



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇEŞİTLİ KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN
STAPHYLOCOCCUS AUREUS SUŞLARININ
PULSED FIELD JEL ELEKTROFOREZİ
YÖNTEMİ İLE TİPLENDİRİLMESİ,
METİSİLİN DİRENCİ VE BAZI GENLERİN
MULTİPLEX PCR YÖNTEMİ İLE
BELİRLENMESİ**

Erdoğan GÜNEŞ

DOKTORA TEZİ

EYLÜL-2017
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Erdoğan GÜNEŞ tarafından hazırlanan “Çeşitli Kaynaklardan İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarının Pulsed Field Jel Elektforezi Yöntemi ile Tiplendirilmesi, Metisilin Direnci ve Bazı Genlerin Multiplex PCR Yöntemi ile Belirlenmesi” adlı tez çalışması 11/09/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan

Prof. Dr. Ali ATEŞ

Danışman

Prof. Dr. Yusuf DURAK

Üye

Prof. Dr. Birol ÖZKALP

Üye

Doç. Dr. Rüstem DUMAN

Üye

Doç. Dr. Ahmet UYSAL

İmza



Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Mustafa YILMAZ
FBE Müdürü

Bu tez çalışması BAP tarafından 14101021 nolu proje ile desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.



Erdoğan GÜNEŞ

11.09.2017

ÖZET

DOKTORA TEZİ

ÇEŞİTLİ KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* SUŞLARININ PULSED FIELD JEL ELEKTROFOREZİ YÖNTEMİ İLE TİPLENDİRİLMESİ, METİSİLİN DİRENCİ VE BAZI GENLERİN MULTİPLEX PCR YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ

Erdoğan GÜNEŞ

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Yusuf DURAK

2017, VIII+102 Sayfa

Jüri

Prof. Dr. Yusuf DURAK

Prof. Dr. Ali ATEŞ

Prof. Dr. Birol ÖZKALP

Doç. Dr. Rüstem DUMAN

Doç. Dr. Ahmet UYSAL

Bu çalışmada, çeşitli klinik örnekler (150), çiğ süt (49) ve dondurma (6) gibi gıdalardan izole ve identifiye edilen toplam 205 *Staphylococcus aureus* suşu, genetik çeşitlilik, metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) oranı, Panton Valentin Toksin (PVL) üretimi ve bazı antibiyotiklere duyarlılık yönünden araştırıldı. *S. aureus* suşlarının genetik ilişkilerini ve çeşitliliklerini belirlemek için Pulsed field jel elektroforezi (PFGE) yöntemi kullanıldı. PFGE sonuçları % 80 benzerlik oranına göre değerlendirildiğinde; *S. aureus* suşları, 21 alt tipe temsil edilen 180 farklı pulsotipe ayrıldı. Analiz edilen 55 gıda suşu arasında 43 farklı pulsotip ve 9 alt tip görülürken; 150 klinik suş 137 farklı pulsotipe ve 12 alt tipe ayrıldı. MRSA suşları ise kendi arasında 15 pulsotip ve 2 alt tipe ayrıldı. Restriksiyon profilleri değerlendirildiğinde, çalışılan tüm suşlar arasında yüksek oranda genetik çeşitliliğin olduğu görüldü. Genotipik analizler, farklı gruplarda bulunan suşların köken olarak aynı olmadıklarını ve ilişkisiz izolat olarak belirlendiklerini gösterdi. MRSA oranının tespitinde moleküler yöntem referans alınarak agar tarama ve disk difüzyon yönteminin duyarlılık ve özgüllüğü karşılaştırıldı. Agar tarama yöntemi referans yöntemle % 100 uyumlu bulunurken, disk difüzyon yönteminin duyarlılık ve özgüllüğü sırası ile % 83.3 ve % 99.4 olarak belirlendi. Klinik kaynaklı 17 (% 11.3) suş ve gıda kaynaklı 1 (% 1.8) suş olmak üzere toplamda 18 (% 8.8) suş MRSA olarak tespit edildi. Gıda kaynaklı hiçbir suş PVL pozitif bulunmazken, klinik kaynaklı 7 (% 4.6) suş PVL pozitif olarak saptandı. Antibiyotik duyarlılık testi, 14 farklı antibiyotiğe karşı disk difüzyon metodu ile yapıldı. Gıda izolatlarının en fazla direnç gösterdiği antibiyotiğin penisilin (% 69.1) olduğu; bunu % 4.6 ile tetrasiklin, % 2 ile gentamisin, seftazidim ve sefuroksimin'in takip ettiği görüldü. Klinik kaynaklı izolatlarda ise en yüksek direnç oranları penisilin (% 94), eritromisin (% 12.7) ve seftazidime (%12) karşı belirlendi. MRSA suşlarındaki direnç oranlarının MSSA (metisilin duyarlı *S. aureus*) suşlarına göre oldukça yüksek olduğu görüldü. MRSA ve MSSA suşlarında sırasıyla; penisilin'e, % 100, % 86.1, sefuroksim'e % 55.6, % 0, ofloksasin'e % 38.9, % 1.1, amoksisilin/klavulanik asit'e % 38.9, % 0 ve gentamisin'e % 33.3, % 0.5 oranlarında direnç saptandı. Çalışılan suşların hiçbirinde vankomisin ve linezolid'e direnç tespit edilmedi. MRSA enfeksiyonlarının tedavisinde linezolid'in vankomisine alternatif olabileceği düşünüldü.

Anahtar Kelimeler: Antibiyotik duyarlılık testi, multiplex PCR, pulsed-field jel elektroforezi, *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

Ph.D THESIS

TYPING OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* STRAINS ISOLATED FROM VARIOUS SOURCES BY PULSED FIELD GEL ELECTROPHORESIS METHOD, DETECTION OF THEIR METHICILLIN RESISTANCE AND SOME GENES BY MULTIPLEX PCR METHOD

Erdoğan GÜNEŞ

**THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN BIOLOGY**

Advisor: Prof. Dr. Yusuf DURAK

2017, VIII+102 page

Jury

Prof. Dr. Yusuf DURAK

Prof. Dr. Ali ATEŞ

Prof. Dr. Birol ÖZKALP

Assoc. Prof. Dr. Rüstem DUMAN

Assoc. Prof. Dr. Ahmet UYSAL

In this study, a total of 205 *Staphylococcus aureus* strains isolated and identified from various clinical specimens (150), foods such as raw milk (49) and ice cream (6) were investigated in terms of their genetic diversity, rate of methicillin resistant *S. aureus* (MRSA), production of Panton Valentine Toxin (PVL) and susceptibility against some antibiotics. Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) was used to determine the genetic relationships and diversity of *S. aureus* isolates. When the PFGE results were evaluated according to the 80% similarity rate; *S. aureus* strains were divided into 180 different pulsotypes representing 21 subtypes. Among the 55 food isolates analyzed, 43 different pulsotypes and 9 subtypes were observed; 150 clinical strains were divided into 137 different pulsotypes and 12 subtypes. MRSA strains were divided into 15 pulsotypes and 2 subtypes among them. When the restriction profiles were evaluated, it was seen that there was high genetic diversity among all strains studied. Genotypic analyzes showed that the strains found in the different groups were not identical in origin and were identified as unrelated isolates. Sensitivity and specificity of agar screening and disc diffusion method were compared with reference to molecular method for the determination of MRSA ratio. While the agar screening method was 100 % compatible with the reference method, sensitivity and specificity of disc diffusion method were 83.3 % and 99.4 % respectively. A total of 18 (8.8 %) strains were identified as MRSA strains, 17 of which were clinical (11.3 %) and 1 (1.8 %) of the strains originated from food. Seven (4.6 %) clinically-originated strains were found to be PVL-positive while none of the foodborne strains had PVL-positive strains. The antibiotic susceptibility test was performed by disc diffusion method against 14 different antibiotics. Penicillin was the most common antibiotic that food isolates resistant to (69.1 %), followed by tetracycline (4.6 %), gentamicin, ceftazidime and cefuroxime (2 %). The highest resistance rates in clinical isolates were determined against penicillin (94%), erythromycin (12.7 %) and ceftazidime (12 %). Resistance rates in MRSA strains were found to be significantly higher than MSSA (methicillin susceptible *S. aureus*) strains. The resistance rates of MRSA and MSSA strains were found as follows, respectively; penicillin, 100 %, 86.1 %, cefuroxime 55.6 %, 0%, ofloxacin 38.9 %, 1.1 %, amoxycillin / clavulanic acid 38.9 %, 0 % and gentamicin 33.3 %, 0.5 %. Resistance to vancomycin and linezolid was not detected in any of the strains studied. It was concluded that linezolid may be an alternative to vancomycin in the treatment of MRSA infections.

Keywords: Antibiotic susceptibility test, multiplex PCR, pulsed field gel electrophoresis, *Staphylococcus aureus*

ÖNSÖZ

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında doktora tezi olarak hazırlanmıştır. Araştırmada, çeşitli kaynaklardan izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarının pulsed field jel elektroforezi yöntemi ile tiplendirilmesi, metisilin direnci ve bazı genlerin multiplex PCR yöntemi ile belirlenmesi amaçlanmıştır. Laboratuvar çalışmaları S.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı ve İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Merkez (Biyomer) Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışma konumun belirlenmesinde ve yürütülmesinde bilgi ve deneyimleri ile beni yönlendiren, bana her türlü desteği sağlayan danışmanım Sayın Prof. Dr. Yusuf DURAK'a (S.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü), çalışmalarım sırasında maddi manevi desteğini gördüğüm, karşılaştığım zorlukları aşmak için bilgi ve tecrübesinden yararlandığım değerli hocam Sayın Doç. Dr. Ahmet UYSAL'a (S.Ü. Sağlık Hizmetleri MYO Tıbbi Laboratuvar Bölümü), laboratuvar çalışmalarında her türlü yardım ve özveriye gösteren değerli arkadaşlarım Handan ÇELİK ve Ümran GÜNTER'e, Pulsed field jel elektroforez deney çalışmalarımın yürütülmesi, optimizasyonu, görüntülenmesi ve elde edilen sonuçların yorumlanmasında yardımlarını gördüğüm İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı (Biyomer) personellerinden Sayın Uzman Evrim BALCI PAŞIK'a, jel görüntülerinin alınmasında ve gerçekleştirdiğim bazı deneylerde laboratuvar imkanlarından yararlandığım değerli hocam Doç. Dr. Evren YILDIZTUGAY'a (S.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü), her konuda benden desteğini esirgemeyen çok kıymetli kardeşim ve meslektaşım sayın Doç. Dr. Gökhan ZENGİN'e (S.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü), ayrıca bu günlere gelmemde büyük pay sahibi olan, maddi ve manevi her zaman yanımda olan anneme, babama ve tüm aileme sonsuz şükran duyularıyla teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde maddi destek sağlayan S.Ü. Bilimsel Araştırma Projeler Koordinatörlüğü'ne (BAP 14101021 no'lu proje) ve 2211-Yurt İçi Doktora Burs Programı kapsamında sağladığı destekten ötürü TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı birimine teşekkür ederim.

Erdoğan GÜNEŞ
KONYA-2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	27
3.1. Materyal	27
3.1.1. Bakteri suşları	27
3.1.2. Kullanılan besiyerleri, solüsyonlar, çeşitli kimyasal maddeler ve antibiyotik diskleri	27
3.1.3. PFGE çalışmasında kullanılan tampon ve çözeltiler	28
3.1.4. Multipleks PCR için kullanılan malzeme ve ekipmanlar	30
3.2. Metot	31
3.2.1. Bakteri suşlarının toplanması.....	31
3.2.2. <i>S. aureus</i> suşlarının fenotipik identifikasyonu.....	32
3.2.3. <i>S. aureus</i> suşlarının genotipik identifikasyonu	32
3.2.4. Pulsed Field Jel Elektforezi (PFGE).....	34
3.2.5. <i>S. aureus</i> suşlarında metisilin direncinin belirlenmesi	37
3.2.6. Agar tarama ve disk difüzyon yöntemlerinin duyarlılık ve özgüllüklerinin belirlenmesi.....	39
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	41
4.1. <i>S. aureus</i> suşlarında metisiline direnç oranı ve kullanılan yöntemlerin duyarlılık ve özgüllükleri	41
4.2. <i>S. aureus</i> suşlarının kullanılan antibiyotiklere duyarlılık durumları	42
4.3. <i>S. aureus</i> suşlarının multipleks PCR analizi	48
4.4. <i>S. aureus</i> suşlarının PFGE analiz sonuçları	53
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	84
5.1 Sonuçlar	84
5.2 Öneriler	85
KAYNAKLAR	87
ÖZGEÇMİŞ	99

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C	: Santigrad Derece
kb	: Kilo Baz
Mb	: Mega Baz
ml	: Mililitre
Mg	: Miligram
µl	: Mikro litre
M	: Molar
mM	: Mili molar
V	: Volt

Kısaltmalar

PFGE	: Pulsed Field Jel Elektroforezi
MRSA	: Metisilin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	: Metisilin Sensitive <i>Staphylococcus aureus</i>
PCR	: Polimerase Chain Reaction
MLST	: Multilokus dizi tiplendirme
PVL	: Panton Valentin Toksin
TSST-1	: Toksik şok sendromu toksini-1
CLSI	: Clinical Laboratory Standarts Institute
P	: Penisilin
TE	: Tetrasiklin
VA	: Vankomisin
LZD	: Linezolid
AMC	: Amoksasilin/klavulanikasit
MEM	: Meropenem
OFX	: Ofloksasin
SXT	: Trimetoprim/Sülfametoksazol
E	: Eritromisin
G	: Gentamisin
R	: Rifampin
CAZ	: Seftazidim
CXM	: Sefuroksim
KF	: Sefalotin
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetat
TSA	: Triptik Soy Agar
BPA	: Baird Parker Agar
MHA	: Müeller Hinton Agar
KS	: Klinik Suş
GS	: Gıda Suşu
SCCmec	: Staphylococcal Cassette Chromosome mec
BORSA	: Borderline Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
MODSA	: Moderately resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
VISA	: Vancomycin Intermediate <i>Staphylococcus aureus</i>
VRSA	: Vancomycin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>

1. GİRİŞ

Stafilokoklar, çok sayıda tür içeren, deri ve mukozalarda kolonize olabilen farklı türleri ile çeşitli hastalıklara neden olabilen virülansı yüksek bakterilerdendir. *Staphylococcus aureus* ise, çok sayıdaki patojenik faktörü ile çeşitli doku ve organlarda ciddi enfeksiyonlara sebep olabilen en önemli türüdür (Sevgican ve ark., 2009). *S. aureus* suşlarının en önemli habitatı insanlarda burun mukozası ve hayvanlarda ise deridir. İnsanlarda hastane enfeksiyonları, gıda zehirlenmeleri, osteomyelitis, poliartritis, endokarditis, toksik şok sendromu, folikütitis, konjunktivitis, idrar yolları enfeksiyonları, pnömoni, haşlanmış deri sendromu gibi çok sayıda ciddi enfeksiyonlara sebep olmaktadır (Ünal ve İstanbulluoğlu, 2009).

Stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde stafilokok türleri arasındaki direnç yaygınlığı önemli bir sorun teşkil etmektedir. Antibiyotiklerin kullanıma girmesinden kısa bir süre sonra mikroorganizmaların direnç kazandığı bilinmektedir (Ünal ve İstanbulluoğlu, 2009). *S. aureus* son yarım yüzyıl içinde, spektrumunda yer alan hemen hemen tüm antimikrobiyal ajanlara karşı direnç geliştirmiştir. Penisilinin yaygın olarak kullanımının ardından çok kısa bir sürede penisilin direnci, metisilin kullanımından bir yıl sonra da metisiline karşı direnç tanımlanmıştır (Sevgican ve ark., 2009). Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) bütün dünyada olduğu gibi ülkemizde de hastane enfeksiyonu etkenleri arasında önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Hastane enfeksiyonları genellikle çoklu ilaç direnci olan mikroorganizmalarla gelişmesi, pahalı ve toksik antibiyotiklerin uzun süre kullanımını gerektirmesi, hastanede yatış süresini uzatması, morbidite ve mortaliteyi artırması gibi sebeplerden dolayı üzerinde titizlikle durulması gereken bir sorundur. Bu nedenle enfeksiyona yol açan patojenin antibiyotik direncinin tespit edilmesinin yanı sıra, kaynağının, rezervuarının, bulaşma ve yayılma yollarının, konak ve çevre faktörlerinin incelenmesi, epidemiyolojik ve genotipik ilişkilerinin belirlenmesi hastane enfeksiyonlarının önlenmesi veya azaltılmasında önemli faydalar sağlayacaktır (Akçimen ve ark., 2010).

Mikroorganizmaların biyokimyasal ve morfolojik karakterlerine göre cins ve tür düzeyinde tanımlamaları yapılabilmektedir. Tür düzeyinde yapılan bir tanımlama enfeksiyon hastalığının etiyolojisini saptamak açısından yeterli olabilmekte ancak, salgınlar esnasında izole edilen aynı tür içindeki birden fazla suşun birbiriyle klonal ilişkisinin olup olmadığını saptamak amacıyla tür içinde farklılık gösterebilen varyantların belirlenmesi gerekmektedir. Alt tiplleme veya suş klasifikasyonu olarak

ifade edilen bu tipte bazı fenotipik ve genotipik özelliklerden yararlanılmaktadır (Durmaz, 2001).

