarının class B *mec* genlerinin jel görüntüleri (M: Moleküler büyüklük belirteci, 1-21: MRSA suşları, K: Kontrol suşları, NK: Negatif kontrol)

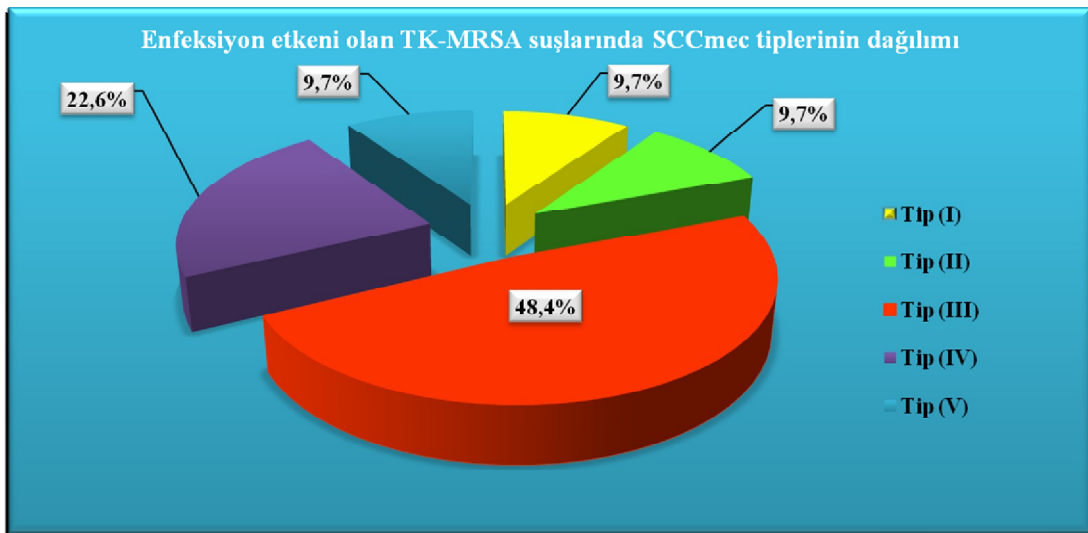


**Şekil 3.15.** TK-MRSA suşlarının class B *mec* genlerinin jel görüntüleri (M: Moleküler büyüklük belirteci, 1-23: MRSA suşları, K: Kontrol suş, NK: Negatif control)

SCCmec tip tayini sonucunda, enfeksiyon etkeni olmayan TK-MRSA suşlarında tip I %5,6 (1/18), tip II %38,9 (7/18), tip III %11,1 (2/18), tip IV %38,9 (7/18) ve tip V %5,6 (1/18) olarak bulunmuş ve tip VI bulunmamıştır; enfeksiyon etkeni olan TK-MRSA suşlarında ise tip I %9,7 (3/31), tip II %9,7 (3/31), tip III %48,4 (15/31), tip IV %22,6 (7/31) ve tip V %9,7 (3/31) olarak bulunmuş ve tip VI bulunmamıştır. Elde edilen sonuçlar çizelge 3.14 ve 3.15'te verilmiştir.



Çizelge 3.14. Enfeksiyon etkeni olmayan TK-MRSA suşlarında SCCmec tiplerinin dağılımı



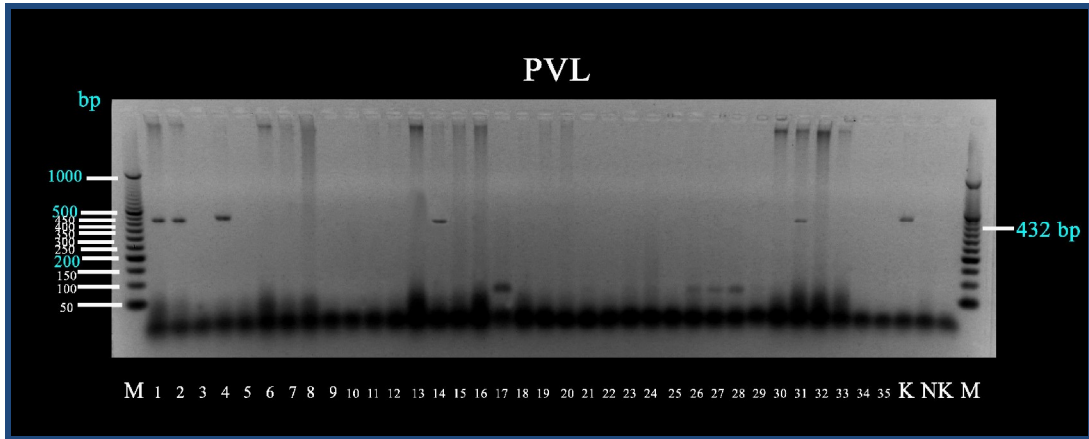
Çizelge 3.15. Enfeksiyon etkeni olan TK-MRSA suşlarında SCCmec tiplerinin dağılımı

İzole edilen 294 *S. aureus* suşunda fenotipik metisilin direnci CLSI'nin önerileri doğrultusunda incelenmiştir. Bu amaçla sefoksitin (30 µg) disk difüzyon yöntemi ve oxacillin salt screening test kullanılmış ve 12 suş MRSA olarak tanımlanmıştır. Bu suşların her biri SCC*mec* yöntemiyle tiplendirilmiştir. 294 *S. aureus* suşunda genotipik metisilin direncini göstermek amacıyla *mecA* gen tayini yapılmış ve 18'inde *mecA* geni pozitif bulunmuştur. Bunlardan 12'si aynı zamanda fenotipik olarak da MRSA olarak tanımlanan suşlardır. Buna karşın *mecA* geni pozitif bulunan 6 suş, fenotipik olarak metisiline duyarlı bulunmuştur.

Genotipik ve fenotipik olarak pozitif bulunan 12 suş, hem SCC*mec* hem de *ccr* yöntemi ile tiplendirilmiş; genotipik olarak pozitif, ancak fenotipik olarak negatif bulunan 6 suş ise sadece *ccr* yöntemiyle tiplendirilebilmiştir. Bu 6 suş potansiyel MRSA olarak kabul edilmiştir.

### 3.2.2. TK-MRSA Suşlarında PVL Tayini

*mecA* pozitif bulunan enfeksiyon etkeni olmayan 18 ve enfeksiyon etkeni olan 31 TK-MRSA suşunda, PVL geni PZR yöntemi ile araştırılmış, jel görüntüleri 3.16'da verilmiştir. Enfeksiyon etkeni olmayan 18 TK-MRSA suşundan 4'ü (4/18) PVL (+) bulunurken, enfeksiyon etkeni olan 31 TK-MRSA suşundan hiçbirinde PVL geni bulunmamıştır. SCC*mec* ve/veya *ccr* yöntemiyle tiplendirilen 18 MRSA suşundan PVL (+) bulunan 4 suşun hepsi de tip IV olarak tanımlanmıştır.



**Şekil 3.16.** TK-MRSA suşlarının PVL jel görüntüleri (M: Moleküler büyüklük belirteci, 1-18: Enfeksiyon etkeni olmayan MRSA suşları, P1-P17: [Enfeksiyon etkeni olan MRSA suşları], K: Kontrol suş, NK: Negatif control)

Çizelge 3.16. Enfeksiyon etkeni olan ve olmayan CA-MRSA suşlarının özellikleri

Özellikler	Enfeksiyon etkeni olan CA-MRSA N=31 (%)		Enfeksiyon etkeni olmayan CA-MRSA N=18 (%)		Enfeksiyon etkeni olan ve olmayan CA-MRSA'ların *P
	Duyarlı	Ortaduyarlı	Dirençli	Dirençli	
Yaş ortalaması	39,6±19,9		29,39 ± 13,73		
Cinsiyet					NS
Erkek	21 (67,7)		13 (72,2)		
Kadın	10 (32,3)		5 (27,8)		
SCCmec tipi					NS
Tip I	3 (9,7)		1 (5,6)		
Tip II	3 (9,7)		7 (38,9)		
Tip III	15 (48,4)		2 (11,1)		
Tip IV	7 (22,6)		7 (38,9)		
Tip V	3 (9,7)		1 (5,6)		
Tip VI	0 (0)		0 (0)		
PVL	0 (0)		4 (22,2)		<0,014 ‡
Antimikrobiyal duyarlılık profilleri					
AMC	25 (80,6)	0 (0,0)	6 (19,4)	3 (16,7)	NS
TE	19 (61,3)	0 (0,0)	12 (38,7)	3 (16,7)	NS
SXT	28 (90,3)	0 (0,0)	3 (9,7)	0 (0,0)	NS
IMP	26 (83,9)	0 (0,0)	5 (16,1)	1 (5,6)	NS
GM	22 (71,0)	1 (3,2)	8 (25,8)	1 (5,6)	NS
AN	25 (80,6)	0 (0,0)	6 (19,4)	0 (0,0)	NS
TEC	22 (71,0)	4 (12,9)	5 (16,1)	1 (5,6)	NS
C	30 (96,8)	0 (0,0)	1 (3,2)	0 (0,0)	NS
CIP	20 (64,5)	0 (0,0)	11 (35,5)	1 (5,6)	NS
VA	31 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	NS
İndiklenebilir Makrolid-Linkozamid Streptogramin B direnci	4 (12,9)		2 (11,1)		NS
IMLSB (ER-R, C-S, D <sup>+</sup> )	2 (6,5)		0 (0,0)		
MS (ER-R, C-S, D <sup>+</sup> )	25 (80,6)		16 (88,9)		
ER-S, C-S	0 (0,0)		0 (0,0)		
ER-R, C-R	0 (0,0)		0 (0,0)		

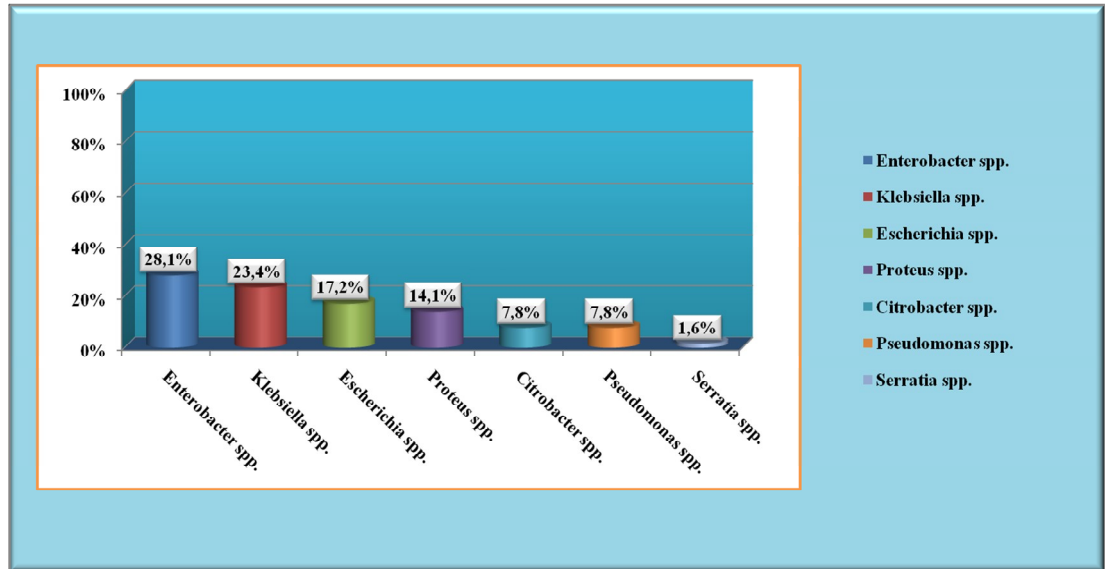
\*P değeri, ‡P < 0,05, NS; Anlamı değil, ER=Eritromisin, C=Klin damışın, D<sup>+</sup>=D-dest pozitif, D<sup>-</sup>=D-dest negatif, R=Dirençli, S=Duyarlı

### 3.3. Sağlıklı Bireyden Burun ve Koltuk Altı Örneklerinde Gram Negatif Suşların Dağılımı

1040 sağlıklı bireyden alınan burun ve koltuk altı örneklerinde, *Enterobacteriaceae* ailesinde yer alan 64 gram negatif basil üremiştir ve taşıyıcılık oranı %5,8 olarak bulunmuştur. En sık izole edilen tür *Enterobacter* spp. (%28,1) iken, bunu sırasıyla *Klebsiella* spp. (%23,4), *Escherichia* spp. (%17,2), *Proteus* spp. (%14,1), *Citrobacter* spp. (%7,8), *Pseudomonas* spp. (%7,8) ve *Serratia* spp. (%1,6) izlemiştir. Gram negatif suşların dağılımı çizelge 3.17 ve 3.18’de verilmiştir.

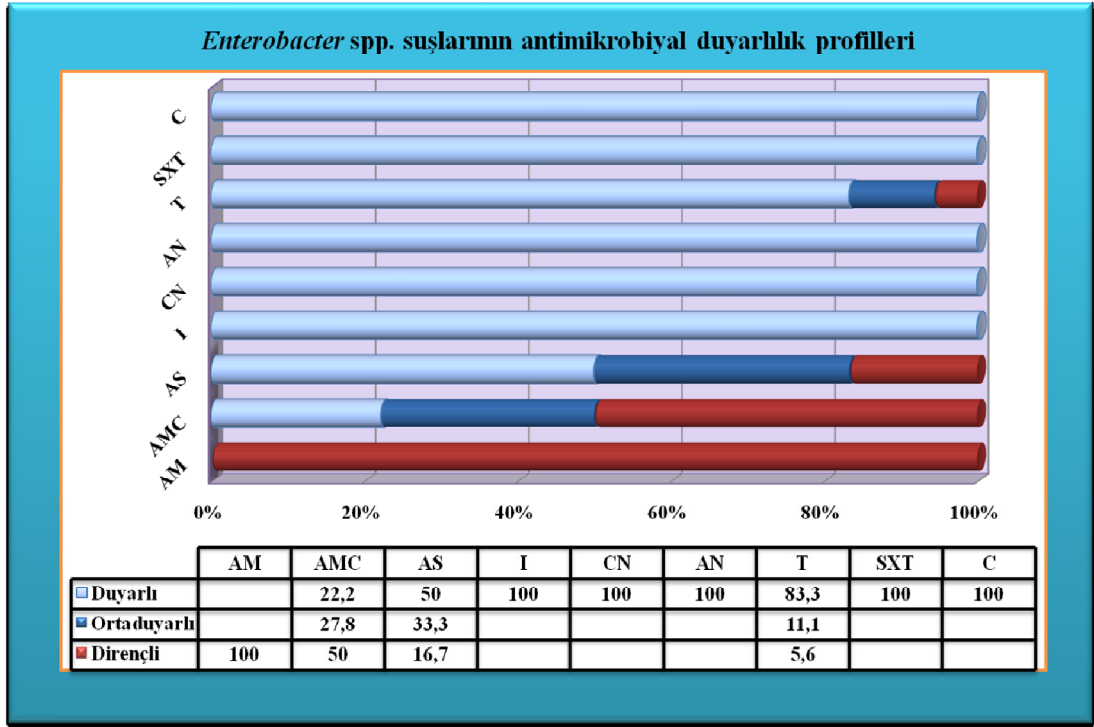
**Çizelge 3.17.** Sağlıklı bireyden burun ve koltuk altı örneklerinde gram negatif suşların dağılımı

Gram Negatif	Burun	Koltuk altı	Dağılımı (%)
<i>Enterobacter</i> spp.	14	4	18 (28,1)
<i>Klebsiella</i> spp.	10	5	15 (23,4)
<i>Escherichia</i> spp.	10	1	11 (17,2)
<i>Proteus</i> spp.	9	0	9 (14,1)
<i>Citrobacter</i> spp.	5	0	5 (7,8)
<i>Pseudomonas</i> spp.	4	1	5 (7,8)
<i>Serratia</i> spp.	0	1	1 (1,6)

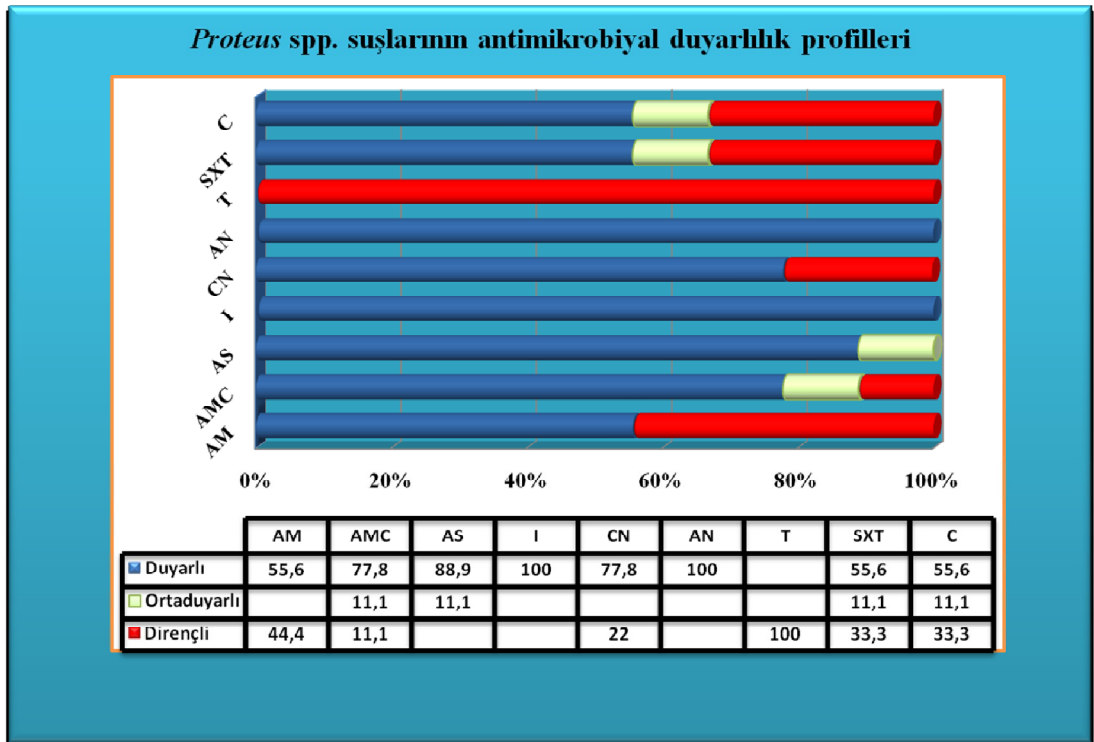


**Çizelge 3.18.** Sağlıklı bireyden burun ve koltuk altı örneklerinde gram negatif suşların dağılımı

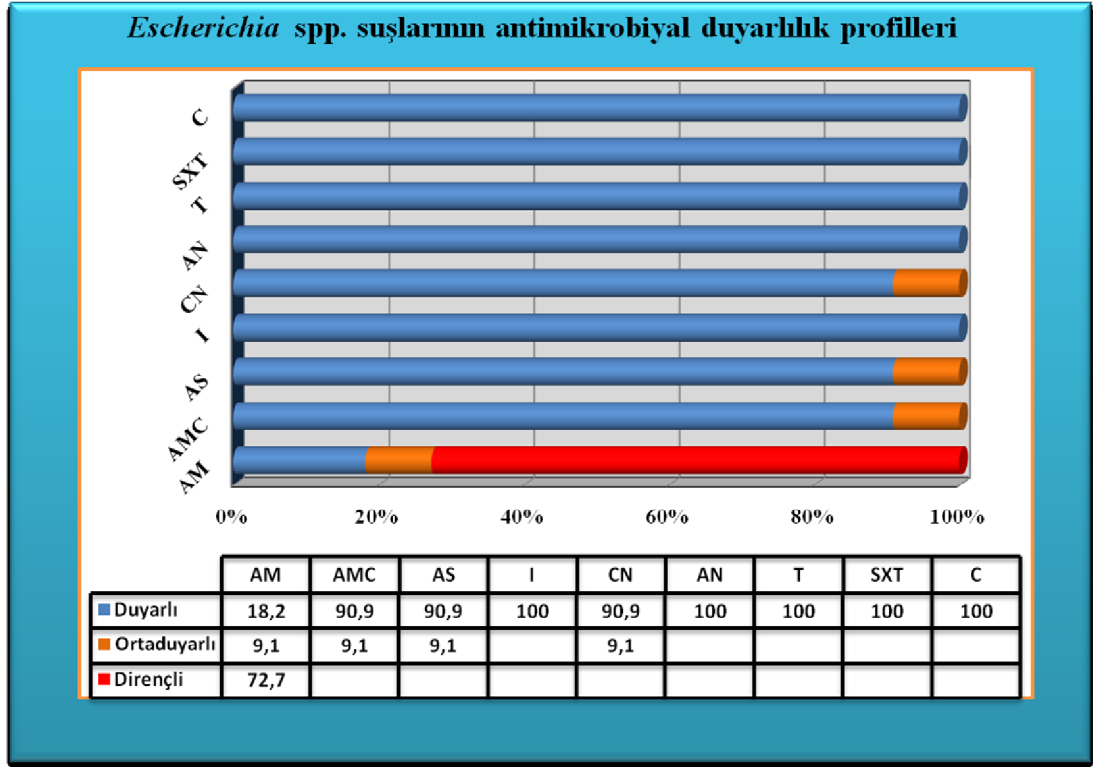




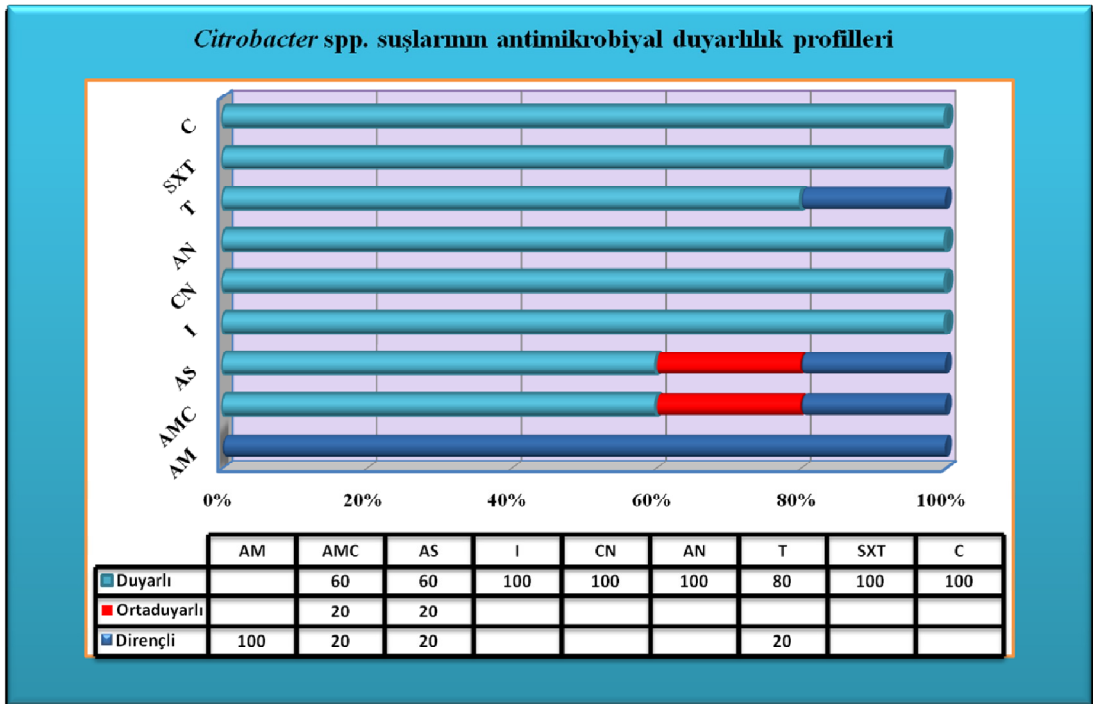
Çizelge 3.20. *Enterobacter* spp.'nin antimikrobiyal duyarlılık profilleri



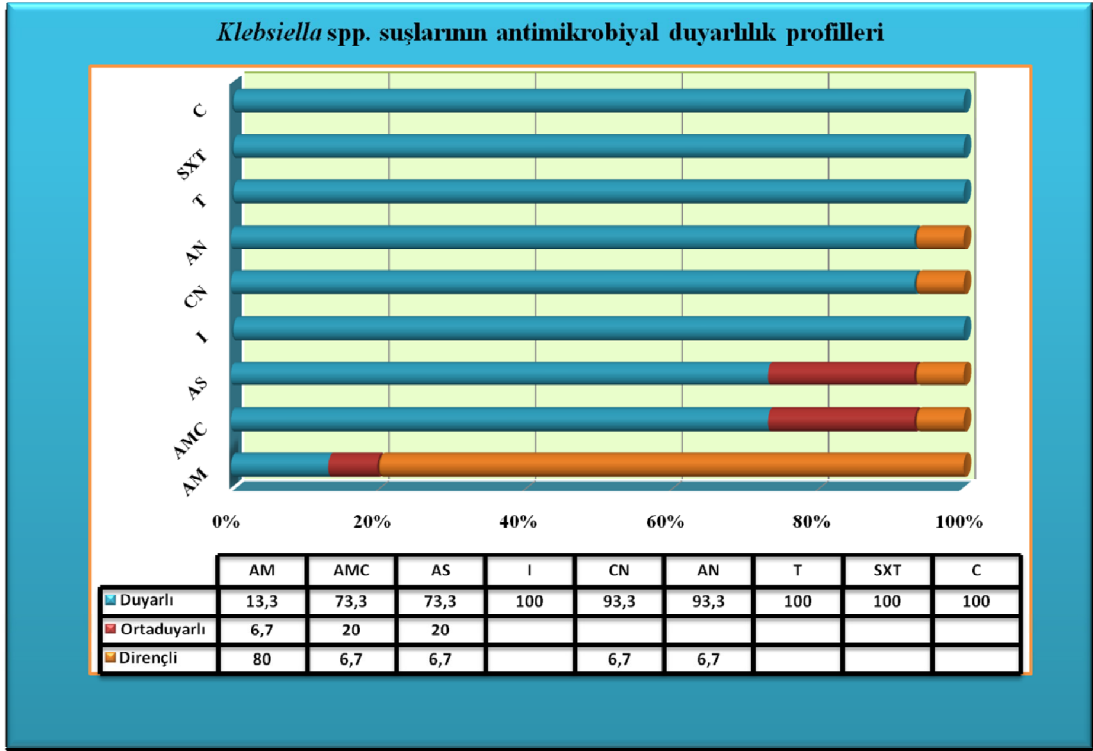
Çizelge 3.21. *Proteus* spp.'nin antimikrobiyal duyarlılık profilleri



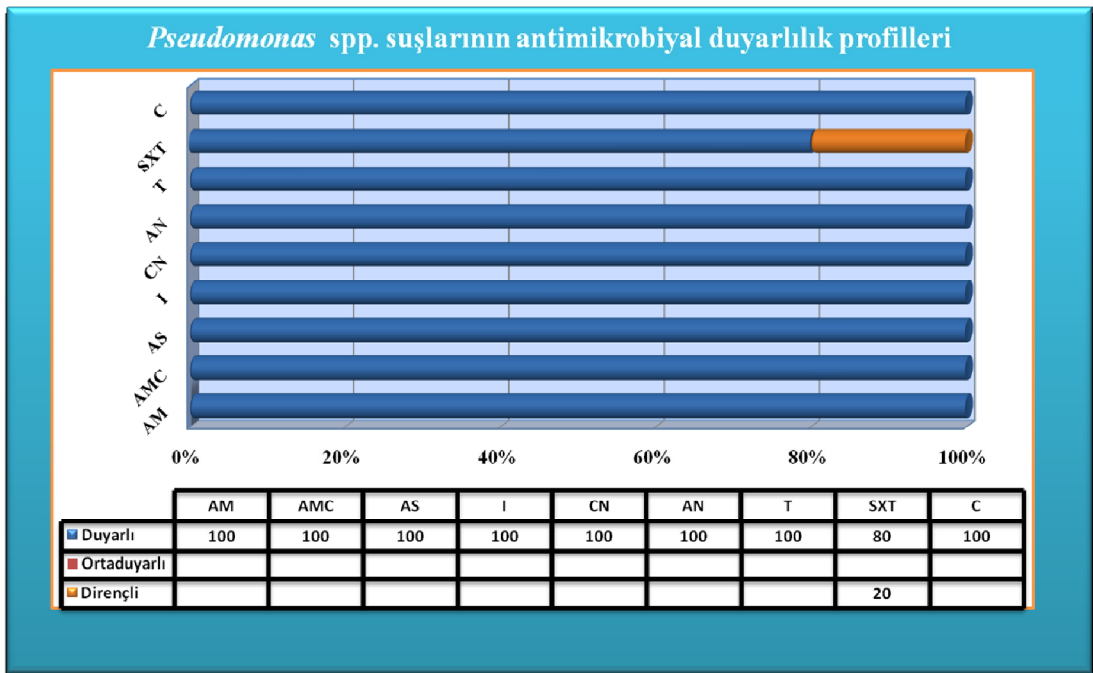
Çizelge 3.22. *Escherichia* spp.'nin antimikrobiyal duyarlılık profilleri



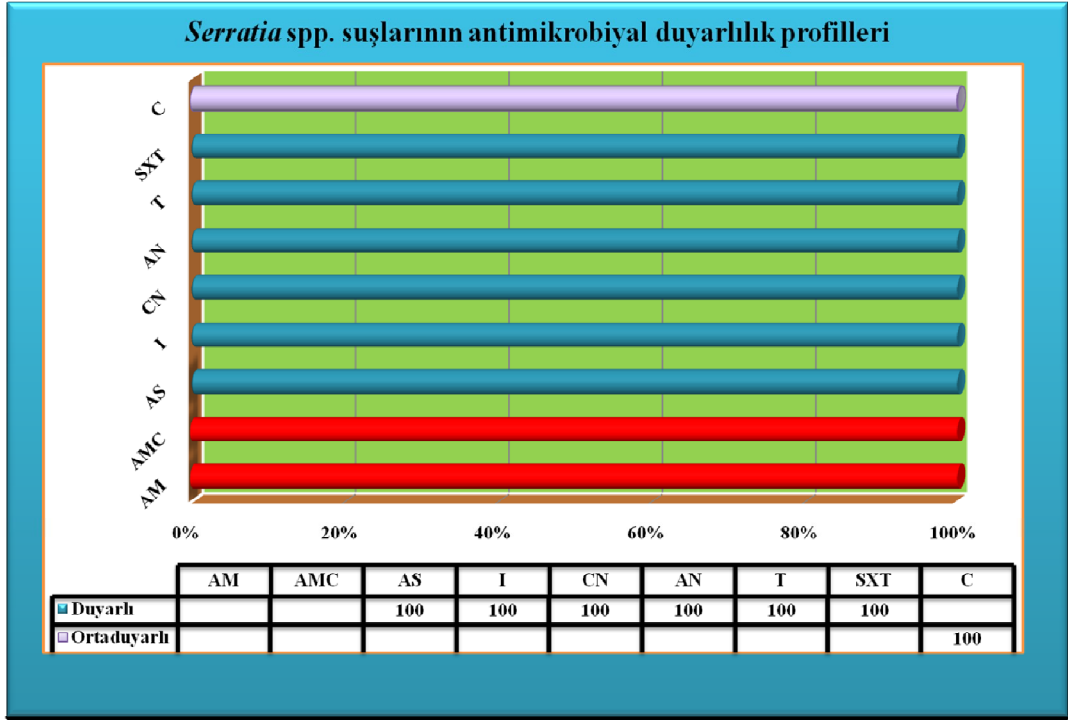
Çizelge 3.23. *Citrobacter* spp.'nin antimikrobiyal duyarlılık profilleri



Çizelge 3.24. *Klebsiella* spp.'nin antimikrobiyal duyarlılık profilleri

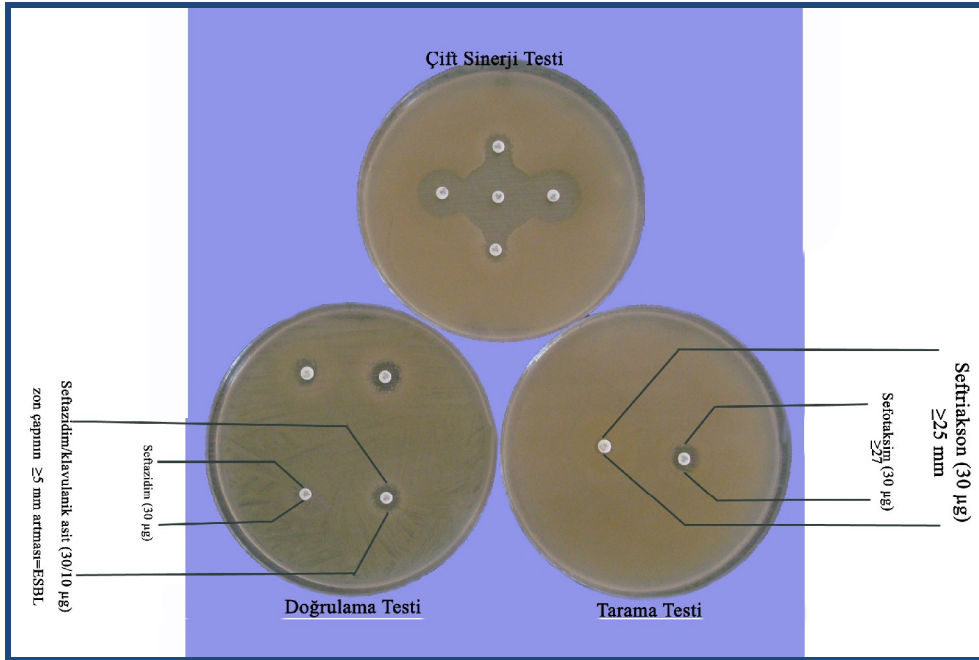


Çizelge 3.25. *Pseudomonas* spp.'nin antimikrobiyal duyarlılık profilleri



**Çizelge 3.26.** *Serratia* spp.'nin antimikrobiyal duyarlılık profilleri

Tarama, doğrulama ve çift disk sinerji yöntemleri kullanılarak 64 gram negatif izolatın 5'i (3 *Pseudomonas* spp. ve 2 *Klebsiella* spp.) ESBL (+) olarak tanımlanmıştır. ESBL pozitif suşların hepsi burun örneklerinden izole edilmiştir.



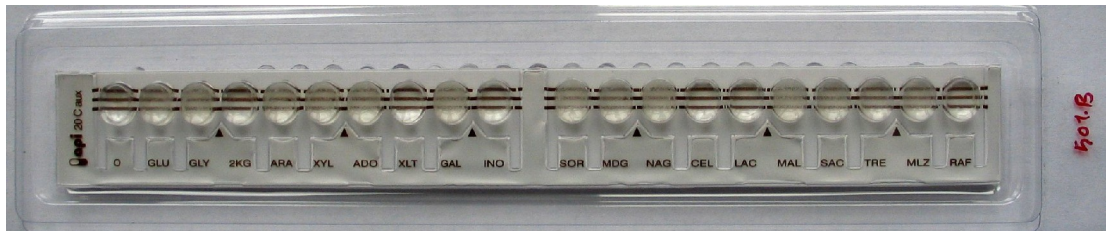
**Şekil 3.17.** Gram negatif suşların ESBL tayininde kullanılan yöntemler (tarama, doğrulama ve çift sinerji) ve elde edilen sonuçlar

### 3.5. Mantar İzolatlarının Dağılımı

Çalışmaya alınan 1040 sağlıklı bireyde, 3'ü (%0,3) koltuk altı ve 2'si (%0,2) burun örneklerinden olmak üzere toplam 5 maya mantarı antibiyotikli-SDA besiyerinde izole edilmiştir (Şekil 3.18). İzolatların germ tüp oluşturup oluşturmadıkları araştırıldıktan sonra, API 20 C AUX kiti ile biyokimyasal özellikleri incelenmiştir. Germ tüp oluşumu 1 ml insan serumunda 37C°'de 3 saat inkübasyonu takiben değerlendirilmiştir. Tüm izolatlar *Candida parapsilosis* olarak tanımlanmış, maya mantarı taşıyıcılığı %0,5 olarak bulunmuştur (Şekil 3.19).



Şekil 3.18. Antibiyotikli-SDA besiyerinde maya mantarlarının görünüşleri



Şekil 3.19. Maya mantarların API 20 C AUX ile yapılan tür tayini

#### 4. TARTIŞMA

Dirençli suşlarla oluşan enfeksiyonlar tüm dünyada önemli bir sağlık sorunu oluşturmaktadır. MRSA suşlarının tüm dünyada yayılması, özellikle hastanelerde bu suşlarla ortaya çıkan enfeksiyonların tedavisinde ciddi sorunlar doğurmaktadır. MRSA'lar, Avrupa'da metisilin kullanılmaya başlanmasından kısa süre sonra, 1960'larda ortaya çıkmış, 1980'lerin ortasına gelindiğinde ise epidemik suşlar tüm dünyadaki hastanelere yayılmıştır. Enfeksiyon kontrol önlemlerinin geliştirilmesi ve uygulanması sonucunda bu suşlar endemik hale gelmiş, arkasından, kolonize ve enfekte hastalardan oluşan ciddi bir rezervuar bırakmıştır. 1990'ların ortasından itibaren Avustralya, Kanada, Fransa ve ABD'nde, altta yatan herhangi bir risk faktörü bulunmayan hastalarda da TK-MRSA enfeksiyonlarının bildirilmesi, son yıllarda ortaya çıkan en önemli sağlık sorunlarından birisi olarak kabul edilmiştir (Witte, 2005).

*S. aureus* taşıyıcılığının tespit edilmesi, enfeksiyonların yayılma özelliği nedeniyle önem taşımaktadır. Taşıyıcılığın tespitinde anamnez ve fizik muayene bulguları yardımcı olamamaktadır. Taşıyıcılığı belirlemenin tek yolu, hastadan alınan klinik örneklerde bakterinin üretilmesidir. Bununla birlikte, farklı bireylerde, *S. aureus*'un farklı bölgelerde kolonize olabildiği ve tek başına nazal örnek alınmasının taşıyıcılığı belirlemede yetersiz kalabileceği de vurgulanmaktadır. Bu nedenle, taşıyıcılığın araştırılmasında, birden fazla kolonizasyon bölgesinden örnek alınması gerekmektedir. Ancak, hiçbir şikayeti bulunmayan sağlıklı insanlardan muayene materyalinin elde edilmesindeki güçlükler, taşıyıcılığın tespit edilmesinde, kontrolünde ve azaltılmasında başarısızlığa yol açmaktadır. MRSA suşları, çoklu antibiyotik direnci nedeniyle oldukça yüksek mortalite ile seyreden enfeksiyonlara yol açarlar. Bu bakterilerin sahip oldukları virulans faktörleri, neden oldukları enfeksiyonların patogeneğinde önemli rol oynamaktadır. Virulans faktörlerini kodlayan genlerdeki polimorfizmler *S. aureus* enfeksiyonlarının seyrini etkileyebileceğinden dolayı, izole edilen *S. aureus* suşlarının virulansında rol oynayan çeşitli genlerin ve ürünlerinin tanımlanması, enfeksiyonların patogeneğini

anlamada büyük önem taşımaktadır. Bu da ancak, izole edilen suşlarının tiplendirilmesi ile mümkün olabilmektedir.