Tanısal mikrobiyolojinin temel hedefi, patojen mikroorganizmanın mümkün olan en kısa sürede saptanması ve tanımlanması ile hasta tedavisine katkı sağlamaktır. Mikrobiyolojik tanımlama, temel olarak ya gen ekspresyon ürünlerinin ortaya konduğu fenotipik yöntemlerle ya da mikroorganizmaların kromozomal ve ekstrakromozomal genetik elementlerinin analizine dayanarak tür ve suşlar arasındaki farklılıkların incelendiği genotipik yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmektedir (Ünal ve İstanbulluoğlu, 2009).

Tiplendirmede kullanılan fenotipik metotlardan başlıcaları; biyotiplendirme, serotiplendirme, bakteriyofaj tiplendirmesi, bakteriyosin tiplendirmesi ve antibiyotik direnç profili analizi (antibiyogram)'dır. Antibiyogram, laboratuvarlarda en çok kullanılan, ucuz, uygulanması kolay, hızlı ve ekonomik bir metottur. Fakat ayırım gücü yeterli değildir. Fenotipik metotların, iş yüklerinin fazla olması, uzun zaman almaları, genellikle değişken sonuçlar vermeleri gibi dezavantajlarından dolayı araştırmacılar, ayırım gücü daha yüksek olan genotiplendirme metotlarını kullanmaya yönelmişlerdir.

Genotipik tiplendirme metotları ise; plazmit profil analizi, PFGE (pulsed-field jel elektroforezi), RFLP-PCR (restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi- polimeraz zincir reaksiyon), REP-PCR (tekrarlanan ekstrasjenik palindromik element-polimeraz zincir reaksiyonu), RAPD-PCR (rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA- polimeraz zincir reaksiyon), AFLP (çoğaltılmış fragment uzunluk polimorfizmi) ve MLST (Multilokus dizi tiplendirme) olarak sıralanabilir. Bu tekniklerin her birinin ayırım gücü, tekrarlanabilirlik ve tiplendirilebilirliklerine göre avantajları ve dezavantajları vardır. Pulsed field jel elektroforezi tekniği tekrarlanabilirlik, yorumlanabilirlik ve ayırım gücü açısından en iyi olan yöntemdir. Bu nedenle günümüzde moleküler tiplendirme yöntemleri içinde "altın standart" olarak kabul edilmektedir (Ünal ve İstanbulluoğlu, 2009; Akçimen ve ark., 2010).

Bu çalışmada, farklı kaynaklardan izole edilen *S. aureus* suşlarının, ileri bir moleküler tiplendirme yöntemi olan Pulsed Field Gel Elektroforezi ile tiplendirilmesi ve hastane enfeksiyonlarından izole edilenler ile gıdalardan izole edilen suşlar arasında genetik akrabalık olup olmadığının belirlenmesi, Multiplex PCR yöntemiyle metisilin direnci ve bazı genlerin tespiti ayrıca antibiyotiklere karşı duyarlılıklarını belirlemeyi amaçlamaktayız.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

İnsanlarda ve hayvanlarda çeşitli hastalıklara yol açabilen *Staphylococcus* cinsi bakterileri ilk olarak, Robert Koch (1878)' de ışık mikroskopunda tanımlamış, 1880'de ise Pasteur tarafından sıvı besiyerinde üretilmiştir.

Staphylococcus (Staphyle: üzüm salkımı) ismi 1881'de Alexander Ogston tarafından üremeleri esnasında birbirinden ayrılmayarak üzüm salkımına benzeyen düzensiz kümeler oluşturmalarına bakılarak verilmiştir. Ardından, 1884'te ilk kez Rosenbach tarafından hasta örneklerinden saf kültürde izole edilen bu mikroorganizmaya tür epiteti olarak aureus (altın) eklenmiş ve "*Staphylococcus aureus*" olarak isimlendirilmiştir (Fluit ve Schmitz, 2003).

Staphylococcus cinsi Bergey'in 1986 yılında yaptığı sistematik bakteriyoloji sınıflandırmasına göre, *Micrococcaceae* familyası içerisinde yer almaktadır. Genel karakterleri olarak stafilokoklar yuvarlak 0,5-1,5 µm çapında düzensiz kümeler oluşturan kok şeklinde gram olumlu bakterilerdir. Hareketsizdirler, fakültatif anaerop olup genellikle aerop üremeyi tercih ederler. Sporsuz, kapsülsüz, oksidaz negatif ve katalaz olumlu olup çoğunluğu % 10 NaCl'lü ortamda ve 18-40 °C'ler arasında üreyebilmektedirler. Birçok türünde karotenoid pigment bulunabilmektedir. Optimal olarak 30-37 °C de ve pH 7,4'de ürerler. Jeloz besiyerinde bolca üreyip yuvarlak kenarlı, kabarık, parlak yüzeyli S tipinde koloniler oluştururlar. Stafilokokların çoğu sıcakkanlı hayvanların derilerinde, deri ile ilişkili bezlerin kanallarında ve mukozalarında doğal olarak bulunurlar. Bir kısmı da insan ve hayvanlar için patojen ve çoğu fırsatçı patojendirler (Murray ve ark.; Bilgehan, 2000; Cengiz ve ark., 2004a; 2004b).

Staphylococcus cinsi bugüne kadar tanımlanmış 35'den fazla tür ve alt tür içermekte ve bu türlerden 16 kadarı insana ait klinik materyallerden izole edilmiştir. Stafilokok türleri arasında insanda çeşitli hastalıklara sebep olduğu bilinen en yaygın ve en virülen türü *Staphylococcus aureus*'tur. *S. aureus* sahip olduğu karotenoit pigment sayesinde altın sarısı koloniler oluşturmaktadır ve ismini de bu özelliği sayesinde almıştır (Barcia-Macay, 2007).

S. aureus hemoliz yapan, katalaz ve koagülaz olumlu, mannitolu aerop ve anaerop koşullarda asit oluşturarak parçalayan, insan ve diğer sıcakkanlı hayvanlarda çeşitli enfeksiyonlara sebep olabilen patojen bir türdür. Katalaz pozitif olma özelliği ile aynı familya içerisinde bulunan streptokoklardan ayırt edilebilmektedir. Koagülaz testi

mikrobiyoloji laboratuvarlarında *S. aureus*'un diğer koagülaz negatif stafilokok türlerinden ayrılmasında kullanılan bir testtir. *S. aureus* başta glikoz olmak üzere birden fazla karbonhidratları parçalamakta ve son ürün olarak laktik asit oluşturmaktadır. Yalnız herhangi bir gaz meydana getirmezler. Şekerlerden mannitol üzerine olan etkileri ayrıcalık göstermekte olup, bu şekeri yalnız koagülaz pozitif (patojen) stafilokoklar parçaladığı halde koagülaz negatif olanlar parçalamazlar. Bu sebepten dolayı mannitole etki deneyi *S. aureus*'u diğer türlerden ayırt edebilmek için koagülaz testinden sonraki en önemli ve faydalı testtir. Yine at, insan ve koyun kanlı agar plaklarında üretilen *S. aureus* suşlarının kolonilerinin etrafında beta hemoliz zonları oluşmaktadır (Bilgehan, 2000; Cengiz ve ark., 2004a; Makgotlho, 2010). *S. aureus*'un biyokimyasal ve diğer bazı özellikleri tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1. *S. aureus*'un biyokimyasal ve diğer temel özellikleri (Bilgehan, 2000; Cengiz ve ark., 2004a)

Özellikler	<i>S. aureus</i>	Özellikler	<i>S. aureus</i>
Pigment	+	Glikoz	+
Aerop üreme	+	Asetoin oluşumu	+
Anaerop üreme	+	Üreaz	+
Hemoliz yapma	+	Alfa toksin	+
Koagülaz varlığı	+	Ksiloz	-
DNAse varlığı	+	Sellobioz	-
Mannitolden asit oluşturma	+	Hücre duvarı	
Trehaloz	+	-Ribitol	+
Maltoz	+	-Gliserol	-
Laktoz	+	-Protein A	+
Sükroz	+	Novobiosin duyarlılığı	+
Hiyalüronidaz	+	Basitrasin duyarlılığı	-

Birçok *S. aureus* kökeninde polisakkarit yapıda bir mikrokapsül bulunmakta ve bu ekzopolisakkarit bakteriyi fagositoza karşı korumak suretiyle virülans faktörü etkinliğini gösterir. Bu güne dek tanımlanan 11 kapsüler serotipin içinde özellikle tip 5 ve 8'in insandaki enfeksiyonların % 75'inden sorumlu olduğu bildirilmiştir.

Diğer Gram pozitif bakterilerde olduğu gibi *S. aureus*'un hücre duvarı kuru ağırlığının yarısını peptidoglikan tabaka (müreïn) oluşturmakta ve bu tabaka mikroorganizmaya şeklini vermekte, dayanıklılık sağlamaktadır. Glikan zincirlerin katmanlarından oluşan peptidoglikan iskelet N-asetil glikozamin ve N-asetil müramik asitin 10 ila 12 arasında değişen alt ünitelerinden meydana gelir. N-asetil müramik asit alt ünitelerine bağlanan oligopeptit yan zincirler pentaglisin köprüleriyle çapraz bağlanırlar. Peptidoglikan tabaka makrofajlardan sitokin salınımını uyarmakta, komplemanın aktivasyonuna yol açmakta ve trombosit agregasyonuna sebep olmaktadır. Monositlerden interlökin-1 salınımını uyarak polimorf nüveli lökositlerin enfeksiyon bölgesine toplanmasına ve sonuç olarak abse oluşumuna neden olmaktadır. Peptidoglikan tabakada bulunan teikoik asit türe özgüdür ve *S. aureus*'ta ribitol teikoik asit yapısındadır. Yüzey proteinleri olarak protein A (SpA), elastin, kollagen, fibronektin bağlayan proteinler ve “clumping faktör” bulunmaktadır. Bu proteinler konak dokulara kolonize olmayı sağlayan en önemli faktörlerdir. Protein A (SpA), IgG₃ dışındaki tüm IgG ve IgA₂ ile bazı IgM'nin FC reseptörlerine bağlanarak immün kompleks oluşmasına ve kompleman aktivasyonuna yol açarak antifagositik etki gösterir. *S. aureus*'un dış yüzeyinde bulunan “clumping faktör” (bağlı koagülaz da denilmektedir) fibronojene bağlanarak onu fibrine dönüştüren oldukça önemli bir virülans faktördür. Bu proteinin saptanması *S.aureus*'un identifikasyonunda büyük bir rol oynamaktadır (Cengiz ve ark., 2004b; Tünger ve ark., 2005; Murray ve ark., 2015).

S. aureus, kolonize olma ve hastalık yapabilme yeteneğini sağlayan çok çeşitli toksinler üretmektedir. Bunlardan beşi sitolitik veya membran hasarlayıcı toksin olarak bilinen alfa, beta, delta, gama ve Panton-Valentin (P-V) lökosidin toksinleri, ikisi eksfoliyatif toksin A ve B, sekiz tanesi A, B, C, D, E, G, H ve I gibi serolojik olarak gruplanan enterotoksinler, toksik şok sendrom toksin-1 (TSST-1)'dir. TSST-1 Eksfoliyatif toksin A, ve enterotoksinler gibi pirojenik ekzotoksinler süper antijenler olarak bilinirler (Tünger ve ark., 2005; Murray ve ark., 2015).

Alfa toksin: Bu toksin eritrosit, lökosit ve trombosit gibi hücrelerde por oluşumuna neden olarak inflamatuvar yanıtı indüklemektedir. Kanlı agarda üreyen *S. aureus* kolonilerinin çevresindeki beta hemolizden sorumludur. Hemolitik, letal ve dermanekrotiktir. Dolaşım, kas ve böbrek korteksi dokuları üzerinde tahribata sebep olmaktadır (Bilgehan, 2000; Tünger ve ark., 2005).

Beta toksin: Sfingomiyelin ve lizofosfatidilkolin için özgüllük göstermektedir ve eritrosit, fibroblast, lökosit ve makrofajlar için toksiktir. Alfa toksin ile birlikte

invaziv stafilokok enfeksiyonları için tipik olan doku hasarı ve abse oluşumundan sorumlu toksinlerdir (Murray ve ark., 2015).

Gama toksin: Hemen hemen tüm *S. aureus* suşları tarafından üretilmektedir. Sitolitik etki, membranlarda por oluşumunun arkasından hücre katyon gradiyetindeki değişikliklerden kaynaklı osmotik farklılıklardan kaynaklanmaktadır. Stafilokok kaynaklı kemik enfeksiyonlarında kanda bu toksine karşı antikor seviyesi artmaktadır (Bilgehan, 2000; Murray ve ark., 2015).

Delta toksin: Toksin, eritrositler, makrofajlar, lenfositler, nötrofiller ve trombositler gibi birçok memeli hücrelerini ve hücre içi zar yapılarını etkileyen geniş bir sitolitik aktiviteye sahiptir. Termolabil yüzeysel etkin bir toksin olup deterjanların gösterdiği etkiye benzer şekilde hücre membranını bozar. Ayrıca ileumda su absorpsiyonunu inhibe etmekte, kobayların ileumunda iyon geçirgenliğini değiştirmekte ve adenozin monofosfat birikimini stimüle etmektedir (Bilgehan, 2000).

Panton-Valentin (P-V) Lökosidin: Lökositleri hücre zarlarında por oluşturarak yıkıma uğratan ve pvl genleri olarak bilinen lukS PV ve lukF PV tarafından kodlanan iki komponentli hemolitik aktivitesi olamayan bir sitotoksindir. İlk kez 1894 yılında Van de Velde tarafından tanımlanmış (Van de Velde, 1894), Panton ve Valentin tarafından 1932 yılında deri ve yumuşak doku enfeksiyonları ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Panton ve Valentine, 1932).

Yapılan bir çalışmada Panton–Valentin Lökosidini tavşanlara deri içi olarak enjekte edilmiş ve sonrasında tavşanlarda kapiller dilatasyon, kemotaksis, polimorfonükleer hücre infiltrasyonu, polimorfonükleer karyorekzis ile deri ve doku nekrozunu da içeren ciddi inflamatuvar lezyonlar gözlenmiştir (Prevost ve ark., 1995). En son yapılan çalışmalarda, PVL'nin ayrıca mitokondrileri de inaktive ettiği ve apoptozisi artırdığı gözlenmiştir (Genestier ve ark., 2005).

Enterotoksinler: Stafilokoksik besin zehirlenmelerine sebep olan toksinler enterotoksinlerdir ve A, B, C, D, E, G, H ve I gibi serolojik olarak gruplara ayrılmışlardır. Bu toksinler midenin asitliğine, enzimlerine ve yüksek ısıya (100 °C'de 30 dk ısıtmaya) dirençlidir. Bundan dolayı besinler üzerinde bulunan toksinler, gıda maddeleri ısıtılıp bu toksini üreten *S. aureus* öldürülse bile etkinliklerini kaybetmezler (Tünger ve ark., 2005; Murray ve ark., 2015). Enterotoksin A sıklıkla gıda zehirlenmesiyle ilişkilendirilmiştir. Enterotoksin C ve D kontamine süt ürünlerinde bulunmakta ve enterotoksin B, stafilokoksik psödomembranoz enterokolite neden olmaktadır (Murray ve ark., 2015). İzole edilen *S. aureus* suşlarından % 35-% 50'sinin

bu toksinleri üretebildiği saptanmıştır. İzole edilen suşun bu toksinlerden yalnızca birini üretebildiği gibi birden fazlasını da üretebildiği gözlenmiştir (Bilgehan, 2000).

Eksfoliatif (Epidermolitik) toksin: *S. aureus* tarafından oluşturulan ve haşlanmış deri sendromuna neden olan toksindir. Antijenik ve biyokimyasal yapıları bakımından bu toksin eksfoliatif toksin A (ETA) ve eksfoliatif toksin B (ETB) olarak ikiye ayrılmıştır. ETA'nın ısıya dirençli ve kromozomal olduğu, ETB'nin ise ısıya duyarlı ve plazmid kaynaklı olduğu bildirilmiştir (Bilgehan, 2000; Murray ve ark., 2015).

Toksik şok sendromu toksini-1(TSST-1): TSST-1 önceden pirojenik ekzotoksin C ve enterotoksin F olarak adlandırılmaktadır ve bu toksin tüm T hücrelerine bağlanabilmekte ve T hücrelerinde patlamaya yol açmaktadır. Bu olay sonucunda T hücreleri ve makrofajlardan bol miktarda sitokinler salgılanır ve endotoksik şoka benzeyen toksik şok sendromu ortaya çıkar (Tünger ve ark., 2005). Menstruasyon gören kadınların kullandığı tamponların *S. aureus*'un vajinal kolonizasyonunu kolaylaştırdığı belirtilmektedir. Menstruasyonla ilişkili toksik şok sendromundan sorumlu *S. aureus* suşlarının % 90'ının ve diğer TSS formlarından sorumlu suşların yarısının TSST-1 ürettiği tahmin edilmektedir (Murray ve ark., 2015). Bu toksin yüksek oranda aminoosit içerir ve suda çözünmektedir, sistein rezidüleri içermez, ısıya ve proteolize dirençlidir (Cengiz ve ark., 2004b).