*S. aureus*, başta burun ve deri olmak üzere perine, aksilla, nazofarinks, vajen ve rektumda kolonize olmakta, taşıyıcılık oranları yetişkinlerde %20-40'ı bulabilmektedir. Hem çocuklarda hem de yetişkinlerde, kolonizasyonun en sık görüldüğü yer burun bölgesidir. Taşıyıcılık durumu klinik açıdan büyük önem taşır, zira *S. aureus* kolonizasyon bölgesinden farklı bölgelere yayılarak endojen kaynaklı enfeksiyonlara yol açabilir. Örneğin, burun taşıyıcılarında cildin *S. aureus* ile kontamine olması, cerrahi uygulama ya da cilt bütünlüğünün herhangi bir nedenle bozulması durumunda çeşitli enfeksiyonlara neden olabilir (Saravolatz, 1982).

Burada *S. aureus* taşıyıcılığı prevalansı, çalışılan popülasyona göre değişkenlik gösterebilmektedir. Taşıyıcılık oranları yaş, ırk, cinsiyet, antibiyotik kullanımı, hastanede yatış öyküsü, altta yatan hastalıkların varlığı (diyabet, hemodiyaliz hastaları, vb.), nazogastrik tüp ve kateter mevcudiyeti, hijyenik alışkanlıklar ve giyim tarzı gibi birçok faktörden etkilenmektedir. Sağlık personeli (doktorlar, hemşireler, hasta bakıcılar, vb.) intravenöz ilaç kullananlar, uyuşturucu madde bağımlıları, dermatolojik hastalığı olanlar (ekzama gibi) ve HIV pozitif hastalarda taşıyıcılık oranları genel popülasyona göre daha yüksek bulunmaktadır. Ayrıca, taşıyıcı kişilerin aile bireylerinde de taşıyıcılık daha yaygın görülmektedir (Bradley, 1992; Moreno, 1995; Kluytmans, 1997; Kluytmans, 2005).

Creech ve ark. 2001 ve 2004 yıllarında, ABD'nde aynı popülasyonda sağlıklı gönüllülerde *S. aureus* taşıyıcılığı oranlarını sırasıyla %29,0 (145/500) ve %36,4 (182/500) olarak bulmuştur. Bu çalışmalarda, *S. aureus* taşıyıcılığında yıllar içerisinde görülen artış dikkat çekicidir. Yine, sağlıklı gönüllülerde *S. aureus* taşıyıcılığı Çizelge 3.16. Enfeksiyon etkeni olan ve olmayan CA-MRSA suşlarının özellikleri prevalansını araştırmak amacıyla yapılan çalışmalarda taşıyıcılık oranlarını, Kuehnert ve ark. (2006) ABD'nde %32,4 (2916/9622), Fluegge ve ark. (2006) Almanya'da %25,8 (489/1895) Leman ve ark. (2004) ABD'nde %27,3 (128/469), Hisata ve ark. (2005) Japonya'da %28,2 (231/818) olarak bulmuşlardır. Bu konuda ülkemizde yapılan çeşitli araştırmalarda *S. aureus* taşıyıcılığı Çizelge

3.16. Enfeksiyon etkeni olan ve olmayam CA-MRSA suşlarının özellikleri prevalansını Soysal ve ark. (2006) ve Oğuzkaya ve ark. (2008) İstanbul'da sırasıyla %17,3 (173/1000) ve %18,0 (36/200), Erdenizmenli ve ark. (2004) İzmir'de %11,0 (55/500), Uğur (2006) İstanbul'da %11,4 (552/4843), Çıtak ve ark. (2004) Ankara'da %31,1 (50/161), Karabiber ve ark. (1991) Ankara'da %28,5 (41/144) olarak tespit etmişlerdir. Uğur, Soysal, Erdenizmenli, Oğuzkaya ve ark.'nın çalışmalarında, *S. aureus* taşıyıcılığının düşük oranda bulunması dikkat çekicidir. Bu durum, çalışmaya alınan kişilerin risk faktörlerinin rölatif olarak az olması ile açıklanabilir. Bizim çalışmamızda yaş ortalaması (29,35±13,41) ve *S. aureus* taşıyıcılık oranı %27,1 (282/1040) olarak bulunmuştur. Bu oranlar ülkemizde ve dünyada bu konuda yapılan çalışmalarda elde edilen rakamlarla uyumludur. Sağlıklı bireylerde *S. aureus* taşıyıcılığı oranlarındaki farklılıklar yaş ortalamasından başka, mevsimsel ve lokal epidemiyolojik faktörler arasındaki değişkenlerle de açıklanabilir.

Erdenizmenli ve ark. (2004) 500 sağlıklı gönüllü üzerinde yaptıkları çalışmada 42'si (%8,4) burundan, 8'i (%1,6) koltuk altından ve 5'i (%1,0) hem burun hem de koltuk altından olmak üzere toplam 55 *S. aureus* izole etmişlerdir. Soysal ve ark. (2006) ise 1000 sağlıklı gönüllü üzerinde yaptıkları çalışmada 169'u (%16,9) burundan, 3'ü (%0,3) perineden ve 1'i (%0,1) hem burun hem de perineden olmak üzere toplam 173 *S. aureus* izole etmişlerdir. 1040 sağlıklı gönüllü üzerinde yürütülen bizim çalışmamızda ise, 259'u (%24,9) sadece burun, 11'i (%1,1) sadece koltuk altı ve 12'si (%1,2) hem burun hem de koltuk altından olmak üzere, toplam 294 *S. aureus* suşu izole edilmiştir. Bu durumda *S. aureus* taşıyıcılarında (toplam 282 kişi) burun kolonizasyonu %91,8 (259/282), koltuk altı kolonizasyonu %3,9 (11/282), hem burun hem de koltuk altı kolonizasyonu %4,3 (12/282) olarak hesaplanmıştır. Burun taşıyıcılığı ile koltuk altı taşıyıcılığı arasındaki fark istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ( $p<0,001$ ).

Erdenizmenli ve Soysal'ın çalışmalarında *S. aureus* burun taşıyıcılığının daha düşük oranlarda bulunması, yine çalışmaya alınan kişilerin yaş ortalamasının düşük olması ve hasta sayısının az olması ile açıklanabilir. *S. aureus* taşıyıcılığını, Kuehnert ve ark. (2006) ABD'nde erkeklerde %37,0 (1733/4685), kadınlarda %28,0 (1382/4937); Soysal ve ark. (2006) erkeklerde %16,9 (90/534), kadınlarda %17,8

(83/466); Oğuzkaya ve ark. (2008) erkeklerde %15,1 (16/106), kadınlarda %21,3 (20/94); Kenner ve ark. (2003) erkeklerde %43,6 (95/218), kadınlarda %31,4 (58/185) olarak tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da *S. aureus* taşıyıcılığı, Kuehnert ve Kenner'in çalışmalarına benzer şekilde, erkeklerde kadınlara göre daha yüksek tespit edilmiş (sırasıyla %32,1 [181/564] ve %21,2 [101/476]); taşıyıcılık ile cinsiyet arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur ( $p<0,001$ ). Birçok çalışmada *S. aureus* taşıyıcılığının erkeklerde kadınlara göre daha yüksek bulunması dikkat çekicidir. Kesin kanıtlar bulunmamakla birlikte, erkek ve kadınlar arasındaki hormonal ve anatomik farklılıklar, erkeklerde pubertenin daha ileri yaşlarda başlaması, erkeklerde andropoz yaşının kadınlardaki menapoz yaşına göre daha ileri olması, üzerinde durulması gereken faktörler olarak karşımıza çıkmaktadır. Erkeklerde taşıyıcılığın kadınlara oranla daha yüksek çıkması, kadınların el yıkama gibi temel hijyenik kurallara daha fazla uyduğunu da düşündürmektedir. Bunun yanısıra diğer hijyenik alışkanlıklar, çalışma mekanı ve koşulları, giyim alışkanlıkları, beslenme alışkanlıkları, fiziksel aktiviteler, sigara ve alkol kullanımı, uzun süreli toplu yerlerde bulunma, sosyoekonomik durum gibi çeşitli faktörler, kadın ve erkeklerde taşıyıcılık oranları arasındaki farkları açıklayabilecek niteliktedir. Buna karşın Soysal ve Oğuzkaya'nın çalışmalarında taşıyıcılık oranlarının kadınlarda düşük bulunması, örneklem sayısının yetersiz olması ile açıklanabilir.

Toplumda *S. aureus* taşıyıcılarının yaş dağılımına baktığımızda, Kuehnert ve ark. (2006) ABD'nde 1-19 yaş grubunda %36,9 (1760/4772), 20-59 yaş grubunda %31,4 (1033/3290) ve 60 yaş üstü grubunda %27,7 (432/1560); Fluegge ve ark. (2006) Almanya'da 5-7 yaş grubunda %25,8 (489/1895); Oğuzkaya ve ark. (2008) 5-7 yaş grubunda %18,0 (36/200); Soysal ve ark. (2006) 0-16 yaş grubunda %17,3 (173/1000) oranlarında *S. aureus* taşıyıcılığı saptamışlardır. Bizim çalışmamızda da benzer sonuçlar elde edilmiş ve *S. aureus* taşıyıcılığı 4-9 yaş grubunda %35,5 (11/31), 10-19 yaş grubunda %23,7 (46/194), 20-29 yaş grubunda %26,2 (106/405), 30-39 yaş grubunda %29,1 (51/175), 40-49 yaş grubunda %32,7 (48/147), 50-59 yaş grubunda %25,0 (12/48) ve 60 yaş üstü grubunda %22,5 (9/40) olarak bulunmuştur. Çalışmamızda taşıyıcılık oranı 4-9 yaş grubunda beklendiği gibi yüksek çıkmış, 60 yaş üstü grubunda ise daha yüksek olması beklenirken düşük çıkmıştır. Yaş

gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaması, gruplarda, yaş gruplarından bağımsız olarak risk faktörlerinin bulunması ve/veya gruplarda örnek sayısının yetersiz olması ile açıklanabilir.

*S. aureus* taşıyıcılarında risk faktörlerinin dağılımına bakıldığında, Erdenizmenli ve ark. (2004) 55 *S. aureus* taşıyıcısından 5'inin (%9,1) son 6 ay içinde  $\beta$ -laktam antibiyotik kullandığını, 3'ünün (%5,5) diyabet hastası olduğunu; Soysal ve ark. (2006) 173 *S. aureus* taşıyıcısından 64'ünün (%37,0) son 1 yıl içerisinde hastanede yatış öyküsü bulunduğunu, 106'sının (%61,3) son 6 ay içinde antibiyotik kullandığını, 25'inde (%14,5) üriner katater bulunduğunu ve 13'ünde (%7,5) son 6 ay içerisinde cerrahi müdahale öyküsü bulunduğunu bildirmişlerdir. Kenner ve ark. (2003) 153 *S. aureus* taşıyıcısından 18'inin (%12,0) son 1 yıl içerisinde hastanede yatış öyküsü bulunduğunu, 11'inin (%7,0) son 1 yıl içinde antibiyotik kullandığını, 22'sinin (%14,0) kronik hastalığı bulunduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda *S. aureus* taşıyıcılarında risk faktörlerinin dağılımına bakıldığında; %18,1'inin son üç ay içinde çeşitli nedenlerle antibiyotik kullandığı, %13,1'inde son 2 hafta içerisinde akut bir enfeksiyon belirtisi bulunduğu, %9,6'sının kronik hastalığı bulunduğu, %4,3'ünde deri veya yumuşak doku enfeksiyonu bulunduğu ve %5,3'ünde son 6 ay içerisinde hastanede yatış öyküsü bulunduğu görülmüştür. *S. aureus* taşıyıcılığı ile risk faktörleri arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.

Kluytmans ve ark. *S. aureus* taşıyıcılığının hemodiyaliz uygulanan hastalarda %30,1-84,4, insuline bağımlı diyabeti bulunan hastalarda %24,1-76,4, insuline bağımlı olmayan diyabeti bulunan hastalarda %11,1-35,0, HIV enfeksiyonu bulunan hastalarda %26,9-54,7, kronik böbrek yetmezliği bulunan hastalarda %14,3-33,3, cilt enfeksiyonu bulunan hastalarda %42,0-100, intravenöz uyuşturucu bağımlılarında %33,8-61,4 ve sağlık kurumlarında çalışanlarda %16,8-56,1 arasında değiştiğini bildirmiştir. Erdenizmenli ve ark. (2004) 500 sağlıklı gönüllü üzerinde yaptıkları çalışmada, 55 *S. aureus* taşıyıcısından 3'ünün (%5,5) diyabet hastası olduğunu; Soysal ve ark. (2006) 1000 sağlıklı gönüllü üzerinde yaptıkları çalışmada, 173 *S. aureus* taşıyıcısından 26'sında (%15,0) astım, 15'inde (%8,6) alerjik rinit ve 4'ünde (%4,0) atopik dermatit bulunduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda, *S. aureus* taşıyıcılarında en yaygın bulunan kronik hastalık %4,3 (12/282) ile alerjik rinit idi.

Bunu sırasıyla %1,4 (4/282) ile astım, %1,1 (3/282) ile kronik bronşit ve hipertansiyon, %0,7 (2/282) ile diabetes mellitus ve immünoşüpresif tedavi gören hastalar ve %0,4 (1/282) ile idrar yolu enfeksiyonu bulunan hastalar takip etmiştir.

*S. aureus* burun taşıyıcılığı ile kronik alerjik rinit arasında anlamlı bir ilişki olduğu bildirilmektedir. Ayrıca birçok çalışmada bronşiyal astım ve atopik dermatit ile *S. aureus* kolonizasyonu arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (Shiomori, 2000). İstatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmama ile birlikte, *S. aureus* burun taşıyıcılığı ile alerjik rinit arasındaki ilişki bizim çalışmamızda da dikkat çekicidir.

*S. aureus* taşıyıcılığı ile meslek grupları arasında bir ilişki olduğu bilinmektedir. Sağlık kurumlarında çalışanlarda *S. aureus* taşıyıcılığı, diğer meslek gruplarında çalışanlara göre daha yüksek oranlarda bildirilmektedir. Kampf ve ark. (2003) Almanya'da üç hastanede toplam 447 sağlık personelinde nazal *S. aureus* kolonizasyonunu %33,8 (151/447) olarak bildirmiştir. Öncül ve ark. (2002) İstanbul'da 495 sağlık personelinde nazal *S. aureus* kolonizasyon oranlarını doktorlarda %10,6 (15/141), hemşirelerde %16,6 (35/211) ve diğer sağlık personelinde %19,6 (28/143) olmak üzere, toplam %15,8 (78/495); Naz ve ark. (2006) Eskişehir'de 500 sağlık personelinde nazal kolonizasyon oranlarını doktorlarda %14,0 (14/100), hemşirelerde %11,1 (21/190) ve diğer sağlık personelinde %16,2 (34/210) olmak üzere, toplam %13,8 (69/500); Oğuzkaya ve ark. Erciyes'de 136 sağlık personelinde nazal kolonizasyon oranlarını doktorlarda %11,8 (2/17), hemşirelerde %12,5 (4/32) ve diğer sağlık personelinde %14,8 (12/81) olmak üzere, toplam %13,2 (18/136); Demirdal ve ark. (2006) Afyon'da 189 sağlık personelinde nazal kolonizasyon oranlarını doktorlarda %30,0 (33/110), hemşirelerde %33,9 (20/59) ve diğer sağlık personelinde %30,0 (6/20) olmak üzere, toplam %31,2 (59/189) olarak bildirmişlerdir. Erdenizmenli ve ark. (2004) ise, hastanelerde çalışan 102 sağlıklı bireyde *S. aureus* taşıyıcılığını %8,8 (9/102) olarak bildirmiştir. Bizim çalışmamızda da sağlık kurumlarında çalışan 340 kişiden 104'ünde (%30,6), 445 öğrenciden 113'ünde (%25,4) ve diğer meslek gruplarında çalışan 255 kişiden 65'inde (%25,5) *S. aureus* taşıyıcılığı tespit edilmiştir. Çalışmamızda yer alan öğrenciler ve diğer meslek gruplarına bakıldığında, bunlarda, sağlık kurumlarında çalışanlarda bulunan mesleki risk faktörlerinin bulunmadığı görülmemektedir.

Çalışmamızda *S. aureus* taşıyıcılığı ile meslek grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ( $p=0,214$ ).

Velasco ve ark. (2005) 102 *S. aureus* suşunda metisilin direnci tespit etmek amacıyla oksasilin ve sefoksitin disk difüzyon, “okasilin tuz tarama besiyeri” ORSAB, E-test ve *mecA* gen tayini yöntemlerini kullanmışlar; PZR ile 51 suşta *mecA* geni tespit etmelerine karşın, bu suşların 3’ünü diğer yöntemlerle metisiline karşı duyarlı olarak bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda da MRSA suşlarının saptanması amacıyla hem fenotipik (sefoksitin disk difüzyon, oksasilin disk difüzyon, “okasilin tuz tarama besiyeri” ve ORSAB), hem de genotipik yöntemler kullanılmıştır. 294 *S. aureus* suşunun 18’inde PZR yöntemiyle *mecA* geni tespit edilmiş olmasına rağmen; sefoksitin ve oksasilin disk difüzyon testleriyle ve “okasilin tuz tarama besiyeri” testiyle 12’sinde ve ORSAB testiyle 51’inde fenotipik metisilin direnci saptanmıştır. Görüldüğü gibi, metisilin direncinin saptanmasında testler birbiriyle uyumlu bulunmamıştır (Çizelge 4.1). Günümüzde metisilin direncinin tespiti amacıyla fenotipik yöntemlerden çok genotipik inceleme yöntemleri kullanılmaya başlanmıştır. Zira, sınırda dirence sahip suşlarda direncin saptanmasında fenotipik yöntemler yetersiz kalmakta, PZR ile *mecA* geninin saptanması altın standart olarak kabul edilmektedir (Fluit, 2001; Koneman, 2006; Sancak, 2007).

PZR ile sefoksitin disk difüzyon, oksasilin disk difüzyon ve oksasilin tuz tarama agar testlerinin uyumlu bulunmaması, suşların muhtemelen borderline dirence sahip olduklarını düşündürmektedir. Bununla birlikte, *mecA* geni bulunmasına rağmen, genin her zaman eksprese olmadığı, ya da düşük düzeyde eksprese olduğu, bunun sonucunda yetersiz miktarda PBP2a sentezleyen duyarlı suşların da bulunabileceği düşünülmektedir.