S. aureus başta koagülaz olmak üzere, katalaz, hyalüronidaz, stafilokinaz (fibrinolizin), lipaz, nükleaz ve DNaz gibi komşu dokulara yayılımı kolaylaştırıp enfeksiyon patogeneğinde rol oynayan bir çok enzime sahiptir. Koagülaz enzimi bağlı koagülaz (clumping faktör) ve serbest koagülaz olmak üzere iki tiptedir. Bağlı koagülaz bakterinin hücre duvarında yer alır ve fibrinojenin fibrine dönüşmesini sağlar. Serbest koagülaz ise dışarıya salgılanarak globülin yapısındaki plazma faktörü ile reaksiyona girerek trombin benzeri stafilotrombini meydana getirir. Bu da fibrinojenin fibrine dönüşmesini sağlayarak plazmayı pıhtılaştırır (Tünger ve ark., 2005; Murray ve ark., 2015). Koagülaz testi *S. aureus*'un identifikasyonunda kullanılan en güvenilir testtir. Lipaz yağları hidroliz eder ve bakterinin yağ bakımından zengin dokularda yaşamasına olanak sağlayarak fronkül ve karbonkül gibi enfeksiyonların oluşumuna neden olur. Hyalüronidaz; bağ dokudaki hyalüronik asiti hidrolize ederek bakterinin bu dokuya yayılmasına ortam hazırlar. Stafilokinaz ise ısıya dirençlidir, dokudaki fibrin zırhının çözülüp bakterinin yayılmasını sağlar. Yine DNaz enzimi de DNA'yı hidroliz ederek

bakterinin yayılmasında önemli bir rol oynamaktadır (Cengiz ve ark., 2004b; Tünger ve ark., 2005; Murray ve ark., 2015).

S. aureus ile geçici kolonizasyon, insan nemli derisinde çok sık görülür. Yenidoğanların göbek bağı, deri ve perineal alanlarının *S. aureus* ile kolonize edilmesi yaygın bir durumdur. Ayrıca *S. aureus*; orofarinks, gastrointestinal sistem ve ürogenital sistemde de bulunur. Çocuklarda ve yetişkinlerde kısa süreli veya kalıcı *S. aureus* taşınması anterior nazofarenkste, orofarinkste olduğundan daha sıktır. Normal sağlıklı yetişkin insanların yaklaşık % 15'i *S. aureus*'un kalıcı nazofaringeal taşıyıcıları olup, hastaneye yatan hastalar, tıbbi personel, deri hastalıkları olan kişiler ve yasadışı yollarla (uyuşturucu kullananlar) veya tıbbi nedenlerden dolayı (diyabetli hastalar, alerji enjeksiyonu alan hastalar veya hemodiyalize giren hastalar) düzenli olarak iğne kullananlar için bildirilen insidansı daha yüksektir. *S. aureus*'un ciltte ve nazofarinkste bulunması bakterinin kontaminasyonunu kolaylaştıracağı için mikroorganizma birçok hastane kaynaklı enfeksiyondan sorumludur (Murray ve ark., 2015).

S. aureus, insanlarda özellikle hastane enfeksiyonları başta olma üzere hem hastane hem de toplum kökenli çok ciddi enfeksiyonlara sebep olmaktadır. Çoğunlukla yara ve yumuşak doku olmak üzere (fronkül, selülit, impetigo vb) derin doku enfeksiyonları (osteomyelit, septik artrit, endokardit, karaciğer dalak apsesi gibi) solunum ve üriner sistem enfeksiyonları, bakteriyemi, pnömoni, konjunktivitis, gıda zehirlenmeleri, toksik şok sendromu ve haşlanmış deri sendromu ve gibi çok sayıda enfeksiyona neden olmaktadır (Duman ve ark., 2009; Ünal ve İstanbulluoğlu, 2009).

S. aureus'un neden olduğu enfeksiyonlarda en önemli sorun antibiyotiklere çok hızlı direnç geliştirmesidir. Uygunsuz antibiyotik kullanımı sonucunda klinik kullanımına yeni başlanan bir antibiyotiğe karşı bile, bir süre sonra direnç kazanılmaktadır. Bunun sonucunda morbidite ve mortalitesi yüksek, hastanede kalma süresi uzun, yüksek maliyetli tedavi gerektiren enfeksiyonlar meydana gelmektedir (Duman ve ark., 2009).

S. aureus kaynaklı ölümcül enfeksiyonlar, 1941 yılında penisilinin kullanılmasıyla birlikte büyük oranda azalma göstermiştir. Fakat kısa bir süre sonra penisiline direnç kazanan *S. aureus* suşları ortaya çıkmış ve sonraki 20 yıl boyunca hem hastane kaynaklı hem de toplum kaynaklı *S. aureus*'ların neredeyse % 80'i bu antibiyotiğe direnç kazanmışlardır. Beta laktamaz olan penisilinaza bağlı gerçekleşen bu direnç sorununa 1959 yılında bu enzime dirençli semisentetik bir penisilin olan metisilin antibiyotiğinin kullanılmasıyla çare bulunmuştur. Fakat bu çözüm uzun sürmemiş

enfeksiyonların tedavisinde metisilin kullanılmaya başlanmasından sadece 2 yıl sonra (1961 yılında) İngiltere’de ilk metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşu (MRSA) izole edilmiştir (Jevons ve ark., 1963; Appelbaum, 2007; Sancak, 2007). Beta laktamazlar aracılığı ile inhibe olmayan metisilin, oksasilin, nafsilin, kloksasilin ve dikloksasilin gibi beta laktam antibiyotiklere karşı olan dirence metisilin direnci adı verilmektedir (Johnson, 1999; Serhat, 2009). Günümüzde sadece hastane kökenli MRSA (hospital Acquired MRSA) enfeksiyonları değil toplum kökenli MRSA (Community Acquired MRSA) enfeksiyonlarının görülme sıklığı ülkemizde ve dünyanın pek çok bölgesinde artış göstermektedir. MRSA bir kez hastaneye girdikten sonra yok edilmesi oldukça güçtür (Sancak, 2007). Bundan dolayı hastanelerde MRSA izolatlarının saptanması, bu izolatların yayılmasının engellenmesi, yüksek oranda risk taşıyan hastalarda MRSA kolonizasyonunun ortadan kaldırılması oldukça önemlidir (Thompson ve ark., 1982).

S.aureus’un hücre duvarında bulunan peptidoglikan denilen tabakanın yapımında Penisilin Bağlayan Protein (PBP) adı verilen birbirinden farklı beş tane enzim rol almaktadır. Penisilin ve diğer beta laktam antibiyotiklerin hedefi bu PBP’lere bağlanıp onları inaktive ederek hücre duvarı sentezini engellemektir. *S. aureus*’lardaki metisilin direnci incelendiğinde, metisiline dirençli *S. aureus*’ta bu beş tane PBP’ye ek olarak 78 kDa ağırlıkta olan ve PBP2a veya PBP2’ olarak adlandırılan farklı bir PBP sentezlenmektedir. Bu PBP2a metisiline ve diğer beta laktam antibiyotiklerin çoğuna düşük afinite göstermekte ve bu sayede beta laktam antibiyotiklere yüksek afinitesi olan diğer PBP’ler inhibe olsalar bile peptidoglikan sentezi devam etmektedir (Deurenberg ve ark., 2007; Sancak, 2007).

PBP2a, 2.1 kb büyüklüğünde olan ve *mecA* geni adı verilen bir gen tarafından kodlanmaktadır. MSSA suşlarının hiçbirinde bu gen bulunmazken, MRSA suşlarının hepsinde bulunmaktadır. *mecA* geni bakteri kromozomunda **stafilokokal kaset kromozomu *mec* (Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*; SCC*mec*)** olarak adlandırılan ve 21-67 kb kadar olan geniş hareketli bir genetik eleman üzerinde taşınmaktadır (Hartman ve Tomasz, 1986; Deurenberg ve ark., 2007).

mecA geni, *mecI* ve *mecR1* denilen iki düzenleyici gen ile birlikte SCC*mec* üzerinde *mec* kompleksini oluşturur. *mec* kompleksi *S. aureus*’daki metisilin direncinin belirlenmesinden sorumludur. *mecR1* geni sinyal dönüştürücü bir protein olan MecR1’i, *mecI* geni ise baskılayıcı bir protein olan MecI’yı (*mecA*’yı baskılayan protein) kodlamaktadır. Ortamda beta laktam grubu antibiyotik olmadığında MecI proteini, hem

mecA hemde *mecR1* genlerinin transkripsiyonunu baskılar. Beta-laktam antibiyotiklerin varlığında ise transmembran yerleşim gösteren MecR1'in hücre dışı yerleşim gösteren penisilin bağlayan domaini sayesinde antibiyotikler algılanır ve otokatalitik olarak ayrılır, sonrasında ise MecR1'in sitoplazmik parçasında yer alan metalloproteaz bölgesi aktive olur. Metalloproteaz *mecA*'nın operatör bölgesinde bağlı bulunan MecI'yi parçalar ve böylece *mecA*'nın transkripsiyonu başlamış olur ve sonuçta PBP2a'nın üretimi sağlanır (Deurenberg ve Stobberingh, 2008; Elements, 2009a; Elements, 2009b).

S. aureus suşlarında **SSCmec** kaseti kromozomda replikasyon başlangıcının (oriC) yakınındaki orfX (open reading frame X)'in 3' ucunda attBscC (Bacterial chromosomal attachment site) bölgesinde yer alır. SCC mec'in replikasyon merkezine yakın bir bölgede yerleşmesinin avantajı antibiyotik direnç genlerinin hızlı bir şekilde alınmasıdır (Hiramatsu ve ark., 2001; Ito ve ark., 2001). Stafilokokal kaset kromozom *mec*, *mec* gen kompleksi (*mecA* ve regüle edici genler), *ccr* (casette chrosome recombinases; kaset kromozom rekombinaz) gen kompleksi ve junkyard ya da joining regions olarak adlandırılan "J" bölgesi olmak üzere üç bölgeden meydana gelmektedir. *mec* gen kompleksi *mecA* ve onun düzenleyici genleri ile ve insertion sequence denilen IS elemanlarından oluşur. Beta-laktam direnç fenotipidir ve metisilin direncinden sorumludur. İçerdikleri yapılar göre *mec* gen kompleksi A, B, C, D ve E olmak üzere beş sınıfta incelenir. *ccr* gen kompleksi ise *S. aureus* genomuna SSCmec kasetinin integrasyonu ve eksizyonundan yani mobilitesinden sorumludur. *ccrA*, *ccrB* ve *ccrC* olmak üzere üç farklı rekombinaz kodlayan *ccr* geni bulunmaktadır.

ccr ve *mecA* gen komplekslerinin yapısına göre bu güne kadar 11(Tip I – XI) farklı SCCmec tipi belirlenmiştir. Bu 11 tip içerisinde sadece tip II ve tip III'de çoklu antibiyotik direncine neden olan plazmitler ve transpozonlar bulunur.(Elements, 2009a; Elements, 2009b; Turlej ve ark., 2011).

Genellikle SCCmec tip I, II veya III hastane kaynaklı MRSA izolatlarında bulunurken, tip IV ve V ise yüksek oranda toplum kaynaklı MRSA izolatlarında bulunur. Çok düşük oranlarda tip I, II veya III SCCmec taşıyan toplum kaynaklı MRSA izolatları saptandığı gibi, nadir de olsa tip IV taşıyan hastane kaynaklı MRSA izolatu da tespit edilmiştir. Toplum kaynaklı MRSA'larda bakterinin virülansında rol oynayan bir toksini kodlayan Panton -Valantine leucosidin (PVL) geni bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar toplum kaynaklı MRSA izolatlarının % 40 – 90'ında PVL geni bulunduğunu

ortaya koymuştur (Deurenberg ve Stobberingh, 2008; David ve Daum, 2010; Sancak, 2012).

ccr ve *mecA* gen komplekslerinin yanı sıra, üçüncü bir bölge olan ve J (Junkyard ya da joining regions) bölgesi olarak isimlendirilen, SCCmec tipleri arasında farklılık gösteren diziler içerir. SCCmec işlevleri açısından daha az önemli sayılmasına rağmen bu bölgeler, antibiyotik ve ağır metal direnci determinantları taşıyan plazmidler veya transpozonlar için hedef görevi yaptıkları için epidemiyolojik açıdan önemlidir (Deurenberg ve ark., 2007; Turlej ve ark., 2011).

Günümüzde SCCmec'in orijini hala bilinmemektedir, ancak *S. sciuri*'den *S. aureus* tarafından edinildiğini ve özellikle de *mecA*-pozitif koagülaz negatif stafilokokların (CoNS), SCCmec için potansiyel bir kaynak olabileceği düşünülmektedir (Mongkolrattanothai ve ark., 2004; Turlej ve ark., 2011). Farklı bir görüş ise kaynağının *S. aureus*'un kendisinin olduğudur (De Sousa ve Lencastre de, 2004). Aynı zamanda hayvanlarda komensal bir bakteri olan *S. fleurettii*'den de kazanılmış olabileceğine dair görüşler de bildirilmiştir (Tsubakishita ve ark., 2010).

mecA genine bağlı olarak gelişen metisilin direncinin fenotipik olarak ortaya çıkması bakteriler arasında değişkenlik göstermekte ve bu direnç homojen veya heterojen direnç olarak ortaya çıkmaktadır. Homojen dirençte, popülasyonu oluşturan hücrelerin tamamı metisilinin yüksek konsantrasyonlarında ($> 128 \mu\text{g/ml}$) üreyebilme yeteneğine sahiptirler. Daha sık görülen ve tespiti zor olan heterojen dirençte ise bakteri topluluğundaki tüm hücrelerde *mecA* geni bulunmasına rağmen hücre topluluğunun sadece belli bir kısmında, yüksek düzeyde metisilin direnci görülür ve bu direnç ancak standart deney koşullarında saptanabilir. Heterojen suşlara ait hücrelerin çoğunluğu (% 99,9 veya daha fazla) düşük konsantrasyonlarda (örn. 1 ila $5 \mu\text{g/ml}$) duyarlı iken, yalnızca küçük bir kısmı (örn., 10^6 'da 1'i) $50 \mu\text{g/ml}$ veya daha yüksek metisilin konsantrasyonlarına direnç göstermektedirler. Heterojen direnç gösteren suşlar, NaCl veya sukroz eklenmiş hipertonic kültür besiyerinin kullanılması veya 30°C 'de inkübasyon gibi bazı özel kültür koşullarında homojen direnç gösterebilir. Ayrıca EDTA eklenmesi veya ısısının $37-43^\circ\text{C}$ 'ye çıkarılması, heterojen dirence neden olabilir veya direnci bütünüyle baskılayabilir. Değişik ortam koşullarından kaynaklanan direnç ifadesindeki bu değişiklikler geçici ve tamamen fenotipiktir (Chambers, 1997).

Son yıllarda *mecA* geni taşımamalarına rağmen düşük seviyede metisiline dirençli suşlar tespit edilmiştir. Bu suşların metisilin MİK (Minimum İnhibisyon Konsantrasyon) değerlerinin, duyarlılık değerinin bir miktar üzerinde ($8-16 \mu\text{g/ml}$)

olduğundan dolayı, fenotipik yöntemlerle metisiline dirençli olarak tanımlanmaktadırlar. Bunlardan aşırı betalaktamaz üretiminden kaynaklandığı düşünülen suşlara borderline-resistant *S. aureus* (BORSA), PBP'lerdeki (özellikle PBP2 ve PBP4) nokta mutasyonlarından ve düşük molekül ağırlıklı PBP olan PBP4'ün yüksek oranda yapımından kaynaklananlara ise Moderately resistant *S. aureus* (MODSA)] adı verilmektedir (Chambers, 1997; Derbentli, 2005).

Metisilin direncinin düzenlenmesinde *mec* gen kompleksi dışında “auxiliary” veya “factor essential for the expression of methicillin resistance” ya da kısaca “*fem*” genleri olarak tanımlanan genler de saptanmıştır. *fem* faktörlerinin hem metisiline duyarlı hem de dirençli suşlarda bulunduğu belirtilmiştir. Şu ana kadar *femX* (*fmhB*), *femA*, *femB*, *femC*, *femD*, *femE* ve *femF* gibi çeşitli *fem* genleri tanımlanmıştır. *femE* hariç diğerlerinin görevleri belirlenmiş olup bu genlerin hücre duvarı sentezinin farklı basamaklarında görev yaptıkları saptanmıştır. *femA*, *femB* ve *femX* genleri glikan zincirlerini birbirine bağlayan pentaglisin çapraz köprülerinin oluşumunda görev alırlar. *femX* ilk glisini, *femA* ikinci ve üçüncü glisinleri ve *femB*'de dördüncü ve beşinci glisinleri köprüye ekler. *femA* ve *femB* genlerinin birinde meydana gelen mutasyon hücre duvarındaki peptidoglikan tabakanın sentezlenmesini engellemektedir. Bu durum da bakteri için öldürücü olduğundan dolayı, ilaç çalışmalarının yeni hedefleri *femA* ve *femB* genleridir (Chambers, 1997; Stapleton ve Taylor, 2002).