**Çizelge 4.1.** Enfeksiyon etkeni olmayan TK-MRSA suşlarının idantifikasyonu ve tiplendirilmesi

Adı, Soy Adı	Pr.No	Örnek	Yaşı	Cinsiyet	Meslek	FOX	OX	OX-Screening	ORSAB	<i>mecA</i>	SCC <i>mec</i> tipi	<i>ccr</i> tipi	TK-MRSA tipi	PVL
M. Akgül	132	B	11	K	Öğr	S	S	S	S	+	Tiplendirilemedi	II	II	
Ö. Doğanlı	172	B	12	E	Öğr	R	R	R	R	+	IV	IV	IV	
B. Mantı	228	B	20	K	Öğr	S	S	S	S	+	Tiplendirilemedi	II	II	
C. Erol	234	B	20	E	Öğr	S	S	S	S	+	Tiplendirilemedi	II	II	
E. Yalçın	236	B	21	K	Öğr	S	S	S	S	+	Tiplendirilemedi	II	II	
D. Bbozoğlan	277	B	44	E	Diğer	R	R	R	R	+	III	III	III	
H. Ünal	294	B	28	E	Diğer	S	S	S	S	+	Tiplendirilemedi	II	II	
M. Kaya	305	B	20	E	Öğr	S	S	S	S	+	Tiplendirilemedi	II	II	
M. Yıldız	388	B	29	E	Sağ.K	R	R	R	R	+	V	V	V	
S. Kavak	437	B	54	E	Diğer	R	R	R	R	+	IV	IV	IV	+
H. Taş	453	B	18	E	Diğer	R	R	R	R	+	IV	II	IV	+
N. Acar	454	B	49	E	Diğer	R	R	R	R	+	IV	IV	IV	+
Ç. Güngör	459	B	44	K	Sağ.K	R	R	R	R	+	III	III	III	
İ. Ağl	559	B	20	E	Öğr	S	S	S	S	+	Tiplendirilemedi	II	II	
C. Bayramova	581	B	7	E	Öğr	R	R	R	R	+	I	I	I	
A. Leylan	598	B	21	E	Öğr	R	R	R	R	+	IV	IV	IV	
Z. İnce	759	B	19	K	Öğr	R	R	R	R	+	IV	IV	IV	+
H. Erdoğan	797	B	38	E	Diğer	R	R	R	R	+	IV	IV	IV	

Sefoksitin (FOX), Oksasilin (OX), Oxacillin Salt Screening Agar (Ox-Screening), Oxacillin Resistance Screening Agar Base (ORSAB), Öğrenci (Öğr), Sağlık krumlarıyla ilişkili (Sağ.k), Diğer (D)

PZR ve diğer fenotipik yöntemlerle karşılaştırıldığında, ORSAB testi ile dirençli suş sayısının çok yüksek çıkması, testte kullanılan besiyerinin oksasilin içeriğinden kaynaklanıyor olabilir. Zira, “oksasilin tuz tarama besiyeri” testi için CLSI tarafından önerilen ve bizim de kullanmış olduğumuz oksasilin miktarı 6 µg/ml iken, standart ORSAB testinde besiyerinde bulunan oksasilin miktarı 2 µg/ml’dir. Bu durumda doza bağlı olarak yanlış pozitif sonuçlar ortaya çıkabilmektedir. Kromojenik besiyerleri ile MRSA’ların saptanmasında çelişkili sonuçlar elde edilebileceği bildirilmektedir (Sancak, 2007).

MRSA kolonizasyonu en sık burunda görülmektedir. Kenner ve ark. (2003) ayakta tedavi gören 404 hastanın 8’inde (%2,0) MRSA kolonizasyonu tespit etmiş, kolonizasyonun da en sık burunda (%88,0), sonra da boğazda (%13,0) olduğunu bildirmişlerdir. İki olguda hem burun hem de boğazda kolonizasyon saptanırken, koltuk altından alınan örneklerde MRSA tespit edilmemiştir. Bizim çalışmamızda 18 MRSA suşunun hepsi (%100) burundan alınan örneklerden izole edilmiş, koltuk altından alınan örneklerden MRSA izole edilmemiştir.

TK-MRSA taşıyıcılığı Çizelge 3.16. Enfeksiyon etkeni olan ve olmayan CA-MRSA suşlarının özellikleri prevalansı toplumlar arasında farklılık göstermektedir. Çeşitli yayınlarda TK-MRSA taşıyıcılığı prevalansının %0,1-10 arasında değiştiği bildirilmektedir. İleri yaş, cinsiyet, hastanede yatış öyküsü, hastanede kalış süresi, kronik hastalıklar, antibiyotik kullanımı, MRSA ile kolonize ya da enfekte hastalarla

aynı ortamda bulunma ve intravasküler araç varlığı gibi faktörler, MRSA enfeksiyonu gelişimi için klasik risk faktörleri olarak kabul edilmektedir. Taşıyıcılığın toplum içinde hızla yayılmasından ve suşların, TK-MRSA suşları gibi, birden fazla antibakteriyel ajana karşı dirençli hale gelmesinden endişe duyulmaktadır. İsveç ve Danimarka gibi Kuzey Avrupa ülkelerinde TK-MRSA taşıyıcılığı oranları %0,1-0,3 gibi düşük düzeylerde seyretmektedir. Kuehnert ve ark. (2006) ABD’nde taşıyıcılık oranlarını erkeklerde %0,5 (23/4685), kadınlarda %1,2 (60/4937) olmak üzere ortalama %0,8 (75/9622); Kenner ve ark. (2003) ABD’nde erkeklerde %1,5 (6/218), kadınlarda %1,1 (2/185) olmak üzere ortalama %2,0 (8/404); Leman ve ark. (2004) Amerika’daki Hintli popülasyonunda %1,1 (5/469); Hisata ve ark. (2005) Japonya’da %4,3 (35/818); Karapsias ve ark. (2008) Yunanistan’da %0,9 (9/959); Harbarth ve ark. (2005) İsviçre’de %0,7 (13/1718) olarak bildirmişlerdir. Creech ve ark. (2005) ABD’nde taşıyıcılık oranlarını, aynı toplulukta yaptıkları iki farklı araştırmada 2001 yılında %0,8 (4/500), 2004 yılında ise %9,2 (46/500) olarak bulmuşlardır. Bu konuda ülkemizde yapılan çeşitli araştırmalarda TK-MRSA taşıyıcılığı Çizelge 3.16. Enfeksiyon etkeni olan ve olmayam CA-MRSA suşlarının özellikleri prevalansını, Soysal ve ark. (2006) ve Uğur (2006) İstanbul’da sırasıyla %0,1 (1/1000) ve %0,14 (7/4843) olarak bildirmişlerdir. Çıtak ve ark. (2004) Ankara’da 161, Erdenizmenli ve ark. (2004) ise İzmir’de 500 sağlıklı gönüllü üzerinde yaptıkları araştırmalarda hiç MRSA saptamamışlardır. Bizim çalışmamızda TK-MRSA taşıyıcılığı, erkeklerde %2,3 (13/564) ve kadınlarda %1,1 (5/476) olmak üzere, ortalama %1,7 (18/1040) olarak bulunmuştur. Çıtak ve Erdenizmenli’nin araştırmalarında hiç MRSA suşu saptanmamış olması dikkat çekicidir. Bu durum, her iki çalışmada da örneklem sayılarının az olması ve/veya MRSA idantifikasyonunda genotipik yöntemlerin kullanılmamış olmasıyla açıklanabilir. Creech ve ark. (2005) aynı popülasyonda standart yöntemler kullanarak yaptıkları iki çalışmada, 3 yıl içinde MRSA taşıyıcılığının 10 katlık artış göstermesi özellikle dikkat çekmektedir. Aynı çalışmalarda *S. aureus* burun taşıyıcılığı oranları da %29,0’dan %36,4’e yükselmiştir. Populasyonda *S. aureus* taşıyıcılığının artması, MRSA kolonizasyonun da artmasına neden olabilir. Ayrıca, PFGE gibi yöntemlerle yapılan epidemiyolojik çalışmalar, TK-MRSA suşlarının da toplumda hızla yayıldığını göstermektedir.

TK-MRSA taşıyıcılarında yaş dağılımına baktığımızda, Kuehnert ve ark. (2006) ABD’nde TK-MRSA taşıyıcılık oranlarını 1-19 yaş grubunda %0,6 (28/4772), 20-59 yaş grubunda %0,6 (19/3290), ve 60 yaş üstü grubunda %2,2 (34/1560); Fluegge ve ark. (2006) Almanya’da 5-7 yaş grubunda %0,05 (1/1895); Oğuzkaya ve ark. (2008) 5-7 yaş grubunda %5,6 (2/36), Soysal ve ark. (2006) 0-16 yaş grubunda %0,1 (1/1000) olarak bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda MRSA taşıyıcılığı 4-9 yaş grubunda %3,2 (1/31), 10-19 yaş grubunda %1,5 (3/194), 20-29 yaş grubunda %2,0 (8/405), 30-39 yaş grubunda %1,1 (2/175), 40-49 yaş grubunda %2,0 (3/147), 50-59 yaş grubunda %2,1 (1/48) olarak hesaplanmış, 60 yaş üstü grubunda MRSA taşıyıcılığı saptanmamıştır. Bu rakamlar ülkemizde ve dünyada bu konuda yapılan çalışmalarla uyum göstermektedir. İstatistiksel olarak MRSA taşıyıcılığı ile yaş grupları arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ( $p=0,824$ ).

Karapsias ve ark. (2008) 959 kişi üzerinde yaptıkları araştırmada, son iki ay içinde antibiyotik kullanan 57 kişiden birinde (%1,7), kortikosteroid kullanan 10 kişiden birinde (%10,0), son bir yıl içerisinde hastanede yatış öyküsü bulunan 115 kişiden üçünde (%2,6) ve sigara kullanan 458 kişiden ikisinde (%0,4) MRSA tespit etmişler; kortikosteroid kullanımı ve son bir yıl içinde hastanede yatış öyküsü ile MRSA taşıyıcılığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir. Leman ve ark. (2004) son bir yıl içinde antibiyotik kullanımını ile MRSA taşıyıcılığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bildirirken, Kenner ve ark. (2003) TK-MRSA izole edilen kişilerde, anlamlı bir risk faktörü tespit edememişlerdir. Bizim çalışmamızda TK-MRSA taşıyıcılarında risk faktörlerinin dağılımına bakıldığında, %1,9’unun son üç ay içerisinde antibiyotik kullandığı, %2,6’sında son iki hafta içerisinde akut bir enfeksiyon belirtisi bulunduğu, %1,2’sinin kronik hastalığı bulunduğu, %2,7’sinde son altı ay içerisinde hastanede yatış öyküsü bulunduğu görülmüştür. Çalışmada MRSA taşıyıcılığı ile risk faktörleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamış olmasına rağmen, erkeklerde, akut enfeksiyon öyküsü bulunanlarda ve son altı ay içinde hospitalizasyon öyküsü bulunanlarda, MRSA taşıyıcılığına bir eğilim olduğunu gözlenmektedir. Kronik hastalıklar ve bazı akut hastalıklar, bakterilerin deri veya

gastrointestinal sistem kolonizasyonuna ve direnç kazanmasına neden olabilmektedir. Bizim çalışmamızda TK-MRSA taşıyıcılarında en yaygın bulunan kronik hastalık alerjik rinit (%2,7) idi, ancak MRSA taşıyıcılığı ile kronik hastalıklar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ( $p=1,000$ ).

MRSA taşıyıcılığı ile meslek grupları arasında bir ilişki olduğu bilinmektedir. Sağlık kurumlarında çalışanlarda MRSA taşıyıcılığı, diğer meslek gruplarında çalışanlara göre daha yüksek oranlarda bildirilmektedir. Kampf ve ark. (2003) Almanya'da üç hastanede toplam 447 sağlık çalışanında nazal MRSA kolonizasyonunu %0,7 (3/447) olarak saptamışlardır. Ülkemizde yapılan araştırmalarda hastane çalışanlarında nazal MRSA kolonizasyonunu Cesur ve ark. (2002) Ankara'da %6,0 (30/500); Erdenizmenli ve ark. (2004) %1,0 (1/102); Öncül ve ark. (2002) İstanbul'da %2,4 (12/495); Naz ve ark. (2006) Eskişehir'de %1,8 (9/500); Demirdal ve ark. (2006) Afyon'da %4,8 (9/189) olarak bildirmişlerdir. Demirdal ve ark. ayrıca MRSA taşıyıcılığının doktorlarda %2,7 ve hemşirelerde %10,2 olduğunu belirtmiştir. Bizim çalışmamızda MRSA taşıyıcılığı sağlık kurumları ile ilişkili mesleklerde çalışanlarda %0,6 (2/340), öğrencilerde %2,2 (10/445) ve diğer meslek gruplarında çalışanlarda %2,4 (6/255) olarak bulunmuştur. MRSA taşıyıcılığı ile meslek grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamasına rağmen ( $p=0,143$ ), sağlık kurumları ile ilişkili mesleklerde MRSA taşıyıcılığın düşük oranda bulunması dikkat çekicidir. Bunun bir nedeni, örneklerin yoğun bakım üniteleri, cerrahi klinikler gibi, daha yüksek riskli yerlerde çalışanlardan alınmamış olması olabilir. Sonuç olarak, hastane ortamında stafilokok enfeksiyonlarıyla sık karşılaşılan durumlarda *S. aureus* ve MRSA taşıyıcılığının belirlenmesi, etkin enfeksiyon kontrol yöntemlerinin uygulanmasında atılacak ciddi bir adım olarak kabul edilmelidir. Ayrıca taşıyıcı personelin saptanması, eğitimi, kontrolü ve bunların daha az hasta temasını gerektiren yerlerde istihdam edilmesi, göz önünde bulundurulması gereken önemli yaklaşımlardır.

Sağlıklı kişilerden izole edilen TK-MRSA suşlarının antimikrobiyal duyarlılık profillerine baktığımızda, Kuehnert ve ark. (2006) ABD'nde izole ettikleri 75 MRSA suşundan hepsinin (%100) vankomisin, gentamisin ve trimetoprim/sulfametoksazol, 19'unun (%25,3) eritromisin, 51'inin (%68,0) klindamisine karşı duyarlı ve hepsinin

(%100) penisiline karşı dirençli olduğunu; Creech ve ark. (2005) izole ettikleri 46 MRSA suşundan 45'inin (%97,8) gentamisin, rifampin ve trimetoprim/sulfametoksazol, 21'inin (%55,7) eritromisin ve 34'ünün (%74,9) klindamisine karşı duyarlı olduğunu; Buck ve ark. (2005) izole ettikleri 517 MRSA izolatının hepsinin (%100) vankomisin ve linezolid, 509'unun (%98,5) gentamisin, rifampin ve trimetoprim/sulfametoksazol, 201'inin (%38,9) eritromisine karşı duyarlı olduğunu; Harbarth ve ark. (2005) izole ettikleri 13 MRSA suşunun hepsinin (%100) klindamisin, vankomisin ve trimetoprim/sulfametoksazole karşı duyarlı, yine hepsinin (%100) eritromisine karşı dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Bu konuda ülkemizde yapılan çalışmalarda Çıtak ve ark. (2004) toplum kaynaklı 50 MRSA izolatında vankomisin duyarlılığını %100 (50/50), netilmisin duyarlılığını %72,0 (36/50), fusidik asit duyarlılığını ve levofloksasin duyarlılığını %42,0 (21/50), kloramfenikol duyarlılığını %58,0 (29/50), siprofloksasin duyarlılığını %46,0 (23/50), tetrasiklin ve eritromisin duyarlılığını %16,0 (8/50) ve gentamisin duyarlılığını %30,0 (15/50) olarak bildirmiştir. Demirdal ve ark. (2006) ise Afyon'da izole ettikleri dokuz MRSA izolatının hepsinin de (%100) vankomisin ve teikoplanine karşı duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da benzer sonuçlar elde edilmiş, sağlıklı kişilerden izole edilen TK-MRSA suşlarında en yüksek duyarlılık vankomisin (%100), trimetoprim/sulfametoksazol (%100) ve kloramfenikole (%100) karşı saptanırken, tetrasiklin ve amoksisilin/klavulanik asit duyarlılığı %16,7 (3/18) olarak bulunmuştur. Ülkemizde yapılan diğer çalışmalarda da vankomisin direnci bildirilmemiştir.

Ayaktan tedavi gören hastalarda enfeksiyon etkeni olarak izole edilen TK-MRSA suşlarının antimikrobiyal duyarlılık profillerine bakıldığında; Buck ve ark. (2005) 57 MRSA izolatında vankomisin ve linezolid duyarlılığını %100, gentamisin, rifampin ve trimetoprim/sulfametoksazol duyarlılığını %98,0, eritromisin ve klindamisin duyarlılığını ise sırasıyla %36,9 ve %77,2 olarak bulmuştur. Frazee ve ark. (2005) 89 MRSA izolatında vankomisin ve trimetoprim/sulfametoksazol duyarlılığını %100, klindamisin duyarlılığını %94,3, tetrasiklin duyarlılığını %86,0 olarak bulurken, en yüksek direncin eritromisine karşı %96,4 olduğunu saptamıştır. Bizim çalışmamızda da benzer sonuçlar elde edilmiş ve en yüksek duyarlılık vankomisin (%100) ve kloramfenikole (%96,8) karşı bulunurken, tetrasiklin ve

siprofloksazin duyarlılıkları sırasıyla %38,7 ve %35,5 olarak saptanmıştır. Ülkemizde, ayaktan tedavi gören hastalardan izole edilen TK-MRSA suşlarında vankomisin direnci bildirilmemiştir. Buck, Frazee ve ark.'nın (2005) çalışmalarında, MRSA suşlarının hepsinin (%100) vankomisin, linezolid ve trimetoprim/sulfametoksazole karşı duyarlı olması ve ertromisine karşı çok yüksek direnç (%96,4) tespit edilmesi dikkat çekicidir. Bu durumun örneklerin alındığı bölgeye (cilt ve yumuşak doku) ve çalışma grubundaki değişken özelliklere (eşlik eden kronik hastalıkların bulunması, antibiyotik, immünsüpresif ilaç ve intravenöz ilaç kullanımı öyküsü, vb.) bağlı olduğu düşünülebilir.

TK-MRSA suşlarında antibakteriyel direnç gelişiminde, tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de artış görülmekte, bu suşlarla meydana gelen enfeksiyonların tedavisinde genellikle vankomisin veya teikoplanin gibi glikopeptid antibiyotikler kullanılmaktadır. MRSA enfeksiyonlarının tedavisinde vankomisinin en etkili antibiyotik olma özelliğini sürdürdüğü görülmektedir. Ancak glikopeptid antibiyotiklerin maliyetleri göz önünde bulundurulduğunda, tedaviye başlamadan önce antibiyogram sonuçlarının ve enfeksiyonun lokalizasyonunun da dikkate alınması gerektiği, daha ucuz ve etkili alternatiflerin bulunduğu durumlarda bunların tercih edilmesinin ve glikopeptid antibiyotiklerin son tercih olarak kullanılmasının uygun olduğu ortaya çıkmaktadır. Ayrıca, vankomisinin ileri derecede ototoksik ve nefrotokrik olması da, kullanımını kısıtlayan önemli bir faktördür.

Janapatl ve ark. (2007) Tayvan'da 709 TK-MRSA suşunun 29'unda (%4,1) iMLS<sub>B</sub>, 31'inde (%4,4) MS, sekizinde (%1,0) S ve 659'unda (%92,9) cMLS<sub>B</sub> fenotipi; Patel ve ark. (2008) Amerika'da 58 TK-MRSA suşunun 13'ünde (%22,4) iMLS<sub>B</sub> fenotipi; Delialioğlu ve ark. (2005) Mersin'de 128 MRSA suşunun yedisinde (%5,4) iMLS<sub>B</sub>, 56'sında (%43,7) cMLS<sub>B</sub> ve 65'inde (%50,8) S fenotipi; Yılmaz ve ark. (2007) Trabzon'da 464 MRSA suşunun 113'ünde (%24,4) iMLS<sub>B</sub>, 24'ünde (%5,2) MS, 122'sinde (%26,3) S ve 205'inde (%44,2) cMLS<sub>B</sub> fenotipi; Balaban (2008) Ankara'da 125 MRSA suşunun 66'sında (%52,8) S, 4'ünde (%3,2) MS, 34'ünde (%27,2) iMLS<sub>B</sub> ve 20'sinde (%16,0) cMLS<sub>B</sub> fenotipi saptamışlardır. Bizim çalışmamızda da D-test kullanılarak, enfeksiyon etkeni olan ve olmayan TK-MRSA suşlarının iMLS<sub>B</sub> fenotipi tayini yapılmıştır. Enfeksiyon etkeni olan ve olmayan TK-

MRSA suşlarında iMLS<sub>B</sub> fenotipi (ER-R, C-S, D<sup>+</sup>) sırasıyla %12,9 (4/31) ve %11,1 (2/18); MS fenotipi (ER-R, C-S, D<sup>-</sup>) sırasıyla %6,5 (2/31) ve %0 (0/18); S fenotipi (ER-S, C-S) sırasıyla %80,6 (25/31) ve %88,9 (16/18) olarak bulunmuştur. Enfeksiyon etkeni olan ve olmayan TK-MRSA suşlarında cMLS<sub>B</sub> (ER-S, C-R) direnci tespit edilmemiştir (Çizelge 4.2).

**Çizelge 4.2.** Enfeksiyon etkeni olan ve olmayan TK-MRSA suşlarında direnç fenotipleri

	TK-MRSA	Enfeksiyon etkeni olan TK-MRSA	Enfeksiyon etkeni olmayan TK-MRSA	iMLS <sub>B</sub>	MS	S	cMLS <sub>B</sub>
Janapatlı ve ark.	+			%4,1	%4,4	%1,0	%92,9
Patel ve ark.		+		%22,4			
Delialioğlu ve ark.		+		%5,4	%0,0	%50,8	%43,7
Yılmaz ve ark.		+		%24,4	%5,2	%26,3	%44,2
Balaban	+			%27,2	%3,2	%52,8	%16,0
Barkar		+		%12,9	%6,5	%80,6	%0,0
barkar			+	%11,1	%0,0	%88,9	%0,0

TK-MRSA suşlarının SCC<sub>mec</sub> ve *ccr* tip tayini, Milheiriço ve Okuma tiplendirme yöntemleri ile yapılmıştır. Gonzalez ve ark. (2005) ABD’nde 12 TK-MRSA suşunun hepsini SCC<sub>mec</sub> tip IV olarak tanımlamış ve yine hepsinin PVL geni taşıdıklarını saptamışlardır. Patel ve ark. (2008) 58 TK-MRSA suşunun 36’sını (%62,0) SCC<sub>mec</sub> tip IV, 15’ini (%26,0) tip II olarak tanımlamış, 7’sini (%12,0) tiplendirememişlerdir. Hisata ve ark. (2005) 44 TK-MRSA suşunun 30’unu (%68,1) SCC<sub>mec</sub> tip II ve 14’ünü (%31,9) tip IV olarak tanımlamış, hiçbirinde PVL geni saptamamışlardır. Frazee ve ark. (2005) 85 TK-MRSA suşunun 84’ünü (%98,8) SCC<sub>mec</sub> tip IV ve birini (%1,1) tip II olarak; Harbarth ve ark. (2005) 13 TK-MRSA suşunun 10’unu (%76,9) SCC<sub>mec</sub> tip IV, ikisini (%15,4) tip V ve birini (%7,7) tip II olarak; Karapsias ve ark. (2008) dokuz TK-MRSA suşunun hepsini (%100) SCC<sub>mec</sub> tip IV olarak tanımlamışlardır. Türkiye’de TK-MRSA ile ilgili sınırlı sayıda çalışma vardır ve henüz epidemiyolojisi hakkında yeterli bilgi mevcut değildir (Karahan, 2008). Bizim çalışmamızda genotipik metisilin direncini incelemek amacıyla, izole edilen 294 *S. aureus* suşunda PZR ile *mecA* geni aranmıştır. *mecA* geni pozitif bulunan, enfeksiyon etkeni olmayan 18 ve enfeksiyon etkeni olan 31 TK-MRSA suşunun tip tayini için SCC<sub>mec</sub> ve *ccr* tiplendirme yöntemleri kullanılmıştır. SCC<sub>mec</sub> tip tayinini sonucunda, enfeksiyon etkeni olmayan TK-MRSA suşlarında tip I %5,6, tip II %38,9, tip III %11,1, tip IV %38,9 ve tip V %5,6; enfeksiyon etkeni

olan TK-MRSA suşlarında ise tip I %9,7, tip II %9,7, tip III %48,4, tip IV %22,6 ve tip V %9,7 oranında bulunmuştur. Enfeksiyon etkeni olan TK-MRSA suşlarının kaset tipleri, daha çok TK-MRSA suşlarına benzerlik göstermektedir. Bu durum, enfeksiyon etkeni olan TK-MRSA hastalarında daha çok risk faktörü (antibiyotik kullanımı, hastanede yatış öyküsü, kronik hastalıklar, immünsüpresif ilaç kullanımı, vb.) bulunmasıyla açıklanabilir. Bazı araştırmalarda PFGE yöntemiyle, enfeksiyon etkeni olan ve olmayan TK-MRSA suşları arasında klonal ilişki gösterilmiştir (Buck, 2005; Naimi, 2001).

Sentezledikleri çeşitli ekstrasellüler enzimler ve toksinler, *S. aureus* suşlarının virulansından sorumludur. Stafilokoklarda bugüne kadar otuzdan fazla ekstrasellüler ürün tanımlanmıştır. Hemen bütün suşlar hemolizinler ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  ve  $\delta$ ), nükleazlar, proteazlar, lipazlar, hyaluronidaz ve kollajenaz gibi sitotoksinler ve enzimler sentezler. Bazı suşlar bunlardan başka, bir veya daha çok sayıda ekzoprotein de salgılar. Bunlar arasında toksik şok sendromu toksini-1, stafilokoksik enterotoksinler (A-E, G-I), ekfoliyatif toksinler (ETA ve ETB) ve PVL yer almaktadır. Klinik *S. aureus* izolatlarının neredeyse tamamı  $\gamma$ -hemolizin salgılamakla birlikte, bu izolatların yalnızca %2-5'inde PVL geni pozitifliği gösterilmiştir. PVL üretiminin özellikle fronkül, cilt abseleri ve ağır nekrotik doku enfeksiyonları ile ilişkili olduğu gösterilmiş, birçok çalışmada, özellikle nekrotik cilt enfeksiyonları ve toplumdan kazanılmış nekrotik pnömoni olgularında önemli bir virulans faktörü olarak rol oynadığı ortaya konmuştur. PVL üretimi ile diğer virulans faktörleri arasındaki ilişki ise henüz bilinmemektedir (Lina, 1999; Witte, 2005; Johnsson, 2004).

Lina ve ark. (1999), çeşitli enfeksiyonlardan izole etikleri 172 *S. aureus* suşunun 64'ünde (%37,2) ve 27 TK-MRSA suşunun 23'ünde (%85,1) PVL geni tespit etmişler ve PVL (+) olarak saptanan *S. aureus* suşları en sık fronküllerden izole edildiğini bildirmişlerdir. Dufour ve ark. (2002) 14, Gonzalez ve ark. (2005) ise 12 TK-MRSA izolatının hepsinde (%100) PVL geni tespit etmiş, PVL (+) olarak saptanan suşların cilt ve yumuşak doku enfeksiyonlarından izole edildiğini bildirmiş, PVL geni taşıyan suşların hepsini SCCmec tip IV olarak tanımlamışlardır. Harbarth ve ark. (2005) 13 TK-MRSA izolatının beşinde (%38,5) PVL geni tespit etmiş, PVL geni taşıyan suşların hepsini SCCmec tip IV olarak tanımlamışlardır. Patel ve ark.

(2008) 58 TK-MRSA izolatının 35'inde (%60,3) PVL geni tespit etmiş, PVL geni taşıyan suşların hepsini *SCCmec* tip IV olarak tanımlamışlardır. Creech ve ark. (2005) 46 TK-MRSA izolatının 10'unda (%22,0), Frazee ve ark. (2005) 85 TK-MRSA izolatının 80'inde (%94,1) PVL geni tespit etmişlerdir. Kuehnert ve ark. (2006) izole ettikleri 75 MRSA suşunun altısında (%0,8) PVL geni tespit etmiş, PVL geni taşıyan suşların hepsini *SCCmec* tip IV olarak tanımlamışlardır. Karapsias ve ark. (2008) dokuz TK-MRSA izolatının birinde (%11,1) PVL geni tespit etmiş, bunu da *SCCmec* tip IV olarak tanımlamışlardır. Buna karşın Hisata ve ark. (2005) 44 TK-MRSA izolatının hiçbirinde PVL geni tespit etmemişlerdir. Görüldüğü gibi, farklı çalışmalarda TK-MRSA izolatlarında PVL geni pozitifliğinde büyük farklılıklar (%0,0-100) bulunmaktadır. Ancak PVL üretiminin, suşların izole edildiği enfeksiyon bölgesi ile ilişkisi yine dikkat çekmektedir. Örneğin Dufour ve Gonzalez, PVL pozitif buldukları tüm suşları cilt ve yumuşak doku enfeksiyonlarından izole etmişlerdir. Bizim çalışmamızda enfeksiyon etkeni olmayan 18 TK-MRSA suşunda %22,2 (4/18) PVL (+) bulunurken, enfeksiyon etkeni olan 31 TK-MRSA suşundan hiçbirinde PVL geni bulunmamıştır. *SCCmec* ve/veya *ccr* yöntemiyle tiplendirilen 18 MRSA suşundan PVL (+) bulunan 4 suşun hepsi de tip IV olarak tanımlanmıştır. Enfeksiyon etkeni olan ve olmayan TK-MRSA suşlarında PVL pozitifliği arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0,014$ ). Bu durumda, enfeksiyon etkeni olan TK-MRSA suşlarının TK-MRSA suşlarına benzerlik gösterdikleri düşünülebilir. Sonuç olarak, TK-MRSA izolatlarında PVL geni pozitifliğinin, örneklerin alındığı bölgeye, çalışılan toplumlara, hormonal faktörlere, hastanın immünesine, yaş, ırk ve cinsiyet gibi çok sayıda faktöre bağlı olarak değişiklik gösterebildiği düşünülmektedir. Ayrıca, PVL geni araştırılırken, kullanılan yöntemlere bağlı olarak da yalancı pozitif veya negatif sonuçlar elde edilebileceği bildirilmektedir. Bu nedenle, doğrulama amacıyla sekans analizi gibi diğer yöntemlerin kullanılması da önerilebilir. Bizim çalışmamızda TK-MRSA suşlarında PVL pozitifliği rölatif olarak düşük oranlarda saptanmıştır. Bu durum muhtemelen, örneklerin deri ve yumuşak dokudan ziyade burun ve koltuk altından alınmış olmasından kaynaklanmakta ve PVL geninin toplum kökenli *S. aureus* suşlarında henüz yaygın olarak bulunmadığını göstermektedir.

MRSA suşlarının yaygınlaşmasında rastgele anitibiyotik kullanımı çok önemlidir. MRSA taşıyıcılığının azalmasında eğitim, uygun dezenfeksiyon-antisepsi uygulanmaları, etkin karantina önlemleri, ve belki de en önemlisi, bilinçli antibiyotik kullanımı, büyük rol oynamaktadır. Antibiyotikler, bir bakteriyel enfeksiyon tanısı konduğunda tedavi amacıyla, enfeksiyon şüphesi bulunduğunda ampirik olarak, ya da profilaksi amacıyla kullanılabilir. Enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde en sık rastlanan sorunlardan birisi, antibakteriyel direnç gelişimidir. Uygun olmayan antibiyotik seçimi veya antibiyotiklerin uygun olmayan dozlarda ya da sürelerde kullanılması, istenmeyen yan etkilerin ortaya çıkması dışında, ciddi ekonomik kayıplara da yol açmaktadır. Ancak, daha da önemlisi, bilinçsiz antibiyotik kullanımı antibakteriyel direnç gelişiminde en önemli faktör olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle, antibiyotik kullanmadan önce uygun klinik örnekler alınarak antibakteriyel duyarlılık testlerinin yapılması büyük önem taşır. Antibakteriyellerin seçiminde ve doz ayarlanmasında enfeksiyon bölgesi, kişinin yaşı ve kilosu göz önünde bulundurulmalıdır. Bazı durumlarda (sepsis, menenjit vb.) kombine antibiyotik tedavisi de uygulanabilir, ancak bu durumda da, kullanılacak ajanların sinerjik etkileri dikkate alınmalıdır.

TK-MRSA suşları bugüne kadar,  $\beta$ -laktam antibiyotikler dışındaki antibiyotiklere karşı büyük ölçüde duyarlı kalmışlardır. Bu nedenle, yol açtıkları enfeksiyonların tedavisi de, TK-MRSA'ların yol açtığı enfeksiyonların tedavisi kadar zor olmamıştır. TK-MRSA suşlarının çoğu çoklu antibiyotik direnci göstermemektedir. Ancak zaman içerisinde, hastane ortamında çoklu ilaç direncine sahip suşlar toplumda yaygınlaşacak ve çoklu antibiyotik direncine sahip TK-MRSA suşları da ortaya çıkacak gibi görünmektedir.

*Klebsiella* türleri insanlarda dışkıda %5-38, nazofarenkste ise %1-6 oranında bulunur. Genellikle floranın geçici üyeleri olarak kabul edilirler. *Pseudomonas* türleri sağlıklı insanlarda çok nadiren kolonize olurlar. Ciltte %0-2, burun mukozasında %0-3,3, nazofarenkste %0-6,6 ve dışkıda %2,6-24,0 oranında bulunabilirler. Sağlıklı insanların yaklaşık %25'i normal floralarında *Acinetobacter* türleri taşırlar. Bunlar vücutta genellikle koltuk altı, kasıklar, parmak araları gibi nemli bölgelerde, bazen de oral kavite ve solunum yollarında kolonize olurlar. *Escherichia coli* ve *Enterobacter* türleri ise insanlarda gastrointestinal sistem florasında bulunurlar.

Mobbs ve ark. (1999) ABD'nde 120 sağlıklı bireyden alınan orofarinks örneklerinde, *Enterobacteriaceae* ailesinde yer alan çeşitli gram negatif basiller izole etmişler, taşıyıcılık oranını %6,6 olarak bildirmişlerdir. En sık izole edilen tür *Escherichia coli* (%14,2) iken, bunu sırasıyla *Enterobacter* spp. (%11,7), *Serratia* spp. (%8,3), *Klebsiella* spp. (%4,2), *Proteus* spp. (%1,7), *Citrobacter* spp. (%1,7) takip etmiştir. Mengistu ve ark. (1986) sağlıklı kişilerden alınan boğaz örneklerinde gram negatif basil taşıyıcılığını %16,0 olarak bulmuşlar, en sık izole edilen türleri sırasıyla *Klebsiella* spp. (%36,0), *Pseudomonas* spp. (%13,0), *Enterobacter* spp. (%13) ve *Acinetobacter* spp. (%10) olarak bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda 1040 sağlıklı bireyden alınan burun ve koltuk altı örneklerinde, *Enterobacteriaceae* ailesinde yer alan 64 gram negatif basil izole edilmiş ve taşıyıcılık oranı %5,8 olarak bulunmuştur. En sık izole edilen tür *Enterobacter* spp. (%28,1) iken, bunu sırasıyla *Klebsiella* spp. (%23,4), *Escherichia* spp. (%17,2), *Proteus* spp. (%14,1), *Citrobacter* spp. (%7,8), *Pseudomonas* spp. (%7,8) ve *Serratia* spp. (%1,6) izlemiştir. 64 gram negatif basilden 52'si (%81,3) burun, 12'si (%18,8) koltuk altı ve dördü (%6,3) hem burun hem de koltuk altından alınan örneklerden izole edilmiştir. Hem burun hem de koltuk altından izole edilen suşlar aynı tür bakterilerdi.

Delialioğlu ve ark. 2005 yılında yaptıkları çalışmada yatan hastalardan izole edilen *E. coli* suşlarının %29,0'unda, *K. pneumoniae* suşlarının %35,8'inde ve *K. oxytoca* suşlarının %6,7'sinde; poliklinik hastalarından izole edilen *E. coli* suşlarının %7,7'sinde ve *K. pneumoniae* suşlarının %15,4'ünde ESBL saptanmışlar, yatan hastalardan izole edilen suşların daha yüksek oranda ESBL oluşturduğunu vurgulamışlardır. Koçoğlu ve ark. (2007) Bolu'da üriner sistem enfeksiyonu bulunan

ve ayaktan tedavi gören hastalardan izole ettikleri 267 *E. coli* suşunun dokuzunda (% 3,4); Güler (2006) Erzurum'da farklı poliklinik örneklerinden izole ettiği 343 *Enterobacter* suşunun 35'inde (%10,2), 332 *Pseudomonas* suşunun dokuzunda (%2,7), 166 *Acinetobacter* suşunun sekizinde (%4,8) ve 870 *E. coli* suşunun 91'inde (%10,5) ESBL tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise 64 gram negatif izolatin beşi (%7,8, [3 *Pseudomonas* spp. ve iki *Klebsiella* spp.]) ESBL (+) olarak tanımlanmış, ESBL pozitif suşların hepsi burundan alınan örneklerden izole edilmiştir. ESBL'ler tüm dünyada saptanmalarına rağmen bu enzimi üreten mikroorganizmaların sıklığı bölgeden bölgeye, ülkeden ülkeye, hatta hastaneden hastaneye farklılık göstermektedir. ESBL, *Enterobacteriaceae* ailesinin bir çok üyesinde görülmekle birlikte, en sık *K. pneumoniae* suşlarında bulunmaktadır.

*Candida* türleri, başta gastrointestinal sistem olmak üzere, tüm mukokutanöz yüzeylerde normal flora üyesi olarak bulunabilir. İnsan gastrointestinal sisteminden en sık izole edilen tür *Candida albicans* olup, bunu *Candida tropicalis* ve *Candida glabrata* izler. *Candida parapsilosis* ise *C. albicans*'la beraber deri florasında bulunur. *Candida albicans* vajen florasında en sık yer alan *Candida* türüdür ve vajinit olgularının %90'nından sorumludur. Buna karşın, vajen dışındaki mukozal yüzeylerde diğer *Candida* türleri hakimdir. Kandidoz olguları diyabetiklerde, antibiyotik, kortikosteroid ya da oral kontraseptif kullananlarda, uzun süreli damar içi kateter kullananlarda ve gebelerde daha sık görülür. Hücresel immünite yetmezliği olanlarda ise yaygın olarak kronik mukokutanöz kandidoz oluşmaktadır.

Sağlıklı bireylerde maya mantarı taşıyıcılığı ile ilgili az sayıda çalışma vardır. Genelde literatürlerde hastane kaynaklı izolatlara çalışılmıştır. Bizim çalışmamızda 1040 sağlıklı bireyden üçünde (%0,3) koltuk altı ve ikisinde (%0,2) burun örneklerinden olmak üzere, toplam beş maya mantarı izole edilmiştir. Tüm izolatlara *C. parapsilosis* olarak tanımlanmış, maya mantarı taşıyıcılığı %0,5 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.3). *C. parapsilosis* bulunan iki olguda *S. aureus* burun taşıyıcılığı tespit edilmiş, bir olguda böbrek yetmezliği, son altı ay içinde hastanede yatış öyküsü ve son üç ay içinde antibiyotik kullanım öyküsü bulunmuştur. Ayrıca ikisinin sağlıklı ilişkili kurumlarda çalıştıkları bildirilmiştir. Sağlık çalışanlarının

ellerinde mayaların tanımlanması ile ilgili yapılan birçok çalışmada bizim gibi en sık *C. parapsilosis* izole edilmiştir.