MRSA izolatlarının tüm beta laktam antibiyotiklere ve ayrıca betalaktam dışı antibiyotiklerin çoğuna da dirençli olmaları bu bakteri sebebi ile meydana gelen enfeksiyonların tedavisinde büyük sorunlar teşkil etmektedir. *S. aureus*'lardaki metisilin direncinin doğru ve hızlı olarak belirlenmesi, en kısa sürede ve uygun tedaviye başlanmasını, gereksiz yere antibiyotik kullanımının engellenmesini ve hastanede yatış süresini kısaltması bakımından oldukça büyük önem teşkil etmektedir (Sevgican ve ark., 2009). Günümüzde metisilin direncinin saptanmasında direncin fenotipinin belirlendiği yöntemler olarak; disk difüzyon yöntemi, dilüsyon yöntemleri, epsilometrik yöntem (E test), agar tarama yöntem gibi çeşitli konvansiyonel yöntemler kullanılırken genotipik yöntem olarak PCR (Polimeraz Chain Reaction) temelli yöntemler kullanılmaktadır. Klinik izolatların çoğu rutin kültür koşullarında heterojen direnç gösterir ve bu nedenle PCR ve DNA hibridizasyon teknikleri ile *mecA* geninin varlığının saptanması "altın standart" olarak kabul edilir (Chambers, 1997).

Geçtiğimiz on yılda MRSA suşlarının tanımlanması için çok sayıda cihaz ve yöntem geliştirilmiştir. Tek bir primer kullanılarak yapılan bu PCR yöntemlerinin

uygulaması kolay fakat inhibisyona dayanıksızdır. Bu sorunu çözmek amacıyla tüm izolatlarda bulunan başka bir geni çoğaltmak için ikinci bir primer seti kullanılmıştır (Predari ve ark., 1991). Aynı reaksiyon tüpüne farklı gen bölgeleri için özgül olan iki ya da daha fazla primerin konulduğu ve aynı zamanda çok sayıda hedef dizinin çoğaltıldığı reaksiyona Multiplex PCR (Çoklu PCR) adı verilmektedir (Durmaz ve Durmaz, 2001).

S. aureus'da Multiplex PCR yöntemi kullanılarak farklı gen bölgelerinin çalışıldığı çok sayıda çalışma mevcuttur. Towner ve ark. (1998) Multiplex PCR yöntemi ile *mecA* ve *femB* genlerini belirleyerek *S. aureus*'u hızlı bir şekilde tanımlamaya çalışmışlardır. Konvansiyonel yöntemlerle Multiplex PCR'ı karşılaştırdıkları bu çalışma sonucunda, Multiplex PCR tekniğinin, MRSA tespitinde konvansiyonel yöntemlere göre daha doğru ve duyarlı olduğunu belirtmişlerdir.

Ünal ve ark. (1992), yaptıkları bir çalışmada 98 stafilokok suşunda PCR yöntemi ile *mecA* ve *femA* genlerini tespit etmeye çalışmışlardır. Bunlardan 51 tanesini (17 *S.aureus* 34 koagülaz negatif stafilokok) *mecA* pozitif olarak saptamışlardır. 17 *S. aureus* suşunun hepsi *femA* geni taşıırken, koagülaz negatif stafilokokların hiç birinde bu genin saptanmadığını belirtmişlerdir.

S. aureus'u koagülaz negatif stafilokoklardan ayırmak, metisilin direncini ve mupirosin direncini belirlemek için 16S rRNA (Staphylococcus cinsine spesifik), *nuc* (*S. aureus*'a spesifik), *mecA* (metisilin direncinin bir belirleyicisi) ve *mupA* (Mupirosin direnci belirleyicisi) genlerini tespit etmek için yeni bir quadriplex PCR testi geliştirilmiştir. Bu genlere özgü primerler tasarlanarak daha önceden konvansiyonel yöntemlerle metisilin ve mupirosin'e duyarlı ve dirençli olduğu belirlenen *S. aureus* ve CoNS izolatları ve diğer bakterileri içeren 96 ATCC kontrol suşu ve 323 suş çalışma kapsamına alınmıştır. Sonuçta yapılan testin % 100 duyarlılık, özgüllük ve doğruluk gösterdiğini, bu testin metisilin ve mupirosine dirençli stafilokokların saptanması için basit, hızlı, doğru ve güvenilir olduğunu vurgulamışlardır (Zhang ve ark., 2004).

Multiplex PCR kullanılarak yapılan başka bir çalışmada ise *mecA* ve *nuc* genlerini belirlemek için primerler tasarlanmıştır. Çalışma sonucunda ise araştırmacılar yine bu yöntemin klinik tanı laboratuvarlarında metisiline dirençli stafilokokların saptanması için rutin bir test olabileceği görüşüne varmışlardır (Barski ve ark., 1996).

Çiftçi ve ark. (2009), klinik örneklerden izole ettikleri stafilokok suşlarında metisilin direncini oksasilin disk difüzyon testi ve PCR yöntemi ile belirlemeye çalışmışlardır. Çalışma kapsamına 193 stafilokok suşu alınmış, Oksasilin disk difüzyon yöntemiyle 141 izolat metisiline dirençli bulunurken, PCR metoduyla 144 izolatta *mecA*

gen varlığı saptanmıştır. İki metod arasında anlamlı istatistiksel fark görülmemiştir. PCR çalışmalarıyla ortaya konan *mecA* gen varlığı temel alınarak yapılan karşılaştırmada disk difüzyon yönteminin MRSA tespiti için duyarlılığının % 96.5, özgülüğünün % 96.0 olduğu gözlenmiştir.

Yapılan bir çalışmada gerçek zamanlı PCR yöntemiyle çeşitli klinik örneklerden elde edilen toplum ve hastane kaynaklı 147 *S. aureus* suşuna ait virülans faktörler; stafilokokal enterotoksin A-D, toksik şok sendromu toksin-1, Panton-Valentin lökositidin (PVL) toksinleri ile SCCmec fenotiplerinin tespit edilmesi, hastane ve toplum kaynaklı isolatlar arasındaki genotipik ilişkinin gösterilmesi amaçlanmıştır. Araştırma sonucunda, hastane kaynaklı MRSA isolatlarında yüksek oranda enterotoksin A'nın tespit edilmesi, bu toksin ile antibiyotik direnç gelişimi arasında bir ilişki olabileceğini düşündürmüştür (Yılmaz ve ark., 2012a).

Klinik örneklerden izole edilen 50 MSSA ve 50 MRSA olmak üzere toplam 100 *S.aureus* suşunun antiseptik direnç genleri olan *qacA/B* ve *smr* genleri multipleks PCR yöntemiyle araştırılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda 50 MRSA suşunun 18'inde *smr*, 50 MSSA suşunun 2'sinde *qacA/B* genleri belirlenmiştir. *smr* geninin sadece MRSA suşlarında bulunması, MSSA suşlarında ise hiç saptanmaması istatistiksel olarak anlamlı bulunduğu belirtilmiştir (Nakipoğlu ve ark., 2012).

İnegöl ve Türkyılmaz, (2012) sığırlardan ve sektör çalışanlarından izole edilen metisilin dirençli stafilokoklarda SCCmec tipleri *mec* ve *ccr*, IS elementi ve plazmidleri multipleks PCR yöntemi ile incelemişlerdir. Çalışmada 181 stafilokok suşu izole edilmiş, bu suşların 59'unu MRSA olarak belirlemişlerdir. Sığır ve insan stafilokok isolatlarının taşıdığı SCCmec tiplerindeki benzerliğin bulaşmanın hayvanlardan insanlara ya da insanlardan hayvanlara olabileceğini söylemişlerdir.

Mastitisli inek sütlerinden izole edilen 60 *S. aureus* izolatında bazı toksin genleri ve metisilin direnç geninin araştırıldığı bir çalışmada *mecA* geni ve PVL toksin geni normal PCR ile belirlenmiş, enterotoksin genleri ise multipleks-PCR ile belirlenmiştir. Çalışma sonucunda 4 suşda PVL geni ve iki suşda metisilin direnç geni saptanmıştır. Mastitisli sütlerde bulunan *S. aureus*'ların enterotoksin üretebileceği, *mecA* geni taşıyabilecekleri ve bunun sağlık açısından önemli bir risk olabileceği vurgulanmıştır (Ünal, 2013).

Vannuffel ve ark. (1995) 165 stafilokok suşunun multipleks PCR yöntemini kullanarak *mecA* ve *femA* genlerini saptamaya çalışmışlardır. Metisiline dirençli 72 suşun tamamında *mecA* saptanırken, metisiline duyarlı olduğu bilinen 93 suşun 92 sinde

bu gen bulunmamış sadece bir tanesinde bulunmuştur. *femA* geni *S. aureus*'un benzersiz bir özelliği olduğu test edilen suşlarının % 100'ünde bulunmasına karşılık, test edilen tüm koagülaz negatif stafilocoklarda saptanamadığını belirtmişlerdir.

İnsanlardan izole edilen 50 *S. aureus* suşu ve kontrol suşları kullanılarak metisilin direnç geni olan *mecA*, mupirosin direncini şifreleyen *ileS-2* ve metisilin direnci için gerekli bir faktör olan *femB* genlerinin belirlenmesi için spesifik primerler kullanılarak multipleks PCR yapılmıştır. *femB* geni, *S. aureus*'u spesifik olarak tanımlamaya izin verir. Bu testin, mupirosin dirençli MRSA klinik izolatlarının hızlı, basit, uygulanabilir, spesifik, hassas ve doğru tanımlanmasını sağladığı, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında sistematik olarak uygulanabileceği ve antibiyotik tedavisinin belirlenmesini ve kullanımını kolaylaştırdığı belirtilmiştir (Perez-Roth ve ark., 2001).

Louie ve ark. (2002) multiplex PCR yöntemini kullanarak, kan kültürü şişelerinden hızlı bir şekilde metisiline dirençli stafilocokları belirlemeye çalışmışlardır. *mecA* ve bakteriyel 16S rRNA genlerini saptamak üzere tasarlanmış primerler kullanarak çalışma gerçekleştirilmiştir. Stafilocoklu pozitif kan kültürlerinde multipleks PCR testinin sırasıyla % 99.2 ve % 100 duyarlılık ve özgüllüğü sahip olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, metisiline dirençli stafilocokların hızlı ve doğrudan tespiti mümkün olduğu ve klinisyenlerin stafilocoksik bakteriyemi hastalarının tedavisine yönelik hızlı ve etkili kararlar almalarını mümkün kıldığını vurgulamışlardır.

Enfeksiyon hastalıklarının tanısı; etkenin biyokimyasal, moleküler seviyede tanımlanması ve tiplendirilmesi, patogeneze sebep olan genlerin belirlenmesi, konak ve patojen ilişkisi, konağın enfeksiyonlara yatkınlığından sorumlu etkenlerin incelenmesi, toplumlarda ve ailelerde hastalığın dağılımı, kontrolü ve etiyolojilerinde, moleküler düzeyde tanımlanmış çevresel risk faktörleri ve potansiyel genetik faktörlerin katkıları gibi konular moleküler epidemiyolojinin üzerinde durduğu konulardır (Andrei ve Zervos, 2006; Durmaz, 2007).

Son yıllarda moleküler epidemiyolojik çalışmaların geliştirilmesiyle enfeksiyon hastalıklarının epidemiyolojisinde oldukça fazla ilerlemeler görülmüştür. Moleküler epidemiyolojik çalışmaların amacı, tür içinde değişen ancak suşlarda sabit olan belirli bir genetik gösterge kullanılarak, salgın esnasında toplanan epidemiyolojik olarak ilişkili aynı tür içindeki izolatların aynı zamanda genetik olarak da ilişkili olup olmadıklarını yani izolatların birbirinin aynısı mı yoksa farklı izolatlar olduğunu

gösteren bulgulara ulaşmaktır. Bu bilgi, hem hastanelerde hem de topluluklarda hastalığın yayılmasının anlaşılması ve kontrol edilmesi için yararlıdır (Tenover ve ark., 1995; Durmaz, 2007).

Çoğunlukla salgın izolatları klonal olarak da ilişkili olup ortak bir kaynaktan köken alırlar. Bu izolatlarda sınırlı veya hiç kromozomal rekombinasyon olmadığı kabul edilmekte ve kromozom atasal hücreden yeni soylara bütün olarak geçmektedir. Bunlarda görülen değişimin sebebi nokta mutasyon veya DNA segmentlerinin delesyonu ve insersiyonu şeklinde gerçekleşen mutasyonlardır. Meydana gelen bu mutasyonlar uygun markerlarla belirlenebilir ve suşlar arasındaki genetik ilişki saptanabilir. Bu sayede hastalığın yayılımı anlaşılabilir ve kontrol altına alınabilir (Durmaz, 2007).

Tiplendirmede kullanılacak yöntemler, test edilen suşlardan kesin sonuçlar çıkartabilmeli, yer ve zaman bağımlılığı olmaksızın her çalışmada aynı sonuçları üretmeli ve epidemiyolojik olarak ilgisiz suşları belirleyebilmelidir. Epidemiyolojik tiplendirmede kullanılan yöntemler fenotipik ve genotipik tiplendirme yöntemleri olarak ikiye ayrılmaktadır. Fenotipik yöntemlerden en çok kullanılanları; biyotiplendirme, serotiplendirme, bakteriyofaj tiplendirmesi, bakteriyosin tiplendirmesi, antibiyotiklere duyarlılık profili (antibiyogram) ve protein bazlı yöntemlerdir (Köksal, 1993; Durmaz, 2007).

Birçok araştırmacı tarafından kullanılan bu fenotipik testler yeteri kadar ayırım yeteneğine ve kullanılabilirlik özelliklerine sahip değildir. Bu testlerin yetersiz kaldığı yönler; genotipik ekspresyon veya varyasyonlarla değişebilecek stabil olmayan karakterleri kullanmaları, sınırlı sayıda özelliği ortaya koyabilmeleri, farklı özelliklerin ortaya çıkarılması için metotların önemli ölçüde modifikasyonlar gerektirmeleri ve yavaş, çok fazla emek isteyen, maliyetli ve yorumlaması zor olan sonuçlar üretmeleridir (Köksal, 1993). DNA teknolojisindeki gelişmelerden sonra fenotipik sonuçların, tek başına bakterilerin karakterizasyonunda yeteri kadar tatmin edici olmadığı bunların genotipik testlerle eşleştirilmesi gerektiği belirtilmiştir.

Genotipik yöntemler, fenotipik yöntemlerin alternatifi veya tamamlayıcısı olarak ortaya çıkmıştır. Bu yöntemler DNA bazlı kromozomal ve ekstra kromozomal genetik materyal analizini içerir (Busch ve Nitschko, 1999). Genotipik yöntemlerde temel prensip, DNA'nın uygun restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilmesi sonucu ortaya çıkan polimorfik DNA parçacıklarının büyüklüklerine göre elektrikli bir ortamda agaroz jel veya akrilamid jelde yürütülerek ayrışmaları ve ayrılan parçaların jelde

oluşturdukları bantların ethidium bromide ile boyanarak veya işaretli problemler kullanılarak görüntülenmesi esasına dayanır. Genotipik yöntemler olarak; Plazmid DNA analizi, kromozomal DNA restriksiyon endonükleaz analizi (REE), southern hibridizasyon yöntemi, ribotipleme (rDNA-RFLP), pulsed field gel electrophoresis (PFGE), RFLP-PCR, PCR-ribotipleme, amplifiye fragment length polimorfizmi (AFLP), tekrarlayan ekstragenik elementlerin PCR ile amplifikasyonu (REP-PCR) ve multiple arbitrary amplicon profiling (MAAP - AP-PCR, RAPD ve DAF) yöntemleri tanımlanmıştır. Fenotipik yöntemlere göre daha güvenilir sonuçların elde edildiği genotipik yöntemlerin en önemli avantajları: a) Standardize edildikleri zaman stabildirler, b) Çok güçlü ayırım gücüne sahip oldukları için bütün farklı polimorfik özellikleri ortaya koyabilirler, c) Benzer kimyasallar, aletler ve prosedürler kullanılarak farklı mikroorganizma türleri için kullanılabilirler, d) Ucuz, hızlı, basit ve duyarlı yöntemlerdir (Köksal, 1993).

Bütün tiplendirme sistemlerinin kullanılabilmesi için bazı özelliklere sahip olması gerekir:

Tiplendirebilirlik: Uygulanan yöntemin bir tür içindeki tüm mikroorganizmaları tiplendirebilme yeteneğini ifade eder. Tiplendirilemeyen izolatlar fenotipik yöntemlerde genotipik yöntemlere göre kıyasla daha fazla görülmektedir.

Tekrarlanabilirlik: Bir yöntemin tekrarlanabilirliği, bakteriyel bir suşun tekrar test edilmesiyle aynı sonucun elde edilmesini ifade eder. Zayıf tekrarlanabilirlik, test edilecek organizmaların in vivo ya da in vitro geçişi sırasında yöntemdeki veya biyolojik varyasyondaki değişiklikleri yansıtabilir (Andrei ve Zervos, 2006).