**Çizelge.4.3.** Maya mantarların risk faktör özellikleri

Pr.No	Yaşı	Cinsiyets	Meslek	Son 6 ayda HYÖ	Son 3 ayda ABKÖ	Son 2 haftada AHÖ	KHÖ	DYDE	<i>S. aureus</i>	MRSA	Gram (-)	Maya burun ve/veya koltuk altı
501	63	E	Diğer	-	+	+	BOY	-	-	-	-	Burun ( <i>C. parapsilosis</i> )
811	47	E	Sağ. P	-	-	-	-	-	+	-	-	Burun ( <i>C. parapsilosis</i> )
39	37	E	Sağ. P	-	-	-	-	-	-	-	-	Koltuk altı ( <i>C. parapsilosis</i> )
81	43	E	Diğer	-	-	-	-	-	-	-	-	Koltuk altı ( <i>C. parapsilosis</i> )
514	9	E	Öğrenci	-	-	-	-	-	+	-	-	Koltuk altı ( <i>C. parapsilosis</i> )

HYÖ; Hastanede yatma öyküsü, ABKÖ; Antibiyotik kullanma öyküsü, AHÖ; Akut hastalık öyküsü, KHÖ; Kronik hastalık öyküsü, DYDE; Cilt ve yumuşak doku enfeksiyonu  
Sağ. P; sağlık kurumları personeli, BOY; Bobrek yetmezliği

Elde edilen sonuçlar; etkili ve kısa süreli tedavi protokollerinin geliştirilmesinde, antibakteriyel direnç gelişiminin önlenmesinde, *S. aureus* enfeksiyonlarında morbidite ve mortalite oranlarının ve bu enfeksiyonların tedavi maliyetlerinin azaltılmasında önemli veriler sağlamıştır. Elde edilecek veriler ayrıca ülkemizde daha önce yapılmış çalışmalardan elde edilen sonuçlarla karşılaştırılarak, yıllar içerisinde *S. aureus* taşıyıcılığı oranlarındaki değişiklik, *S. aureus*'ların antibakteriyel direnç paternlerinde oluşan farklılıklar ve bu farklılıklara yol açan faktörler irdelenmiştir.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Enfeksiyon etkeni olmayan TK-MRSA grubu olarak, yaşları 4 ile 85 arasında değişen (yaş ortalaması  $29,35 \pm 13,41$ ) 564 (%54,2) erkek ve 476 (%45,8) kadın olmak üzere, toplam 1040 sağlıklı bireyden izole edilen MRSA izolatları; enfeksiyon etkeni olan TK-MRSA grubu olarak ise, 2004-2005 yılları arasında İstanbul Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nin çeşitli polikliniklerine başvuran, yaşları 4 ile 76 arasında değişen (yaş ortalaması  $39,6 \pm 19,9$ ) 21 erkek (%67,7) ve 10 (%32,3) kadın hastadan izole edilmiş olan 31 MRSA izolatı kullanılmıştır.
2. 1040 sağlıklı gönüllüden; 259'u (%24,9) sadece burundan, 11'i (%1,1) sadece koltuk altından ve 12'si (%1,2) hem burun hem de koltuk altından olmak üzere, toplam 294 *S. aureus* suşu izole edilmiştir. Bu durumda *S. aureus* taşıyıcılarında (toplam 282 kişi) burun kolonizasyonu %91,8 (259/282), koltuk altı kolonizasyonu %3,9 (11/282), hem burun hem de koltuk altı kolonizasyonu %4,3 (12/282) olarak hesaplanmıştır. *S. aureus* burun taşıyıcılığı, koltuk altı taşıyıcılığına göre yüksek bulunmuş, burun taşıyıcılığı ile koltuk altı taşıyıcılığı arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0,001$ ).
3. *S. aureus* taşıyıcılığı erkeklerde %32,1 ve kadınlarda %21,2 olarak bulunmuştur ( $p < 0,001$ ). El hijyenine uyum ve enfeksiyon kontrol önlemleri konusunda eğitime önem verilmesinin, taşıyıcılık oranlarının azalmasında etkili olacağı düşünülmektedir.
4. *S. aureus* taşıyıcılığı 4-9 yaş grubunda %35,5, 10-19 yaş grubunda %23,7, 20-29 yaş grubunda %26,2, 30-39 yaş grubunda %29,1, 40-49 yaş grubunda %32,7, 50-59 yaş grubunda %25,0 ve 60 yaş üstü grubunda %22,5 olarak bulunmuştur. *S. aureus* taşıyıcılığı her yaşta görülmekle birlikte, özellikle çocuk ve gençlerde daha sık olduğu görülmektedir.
5. *S. aureus* taşıyıcılarında risk faktörlerin dağılımına bakıldığında; %18,1'inin son üç ay içinde çeşitli nedenlerle antibiyotik kullandığı, %13,1'inde son iki hafta içerisinde akut bir enfeksiyon belirtisi olduğu, %9,6'sının kronik hastalığı bulunduğu, %4,3'ünde deri veya yumuşak doku enfeksiyonu bulunduğu ve

%5,3'ünde son altı ay içerisinde hastanede yatış öyküsü bulunduğu görülmüştür. En yaygın bulunan kronik hastalık alerjik rinit (%4,3) idi. Bunu sırasıyla astım (%1,4), kronik bronşit (%1,1), hipertansiyon (%1,1), diabetes mellitus (%0,7), immünoşüpresif tedavi gören hastalar (%0,7) ve idrar yolu enfeksiyonu (%0,4) izlemiştir.

6. *S. aureus* taşıyıcılığı sağlık kurumlarında çalışanlarda %30,6, öğrencilerde %25,4 ve diğer meslek gruplarında çalışanlarda %25,5 olarak bulunmuştur ( $p=0,214$ ). Bu durum istatistiksel olarak anlamlı bulunmamasına rağmen, sağlık kurumlarında çalışanlarda *S. aureus* taşıyıcılığına bir eğilim olduğunu gözlenmektedir.
7. İki yüz doksan dört *S. aureus* suşunun 18'inde PZR yöntemiyle *mecA* geni tespit edilirken; sefoksitin ve oksasilin disk difüzyon testleriyle ve "oksasilin tuz tarama besiyeri" testiyle 12'sinde ve ORSAB testiyle 51'inde fenotipik metisilin direnci saptanmıştır. PZR ile fenotipik yöntemlerle elde edilen sonuçların uyumlu bulunmamasının, suşların muhtemelen sınırda dirence sahip olmalarına bağlı olduğu, ayrıca *mecA* geni bulunmasına rağmen, genin her zaman eksprese olmadığı, ya da düşük düzeyde eksprese olduğu düşünülmüştür. Bu sonuçlar fenotipik yöntemlerin MRSA suşlarının belirlemede yetersiz kaldığını ve moleküler yöntemlerle doğrulanması gerektiğini göstermektedir.
8. 1040 sağlıklı bireyde TK-MRSA taşıyıcılığı, erkeklerde %2,3 ve kadınlarda %1,1 olmak üzere, ortalama %1,7 olarak bulunmuş ve MRSA suşlarının hepsi burundan alınan örneklerden izole edilmiştir. MRSA taşıyıcılığı 4-9 yaş grubunda %3,2, 10-19 yaş grubunda %1,5, 20-29 yaş grubunda %2,0, 30-39 yaş grubunda %1,1, 40-49 yaş grubunda %2,0, 50-59 yaş grubunda %2,1 olarak hesaplanmış, 60 yaş üstü grubunda MRSA taşıyıcılığı saptanmamıştır. MRSA taşıyıcılığı da her yaşta görülmekte ve *S. aureus* taşıyıcılığında olduğu gibi, yine çocuk ve gençlerde daha sık rastlanmaktadır.
9. TK-MRSA taşıyıcılarında risk faktörlerinin dağılımına bakıldığında, %1,9'ünün son üç ay içinde çeşitli nedenlerle antibiyotik kullandığı, %2,6'sında son iki hafta içerisinde akut bir enfeksiyon belirtisi bulunduğu, %1,2'sinin kronik hastalığı bulunduğu, %2,7'sinde son altı ay içerisinde hastanede yatış öyküsü bulunduğu görülmüştür. En yaygın bulunan kronik hastalık alerjik rinit (%2,7) idi.

10. MRSA taşıyıcılığı sağlık kurumları ile ilişkili mesleklerde çalışanlarda %0,6, öğrencilerde %2,2 ve diğer meslek gruplarında çalışanlarda %2,4 olarak bulunmuştur ( $p=0,143$ ).
11. Enfeksiyon etkeni olmayan TK-MRSA suşlarında, en yüksek duyarlılık vankomisin (%100), trimetoprim/sulfametoksazol (%100) ve kloramfenikole (%100) karşı saptanırken, tetrasiklin ve amoksisilin/klavulanik asit duyarlılığı %16,7 olarak bulunmuştur. Enfeksiyon etkeni olan TK-MRSA suşlarında ise en yüksek duyarlılık, vankomisin (%100) ve kloramfenikole (%96,8) karşı saptanırken, tetrasiklin ve siprofloksazin duyarlılıkları sırasıyla %38,7 ve %35,5 olarak bulunmuştur. Elde edilen antibakteriyel duyarlılık testleri sonuçları, TK-MRSA kuşkusu olan enfeksiyonların ampirik tedavisinde  $\beta$ -laktamazlara karşı dayanıklı  $\beta$ -laktam antibiyotiklerin,  $\beta$ -laktamaz inhibitörü kombinasyonlarının, trimetoprim/sulfametoksazolün ve kloramfenikolün ülkemizde halen etkin olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Kloramfenikol MRSA enfeksiyonların tedavisinde etkili olmasına rağmen, ciddi yan etkilere yol açması nedeniyle, kullanımı sadece ciddi enfeksiyonlarla sınırlı kalmalıdır.
12. Enfeksiyon etkeni olan ve olmayan TK-MRSA suşlarının iMLS<sub>B</sub> fenotipi tayini D-test ile yapılmıştır. Enfeksiyon etkeni olan ve olmayan TK-MRSA suşlarında iMLS<sub>B</sub> fenotipi sırasıyla %12,9 ve %11,1; MS fenotipi sırasıyla %6,5 ve %0; S fenotipi sırasıyla %80,6 ve %88,9 olarak bulunmuştur. Enfeksiyon etkeni olan ve olmayan TK-MRSA suşlarında cMLS<sub>B</sub> fenotipi tespit edilmemiştir. Sonuçta fenotipik olarak duyarlı görülen suşlarda da direnç genlerinin belirlenmiş olması, direnç tesbitinde fenotipik yöntemlerin yetersiz kaldığını ve moleküler yöntemlerle de doğrulaması gerektiğini göstermektedir.
13. Enfeksiyon etkeni olmayan 18 ve enfeksiyon etkeni olan 31 TK-MRSA suşlarının SCC<sub>mec</sub> tip tayini için SCC<sub>mec</sub> ve *ccr* tiplendirme yöntemleri kullanılmıştır. SCC<sub>mec</sub> tip tayini sonucunda, enfeksiyon etkeni olmayan TK-MRSA suşlarında tip I %5,6, tip II %38,9, tip III %11,1, tip IV %38,9 ve tip V %5,6; enfeksiyon etkeni olan TK-MRSA suşlarında ise tip I %9,7, tip II %9,7, tip III %48,4, tip IV %22,6 ve tip V %9,7 olarak bulunmuştur. Toplumda MRSA enfeksiyonlarının epidemiyolojisinin ve kolonizasyon ile enfeksiyon arasındaki ilişkinin daha iyi aydınlatılmasına ihtiyaç

olduğu görülmektedir. Sonuç olarak ülke genelinde MRSA taşıyıcılığının yanısıra, yaygın tiplerin ve klonların belirlenmesi de büyük önem taşımaktadır.

14. Enfeksiyon etkeni olmayan 18 TK-MRSA suşunda %22,2 PVL (+) bulunurken, enfeksiyon etkeni olan 31 TK-MRSA suşundan hiçbirinde PVL geni bulunmamıştır. SCC<sub>mec</sub> ve/veya *ccr* yöntemiyle tiplendirilen 18 MRSA suşundan PVL (+) bulunan 4 suşun hepsi de tip IV olarak tanımlanmıştır. Enfeksiyon etkeni olan ve olmayan TK-MRSA suşlarında PVL pozitifliği arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0,014$ ).
15. Enfeksiyon etkeni olan TK-MRSA suşlarının kaset tiplerine, PVL varlığına ve antimikrobiyal duyarlılık profillerine baktığımızda, daha çok TK-MRSA suşlarına benzerlik gösterdikleri görülmüştür.
16. 1040 sağlıklı bireyden alınan burun ve koltuk altı örneklerinden, *Enterobacteriaceae* ailesinde yer alan 64 gram negatif basıl üremiştir. Taşıyıcılık oranı %5,8 olarak bulunmuş ve en sık *Enterobacter* spp. izole edilmiştir (%28,1). Bunu sırasıyla *Klebsiella* spp. (%23,4), *Escherichia* spp. (%17,2), *Proteus* spp. (%14,1), *Citrobacter* spp. (%7,8), *Pseudomonas* spp. (%7,8) ve *Serratia* spp. (%1,6) izlemiştir.
17. 64 gram negatif bakteri suşunun antimikrobiyal profilleri incelenmiş ve ESBL tayini yapılmış ve 64 gram negatif izolatın beşi (%7,8, [üç *Pseudomonas* spp. ve iki *Klebsiella* spp.]) ESBL (+) olarak tanımlanmıştır. ESBL pozitif suşların hepsi burun örneklerinden izole edilmiştir.
18. 1040 sağlıklı bireyde, üçü (%0,3) koltuk altı ve ikisi (%0,2) burun örneklerinden olmak üzere toplam beş maya mantarı izole edilmiştir. Tüm izolatlar *Candida parapsilosis* olarak tanımlanmış, maya mantarı taşıyıcılığı %0,5 olarak bulunmuştur.
19. Elde edilen bulgular literatür verileriyle birlikte değerlendirildiğinde, *mecA* geni varlığı ile metisilin direnci arasında her zaman direkt bir ilişki kurulamayacağı ortaya çıkmaktadır. Bu durum, bilinen mekanizmaların dışında başka faktörlerin de rol oynadığını düşündürmektedir.
20. Bu çalışmada toplumda *S. aureus* taşıyıcılığı, bu konuda yapılan çalışmalarla uyumlu bulunmuştur. Dünyada birçok bölgede yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında, taşıyıcılık oranlarının ve PVL pozitifliğinin rölatif olarak düşük bulunması, ülkemizde toplum için henüz ciddi bir tehlike oluşturmadığını vurgulamıştır. Ancak,

belirli aralıklarla risk faktörlerine yönelik epidemiyolojik çalışmalar devam etmeli ve gerekli önlemler alınmalıdır. Toplumda MRSA taşıyıcılığının azalmasında eğitim, uygun dezenfeksiyon-antisepsi uygulanmaları, etkin karantina önlemleri, ve belki de en önemlisi, bilinçli antibiyotik kullanımı, büyük rol oynayacaktır.

## ÖZET

### TOPLUM KAYNAKLI METİSİLİN DİRENÇLİ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (CA-MRSA) SUŞLARINDA KROMOZOMAL KASET TİPLERİNİN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR) YÖNTEMLERİ İLE ARAŞTIRILMASI

*S. aureus* tüm dünyada toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonlara yol açan en önemli patojenlerden birisidir. Toksik şok sendromu, gıda zehirlenmesi, haşlanmış deri sendromu gibi toksikojenik hastalıklara; impetigo, follikülit, fronkül, karbonkül, sellülit, blefarit, mastit, cerrahi yara enfeksiyonları gibi lokal piyojenik hastalıklara ve endokardit, osteomyelit, artrit, sepsis, pnömoni, idrar yolu enfeksiyonları, metastatik abseler ve menenjit gibi sistemik enfeksiyonlara yol açmaktadır. Nazal taşıyıcılık *S. aureus* enfeksiyonları için önemli bir risk faktörüdür. Önceleri bir nozokomiyal enfeksiyon etkeni olarak kabul edilen metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA)'lar, 1980'lerden itibaren toplum kaynaklı enfeksiyonlardan da izole edilmeye başlamıştır. Çalışmanın amacı, konvansiyonel ve moleküler yöntemler kullanarak, çeşitli klinik örneklerden ve çeşitli yaş gruplarındaki sağlıklı taşıyıcılardan izole edilen *S. aureus* suşlarının direnç profillerinin ve virulans faktörlerinin belirlenmesi ve CA-MRSA suşların kromozomal kaset tiplerinin (SCC*mec* ve *ccr* gen kompleks) PCR yöntemleriyle araştırılmasıdır.

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yürütülmüştür. Enfeksiyon etkeni olmayan CA-MRSA suşlarının elde edilmesi amacıyla, Ekim 2007-Mayıs 2008 tarihleri arasında, yaşları 4 ile 85 arasında değişen toplam 1040 sağlıklı bireyden burun ve koltuk altı örnekleri alınmıştır. Steril nemlendirilmiş eküvyonlar kullanılarak alınan burun ve koltuk altı örnekleri stuart taşıma besiyeri içerisine alınarak %5 koyun kanlı agar, EMB besiyeri ve antibiyotikli-SDA besiyerlerine inoküle edilerek rutin bakteriyolojik incelemeler yapılmıştır. Enfeksiyon etkeni olan 31 CA-MRSA suşu, 2004-2005 yılları arasında, İstanbul Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nin çeşitli polikliniklerine başvuran ve yaşları 4 ile 76 arasında değişen hastalardan alınan örneklerden (idrар, üretral akıntı, burun, püy, yara, eklem sıvısı) enfeksiyon etkeni olarak izole edilmiştir. *S. aureus*'u düşündüren gram pozitif koklardan katalaz, koagülaz, tüpte koagülaz testleri, mannitol salt agar ve DNaz testi yapılmıştır. Tüm *S. aureus* suşlarından fenol kloroform yöntemiyle DNA ekstraksiyonu yapılmış, PCR ve multipleks PCR yöntemleriyle *mecA*, PVL, SCC*mec* ve *ccr* gen kompleksi araştırılmıştır.

1040 sağlıklı bireyde *S. aureus* taşıyıcılığı oranı %27,1 olarak hesaplanırken, bu oran erkeklerde (%32,1), kadınlara göre (%21,2) daha yüksek bulunmuştur ( $p<0,001$ ). *S. aureus* burun kolonizasyonu %91,8, koltuk altı kolonizasyonu %3,9, hem burun hem de koltuk altı kolonizasyonu %4,3 olarak hesaplanmıştır. Burun taşıyıcılığı, koltuk altı taşıyıcılığına göre yüksek bulunmuştur ( $p<0,001$ ). *S. aureus*

taşıyıcılığı sağlık kurumlarında çalışanlarda %30,6, öğrencilerde %25,4 ve diğer meslek gruplarında çalışanlarda %25,5 olarak bulunmuştur.

PCR ile 18, sefoksitin, oksasilin disk difüzyon, oksasilin tuz tarama agar testleriyle 12 ve ORSAB testiyle 51 MRSA suşu saptanmıştır. CA-MRSA taşıyıcılığı, erkeklerde %2,3 ve kadınlarda %1,1 olmak üzere, ortalama %1,7 olarak bulunmuştur.

Enfeksiyon etkeni olmayan CA-MRSA suşlarında, en yüksek duyarlılık vankomisin (%100), trimetoprim/sulfametoksazol (%100) ve kloramfenikole (%100) karşı saptanırken, tetrasiklin ve amoksisilin/klavulanik asit duyarlılığı %16,7 olarak bulunmuştur. Enfeksiyon etkeni olan CA-MRSA suşlarında en yüksek duyarlılık vankomisin (%100) ve kloramfenikole (%96,8) karşı saptanırken, tetrasiklin ve siprofloksazin duyarlılıkları sırasıyla %38,7 ve %35,5 olarak bulunmuştur. Enfeksiyon etkeni olan ve olmayan CA-MRSA suşlarında iMLS<sub>B</sub> fenotipi sırasıyla %12,9 ve %11,1; MS fenotipi sırasıyla %6,5 ve %0; S fenotipi sırasıyla %80,6 ve %88,9 olarak bulunmuştur. Enfeksiyon etkeni olan ve olmayan CA-MRSA suşlarında cMLS<sub>B</sub> fenotipi tespit edilmemiştir.

Enfeksiyon etkeni olmayan 18 ve enfeksiyon etkeni olan 31 CA-MRSA suşlarının tip tayini için SCC<sub>mec</sub> ve *ccr* tiplendirme yöntemleri kullanılmıştır. Kaset kromozom tip tayini sonucunda, enfeksiyon etkeni olmayan CA-MRSA suşlarında tip I %5,6 (1/18), tip II %38,9 (7/18), tip III %11,1 (2/18), tip IV %38,9 (7/18) ve tip V %5,6 (1/18) olarak bulunmuş ve tip VI bulunmamıştır; enfeksiyon etkeni olan CA-MRSA suşlarında ise tip I %9,7 (3/31), tip II %9,7 (3/31), tip III %48,4 (15/31), tip IV %22,6 (7/31) ve tip V %9,7 (3/31) olarak bulunmuş ve tip VI bulunmamıştır. Enfeksiyon etkeni olmayan 18 CA-MRSA suşunda %22,2 PVL pozitifliği saptanırken, enfeksiyon etkeni olan 31 CA-MRSA suşundan hiçbirinde PVL geni bulunmamıştır. SCC<sub>mec</sub> ve/veya *ccr* yöntemiyle tiplendirilen 18 MRSA suşundan PVL (+) bulunan 4 suşun hepsi de tip IV olarak tanımlanmıştır. Enfeksiyon etkeni olan ve olmayan CA-MRSA suşlarında PVL pozitifliği arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0,014).

Enfeksiyon etkeni olan CA-MRSA suşlarının kaset tiplerine, PVL varlığına ve antimikrobiyal duyarlılık profillerine baktığımızda, daha çok HA-MRSA suşlarına benzerlik gösterdikleri görülmüştür.

**Anahtar Sözcükler:** *Staphylococcus aureus*, CA-MRSA, PVL, SCC<sub>mec</sub>

## SUMMARY

### INVESTIGATION OF CASSETTE CHROMOSOME TYPES WITH POLIMERASE CHAIN REACTION (PCR) IN COMMUNITY-ASSOCIATED METHICILLIN RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (CA-MRSA) STRAINS

*S. aureus* is one of the major causes of infections in both communities and hospitals worldwide. It is associated with toxigenic diseases such as toxic shock syndrome, food poisoning, scalded skin syndrome; local pyogenic diseases such as impetigo, folliculitis, furuncles, carbuncles, cellulites, blepharitis, mastitis, surgical wound infections; and systemic infections such as endocarditis, osteomyelitis, arthritis, sepsis, pneumonia, urinary tract infections, metastatic abscesses and meningitis. Nasal carriage is an important risk factor for *S. aureus* infections. Formerly known to be a nosocomial pathogen, methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) has begun to be isolated from community associated infections since the 1980s. The aim of this study is to determine the resistance profiles and virulence factors of *S. aureus* strains isolated from various clinical specimens and healthy carriers of different age groups, and to investigate the cassette chromosome types (SCC*mec* ve *ccr* gen complex) with PCR methods.

This study was carried out at Ankara University Faculty of Medicine, Department of Microbiology and Clinical Microbiology. In order to obtain CA-MRSA strains, nasal and axillary specimen were taken from 1040 healthy individuals of ages from 4 to 85, between October 2007 and May 2008. Taken using sterile moistured swabs and carried in Stuart's transpor media, nasal and axillary specimen were inoculated on to 5% sheep blood agar, EMB media and SDA (including antibiotics) for routine bacteriological examinations. 31 CA-MRSA strains as infectious agents were isolated from urine, uretral discharge, nasal, pus, wound, joint fluid samples of outpatients of ages from 4 to 76 who applied to Istanbul Haydarpaşa Numune, Teaching and Research Hospital between 2004-2005. For all *S. aureus* strains, DNA extraction was performed by phenol chloroform method and *mecA*, PVL, SCC*mec* genes and *ccr* gene complex was investigated by PCR and multiplex PCR methods.

The rate of *S. aureus* carriers among 1040 healthy individuals was found to be 27,1%, while carriage rates in males and females were found to be 32,1% and 21,2% respectively ( $p < 0,001$ ). *S. aureus* nasal, axillary, and both nasal and axillary colonisation rates were found to be 91,8%, 3,9% and 4,3% respectively. Nasal carriage was higher than axillary carriage ( $p < 0,001$ ). *S. aureus* carriage rates were found to be 30,6% among medical workers, 25,4% among students and 25,5% among other occupational groups.

18 MRSA strains were determined by PCR method, 12 by cefoxitin, oxacillin disc diffusion and oxacillin-salt screening agar tests and 51 by ORSAB tests. CA-

MRSA carriage rates among males and females were found to be 2,3% and 1,1% respectively, while the average rate was 1,7%.

Among CA-MRSA strains isolated from healthy individuals, highest sensitivity were found against vancomycin (100%), trimethoprim/sulfamethoxazole (100%) and chloramphenicol; whereas sensitivity against tetracycline and amoxicilline/clavulanic acid was found to be 16,7%. Among CA-MRSA strains isolated from outpatients, highest sensitivity rates were found against vancomycin (100%), and chloramphenicol (96,8%), whereas tetracycline and ciprofloxacin sensitivities were found to be 38,7% and 35,5% respectively. iMLS<sub>B</sub>, MS and S phenotypes of CA-MRSA strains isolated from healthy individuals /outpatients were found as 12,9% / 11,1%; 6,5% / 0% and 80,6% / 88,9% respectively. cMLS<sub>B</sub> phenotypes could not be detected in any of the CA-MRSA strains.

SCC<sub>mec</sub> and *ccr* typing methods were used for type determination of 18 CA-MRSA strains isolated from healthy individuals and 31 strains isolated from outpatient. Cassette chromosomal typing resulted as %5,6 (1/18) type I, %38,9 (7/18) type II, %11,1 (2/18) type III, %38,9 (7/18) type IV and %5,6 (1/18) type V in healthy individual CA-MRSA strains; and %9,7 (3/31) type I, %9,7 (3/31) type II, %48,4 (15/31) type III, %22,6 (7/31) type IV and %9,7 (3/31) type V in outpatients CA-MRSA strains. 22,2% of 18 healthy individuals CA-MRSA strains were found to be PVL positive, while the PVL gene was not found in any of the 31 outpatient CA-MRSA strains. All of 4 PVL positive strains out of 18 healthy individual MRSA strains which were typed by SCC<sub>mec</sub> and/or *ccr* methods were found to be type IV. The differentiation of PVL positivity between CA-MRSA strains isolated from healthy individuals and from outpatients was statistically found to be significant ( $p < 0,014$ ).

When cassette types, PVL positivity and antimicrobial susceptibility test profiles of outpatient CA-MRSA strains were investigated, they were found to be more similar to HA-MRSA strains.

**Key Words:** *Staphylococcus aureus*, CA-MRSA, PVL, SCC<sub>mec</sub>

## KAYNAKLAR

- ADALETİ, R., NAKİPOĞLU, Y., KARAHAN, Z.C., TASDEMİR, C., KAYA, F. (2008). Comparison of Polymerase Chain Reaction and Conventional Methods in Detecting Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Infection in Developing Countries*, **2**: 46-50.
- ARAJ, G.F., TALHOUK, R.S., SIMAAN, C.J., MAASAD, M.J. (1999). Discrepancies Between *mecA* PCR and Conventional Tests Used for Detection of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **11**: 47-52.
- ARDA, M. (2000). Temel Mikrobiyoloji. Mikrobiyoloji Kulübü Arama Siteleri Linkleri, <http://www.mikrobiyoloji.org/docgoster.asp?dosya=110013100>.
- AYDIN, N., GÜLTEKİN, B., EYİGÖR, M., GÜREL, M. (2001). Klinik Örneklerimizden İzole Edilen Stafilkokların Antibiyotik Direnci. *Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, **3**: 21-26.
- BALABAN, N. (2008). Klinik Materyallerden İzole Edilen Stafilkoklarda Makrolid, Linkozamid ve Streptogramin B Direnci Sıklığının Disk Yaklaştırma Testi ve Moleküler Yöntemler Kullanılarak Araştırılması, Doktora Tezi, Ankara.
- BANNERMAN, T.L. (2003). *Staphylococcus*, *Micrococcus* and Other Catalase Positive Cocci that Grow Aerobically. In: Manual of Clinical Microbiology. 8th Ed. MURRAY, P.R., BARON, E.J., PFALLER, M.A., JORGENSEN, J.H., YOLKEN, R.H., Washington, DC: ASM Press, p.: 384-404.
- BOKAREWA, M.I., JIN, T., TARKOWSKI, A. (2006). *Staphylococcus aureus*: Staphylokinase. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **38**: 504-509.
- BRADFORD, P. (2001). Extended Spectrum Beta Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology and Detection of this Important Resistance Threat. *Clinical Microbiology Reviews*, **14**: 933-951.
- BRADLEY, S.F. (1992). Methicillin Resistant *S. aureus* Infections. *Clinics in Geriatric Medicine*, **8**: 853-868.
- BRANGER, C., GOULLET, P., BOUTONNIER, A., FOURNIER, J.M. (1990). Correlation between Esterase Electrophoretic Types and Capsular Polysaccharide Types 5 and 8 among Methicillin-Susceptible and Methicillin-Resistant Strains of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, **28**: 150-151.
- BROOKS, G.F., BUTEL, J.S., MORSE, S.A. (2007). The Staphylococci. In: Jawetz, Melnick, and Adelberg's Medical Microbiology. 24th Ed. USA: The McGraw Hill Companies, p.: 224-230.
- BUCK, J.M., COMO-SABETTI, K., HARRIMAN, K.H., DANILA, R.N., BOXRUD, D.J., GLENNEN, A., LYNFIELD, R. (2005). Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, Minnesota, 2000-2003. *Emerging Infectious Diseases*, **11**: 1532-1538.
- CESUR, S., COKÇA, F. (2002). Determination of Nasal Carriage Rates of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* in Hospital Personnel and in the Community. *Mikrobiyoloji Bülteni*, **36**: 247-252.
- CHANG, S., SIEVERT, D.M., HAGEMAN, J.C., BOULTON, M.L., TENOVER, F.C., DOWNES, F.P., SHAH, S., RUDRIK, J.T., PUPP, G.R., BROWN, W.J., CARDO, D., FRIDKIN, S.K. (2003). Infection with Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Containing the *vanA* Resistance Gene. *The New England Journal of Medicine*, **348**: 1342-1347.
- CHEN, C.J., HUANG, Y.C. (2005). Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Taiwan. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, **38**: 376-382.
- CHONGTRAKOOL, P., ITO, T., MA, X.X., KONDO, Y., TRAKULSOMBOON, S., TIENSASITORN, C., JAMKLANG, M., CHAVALIT, T., SONG, J.H., HIRAMATSU, K. (2006). Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*) Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated in 11 Asian Countries: a Proposal for a New Nomenclature for SCC*mec* Elements. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **50**: 1001-1012.
- COCKFIELD, J.D., PATHAK, S., EDGEWORTH, J.D., LINDSAY, J.A. (2007). Rapid Determination of Hospital-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Lineages. *Journal of Medical Microbiology*, **56**: 614-619.

- CREECH, C.B., KERNODLE, D.S., ALSENTZER, A., WILSON, C., EDWARDS, K.M. (2005). Increasing Rates of Nasal Carriage of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Healthy Children. *Pediatric Infectious Disease Journal*, **24**: 617-621.
- ÇITAK, S., KARAÇOCUK, E. (2004). Hastane ve Toplum Kaynaklı Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* Suşlarının Çeşitli Antibiyotiklere Duyarlılığı. *Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, **26**: 13-17.
- ÇOKÇA, F., ARMAN, D., ALTAY, G. (1998). Vankomisin ile Rifampisin, Amikasin, Siprofloksasin ve İmipenem Kombinasyonlarının *Staphylococcus aureus* Suşlarına in Vitro Sinerjik Etkisi. *Klinik Dergisi*, **11**: 109-111.
- ÇOKUĞRAŞ, H. (2002). Bakteriye Menenjitte Akılcı Antibiyotik Kullanımı. *Çocuklarda Akılcı Antibiyotik Kullanımı Sempozyum Dizisi*, **33**: 51-57.
- DAUGHERTY, S., LOW, M.G. (1993). Cloning, Expression, and Mutagenesis of Phosphatidylinositol-Specific Phospholipase C from *Staphylococcus aureus*: a Potential Staphylococcal Virulence Factor. *Infection and Immunity*, **61**: 5078-5089.
- DE LENCASTRE, H., OLIVEIRA, D., TOMASZ, A. (2007). Antibiotic Resistant *Staphylococcus aureus*: A Paradigm of Adaptive Power. *Current Opinion in Microbiology*, **10**: 428-35.
- DELİALİOĞLU, N., ÖCAL, N.D., EMEKDAŞ, G. (2005). Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* Türlerinde Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz Oranları. *Ankem Dergisi*, **19**: 84-87.
- DELİYALİOĞLU, N., ASLAN, G., OZTURK, C., BAKİ, V., SEN, S., EMEKDAS, G. (2005). Inducible Clindamycin Resistance in Staphylococci Isolated from Clinical Samples. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, **58**: 104-106.
- DEMİRDAL, T., DEMİRTÜRK, N., ALTINDİŞ, M. (2006). Hastane Personelinde Nazal *Staphylococcus aureus* Taşıyıcılığı. *Klinik Dergisi*, **19**: 25-27.
- DIEP, B.A., SENSABAUGH, G.F., SOMBOONA, N.S., CARLETON, H.A., PERDREAU-REMINGTON, F. (2004). Widespread Skin and Soft-Tissue Infections Due to two Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Harboring the Genes for Pantone-Valentine Leucocidin. *Journal of Clinical Microbiology*, **42**: 2080-2084.
- DIETRICH, D.W., AULD, D.B., MERMEL, L.A. (2004). Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Southern New England Children. *Pediatrics*, **113**: 347-352.
- DUFOUR, P., GILLET, Y., BES, M., LINA, G., VANDENESCH, F., FLORET, D., ETIENNE, J., RICHET, H. (2002). Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in France: Emergence of a Single Clone that Produces Pantone-Valentine Leucocidin. *Clinical Infectious Diseases*, **35**: 819-824.
- DURMAZ, B., TEKEREKOĞLU, M.S., OTLU, B., TAŞTEKİN, N. (1999). Turgut Özal Tıp Merkezi Personelinde Burunda *S. aureus* ve Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* Taşıyıcılık Oranı. *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi*, **2**: 150-153.
- ERDENİZMENLİ, M., YAPAR, N., SENER, S.S., ÖZDEMİR, S., YÜCE, A. (2004). Investigation of Colonization with Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* in an Outpatient Population in Turkey. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, **57**: 172-175.
- FIDAN, I., YÜKSEL, S., GÜRELİK, F.Ç. (2005). Koagülaz Negatif Stafilokok Suşlarında Biyofilm Oluşumu ve Siprofloksasinin Biyofilm Üzerine Etkisi. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, **35**: 149-152.
- FLUEGGE, K., ADAMS, B., VOLKSBECK, U.L., SERR, A., HENNEKE, P., BERNER, R. (2006). Low Prevalence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a Southwestern Region of Germany. *European Journal of Pediatrics*, **165**: 688-690.
- FLUIT, A.D.C., VISSER, M.R., SCHMITZ, F. (2001). Molecular Detection of Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, **14**: 836-871.
- FORBES, B.A., SAHM, D.F., WEISSFELD, A.S. (2007). *Staphylococcus, Micrococcus* and Similar Organisms: Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 12th Ed. USA: Mosby, p.: 254-263.
- FORBES, B.A., SAHM, D.F., WEISSFELD, A.S. (2007). Laboratory Methods and Strategies For Antimicrobial Susceptibility Testing: Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 12th Ed. USA: Mosby, p.: 187-214.
- FRANKLIN, D.L. (1998). *Staphylococcus aureus* Infections. *The New England Journal of Medicine*, **339**: 520-532.
- FRAZEE, B.W., LYNN, J., CHARLEBOIS, E.D., LAMBERT, L., LOWERY, D., PERDREAU-REMINGTON, F. (2005). High Prevalence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in

- Emergency Department Skin and Soft Tissue Infections. *Annals of Emergency Medicine*, **45**: 311-320.
- GILLET, Y., ISSARTEL, B., VANHEMS, P., FOURNET, J.C., LINA, G., BES, M., VANDENESCH, F., PIÉMONT, Y., BROUSSE, N., FLORET, D., ETIENNE, J. (2002). Association Between *Staphylococcus aureus* Strains Carrying Gene for Panton-Valentine Leukocidin and Highly Lethal Necrotising Pneumonia in Young Immunocompetent Patients. *Lancet*, **359**: 753-759.
- GONZALEZ, B.E, MARTINEZ-AGUILAR, G., HULTEN, K.G., HAMMERMAN, W.A., COSS-BU, J., AVALOS-MISHAAN, A., MASON, E.O., KAPLAN, S.L. (2005). Severe *Staphylococcal* Sepsis in Adolescents in the Era of Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Pediatrics*, **115**: 642-648.
- GUPTA, K., MACINTYRE, A., VANASSE, G., DEMBRY, L.M. (2007). Trends in Prescribing  $\beta$ -Lactam Antibiotics for Treatment of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, **45**: 3930-3934.
- GÜLER, Ö. (2007). Klinik Örneklerden İzole Edilen Bakterilerde Beta-Laktamaz Varlığının ve Çeşitli Antibiyotik Gruplarına Karşı Duyarlılıklarının Araştırılması. Uzmanlık Tezi, Erzurum.
- GÜNDÜZ, T., AKGÜL, S., YILMAZ, S. (2005). Hemodiyaliz Hastalarında ve Çalışanlarında Nazal *Staphylococcus aureus* Taşıyıcılığı. *Kocatepe Tıp Dergisi*, **6**: 13-16.
- HADDADIN, A.S., FAPPIANO, S.A., LIPSETT, P.A. (2002). Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the Intensive Care Unit. *Postgraduate Medical Journal*, **78**: 385-392.
- HARBARTH, S., FRANÇOIS, P., SCHRENZEL, J., FANKHAUSER-RODRIGUEZ, C., HUGONNET, S., KOESSLER, T., HUYGHE, A., PITTET, D. (2005). Community Associated Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. Switzerland. *Emerging Infectious Diseases*, **11**: 962-965.
- HIRAMATSU, K., CUI, L., KURODA, M., ITO, T. (2001). The Emergence and Evolution of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology*, **9**: 486-493.
- HIRAMATSU, K., KATAYAMA, Y., YUZAWA, H., ITO, T. (2002). Molecular Genetics of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*, **292**: 67-74.
- HISATA, K., KUWAHARA-ARAI, K., YAMANOTO, M., ITO, T., NAKATOMI, Y., CUI, L., BABA, T., TERASAWA, M., SOTOZONO, C., KINOSHITA, S., YAMASHIRO, Y., HIRAMATSU, K. (2005). Dissemination of Methicillin-Resistant Staphylococci among Healthy Japanese Children. *Journal of Clinical Microbiology*, **43**: 3364-3372.
- IDA, T., OKAMOTO, R., SHIMAUCHI, C., OKUBO, T., KUGA, A., INOUE, M. (2001). Identification of Aminoglycoside-Modifying Enzymes by Susceptibility Testing: Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*, **39**: 3115-3121.
- ITO, T., KATAYAMA, Y., ASADA, K., MORI, N., TSUTSUMIMOTO, K., TIENSASITORN, C., HIRAMATSU, K. (2001). Structural Comparison of Three Types of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Integrated in the Chromosome in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **45**: 1323-1336.
- ITO, T., MA, X.X., TAKEUCHI, F., OKUMA, K., YUZAWA, H., HIRAMATSU, K. (2004). Novel Type Staphylococcal Cassette Chromosome Driven by a Novel Cassette Chromosome Recombinase, *ccrC*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **48**: 2637-2651.
- ITO, T., OKUMA, K., MA, X.X., YUZAWA, H., HIRAMATSU, K. (2003). Insights on Antibiotic Resistance of *Staphylococcus aureus* from its Whole Genome: Genomic Island *Scs*. *Drug Resistance Updates*, **6**: 41-52.
- IWATSUKI, K., YAMASAKI, O., MORIZANE, S., OONO, T. (2006). Staphylococcal Cutaneous Infections: Invasion, Evasion and Aggression. *Journal of Dermatological Science*, **42**: 203-214.
- JANAPATL, R.P., YAN, J.J., HUANG, A.H., CHEN, H.M., WU, H.M., WU, J.J. (2007). Inducible Clindamycin Resistance in *Staphylococcus aureus* Isolates Causing Bacteremia at a University Hospital in Southern Taiwan. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **58**: 203-209.
- JOHANSSON, D., MÖLLING, P., STRALIN, K., SÖDERQUIST, B. (2004). Detection of Pantone-Valentine leukocidin Gene in *Staphylococcus aureus* by LightCycler PCR: Clinical and Epidemiological Aspects. *Clinical Microbiology and Infection*, **10**: 884-889.