Ayırım gücü: Bir tekniğin ayırmacı gücü, epidemiyolojik açıdan ilgisiz izolatları birbirinden ayırt etme, ideal olarak her birini farklı bir türe dahil etme yeteneği anlamına gelmektedir. Ayırım gücü, yöntemin tekrarlanabilirliği ile yakından ilişkilidir ve tekrarlanabilirlik azalırsa, ayırım gücü kalmaz. Fenotipik yöntemlerin moleküler yöntemlerle karşılaştırıldığında daha düşük ayırım gücü vardır (Durmaz, 2001; Andrei ve Zervos, 2006).

Stabilite: Aynı klondan gelen izolatların sürekli aynı tipi gösterebilme olasılığıdır. Yöntemin stabilitesi kültür şartları ve tekniğin belirleyeceği hedef bölge, yani markırın yapısal bütünlüğü gibi faktörlerden etkilenmektedir (Durmaz, 2001).

Kullanılan tiplendirme yöntemi öğrenilmesi ve yorumlaması kolay olmalı ve yüksek maliyetli malzeme ve ekipman gerektirmemelidir. Kolay uygulanan bir yöntem klinik laboratuvarlarda yaygın şekilde kullanılabilir. Kompleks olan metotlar, rutin

laboratuvarlardan çok referans laboratuvarlarında kullanılmaktadırlar. Ayrıca kullanılan yöntem farklı mikroorganizma grubu ya da çok sayıda örneğin analizine uygun olmalıdır. (Tenover ve ark., 1997; Andrei ve Zervos, 2006).

Moleküler tiplendirme çalışmalarına başlamadan önce araştırmacılar tarafından beklentileri karşılayacak uygun yöntem veya yöntemlerin seçilmesi gerekmektedir. Kullanılacak yöntemi seçerken şu özellikler göz önünde bulundurulmalıdır: a) Yöntem farklı mikroorganizma grubuna uygulanabilmeli b) Tiplendirebilirliği, ayırım gücü yüksek olmalı ve tekrarlanabilmelidir c) Yöntemin kurulması, uygulanması ve sonuçların yorumlanması kolay olmalıdır d) Sosyal ve etik açıdan kabul edilebilir, hızlı ve ekonomik olmalıdır (Durmaz, 2007).

Çeşitli araştırmacılar tarafından belirtilen bu özelliklerin tamamını karşılayacak tek bir yöntem olmadığı için birden fazla yöntemin birlikte kullanılması gerektiği bildirilmiştir (Shimizu ve ark., 2000; Goering, 2004). Tek bir bölgede görülen ve kısa süreli bir salgından izole edilen suşlar tiplendirilecek ise, bir tipleme yöntemi yeterli olmaktadır. Fakat, ülke genelinde görülen bir salgında kapsamlı bir epidemiyolojik çalışma yapılması için birkaç tipleme yönteminin beraber kullanılmasına ihtiyaç duyulmaktadır (Tenover ve ark., 1995).

Günümüzde PFGE yöntemi birçok gram-pozitif ve gram-negatif bakteri ve mayaların tiplendirilmesinde “altın standart” olarak kabul edilmektedir. Diğer yöntemlerle kıyaslandığında ayırım gücü onlara eşit veya daha yüksektir. Fazla emek isteyen, kullanılması biraz maliyetli bir yöntem olmasına rağmen, üstün adaptasyon kolaylığı, tekrarlanabilirliği ve ayırım gücünün yüksek olması gibi avantajları sayesinde nozokomiyal patojenlerin ve bazı toplum kaynaklı patojenlerin tiplendirilmesinde çok kullanılan bir yöntemdir (Durmaz ve Durmaz, 2001).

Günümüzde moleküler biyolojideki hızlı ilerlemenin büyük kısmı, DNA moleküllerinin ayrılması ve görüntülenmesine bağlıdır. Bu amaçla kullanılan en yaygın teknik, standart agaroz jel elektroforezidir. Jel elektroforezi modern biyoloji laboratuvarında en yaygın kullanılan ayırma yöntemlerinden biridir. DNA molekülleri konvansiyonel jel elektroforezinde katı bir matrise (diğer bir deyişle agaroz veya poliakrilamid jelde) yüklenerek, statik bir elektrik alanı altında jelden geçmeye teşvik edilirler. Bu yöntemle 50 kilobaza (kb) kadar olan DNA fragmanları rutin olarak ayrılabilir. 50 kb'in üstündeki fragmanlar ise aynı hızla hareket ederler ve jelde büyük tek bir bant olarak görülürler. Bu sorunu çözmek için düşük yoğunluklu jeller

kullanılmış fakat fazla kırılğan olduklarından sonuç alınamamıştır (Basım ve Basım, 2001).

Bakteriyel kromozomlar genellikle 2000-5000 kb uzunluğundadır. Kromozomların restriksiyon enzimleri ile sindiriminin sonunda diğer 10-800 kb uzunluğunda 10-30 fragman meydana gelmektedir. Bu büyüklükteki DNA fragmanları klasik elektroforezle ayırlanamamaktadır (Weller, 2000). Schwartz ve Cantor (1984) tarafından 50 kb'den büyük DNA moleküllerinin periyodik aralıklarla yönü değişen elektrik alanı (yani PFGE) kullanılarak ayrılabilceği fikrini ortaya atılmış ve ökaryotik organizmalardan gelen büyük DNA parçalarını ayırmak için kullanılmıştır. Bu yeni teknikle 10 Mb'a (10.000 kb) kadar olan DNA fragmentleri ayrılabilmiştir. PFGE'de jelde ilerleyen DNA molekülleri farklı yönlerden gelen elektrik akımları ile farklı yönlerle itilerek hareket ettirilirse bantlar birbirinden ayrılabilir. Uygulanan elektrik akımının her yön değiştirmesi ile DNA fragmentleri yeniden yönlendirilir ve bu yönlendirme daha küçük fragmentlerde hızlı olduğu için daha hızlı hareket ederler ve sonuçta DNA fragmentleri jel boyunca büyüklüklerine göre birbirinden ayrılmış olurlar (Durmaz, 2007).

İzolatların PFGE paternleri restriksiyon kesim bölgelerinin değişimine neden olan, yani yeni bir restriksiyon kesim bölgesinin kazanılması veya kaybedilmesi ile ortaya çıkan genetik olaylar sonucunda görülmektedir. Örneğin; bir nokta mutasyonu veya DNA'nın insersiyonu ya da delesyonu gibi restriksiyon kesim bölgesinin kaybedilmesi veya kazanılmasına neden olan tek bir genetik olay, bir ile üç restriksiyon fragmanında farklılığa sebep olabilirken, iki genetik olay, iki ile beş restriksiyon fragmanında farklılığa sebep olabilmektedir. Bu nedenle, PFGE, izolatların kısa süreli çalışmalarda (örneğin hastane içi salgında) izolatların ilişkisini göstermek açısından son derece ayırtıcıdır, fakat uzun süreli küresel epidemiyolojik çalışmalar için uygun değildir (Enright ve ark., 2002).

Teorik olarak, tüm bakteri türleri, DNA'sının ekstraksiyonundaki zorluklara rağmen PFGE ile tiplendirilebilir (Tenover ve ark., 1997). Kromozomal DNA'nın ekstraksiyonu sırasında ekstra işlemler uygulanarak, kromozom DNA'sının büyük ölçüde bozulmadan kalması sağlanır. Bakteri hücreleri; DNA'nın kırılma riskini ortadan kaldırmak için, DNA ekstraksiyon aşamaları sırasında düşük erime noktalı agaroz içine gömülür (Trindade ve ark., 2003). Agaroz içerisine gömülen bakteri hücrelerinin çeşitli enzimlerle hücre duvarı, proteinleri ve karbohidratlar parçalanarak uzaklaştırılır. Daha sonra agaroz kalıpları yıkanarak DNA iyice saflaştırılır. Saflaştırılan sağlam DNA,

restriksiyon enzimi ile kesime tabi tutularak daha küçük parçalara ayrılır. Kesime uğramış agaroz parçaları jeldeki kuyucuklara yerleştirilir ve belli aralıklarla yönü değişen elektrik akımına tabi tutularak elektroforez işlemi gerçekleştirilir. Elektroforez işleminden sonra jel, etidyum bromürle boyanarak izolatlara ait bant profilleri görünür hale getirilir. Bu bant profillerinin fotoğrafları çekilir, çeşitli bilgisayar programları yardımı ile analiz edilerek suşların birbirleriyle olan ilişkileri ortaya konulmaktadır. (Durmaz ve Durmaz, 2001).

Tenover ve ark. (1995)'nın geliştirmiş olduğu kriterlere göre izolatlar aynı, yakın ilişkili, muhtemel ilişkili ve ilişkisiz olarak analiz edilir.

Aynı İzolat: Bant sayıları ve boyutları birbirinin aynı olan izolatlardır ve genetik olarak ayırt edilemezler. Epidemiyolojik olarak ilişkilidirler ve salgın suşunu temsil ederler.

Yakın ilişkili izolat: Salgın suşuyla yakın ilişkili olarak değerlendirilen epidemiyolojik olarak, salgının bir parçası olma olasılığı yüksek olan ve salgın suşu ile aralarında 2-3 bant farkı bulunan izolatlardır.

Muhtemel ilişkili izolat: Salgın suşları ile aralarında 4-6 bant farkı olan bu izolatlar, epidemiyolojik olarak salgın suşuyla muhtemel ilişkili olarak değerlendirilir. Bu izolatlar salgın suşu ile aynı genetik soylara sahip olabilirler, fakat genetik olarak yakından ilişkili değildirler ve dolayısıyla epidemiyolojik olarak ilişkili olma ihtimalleri daha düşüktür.

İlişkisiz izolatlar: Salgın suşundan yedi veya daha fazla bant farkı olan izolatlardır ve epidemiyolojik olarak salgın suşuyla ilgileri yoktur (Tenover ve ark., 1995; Tenover ve ark., 1997).

Çizelge 2.1. PFGE profilleri için yorumlama kriterleri (Tenover ve ark., 1995)

Kategori	Salgın suşu profiline göre ortaya çıkan genetik farklılık sayısı	Salgın suşundan farklı olarak ortaya çıkan bant sayısı	Epidemiyolojik yorum
Aynı izolat	0	0	İzolat, salgının bir parçası
Yakın ilişkili izolat	1	2-3	İzolat, salgınla yakın ilişkili
Muhtemel ilişkili izolat	2	4-6	İzolat, salgınla muhtemel ilişkili
İlişkisiz izolat	≥ 3	≥ 7	İzolat, salgınla ilişkisiz

PFGE tekniğinin kullanım alanları:

- 1) Endonükleaz kullanılarak elde edilen DNA fragmanlarının PFGE'si, kromozomun parmak izi ve fiziksel haritalaması için kullanılabilir.
- 2) PFGE tekniğinden aynı türdeki farklı suşların arasındaki ilişkinin derecesini belirlemek için faydalanılır.
- 3) PFGE'nin, genom boyutu tahmininde etkili bir yöntem olduğu kanıtlanmıştır, kromozomal haritaların oluşturulması ve bakteriyel türlerin karakterizasyonu için yararlıdır.
- 4) PFGE tekniğinin, mantarların kromozomal DNA'sı, parazitik protozoa, bakteri ve memelilerin spesifik genom fragmentleri dahil olmak üzere çeşitli kaynaklardan elde edilen büyük DNA moleküllerinin analizinde son derece güçlü olduğu kanıtlanmıştır.
- 5) Maya Yapay Kromozom (YAC) kütüphaneleri PFGE tarafından oluşturulmuştur.
- 6) PFGE tekniğinden, transgenik farelerin yapımında faydalanılmıştır.
- 7) PFGE, radyasyona bağlı DNA hasarı ve onarımında, memeli sentromerlerindeki varyasyon çalışmalarında kullanılmaktadır.
- 8) PFGE yöntemi ile meydana gelen mutasyonlar izlenebilir.
- 9) PFGE ile restriksiyon fragmentleri kolayca belirlenebildiğinden dolayı restriksiyon ve gen haritaları oluşturmak için kullanılabilir (Basım ve Basım, 2001).

Prevost ve ark., (1992), 65 hastadan alınan toplam 81 MRSA izolatını PFGE yöntemi ve ClaI, EcoRI ve HindIII restriksiyon enzimlerini kullanarak, ribotiplendirme yöntemi ile tiplendirmeye çalışmışlardır. Ribotiplendirme yönteminin PFGE'den daha az ayırdedici olduğu ve PFGE'nin metisiline dirençli *S. aureus* suşlarının tiplendirilmesinde ribotiplendirmeden daha etkili bir epidemiyolojik araç olabileceğini belirtmişlerdir.

Bannerman ve ark., (1995), 300 *S. aureus* izolatını tiplendirmek için bakteriyofaj tiplendirme (BT) ve PFGE metodunu kullanmışlardır. Yaptıkları çalışmada bakteriyofaj tiplendirme metoduna göre 96 izolat BT gurup I, 19 izolat gurup II, 82 izolat gurup III, 7 izolat gurup V olarak tiplendirilirken 96 izolat ise tiplendirilememiştir. PFGE metodu ile her bir faj grubundaki tüm alt tipleri ve tiplendirilemeyen 96 izolatı tiplendirebilmiştir. Araştırmacılar elde ettikleri bu bulgular sonucunda, PFGE

yönteminin Bakteriyofaj tiplendirme yöntemine göre daha ayırt edici olduğunu ve PFGE yöntemiyle tüm laboratuvarlarda 3-4 gün gibi sürede hızlı bir şekilde sonuç alınabileceğini belirtmişlerdir.

PFGE yönteminin metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'un moleküler tiplemesi için "altın standart" olarak düşünüldüğü söylenmiştir. Bununla birlikte, yöntemin zaman alıcı ve pahalı olduğu da vurgulanmaktadır. Yayınlanmış primerler ile hızlı multipleks PCR tabanlı bir yöntem kullanıldığı ve sonuçlarının PFGE ile karşılaştırıldığı bir çalışmada 75 klinik izolat tiplendirilmeye çalışılmıştır. Bu suşlardan 59'u epidemiyolojik açıdan ilişkisiz izolatlardan oluşurken 16'sı epidemiyolojik açıdan zaman ve mekan olarak tanımlanan bir salgından toplanan suşlardan oluşmaktadır. Multipleks PCR için spa geni, coa geni ve *mecA* geni primer karışımı kullanılmıştır. Hem PFGE hem de PCR, 75 suşu 41 farklı genotipe kümelendirdiği, salgından kaynaklanan suşlar için sonuçların uyumunun % 100 olduğu belirtilmiştir. Bu PCR yönteminin ucuz ve hızlı olduğu fakat PFGE yöntemine göre ayırım gücü ve tekrarlanabilirliğinin yetersiz olduğu vurgulanmıştır (Stranden ve ark., 2003).

Vautor ve ark., (2003), On farklı çiftlikteki çiğ süttten peynir üretilen çeşitli yerlerden topladıkları 179 *S. aureus* izolatını genotipik olarak PFGE yöntemi ile değerlendirmişlerdir. İzolatlar, peynirler, süt tankları, memelerden, varsa meme deri apseleri, çiftçilerin elleri ve burunlarından ve sağım alanının havasından toplanmıştır. Elde ettikleri sonuçlar, dokuz çiftliğin, aynı bant düzenine sahip veya genetik olarak ilgili *S. aureus* izolatları ile kontamine olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlara göre, *S. aureus*'un tek bir klonunun hem enfekte olmuş meme bezlerinde hem de çiğ süttten üretilen peynirlerde yaygın şekilde dağılım gösterdiği belirtilmiştir. Enfeksiyona maruz kalmış meme bezlerinin, koyunlarda süt ürünlerinin kontaminasyonunun ana kaynağı olduğunu söylemişlerdir.

İspanya'nın çeşitli bölgelerinde yer alan çiftliklerinde mastitisli koyun ve tavşanlardan izole edilen 50 *S.aureus* suşunun incelendiği bir çalışmada, suşların direnç durumu ve plazmid profilinin, PFGE ile elde edilen pulsotiplerle ilişkili olduğu belirtilmiştir. Koyunlardan izole edilen stafilokoklarda, hem pulsotip hem de plazmid profilinin, tavşanlardan elde edilenlere göre daha yüksek heterojenlik gösterdiği söylenmiştir (Goni ve ark., 2004).

Vautor ve ark., (2005) mastitisli koyunlardan izole ettikleri 26 *S. aureus* izolatını PFGE, RAPD-PCR, RFLP ve MLST gibi genotipik yöntemlerle tiplendirmeye çalışmışlardır. Ayırım gücü en yüksek olan PFGE ve MLST yöntemleri belirlenmiş ve

bu yöntemlerin enfeksiyonlu popülasyonlarda, endemik klonların prevalansının ve yaygınlığının tespit edilerek, mastitis kontrol programlarının değerlendirilmesine ve epidemiyolojik sürveyansına katkıda bulunabileceğini belirtmişlerdir.

Yapılan bir çalışmada 50 *S.aureus* suşunun antibiyotik duyarlılıkları belirlenmiş ve PFGE yöntemi ile tiplendirilmişlerdir. Çalışmada 20 farklı pulsotip belirlenmiştir. *S. aureus* suşlarını ayırt etmek için PFGE'nin 16S rRNA sekansı analizinden daha yüksek ayırım gücüne sahip olduğu belirtilmiştir. 50 suşun 22'si metisiline dirençli ve *mecA* pozitif bulunmuş olup, 5 suşun metisiline duyarlı olmasına rağmen *mecA* genine sahip olduğu tespit edilmiştir. Suşların hiçbirinde vankomisine dirence rastlanmamıştır (Revazishvili ve ark., 2006).

Ellington ve ark., (2007) 244 *S. aureus* izolatının PVL ve *mecA* genlerini araştırdıkları çalışmalarında PVL pozitif olan suşların PFGE profilleri, spa tipleme, toksin gen profilleri ve çeşitli antibiyotiklere olan direncini belirlemişlerdir. Bu izolatlardan sadece 4'ü PVL pozitif MSSA olarak saptanmıştır ve bu 4 PVL pozitif izolattan bir tanesi penisilin ve fusidik aside dirençli, geriye kalanlar ise test edilen tüm antibiyotiklere duyarlı olarak görülmüştür.

Thong ve ark., (2009) klinik kaynaklı 66 MRSA suşlarının antibiyotik duyarlılıklarını, SCCmec alt tiplerini, PVL taşıyıcılığını ve genetik çeşitliliğini belirlemeyi amaçlamışlardır. Çalışmalarında PVL geni, *mecA* geni ve SCCmec tiplerini belirlemek için PCR kullanılmıştır. Antibiyogramlar standart bir disk difüzyon yöntemi kullanılarak ve izolatların genetik çeşitliliği PFGE yöntemi ile belirlenmiştir. Tüm izolatların vankomisine duyarlı olduğu ve en düşük direnç oranlarının fusidik asit (% 11), rifampisin (% 11) ve klindamisin (% 19)'e karşı olduğu görülmüştür. Test edilen izolatlardan sadece 2 tanesinin PVL pozitif olduğu ve SCCmec tip IV'e sahip olduğu ayrıca izolatların büyük çoğunluğunun SCCmec tip III'ü taşıdığı tespit edilmiştir. PFGE yöntemi ile bu 66 izolat 55 pulsotipe ayrılmıştır.

Brezilya'da 37 çiftlikte üretilen sütlerde *S. aureus* görülmesinin değerlendirildiği bir çalışmada, mastitis görülen 208 inekten ve 37 süt tankından alınan örnekler analiz edilmiş ve 14'ü ineklerden alınan sütte 4'ü de tanklardan alınan sütte olmak üzere 18 izolat tespit edilmiştir. İneklerden alınan 2 süt izolatu ve tanklardan alınan 2 süt izolatının, enterotoksijenik *S. aureus* olduğu tespit edilmiştir. PFGE yöntemi ile bu çiğ sütlerden izole edilen örnekler 13 pulsotipe ayrılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre stafilokokal gıda zehirlenmesinin potansiyel olarak mastitisli ineklerden alınan çiğ süt vasıtasıyla tüketicilere iletildiği belirtilmiştir (Fagundes ve ark., 2010).

Aklilu ve ark., (2012) MRSA'nın sadece nazokomiyal bir patojen olmadığını veteriner tıbbında da büyük sorunlara sebep olduğunu belirtmişlerdir. Veterinerlik personeli, kedi ve köpekler ile üniversite veteriner hekimliği çevresinde MRSA'nın dağılımını inceledikleri çalışmalarında izole ettikleri suşların moleküler tiplendirmelerini MLST, PFGE ve spa tiplendirme metotlarıyla yapmışlardır. PFGE ile elde edilen sonuçlar, iki veteriner personelinden izole edilen iki MRSA izolatının birinin köpeklerden diğerinin ise çevreden izole edilen izolatla yakından ilişkili olduğunu ortaya koymuştur.

Jackson ve ark., (2013) Gürcistan'daki perakende domuz eti ve perakende sığır etlerinden *S. aureus* izole etmişler ve elde edilen MRSA suşlarının, broth mikrodilüsyon yöntemi ile antibiyotik duyarlılıkları belirlenmiş, ayrıca MLST, SCCmec tiplemesi ve PFGE yöntemi ile tiplendirilerek aynı bölgedeki insanlardan izole edilen MRSA suşları ile karşılaştırmışlardır. Domuz etlerinden izole edilen 45 *S. aureus* suşundan 3'ünü, sığır etlerinden izole edilen 63 *S. aureus* suşundan 4'ünü ve insanlardan izole edilen 100 *S. aureus* suşundan 50'sini MRSA olarak saptamışlardır. 37 MRSA suşu PVL pozitif olarak tespit edilmiştir. Sığır etlerinden izole edilen bir MRSA suşunun, insanlardan izole edilen bir MRSA suşu ile benzer PFGE paternine sahip olduğu görülürken domuz etlerinden izole edilen MRSA suşları ile insanlardan izole edilen MRSA suşları arasında herhangi bir benzerlik saptanmamıştır. Elde edilen bu veriler doğrultusunda, perakende sığır eti örneklerinin muhtemelen etin işlenmesi sırasında bir insan kaynağı tarafından kontamine olduğunu söylemişlerdir.

Nazal *S. aureus* taşıyıcılığının araştırıldığı bir çalışmada 686 kişiden burun sürüntüsü örnekleri alınmıştır. İzole edilen *S. aureus* suşlarının metisilin direnci fenotipik yöntemlerle, *mecA* geni ve SCCmec tipi ise moleküler yöntemlerle tespit edilmiştir. MRSA izolatlarının karakterizasyonu ise PFGE, MLST ve spa tiplendirilmesi ile belirlenmiştir. PVL toksin geninin tanımlanması için ise PCR yöntemi kullanılmıştır. Toplam *S. aureus* taşıyıcılığı % 32.7 bulunurken, MRSA taşıyıcılığı oranı ise % 0.9 olarak bulunmuştur. Tüm MRSA izolatlarının SCCmec IV tipini gösterdiği, ancak bunların hiçbirinin PVL toksinini kodlayan genlerini taşımadığı görülmüştür (Pires ve ark., 2014).

Liu ve ark., (2016) Toplum kaynaklı metisiline dirençli *S. aureus* (CA-MRSA) ve metisiline duyarlı *S. aureus*'un (MSSA) epidemiyolojik ve moleküler özelliklerini araştırmışlardır. Antibiyotiklere duyarlılık agar dilüsyon yöntemi ile belirlenmiş olup, genetik karakterler SCCmec, spa tipleme ve MLST yöntemleri ile saptanmıştır. PVL

genleri ise PCR yöntemi ile belirlenmiştir. MSSA suşlarının % 97.3'ü eritromisine,% 96.6'sı penisiline,% 89.1'i de klindamisine dirençliken *S. aureus* suşlarının hiçbirisi vankomisine direnç göstermediği tespit edilmiştir. Sadece beş CA-MRSA suşunda PVL genleri saptanmıştır. Fusidik asit ve mupirosin, topikal tedavide etkili olmaya devam etmekte olduğunu söylemişlerdir.

Yapılan başka bir çalışmada beş hindi çiftliğinden (n = 18) ve 2 tavuk çiftliğinden (n = 9) alınan örneklerden izole edilen 27 *S. aureus* suşunun antibiyotik duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Tavuk ve hindilerden izole edilen tüm suşların ampisiline, sefoksitine, oksasiline, doksisisikline ve tetrasikline dirençli olduğu, ayrıca tavuklardan izole edilen tüm *S. aureus* suşlarının ise eritromisin ve azitromisine dirençli olduğu saptanmıştır. Tüm izolatların ise gentamisin, kloramfenikol, sülfonamidler ve fusidik asite duyarlı olduğu görülmüştür. Siprofloksasine karşı direnç oranı tavuk izolatlarında % 55.6 hindi izolatlarında % 42.1'dir olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak, sağlıklı hindilerde ve tavuklarda MRSA'nın saptanması, halk sağlığı açısından endişe verici olarak değerlendirilmiştir (El-Adawy ve ark., 2016).

Subklinik sığır mastitisli olgulardan elde edilen toplam 112 *Staphylococcus aureus* izolatı, antibiyotik duyarlılığı ve biyofilm oluşum yeteneklerinin yanı sıra antibiyotik direncinden ve biyofilm oluşum yeteneğinden sorumlu genler PCR ile araştırılmıştır. İzolatların antimikrobiyal duyarlılıkları ise disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Beş izolat antibiyotik duyarlılık testi ve PCR ile *mecA* geninin saptanması MRSA olarak değerlendirilmiştir. Penisilin, ampisilin, tetrasiklin, eritromisin, trimetoprim-sulfametoksazol, enrofloksasin ve amoksisilin-klavulanik asitteki direnç oranları sırasıyla % 45.5, % 39.3, % 33, % 26.8, % 5.4, % 0.9 ve % 0.9 olarak belirlenmiş olup, tüm izolatlar vankomisin ve gentamisine karşı duyarlı bulunmuştur. Sonuç olarak, sığır mastitis vakalarında *S.aureus*'un esas olarak β -laktamlara ve daha az oranda da tetrasiklin ve eritromisine dirençli olduğu belirtilmiştir (Aslantaş ve Demir, 2016).

Dekker ve ark. (2016) kan kültürlerinden izole edilen 56 *S. aureus* örneğinin antibiyotik duyarlılıklarını VİTEK 2 sistemi ile belirledikleri çalışmalarında, multipleks PCR yöntemiyle de *nuc*, *mecA*, *mecC* ve PVL genlerini saptamışlardır. Biri MRSA olan *S. aureus* suşlarının % 35.7'sinde çoklu ilaç direnci görülmüştür. En yüksek direnç oranları, penisilin (% 98.2), tetrasiklin (% 57.1) ve trimetoprim / sulfametoksazol (% 46.4)' e karşı belirlenmiştir. *S. aureus* suşlarının 42'sinde PVL geni saptanmıştır. Lokal

olarak kullanılan antibiyotiklere karşı endişe verici derecede yüksek antibiyotik direnci görüldüğünü söylemişlerdir.

Mendem ve ark., (2016) klinik örneklerden izole edilen 212 *S. aureus* arasında antibiyotik direncinin prevalansını araştırdıkları çalışmalarında, antibiyotik duyarlılığı Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile ve minimum inhibisyon konsantrasyonları ise vankomisin ve metisilin için belirlenmiştir. Bu izolatlarda en düşük direnç oranı (% 10.13) fenikollere karşı (Chloramphenicol) en yüksek direnç oranı ise (% 97) penisiline karşı saptanmış olup, izolatların % 44.8'i MRSA olarak tespit edilmiştir. % 10.84 oranında vankomisine karşı belirlenen direncin çok ciddi bir sorun olduğunu söylemişlerdir. MRSA ve VRSA insidansının artmasının sonucu olarak stafilokkal enfeksiyonlarla mücadelede alternatif ilaçların araştırılması ve tedavide yeni yaklaşımların gerektiğini önermişlerdir.

Metisiline duyarlı ve metisiline dirençli ciddi *Staphylococcus aureus* enfeksiyonlarının tedavisinde vankomisinin rolü, bu antibiyotiğe karşı artmakta olan MİK (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu) nedeniyle giderek etkisiz hale gelmektedir. *S. aureus*'un glikopeptidlere karşı azalmış vankomisin duyarlılığının artması, klinisyenlerin tedavide glikopeptid olmayan antibiyotiklerin rollerini gözden geçirme ihtiyacını doğurmaktadır. Bu alternatif glikopeptid olmayan antibiyotiklerin kullanımı arttıkça, direnç oranlarının izlenmesi de uygun olacaktır. Büyük sürveyans programları glikopeptid olmayan (daptomisin, seftaroline, tigesiklin, linezolid ve tedizolid) antibiyotiklere karşı *S. aureus*'daki direnç gelişimi için veriler sağlamıştır. Mevcut yayınlanmış literatürler, ciddi MRSA enfeksiyonlarında, bu non-glikopeptidlere karşı dünya çapında direnç oranlarının hala düşük olduğunu göstermektedir (Molina ve Huang, 2016).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bakteri suşları

Bu çalışmada; Nisan 2014-Eylül 2015 tarihleri arasında Konya İl merkezinde hastane klinik materyallerinden 150 adet, Konya merkez ve ilçelerinden toplanan çiğ süt örneklerinden 49 adet ve Konya merkezden toplanan dondurma örneklerinden 6 adet olmak üzere toplam 205 adet *Staphylococcus aureus* suşu izole edilmiş ve kullanılmıştır. Kontrol suşları olarak S.Ü Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı Bakteri Suş Koleksiyonundaki *S. aureus* ATCC 25923 (MSSA), *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA) ve *S. epidermidis* NRL B-4268 suşları kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan besiyerleri, solüsyonlar, çeşitli kimyasal maddeler ve antibiyotik diskleri

Deney suşlarının izolasyonları ve kültürlerinin hazırlanmasında kullanılan; Brain Heart Infüzyon Broth (BHIB), Trypticase Soy Agar (TSA), besiyerleri ticari olarak Difco (Becton Dickinson, NJ USA) firmasından, Mannitol Salt Phenol Red Agar (MSA), Baird Parker Agar, (BPA) ve içine ilave edilen Egg Yolk Tellurit Solüsyonu, antibiyogram çalışmalarında kullanılan Mueller Hinton Agar (MHA) ticari olarak Merck (Darmstadt, Germany) firmasından temin edilmiştir.

EDTA, Tris-HCl, Trisma base, potasyum asetat, amonyum asetat, etil alkol, glasiyal asetik asit, etidyum bromür, borik asit, gibi kimyasal maddeler Merck (Darmstadt, Germany)'ten, low melting point (LMP) agaroz, pulsed certified agaroz, N-Lauroylsarcosine sodium salt, sodyum deoksikolat Sigma-Aldrich (Chemie GmbH, Germany)'ten, *SmaI* Restriksiyon enzimi, lizostaphin, proteinaz K, Tag polimeraz, RNase A ve DNA izolasyon kiti (Thermo Fisher Scientific, USA) firmasından temin edilmiştir.

Ticari antibiyotik diskleri olarak, Tetrasiklin (TE), Penisilin (P), Vankomisin (V), Rifampin (R), Gentamisin (GM), Ofloksasin (OFX), Oksasilin (O), Eritromisin (E), Meropenem (MEM), Linezolid (LZD), Seftazidim (CAZ), Sefuroksim (CXM), Tirmetoprim- sülfometaksozol (SXT), Sefalotin (KF) ve Amoksisilin klavulanik asit

(AMC) antibiyotikleri Bioanalyse (Tıbbi Malzeme San. Tic. Ltd. Şti, Türkiye) firmasından alınmıştır.

3.1.3. PFGE çalışmasında kullanılan tampon ve çözeltiler

3.1.3.1. 0.5 M EDTA

186.1 g Disodium EDTA-2 H₂O tartılarak 800 ml distile suya konulup manyetik karıştırıcıda eritilerek NaOH ilavesiyle pH 8.0'e ayarlanarak hacim 1000 ml'ye tamamlandı ve 121 °C'de 15 dk otoklavda steril edildi.

3.1.3.2. TBE (Tris, Borik asit, EDTA,)

10X TBE stok solusyonu

108 g tris ve 55 g borik asit 800 ml distile suya konularak karıştırıldı. Daha sonra 40 ml 0.5 M EDTA (pH 8) ilave edilerek hacim 1000 ml'ye tamamlandı ve 121 °C'de 15 dk otoklavda steril edildi.

0.5X TBE kullanma solüsyonu

50 ml 10X TBE, 950 ml distile su ile karıştırılarak hazırlandı.

3.1.3.3. 1M Tris-HCl (pH 8)

121.1 g tris 800 ml distile suda eritilerek HCl ilavesiyle pH 8'e ayarlandı ve son hacim 1000 ml'ye tamamlandı. 121 °C'de 15 dk otoklavda steril edildi.

3.1.3.4. 5M NaCl

292.2g NaCl 800 ml distile suda çözüldükten sonra hacim 1000 ml'ye tamamlandı.

3.1.3.5. TE tamponu (10 mM Tris+ 1 mM EDTA)

1 M Tris çözeltisinden 10 ml alınarak 0.5 M 2ml EDTA çözeltisi ile karıştırılarak distile suyla hacim 1000 ml'ye tamamlandı.

3.1.3.6. Hücre süspansiyonu tamponu (HST) (10 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 20 mM NaCl pH 7.2) 250 ml için

1M Tris-HCl	2.5ml
0.5M EDTA	25 ml
5M NaCl	1 ml

1 M Tris-HCl, 0.5 M EDTA ve 5 M NaCl çözeltilerinden belirtilen miktarlarda alınıp karıştırılarak distile suyla hacim 250 ml'ye tamamlandı. Katı besiyerinde üreyen bakterileri süspansiyon etmek amacıyla kullanıldı.

3.1.3.7. Lizis solüsyonu 1 (10 ml için) (10 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 50 mM NaCl)

1M Tris-HCl	0.1 ml
0.5M EDTA	1 ml
5M NaCl	0.1 ml
Sodyum deoksikolat	20 mg

Sarkozin	50 mg
Distile su	8.8 ml

Yukarıda belirtilen miktarlarda maddeler karıştırılarak elde edildi ve bakterilerin hücre duvarının parçalanması için kullanıldı.