- KAMPF, G., ADENA, S., RÜDEN, H., WEIST, K. (2003). Inducibility and Potential Role of *mecA*-Gene-Positive Oxacillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* from Colonized Healthcare Workers as a Source for Nosocomial Infections. *Journal of Hospital Infection*, **54**: 124-129.
- KARABİBER, N. (1991). *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage in the Normal Population and Hospital Laboratory Personnel. *Mikrobiyoloji Bülteni*, **25**:187-191.
- KARAHAN, Z.C., TEKELİ, A., ADALETİ, R., KOYUNCU, E., DOLAPCI, I., AKAN, O.A. (2008). Investigation of Panton-Valentine leukocidin Genes and SCCmec types in Clinical *Staphylococcus aureus* Isolates from Turkey. *Microbial drug resistance*, **14**: 203-210.
- KARAPSIAS, S., PIPERAKI, E.T., SPILIOPOULOU, I., KATSANIS, G., TSELENI-KOTSOVILI, A. (2008). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage Among Healthy Employees of the Hellenic Air Force. *Euro Surveillance*, **13**: 18999. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=18999>.
- KATAYAMA, Y., ITO, T., HIRAMATSU, K. (2001). Genetic Organization of the Chromosome Region Surrounding *mecA* in Clinical Staphylococcal Strains: Role of IS431-Mediated *mecI* Deletion in Expression of Resistance in *mecA*-Carrying, Low-Level Methicillin-Resistant *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **45**: 1955-1963.
- KENNER, J., O'CONNOR, T., PİANTANIDA, N., FISHBAIN, J., EBERLY, B., VISCOUNT, H., UYEHARA, C., HOSPENTHAL, D. (2003). Rates of Carriage of Methicillin-Resistant and Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in an Outpatient Population. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, **24**: 439-444.
- KILIÇ, A. (2008). Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus*'un Moleküler Epidemiyolojisi. 5. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi. 24-28 Haziran 2008, Ankara. Kongre Kitabı, PNL6, 85-90.
- KILIÇ, A., LI, H., STRATTON, C.W., TANG, Y.W. (2006). Antimicrobial Susceptibility Patterns and Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Types of, as Well as Panton-Valentine Leukocidin Occurrence among, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from Children and Adults in Middle Tennessee. *Journal of Clinical Microbiology*, **44**: 4436-4440.
- KILIÇ, S., BEŞİRBELLİOĞLU, B., KILIÇ, A., PAHSA, A. (2005). Bir Eğitim Hastanesinde 2003-2004 Yıllarında Saptanan Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* İnfeksiyonları. *Güllhane Tıp Dergisi*, **47**: 195-198.
- KLOOS, W.E., BANNERMAN, T.L. (1995). *Staphylococcus and Micrococcus* spp. In Manual of Clinical Microbiology. 5th Ed. MURRAY, P.R., BARON, E.J., PFALLER, M.A., TENOVER, F.C., YOLKEN, R.H. Washington, DC: American Society for Microbiology Press, p.: 282-298.
- KLUYTMANS, J., BELKUM, A., VERBRUGH, H. (1997). Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus*: Epidemiology, Underlying Mechanisms and Associated Risks. *Clinical Microbiology Reviews*, **10**: 505-520.
- KLUYTMANS, J.A., WERTHEIM, H.F. (2005). Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus* and Prevention of Nosocomial Infections. *Infection*, **33**: 3-8.
- KOÇOĞLU, E., KARABAY, O., İNCE, N.K., ÖZKARDEŞ, F., YILDIRIM R. (2007). Toplum Kaynaklı Üriner Sistem İnfeksiyonlarından İzole Edilen *Escherichia coli* Suşlarında Genişlemiş Spektrumlu Beta-laktamaz ve Bazı Antibiyotiklere Direnç Sıklığının Araştırılması. *Ankem Dergisi*, **21**: 5-9.
- KONDO, Y., ITO, T., MA, X.X., WATANABE, S., KREISWIRTH, B.N., ETIENNE, J., HIRAMATSU, K. (2007). Combination of Multiplex PCRs for Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Type Assignment: Rapid Identification System for *mec*, *ccr*, and Major Differences in Junkyard Regions. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **51**: 264-274.
- KONEMAN, E.W., WINN, W.C., ALLEN, S.D., JANDA, W.M., PROCOP, G.W., SCHRECKENBERGER, P.C., WOODS, G.L. (2006). Staphylococci and Related Gram-Positive Cocci. In: Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th Ed. USA: Lippincott Williams and Wilkins, p.: 624-662.
- KONEMAN, E.W., WINN, W.C., ALLEN, S.D., JANDA, W.M., PROCOP, G.W., SCHRECKENBERGER, P.C., WOODS, G.L. (2006). Medical Bacteriology: Taxonomy, Morphology, Physiology, and Virulence. In: Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th Ed. USA: Lippincott Williams and Wilkins, p.: 167-207.
- KUEHNERT, M.J., KRUSZON-MORAN, D., HILL, H.A., MCQUILLAN, G., MCALLISTER, S.K., FOSHEIM, G., MCDUGAL, L.K., CHAITRAM, J., JENSEN, B., FRIDKIN, S.K.,

- KILLGORE, G., TENOVER, F.C. (2006). Prevalance of *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization in the United States, 2001-2002. *Journal of Infectious Diseases*, **193**: 169-171.
- LEMAN, R., ALVARADO-RAMY, F., POCOOCK, S., BARG, N., KELLUM, M., MCALLISTER, S., CHEEK, J., KUEHNERT, M. (2004). Nasal Carriage of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in an American Indian Population. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, **25**: 121-125.
- LEVENT, B., GÜLŞEN, R.K. (2008). Gıda ve Su Kaynaklı Enfeksiyon Etkenleri. Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı Salgın Hastalıklar Araştırma Müdürlüğü Ulusal Enterik Patojenler Referans Laboratuvarı. 1. Baskı, Ankara.
- LINA, G., PIEMONT, Y., GODAIL-GAMOT, F., Bes, M., Peter, M.O., Gauduchon, V., Vandenesch, F., Etienne, J. (1999). Involvement of Panton-Valentine Leukocidin Producing *Staphylococcus aureus* in Primary Skin Infections and Pneumonia. *Clinical Infectious Diseases*, **29**: 1128-1132.
- LOWY, F.D. (1998). *Staphylococcus aureus* Infections. *The New England Journal of Medicine*, **339**: 520-532.
- LOWY, F.D. (2003). Antimicrobial Resistance: The Example of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Clinical Investigation*, **111**: 1265-1273.
- MENGISTU, Y., GEDEBOU, M. (1986). Aerobic Gram-Negative Pharyngeal Bacilli of Adult Ethiopians: Carrier Rates and Antibigrams. *The Journal of Hygiene*, **97**: 247-253.
- MILHEIRIÇO, C., OLIVEIRA, D.C., LENCASTRE, H.D. (2007). Update to the Multiplex PCR Strategy for the Assignment of *mec* Element Types in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **51**: 3374-3377.
- MIMICA, M.J., BEREZIN, E.N., CARVALHO, R.L., MIMICA, I.M., MIMICA, L.M., SÁFADI, M.A., SCHNEIDER, E., CAIAFFA-FILHO, H.H. (2007). Detection of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* Isolated from Pediatric Patients: Is the Cefoxitin Disk Diffusion Test Accurate Enough?. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, **4**: 415-417.
- MOBBS, K.J., VAN SAENE, H.K., SUNDERLAND, D., DAVIES, P.D. (1999). Oropharyngeal Gram-Negative Bacillary Carriage: a Survey of 120 Healthy Individuals. *Chest*, **115**: 1570-1575.
- MOREILLON, P., QUE, Y., GLAUSER, M.P. (2005). *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock) In: MANDELL, G.L., BENNETT, J.E., DOLIN, R.. Principles and Practice of Infectious Disease. 6th Ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, p.: 2321-2351.
- MORENO, F., CRISP, C., JORGENSEN, J.H., PATTERSON, J.E. (1995). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* as a Community Organism. *Clinical Infectious Diseases*, **21**: 1308-1312.
- MULVEY, M.R., CHUI, L., ISMAIL, J., LOUIE, L., MURPHY, C., CHANG, N., ALFA, M. (2001). Development of a Canadian Standardized Protocol for Subtyping Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Using Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, **39**: 3481-3485.
- MURRAY, P.R., ROSENTHAL, K.S., KOBAYASHI, G.S., PFALLER, M.A. (2005). *Staphylococcus* and Related Organisms. In: Medical Microbiology. 5th Ed. USA: Mosby, p.: 175-189.
- NAHIMANA, I., FRANCIOLI, P., BLANC, D.S. (2006). Evaluation of three chromogenic media (MRSA-ID, MRSA-Select and CHROMagar MRSA) and ORSAB for surveillance cultures of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection*, **12**: 1168-1174.
- NAIMI, T.S., LEDELL, K.H., BOXRUD, D.J., GROOM, A.V., STEWARD, C.D., JOHNSON, S.K., BESSER, J.M., O'BOYLE, C., DANILA, R.N., CHEEK, J.E., OSTERHOLM, M.T., MOORE, K.A., SMITH, K.E. (2001). Epidemiology and Clonality of Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Minnesota, 1996-1998. *Clinical Infectious Diseases*, **33**: 990-996.
- NAZ, H., ÇEVİK, F.Ç., AYKIN, N. (2006). Eskişehir Yunus Emre Devlet Hastanesi Personeline Burunda *Staphylococcus aureus* Taşıyıcılığı. *Ankem Dergisi*, **20**: 141-144.
- OGUZKAYA-ARTAN, M., BAYKAN, Z., ARTAN, C. (2008). Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus* in Healthy Preschool Children. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, **61**: 70-72.
- OĞUZKAYA-ARTAN, M., GÜLGÜN, M., BAYKAN, Z., TOK, D. (2008) Hastane Çalışanlarında *Staphylococcus aureus* Burun Taşıyıcılığı ve Antibiyotik Duyarlılığının Araştırılması. *İnfeksiyon Dergisi*, **22**: 87-90.

- OKAMOTO, R., OKUBO, T., INOUE, M. (1996). Detection of Genes Regulating  $\beta$ -Lactamase Production in *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **40**: 2550-2554.
- OLIVEIRA, D.C., LENCASTRE, H.D. (2002). Multiplex PCR Strategy for Rapid Identification of Structural Types and Variants of the *mec* Element in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **46**: 2155-2161.
- ÖNCÜL, O., ERDEMOĞLU, A., ÖZSOY, M.F., ALTUNAY, H., ERTEM, Z., ÇAVUŞLU, F. (2002). Hastane Personelinde Nazal *Staphylococcus aureus* Taşıyıcılığı. *Klinik Dergisi*, **15**: 74-77.
- ÖZTÜRK, R. (2008). Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Ülkemizde Antimikrobik Maddelere Direnç Sorunu. Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlara Pratik Yaklaşımlar Sempozyum Dizisi, **61**: 1-16.
- PATEL, M., HOESLEY, C.J., MOSER, S.A., STAMM, A.M., BADDLEY, J.W., WAITES, K.B. (2008). Dissemination of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a Tertiary Care Hospital. *Southern Medical Journal*, **101**: 40-45.
- PERRY, J.D., DAVIES, A., BUTTERWORTH, L.A., HOPLEY, A.L., NICHOLSON, A., GOULD, F.K. (2004). Development and Evaluation of a Chromogenic Agar Medium for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, **42**: 4519-4523.
- PLANO, L.R.W. (2004). *Staphylococcus aureus* Exfoliative Toxins: How they Cause Disease. *The Journal of Investigative Dermatology*, **122**: 1070-1077.
- PODZORSKI, R.P. (2004). Gel Electrophoresis, Southern Hybridization, and Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. In *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice*. Ed. PERSING, D.H., TENOVAR, F.C., VERSALOVIC, J., TANG, Y., UNGER, E.R., RELMAN, D.A., WHITE, T.J. Washington, DC: ASM Press: 273-280.
- PRAGMAN, A.A., SCHLIEVERT, P.M. (2004). Virulence Regulation in *Staphylococcus aureus*: The Need for in Vivo Analysis of Virulence Factor Regulation. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **42**: 147-154.
- SANCAK, B. (2007). *Staphylococcus aureus*'ta Metisilin ve Vankomisin Direnci. *Hacettepe Tıp Dergisi*, **38**: 127-134.
- SARAVOLATZ, L.D., MARKOWITZ, N., ARKING, L., POHLOD, D., FISHER, E. (1982). Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. Epidemiologic Observations During a Community-Acquired Outbreak. *Annals of Internal Medicine*, **96**: 11-16.
- SHIOMORI, T., YOSHIDA, S., MIYAMOTO, H., MAKISHIMA, K. (2000). Relationship of Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus* to Pathogenesis of Perennial Allergic Rhinitis. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **105**: 449-454.
- SHUKLA, S.K. (2005). Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and its Emerging Virulence. *Clinical Medicine and Research*, **3**: 57-60.
- SOYSAL, A., SAHİN, H., YAGCI, A., BARLAN, I., BAKİR, M. (2006). The Low Rate of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Turkish Children. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, **59**: 195-196.
- STROMMINGER, B., BRAULKE, C., PASEMANN, B., SCHMIDT, C., WITTE, W. (2008). Multiplex PCR for Rapid Detection of *Staphylococcus aureus* Isolates Suspected to Represent Community-Acquired Strains. *Journal of Clinical Microbiology*, **46**: 582-587.
- TRISTAN, A., FERRY, T., DURAND, G., DAUWALDER, O., BES, M., LINA, G., VANDENESCH, F., ETIENNE, J. (2007). Virulence Determinants in Community and Hospital Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Hospital Infection*, **62**: 105-109.
- UĞUR, D. (2006). Toplumda Genç Erişkin Yaş Grubu Erkek Bireylerde Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* Burun Taşıyıcılığı Prevalansının Saptanması ve Moleküler Tıp Tayini, Uzmanlık Tezi, İstanbul.
- ÜNAL, S. (1996). Stafilokoklarda Metisilin Direnç Mekanizmaları ve Metisilin Direnç Tespit Yöntemleri. *Flora Dergisi*, **1**: 14-17.
- ÜNAL, S. (2006). Toplumda Kazanılmış Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus*: Genetik Özellikler. *Ankem Dergisi*, **20**: 100-101.
- VELASCO, D., DEL MAR TOMAS, M., CARTELLE, M., BECEIRO, A., PEREZ, A., MOLINA, F., MOURE, R., VILLANUEVA, R., BOU, G. (2005). Evaluation of Different Methods for Detecting Methicillin (Oxacillin) Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **55**: 379-382.

- WERTHEIM, H.F.L., MELLES, D.C., VOS, M.C., LEEUWEN, W.V., BELKUM, A.V., VERBRUGH, H.A., NOUWEN, J.L. (2005). The Role of Nasal Carriage in *Staphylococcus aureus* Infections. *Lancet Infectious Diseases*, **5**: 751-762.
- WIKLER, M.A., COCKERILL, F.R., CRAIG, W.A., DUDLEY, M.N. (2007). Performance Standarts for Antimicrobial Susceptibility. Clinical and Laboratory Standarts Institute. 17th Ed. *Informational Supplement*, **27**: 44-51.
- WITTE, W., BRAULKE, C., CUNY, C., STROMMENGER, B., WERNER, G., HEUCK, D., JAPPE, U., WENDT, C., LINDE, H.J., HARMSSEN, D. (2005). Emergence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* with Panton-Valentine Leukocidin Genes in Central Europe. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **24**: 1-5.
- YAMAGUCHI, T., NISHIFUJI, K., SASAKI, M., FUDABA, Y., AEPFELBACHER, M., TAKATA, T., OHARA, M., KOMATSUZAWA, H., AMAGAI, M., SUGAI, M. (2002). Identification of the *Staphylococcus aureus etd* pathogenicity island which encodes a novel exfoliative toxin, ETD, and EDIN-B. *Infection and Immunity*, **70**: 5835-5845.
- YILMAZ, G., AYDIN, K., ISKENDER, S., CAYLAN, R., KOKSAL, I. (2007). Detection and Prevalence of Inducible Clindamycin Resistance in Staphylococci. *Journal of Medical Microbiology*, **56**: 342-345.

## ÖZGEÇMİŞ

### I - Bireysel Bilgiler

Adı	Saeid
Soyadı	BARKAR
Doğum yeri ve tarihi	Tebriz/İran, 21.03.1966
Uyruğu	İran
Medeni Durumu	Evli
İletişim Adresi ve Telefonu	Harbiye Mah. Tavus Kuşu Sok. 7/10 Dikmen Ankara 0535 846 14 21

### II - Eğitimi

2005-2009, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı (Doktora)  
2004-2005, Gazi Üniversitesi/TÖMER, Türkçe eğitimi  
1984-1992, Tebriz Azad İslami Üniversitesi, Tıp Fakültesi (Yüksek lisans)  
Yabancı dili: İngilizce, Türkçe, Farsça

### III - Ünvanları

1992-2000, Pratisyen hekim  
2005-2009, Araştırma görevlisi

### IV - Mesleki Deneyimi

1992-1994, Pratisyen hekim, (Askeri Hastane/İran)  
1995-2000, Mecburi hizmet (Sağlık ocağı/İran)

### VI - Bilimsel İlgi Alanları

#### Yayımlar:

Sahin, F., Elyürek, E., Barkar, S., Gerceker, D., Çalgın, .M.K, Kıyan, M., Özsan, T.M. (2008). A New, Simple, Rapid Test for Detection of DNase Activity of Microorganism: DNase Tube Test. *Letters in Applied Microbiology*. (Değerlendirilme aşamasındadır).

Posterler:

Şahin, F., Elyürek, E., Barkar, S., Gerçeker, D., Çalgın, K.M., Kıyan, M., Özsan, M.T. Mikroorganizmaların DNaz Aktivite Tayininde Yeni Bir Yöntem: Tüpte DNaz Yöntemi. 5. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, Ankara, 24-28 Haziran 2008.

VII - Bilimsel Etkinlikleri

Burs:

TÜBİTAK, Doktora Bursu, 2005-2008.

Verdiği Seminerler:

1. Kistik fibrozis'te solunum yolu enfeksiyonları
2. Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)
3. *Staphylococcus aureus*'un virulans faktörleri

VIII- Diğer Bilgiler

1. 10-14 Kasım, 2008, Gıda ve Su Kaynaklı Enfeksiyon Etkenleri Modülü eğitim programı katılımı.
2. 24-28 Haziran, 2008, Ankara, 5. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi katılımı.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.  
This page will not be added after purchasing Win2PDF.