3.1.3.8. Lizis solüsyonu 2 (10 ml için)

0.5M EDTA	5 ml
Sarkozin	0.1 g
Proteinaz K	0.5 mg
Distile su	5 ml

3.1.4. Multipleks PCR için kullanılan malzeme ve ekipmanlar

Multipleks PCR, 96 örnek kapasiteli Thermo Master Cycler Gradient PCR cihazında gerçekleştirildi. $MgCl_2$ (25mM), Taq DNA polimeraz (5U/ μ l), 10X Taq Buffer, 10mM deoksinnükleotid trifosfat (dNTP) set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Fermentas) ve 100X BSA (Bovin serum albümin) kullanılmıştır.

PCR işleminde kullanılan primerler (16S rRNA, *mecA*, *femA* ve *lukS*) çizelge 3.1.4.1’de belirtilmiştir.

Çizelge 3.1.4.1. Multipleks PCR’da kullanılan primer dizileri, hedef gen bölgesi ve amplicon büyüklükleri (Al-Talib ve ark., 2009).

Primerler	Primer Dizisi 5’ - 3’	Hedef Gen	Amplicon Büyüküğü (bp)
16S rRNA-F	GCAAGCGTTATCCGGATTT	16S rRNA	597 bp
16S rRNA-R	CTTAATGATGGCAACTAAGC		
<i>femA</i> -F	CGATCCATATTTACCATATCA	<i>femA</i>	450 bp
<i>femA</i> -R	ATCACGCTCTTCGTTTAGTT		
<i>mecA</i> -F	ACGAGTAGATGCTCAATATAA	<i>mecA</i>	293 bp
<i>mecA</i> -R	CTTAGTTCTTTAGCGATTGC		
<i>lukS</i> -F	CAGGAGGTAATGGTTCATTT	<i>lukS</i>	151 bp
<i>lukS</i> -R	ATGTCCAGACATTTTACCTAA		

Marker olarak 100 bp’lik DNA ladder (Thermo) kullanılmıştır. Elektroforez işlemi Thermo marka, 68 kuyucuklu elektroforez tankında, görüntüleme işlemi ise Bio-Rad marka görüntüleme cihazında gerçekleştirilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1. Bakteri suşlarının toplanması

Konya’daki çeşitli hastanelerde, *S. aureus* olarak izole ve identifiye edilen suşlar toplanılarak laboratuvara getirildi. Bu suşlar; koloni morfolojisi, Gram boyama özellikleri, hemoliz durumu, katalaz, koagülaz ve lesitinaz aktivitesi, mannitol fermantasyonu gibi özellikleri test edilerek doğrulandı. Suşlar Brain - Hearth İnfüzyon sıvı besiyerine pasajlanarak çalışılncaya kadar +4 °C’de saklandı.

Konya İl merkezinde bulunan çeşitli market ve pastanelerden açıkta satılan dondurmalarından bir miktar numune steril plastik kutulara alınarak hızlı bir şekilde laboratuvara getirildi. Örnekler oda ısısında eridikten sonra 100 µl alınarak seçici besiyeri olan Mannitol Salt Phenol-Red ve Baird Parker Agara yayma ekimi yapılarak 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda Mannitol Salt Phenol-Red Agarda etrafında sarı hale olan tek düşmüş koloniden ve Baird Parker Agarda etrafında berrak bir zon olan tek düşmüş siyah-gri renkli koloniden alınarak Brain Hearth İnfüzyon sıvı besiyerine ekim yapılarak 37 °C’de 24 saat inkübe edildi. En son olarak kültüre koagülaz testi yapılarak *S. aureus*’un izolasyonu tamamlandı.

Konya merkez ve ilçelerdeki üreticilerden, steril plastik kutulara alınan süt örnekleri hızlıca laboratuvara getirilerek, 100 µl'lik numune Mannitol Salt Phenol-Red ve Baird Parker Agara yayma ekimi yapılarak 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Bu besiyerlerindeki sarı (MSA) ve siyah-gri (BPA) kolonilerden alınan örnekler sıvı besiyerinde (BHI) üretilerek koagülaz testi yapıldı ve izolasyon tamamlandı.

3.2.2. *S. aureus* suşlarının fenotipik identifikasyonu

İzole edilen bütüş suşlar, koloni morfolojisi, Gram boyama, hemoliz özelliği, katalaz, koagülaz ve lesitinaz aktivitesi ve mannitol fermentasyonu bakımından incelenmiştir.

Katalaz testi: Stafilocokları streptokoklardan ayırt etmede kullanılan bu test için kanlı besiyerinde üreyen kolonilerden steril öze ile alınarak temiz bir lam üzerinde alındıktan sonra üstüne birkaç damla % 3'lük H₂O₂ damlatıldı. Gaz oluşumu gözlenen suşlar katalaz pozitif olarak değerlendirildi.

Koagülaz testi: Koagülaz testi için tüp koagülaz yöntemi kullanıldı. Bunun için 24 saatlik bakteri kültüründen 0.1 ml alınarak steril bir tüpte bulunan 0.5 ml insan plazmasının üzerine ilave edildi. Daha sonra bu tüpler etüvde 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Tüpler 1, 2, 3, 4, 6 ve 24. saatlerde çalkalamadan pıhtı oluşumu gözlemlendi. Bu süreler sonunda deney tüpünde pıhtılaşma meydana gelmişse, test sonucu pozitif, pıhtılaşma meydana gelmemişse negatif olarak değerlendirildi.

Mannitol fermentasyon testi: Mannitol Salt Phenol-red agara ekim yapıldıktan 18- 24 saat sonra üreyen bakterilerin besiyerinin normalde parlak kırmızı olan rengini sarıya dönüştürmesi durumunda bakterinin mannitolü fermente ettiği kabul edildi.

Lesitinaz testi: Egg yolk tellürit ilaveli Baird Parker agar besiyerine 18-24 saatlik stafilocok kültüründen ekim yapıldı ve lesitini hidrolize edip etmediği belirlendi. Besiyerinde meydana gelen siyah-gri renkli kolonilerin etrafında berrak bir zon bulunması pozitif sonuç olarak yorumlandı.

3.2.3. *S. aureus* suşlarının genotipik identifikasyonu

S. aureus izolatlarından DNA ekstraksiyonu ticari DNA ekstraksiyon kiti (Thermo Scientific Genejet Genomic DNA Purification Kit) kullanılarak üretici firmanın önerdiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.1. Multipleks PCR

İzolatların genotipik identifikasyonu, *Staphylococcus* cinsine özgü 16S rRNA gen bölgesi ve *S. aureus*'a özgü *femA* gen bölgesi için spesifik primerler kullanılarak belirlenmiştir. Ayrıca *S. aureus* izolatlarının metisilin direncini belirlemek için *mecA* gen bölgesi, Panton Valentine Toksin genini belirlemek için *lukS* gen bölgesi bu bölgelere özgü primerler kullanılarak Al- Talib ve ark., (2009)'nın belirttikleri multipleks PCR yöntemine göre bazı modifikasyonlarla ile belirlenmiştir.

Master miksin hazırlanması: Bir örnek için PCR amplifikasyonu 50 µl toplam hacimde olacak şekilde DNA polimeraz buffer (10x) 5 µl, MgCl₂ (25 mM) 4 µl, forward primer (20mM) her biri için 1'er µl, reverse primer (20mM)) her biri için 1'er µl, dNTP (10mM) 1.5 µl, Taq polimeraz (5U/µl) 1.5 µl, BSA (100x) 4 µl, DNA (200ng/ µl) 3 µl ve son olarak istenilen hacme ultra saf suyla tamamlanarak hazırlanır. Kullanılan malzemeler ve miktarları Çizelge 3.2.3.1.1'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.2.3.1.1. Master miks'in hazırlanma oranları

Maddeler	Kullanım oranları (50 µl)
DNA polimeraz buffer (10x)	5
Forward primer (20mM)	1
Revers primer (20mM)	1
BSA (100x)	4
dNTP (10mM)	1.5
MgCl ₂ (25mM)	4
Taq polimeraz (5U/µl)	1.5
DNA (200ng/ µl)	3
Ultra saf su	İstenen hacme tamamlanır

Master miksler hazırlandıktan sonra PCR tüpleri, örnek adedi kadar numaralandırılıp, içlerine ekstraksiyonu yapılan DNA'dan 3'er µl eklendi ve daha sonra üstüne 47'şer µl hazırlanan master miksten ilave edilip ağızları sıkıca kapatıldı. Hazırlanan tüpler daha sonra termal döngüleme (termal cycler) cihazına yüklenip, istenen programa ayarlandı. Multipleks PCR işlemine ait ısı döngü ve süre diyagramı Çizelge 3.2.3.1.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2.3.1.2. Multipleks PCR işlemine ait ısı döngü ve süre diyagramı

Basamak	Döngü sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre
Başlangıç Denatürasyon	1	94	3 dk
Denatürasyon	30	94	30 sn
Bağlanma	30	50	30 sn
Uzama	30	72	30 sn
Ekstra bağlanma	1	60	30 sn
Son Uzama	1	72	5 dk

PCR işleminden sonra örnekler ve marker Etidium Bromür ilave edilmiş % 1.5'lik agaroz jele yüklendi, elektroforez tankının kapağı kapatılıp elektrotlar uygun pozisyonda bağlandıktan sonra, elektroforez cihazında 90V'da 120 dakika yürütüldü. Elektroforez işleminin ardından ardından jel, dikkatli bir şekilde alınarak bilgisayara bağlı durumdaki görüntüleme cihazına yerleştirildi. UV ışığı altında fotoğraflandıktan sonra, görülen bantlar markere bakılarak değerlendirildi. *16S rRNA* primerleri için 597 bp, *femA* primerleri için 450 bp, *mecA* primerleri için 293 bp ve *lukS* primerleri için 151 bp uzunluğundaki bantlar belirlenmeye çalışıldı.

3.2.4. Pulsed Field Jel Elektroforezi (PFGE)

Tanımlanan *S.aureus* suşlarının genetik akrabalıklarını belirlemek amacıyla, bazı modifikasyonlar uygulanarak, Durmaz (2007) tarafından bildirilen PFGE protokolü kullanıldı.

3.2.4.1. İzolatların hazırlanması

Triptikaz soy agar besiyerine tek koloni pasajı yapılan örneklerin, bir gecelik inkübasyondan sonra saflığı kontrol edildi. Saf kültür halindeki üreyen bu kolonilerden tekrar alınarak triptikaz soy agar besiyerine, tek koloni ekimi yapılarak inkübasyona bırakıldı. Saf halde üremiş olan kolonilerden plastik öze yardımıyla alınarak, 1 ml hücre süspansiyon tamponu (HST) içinde süspanse edildi. Hücre süspansiyonu, 13,000 x g devirde 4 °C'de 2 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant atılıp, pelletin üzerine tekrar 1 ml soğuk HST eklenerek, kısa süreyle vortekslendi. Bakteri yoğunluğu,

spektrofotometre yardımıyla 590 nm'de 1 absorbans (yaklaşık McFarland 4) olacak şekilde ayarlandı ve kırık buz içinde bekletildi.

3.2.4.2. İzolatların agaroz gömülmesi

HST içerisinde % 2'lik düşük erime ısılı agaroz (Low melting agaroz) hazırlandı. Bir erlen içerisinde 0.2 g agaroz, 10 ml HST ile karıştırıldı ve mikro dalga fırında eritildi. Agaroz iyice çözüldükten sonra, erlen 45-50 °C'lik su banyosuna konuldu ve ependorf tüplerine 100'er µl dağıtılarak 45-50 °C'deki kuru ısı bloğunda bekletildi. Her suş için bir agaroz kalıbı işaretlenip buz kabına yerleştirildi. HST içinde hazırlanmış bakteri süspansiyonundan 100 µl alınarak, 50 °C'de tutulan ve içerisinde 100 µl düşük erime ısılı agaroz bulunan tüpe eklendi. Üzerine 3 µl lizostafin (1mg/ml) eklenerek karışımın homojen hale gelebilmesi için birkaç defa pipetaj işlemi yapıldı. Hemen hücre-agaroz karışımından 100 µl hava kabarcığı olmayacak şekilde agaroz kalıp aparatına dağıtıldı. Kalıplar, agaroz katılaşmaya kadar +4 °C'de 15 dakika bekletildi.

3.2.4.3. Agaroz içindeki hücrelerin parçalanması

Her agaroz kalıp için, 1.5 ml' lik steril ependorflara, 0,5 ml lizis I solusyonu konuldu. İçerisinde bakteri bulunan agaroz, kalıptan çıkarılarak lizis I solüsyonuna yerleştirildi. Lizis I solüsyonuna alınan kalıplar 37 °C' de 1 saat çalkalamalı su banyosunda bekletildi. Daha sonra lizis solüsyonu I alınarak ve yerine 0.5 ml hücre lizis II solüsyonu konularak 50 °C'de 30 dk daha çalkalamalı su banyosunda bekletildi.

3.2.4.4. Hücre lizizinden sonra agaroz kalıpların yıkanması

Lizis aşamasından sonra yumuşayan agaroz kalıplarının katılaşması için tüpler buz içerisinde en az 15 dakika bekletildi ve dikkatlice hücre lizis II solüsyonu aspire edildi. Daha sonra agaroz kalıpları her yıkama 30 dakika olmak üzere 50 °C'de 5 ml TE tamponuyla çalkalamalı su banyosunda 3 kez yıkandı. Böylece içinde saflaştırılmış

DNA bulunan agaroz, restriksiyon enzimi (RE) ile kesime hazır hale gelmiş oldu. Son olarak örnekler TE içerisine konularak +4 °C’de saklandı.

3.2.4.5. Agaroz Kalıplarındaki DNA’ nın *Sma*I ile Kesimi

DNA içeren agaroz kalıbı bir lam üzerine alınarak bir bistürü yardımıyla 1/3 oranında kesildi. Parçalardan biri, 100 µl 1x *Sma*I tamponu içine aktarıldı ve çalkalamalı su banyosunda 30 °C’de 10 dakika bekletildi ve daha sonra bu tampon boşaltıldı. Her agaroz kalıbı için aşağıdaki enzim karışımı hazırlandı.

10 µl 10 x *Sma*I tamponu

3 µl *Sma*I enzimi (10 U/µl) (Fermentas)

87 µl steril ultra saf su

Bu karışımın içerisine, enzimin tamponu ile yıkanmış agaroz kalıbı kondu ve çalkalamalı su banyosunda 30 °C’de bir gece inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüpler buzdolabında 15 dakika bekletildi. Kalıplar elektroforez için hazırlandı.

3.2.4.6. Elektroforez jelinin hazırlanması ve kalıpların jele yüklenmesi

2 litre 0,5X TBE solüsyonu hazırlandı ve içerisinden 200 ml ayrılarak kalan tampon elektroforez tankına döküldü. Ayrılan 0.5X TBE ile % 1’lik 200 ml agaroz (pulsed-field certified agarose, Bio-Rad Laboratories) hazırlandı ve mikrodalgada eritildi. Agaroz dökülecek kaset hazırlandı, *Sma*I enzimi ile kesilmiş olan agaroz kalıpların her biri tarak dişlerinin uç kısmına gelecek şekilde yerleştirildi. Tarağın kenar dişlerine marker yüklendi ve kurutma kağıdı ile agaroz kalıplarının kenarındaki sıvının fazlası alındı. Örneğin bulunduğu kısım DNA’nın yürüyeceği yöne gelecek şekilde, tarak agaroz dökülecek kaset içine yerleştirildi. Sıcaklığı yaklaşık 45-50 °C’de olan agaroz hava kabarcığı kalmayacak şekilde kaset içine döküldü. Oda ısısında 20-30 dakika katılaşmaya bırakıldı. Katılaştıktan sonra tarak çok dikkatli bir şekilde çekildi, agaroz kasetinin çerçeveleri çıkarıldı ve tabla üzerindeki agaroz, içerisinde 1800 ml 0.5X TBE tamponu bulunan PFGE tankına yerleştirildi.

3.2.4.7. Elektroforez İşlemi

CHEF Mapper XA sisteminde (Bio-Rad Laboratories, Nazareth, Belgium), *S. aureus* için elektroforez şartları: Başlangıç vuruş süresi 5.3 sn, bitiş vuruş süresi 34.9 sn, vuruş açısı 120°, akım 6 V/cm², sıcaklık 14 °C, elektroforez süresi 20 saat (TBE tamponu pH=8.0) şeklinde uygulandı.

3.2.4.8. Sonuçların gözlenmesi ve analizi

Elektroforez işleminden sonra jel, 5 µg/ml etidyum bromür içeren 500 ml ultra saf su içine alındı ve 30 dakika çalkalanarak boyandı. Jel, UV ışığa altında görüntülendi ve Gel logic imaging system (Kodak Company, NY, USA) kullanılarak fotoğraflandı. Fotoğraflar TIFF formatında kaydedildi. GelCompar II (version 6.6) yazılım sistemi kullanılarak bant profilleri analiz edildi. "Unweighted pair group method with mathematical averaging (UPGMA)" kullanılarak PFGE profillerinin dendogramı çıkarıldı ve kümeleşme analizi yapıldı. Bantlara bağlı "Dice" benzerlik katsayısına göre suşlar arasındaki ilişki belirlendi. Tenover ve ark. (1995) tarafından belirtilen kriterler kullanılarak izolatlar aynı, yakın ilişkili, muhtemel ilişkili ve ilişkisiz olarak değerlendirildi.

3.2.5. *S. aureus* suşlarında metisilin direncinin belirlenmesi

3.2.5.1 Disk difüzyon yöntemi

S. aureus izolatlarının metisilin direnci, ve diğer antibiyotiklere duyarlılıklar Kirby Bauer disk difüzyon yöntemiyle Clinical Laboratory Standarts Institute (CLSI, 2008), önerileri doğrultusunda belirlendi. Bakterilerin kanlı agar besiyerindeki 18-24 saatlik kültürlerinden, steril serum fizyolojik içerisine bir miktar aktarıldı ve 0.5 McFarland (1X10⁸ Koloni oluşturan birim (kob) /ml) bulanıklığında olacak şekilde süspansiyon hazırlandı. Bu süspansiyondan steril pamuklu swap ile alınarak (kültürün fazlası tüpün kenarlarına bastırılarak atıldı) 4 mm kalınlığındaki Mueller-Hinton agar

besiyeri yüzeyine yayıldı. Besiyeri yüzeyi kuruduktan sonra steril pens yardımıyla diskler besiyerine yerleştirildi. 37 °C'lık etüvde 18-24 saat inkübe edildi. Petri kutuları inkübasyondan sonra aydınlık bir ortamda incelendi. İnhibisyon zon çapı bir cetvel ile mm olarak ölçüldü. Zon çapları değerlendirilmesinde CLSI (2008) kriterleri esas alınarak suşlar duyarlı, orta duyarlı ve dirençli olarak belirlendi. Kontrol suşları olarak *S. aureus* ATCC 25923 (MSSA) ve *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA) suşları kullanıldı. Duyarlılık deneyinde kullanılan antibiyotik diskleri ve inhibisyon zon çaplarına göre duyarlılık durumları Çizelge 3.2.5.1'de verildi.

Çizelge 3.2.5.1. Kullanılan antibiyotik diskleri, ve inhibisyon zon çaplarının değerlendirilmesi (CLSI, 2008).

Antibiyotikler	Duyarlılık durumu (Zon çapı mm)		
	Duyarlı (Susceptible)	Orta duyarlı (Intermediate)	Dirençli (Resistant)
Vankomisin (VA) 30 µg	≥15	-	-
Oksasilin (O) 1 µg	≥13	11-12	≤10
Penisilin (P) 10 µg	≥29	-	≤28
Gentamisin (GM) 10 µg	≥15	13-14	≤12
Eritromisin (E) 15 µg	≥23	14-22	≤13
Tetrasiklin (TE) 30 µg	≥19	15-18	≤14
Ofloksasin (OFX) 5 µg	≥18	15-17	≤14
Rifampin 5 µg	≥20	17-19	≤16
Linezolid (LZD) 30 µg	≥21	-	≤20
Meropenem (MEM) 10 µg	≥16	14-15	≤13
Sefuroksim (CXM) 30 µg	≥18	15-17	≤14
Seftazidim (CAZ) 30 µg	≥18	15-17	≤14
Sefalotin (KF) 30 µg	≥18	15-17	≤14
Amoxicillin/Clavulanic Acid (AMC) 30 µg	≥20	-	≤19
Trimetoprim/Sülfametoksazol (SXT) 25 µg	≥16	11-15	≤10

3.2.5.2 Oksasilin agar tarama yöntemi

Mueller-Hinton agar (Merck) besiyerine % 4 NaCl ve 6 µg/ml oksasilin ilave edildi. Kanlı agar besiyerinde üretilen 4-5 adet *S. aureus* suşu kolonisi, steril swapla alınarak serum fizyolojik içinde 0.5 McFarland bulanıklığı olacak şekilde ayarlandı. Bu süspansiyondan swapla alınan kültürün fazlası, tüpün kenarına bastırılarak çevrilip atıldı. Steril swapla plağın yüzeyine çizgi ekimi yapıldı. Kontrol suşları olarak *S. aureus* ATCC 25923 (MSSA) ve ATCC 43300 (MRSA) suşları kullanıldı. 35 °C’de 24 saat inkübasyondan sonra üreme durumları incelendi. Besiyerinde bir veya birden fazla koloninin görülmesi, oksasilin’e direnç olarak değerlendirildi.

3.2.6. Agar tarama ve disk difüzyon yöntemlerinin duyarlılık ve özgüllüklerinin belirlenmesi

Çizelge 3.2.6.1. Testlerin duyarlılık ve özgüllüklerinin hesaplanması için kullanılan çizelge

	Gerçek durum (referans)		Toplam
Test Sonucu	Gerçek pozitif (Gp=a)	Yalancı pozitif Yp=b	T(T+)
	Yalancı negatif (Yn=c)	Gerçek negatif (Gn=d)	T(T-)
Toplam	a+c	b+d	N

Duyarlılık, uygulanan testin gerçek pozitifleri hangi oranda yakalayabildiğini saptayan bir olasılıktır. Testin gerçek pozitifleri ortaya çıkarmakta ne kadar duyarlı olduğunu belirtir. Şu şekilde hesaplanır:

$$\text{Duyarlılık}=(D)= \text{Gerçek pozitif} / \text{Gerçek pozitif}+ \text{Yalancı negatif} \times 100 = a / a+c \times 100.$$

Özgüllük ise uygulanan testin gerçek negatifleri ayırabilme yeteneğini belirten olasılıktır. Şu şekilde hesaplanır:

$$\text{Özgüllük}=(Ö) = \text{Gerçek negatif} / \text{Yalancı pozitif}+ \text{Gerçek Negatif} \times 100 = d / b+d \times 100.$$

Çizelge: 3.2.6.2: Referans teste göre disk difüzyon yönteminin duyarlılık ve özgüllüğünün belirlenmesi için oluşturulan çizelge

	Gerçek durum (referans)		Toplam
Test Sonucu	15 (MRSA)	1 (referans teste göre fazladan 1 suş MRSA olarak belirlenmiştir)	16
	3 (referans teste göre 3 suş MSSA olarak belirlenmiştir)	186 (MSSA)	189
Toplam	18	187	205

Disk difüzyon yöntemi için: Duyarlılık= $15/18 \times 100 = \% 83.3$, Özgüllük= $186/187 \times 100 = \% 99.4$ olarak hesaplandı. Agar tarama yöntemi referans testle duyarlılık ve özgüllük bakımından $\% 100$ uyumlu bulundu.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. *S. aureus* suşlarında metisiline direnç oranı ve kullanılan yöntemlerin duyarlılık ve özgüllükleri

Çalışmamızda 150 adet klinik ve 55 gıda kaynaklı toplam 205 adet *S. aureus* suşu kullanıldı (Çizelge 4.1.1). Tüm suşlar metisilin direnci yönünden, *mecA* geni varlığı (referans test), oksasilin agar tarama testi ve disk difüzyon testi ile araştırıldı.

Çizelge 4.1.1. İncelenen *S. aureus* suşlarının kaynağı ve sayıları

Çalışılan klinik örnek çeşidi	İzolat sayısı	Çalışılan gıda örneği çeşidi	Örnek sayısı	İzolat sayısı
Yara	54	SÜT	260	49
Boğaz	5			
Kan	20			
Mayi	12			
Balgam	13	DONDURMA	150	6
İdrar	27			
Burun	9			
Kulak	10			
Toplam	150		410	55

Multipleks PCR ile *mecA* genini arayarak yaptığımız çalışmada; 205 *S. aureus* suşu arasından 18'i (% 8.8) *mecA* pozitif bulunurken 187'si (% 91.2) negatif bulundu. Oksasilin agar tarama yöntemiyle de aynı sonuçlar gözlemlendi. Disk difüzyon yönteminde ise referans teste göre bir suş fazladan MRSA (yalancı pozitif) olarak saptanırken 3 suş da MSSA (yalancı negatif) olarak belirlendi.

Her üç yöntemle elde edilen bulgular karşılaştırıldığında; PCR ile *mecA* geni varlığını belirleme ve oksasilin agar tarama ile elde edilen sonuçlar, duyarlılık ve özgüllük yönünden birbiri ile % 100 uyumlu bulundu. Disk difüzyon yönteminde ise referans teste göre *mecA* negatif bir suş MRSA olarak ve *mecA* pozitif 3 suş da MSSA olarak saptandı. Referans teste göre disk difüzyon yönteminin duyarlılığı % 83.3, özgüllüğü ise % 99.4 olarak hesaplandı.

Klinik örneklerden izole edilen 150 *S. aureus* suşunun 17'si (% 11.3) metisiline dirençli bulunurken, 55 gıda örneğinden izole edilen bir suş (% 1.8) metisiline dirençli *S. aureus* olarak belirlendi. İncelenen toplam 205 *S. aureus* suşunun 18'inin (% 8.8) metisiline dirençli olduğu tespit edildi (Çizelge 4.1.2).

Çizelge 4.1.2. İncelenen örneklerden izole edilen *S. aureus* suşları, metisiline dirençli olanların sayısı ve yüzde oranları

Örnek	Suş sayısı	MRSA	% oranı
Yara	54	7	12.9
Boğaz	5	1	20
Kan	20	-	-
Mayi	12	3	25
Balgam	13	3	23
İdrar	27	3	11.1
Burun	9	-	-
Kulak	10	-	-
Toplam	150	17	11.3
Süt örneği	49	-	-
Dondurma örneği	6	1	16.6
Toplam	205	18	8.8

4.2. *S. aureus* suşlarının kullanılan antibiyotiklere duyarlılık durumları

Bu çalışmada identifikasyonları yapılmış 205 *S. aureus* suşunun 14 farklı antibiyotiğe karşı duyarlılık durumları araştırıldı.

Klinik materyallerden izole edilen 150 adet *S. aureus* suşunun antibiyogram sonuçları Çizelge 4.2.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.2.1. Klinik materyallerden izole edilen *S. aureus*'ların kullanılan antibiyotiklere karşı dirençli (R), orta duyarlı (I) ve duyarlı (S) suş sayıları ve % oranları (n= 150)

Antibiotikler	R		I		S	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
TE	7	4.7	2	1.3	141	94
P	141	94	0	0	9	6
VA	0	0	0	0	150	100
R	8	5.3	1	0.7	141	94
GM	6	4	1	0.7	143	95.3
OFX	9	6	1	0.7	140	93.3
E	19	12.7	4	2.67	127	84.7
MEM	4	2.7	0	0	146	97.3
LZD	0	0	0	0	150	100
CAZ	18	12	17	11.3	115	76.7
CXM	9	6	3	2	138	92
KF	5	3.3	1	0.7	144	96
SXT	3	2	1	0.7	146	97.3
AMC	7	4.7	0	0	143	95.3

R: Resistant (dirençli), I: Intermediate (orta duyarlı), S: Sensitive (duyarlı)

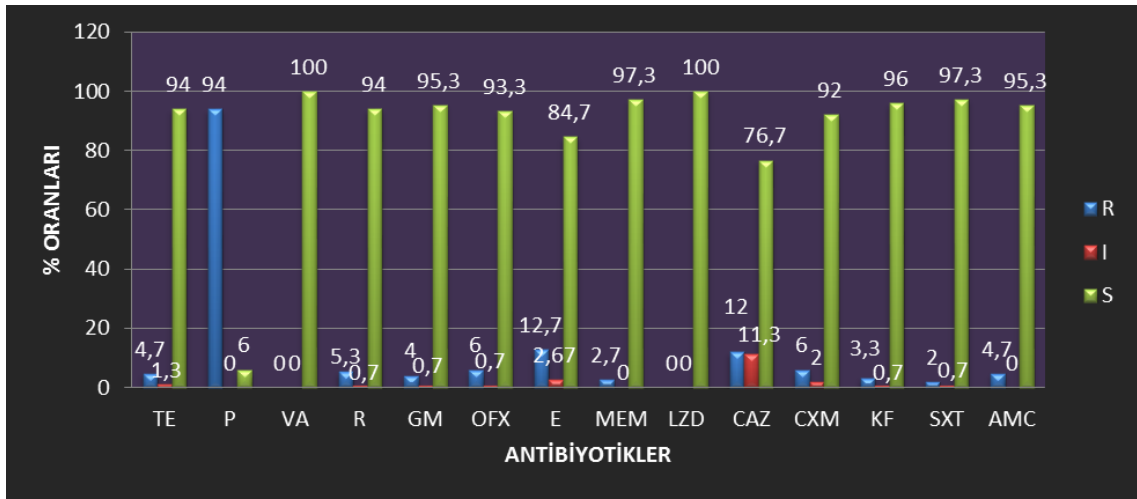
Elde edilen bulgulara göre; beta laktam grubu antibiyotiklerden penisiline (P) karşı 141 (% 94) suş dirençli bulunurken 9 suş (% 6) ise duyarlı olarak belirlendi. Yine aynı gruptan olan amoksisilin/klavulanik asite (AMC) karşı 143 suş (% 95.3) duyarlı olarak saptanırken, 7 suş (% 4.7) ise dirençli bulundu. Deney suşlarından 4'ünün (% 2.7), beta laktam grubu karbapenem olan meropeneme (MEM) direnç gösterdiği, 146 suşun (% 97.3) ise duyarlı olduğu saptandı.

Beta laktam grubu sefalosporinlere karşı duyarlılık durumu: Birinci kuşak sefalosporin olan sefalotine (KF) karşı 5 suş (% 3.3) dirençli, bir suş (% 0.7) orta duyarlı ve 144 suş (% 96) ise duyarlı olarak belirlendi. İkinci kuşak sefalosporin olan sefuroksime (CXM) karşı 9 suş (% 6) dirençli, 3 suş (% 2) orta duyarlı, geriye kalan 138 suşun ise (% 92) duyarlı olduğu saptandı. Üçüncü kuşak sefalosporinlerden biri olan seftazidime (CAZ) 18 suş (% 12) dirençli, 17 suş (% 11.3) orta duyarlı ve geri kalan 115 suş (% 76.7) ise duyarlı olarak belirlendi (Çizelge 4.2.1).

Aminoglikozid grubu antibiyotiklerden gentamisine (GM) karşı, 6 suş (% 4) dirençli, 1 suş (%0.7) orta duyarlı, geriye kalan 143 suş (% 95.3) ise duyarlı olarak belirlendi. Tetrasikline (TE) karşı 7 suşun (% 4.7) dirençli, 2 suşun (% 1.3) orta duyarlı ve 141 suşun (%94) duyarlı olduğu saptandı. Rifampine (R) karşı 8 suş (% 5.3) dirençli, 1 suş (% 0.7) orta duyarlı ve 141 suş (% 94) ise duyarlı bulundu.

Makrolid grubu antibiyotiklerden olan eritromisine (E) karşı 19 suş (%12.7) direnç gösterirken, 4 suş (% 2.67) orta dirençli, geriye kalan 127 suş (%84.7) ise duyarlı

olarak belirlendi. Kinolon grubundan olan ofloksasine (OFX) karşı ise 9 suş (% 6) dirençli, 1 suş (% 0.7) orta duyarlı ve 140 suş (% 93.3) ise duyarlı olarak saptandı. Trimetoprim/sulfametoksazole (SXT) karşı 3 suş (% 2) dirençli, 1 suş (% 0.7) orta duyarlı ve 146 suş (%97.3) duyarlı olarak belirlendi. Klinik örneklerden izole edilen *S. aureus* suşlarının hiçbirinde vankomisin (VA) ve linezolid (LZD) antibiyotiklerine karşı direnç tespit edilmedi (Çizelge 4.2.1). Klinik suşların dirençli, orta duyarlı ve duyarlı sayılarının % oranları Şekil 4.2.1'de verilmiştir.



Şekil 4.2.1. Klinik materyallerden izole edilen *S. aureus* suşlarının dirençli, orta duyarlı ve duyarlı % oranları

Süt ve dondurma örneklerinden izole edilen 55 adet *S. aureus* suşunun antibiyogram sonuçları Çizelge 4.2.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2.2. Gıda örneklerinden izole edilen *S. aureus* 'ların kullanılan antibiyotiklere karşı dirençli (R), orta duyarlı (I) ve duyarlı (S) suş sayıları ve % oranları (n=55)

Antibiotikler	R		I		S	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
TE	2	4.6	0	0	53	96.4
P	38	69.1	0	0	17	30.9
VA	0	0	0	0	55	100
R	0	0	0	0	55	100
GM	1	2	0	0	54	98
OFX	0	0	1	2	54	98
E	0	0	1	2	54	98
MEM	0	0	0	0	55	100
LZD	0	0	0	0	55	100
CAZ	1	2	0	0	54	98
CXM	1	2	0	0	54	98
KF	0	0	0	0	55	100
SXT	0	0	0	0	55	100
AMC	0	0	0	0	55	100

Elde edilen bulgulara göre süt ve dondurma örneklerinden izole edilen *S. aureus* suşlarının 38'i (% 69.1) penisilinde karşı dirençli bulunurken 17'si (% 30.9) duyarlı olarak belirlendi. Gentamisin, seftazidim ve seforoksime karşı 1 suş (% 2), tetrasikline karşı 2 (% 4.6) suş dirençli olarak tespit edilmiştir. Vankomisin, rifampin ofloksasin, eritromisin, meropenem, linezolid, sefalotin, trimetoprim/sulfametoksazol ve amoksisilin/klavulonik asite karşı herhangi bir direnç saptanmadı (Çizelge 4.2.2).

MRSA ve MSSA suşlarının kullanılan çeşitli antibiyotiklere direnç dağılımı Çizelge 4.2.3'de özetlenmiştir.

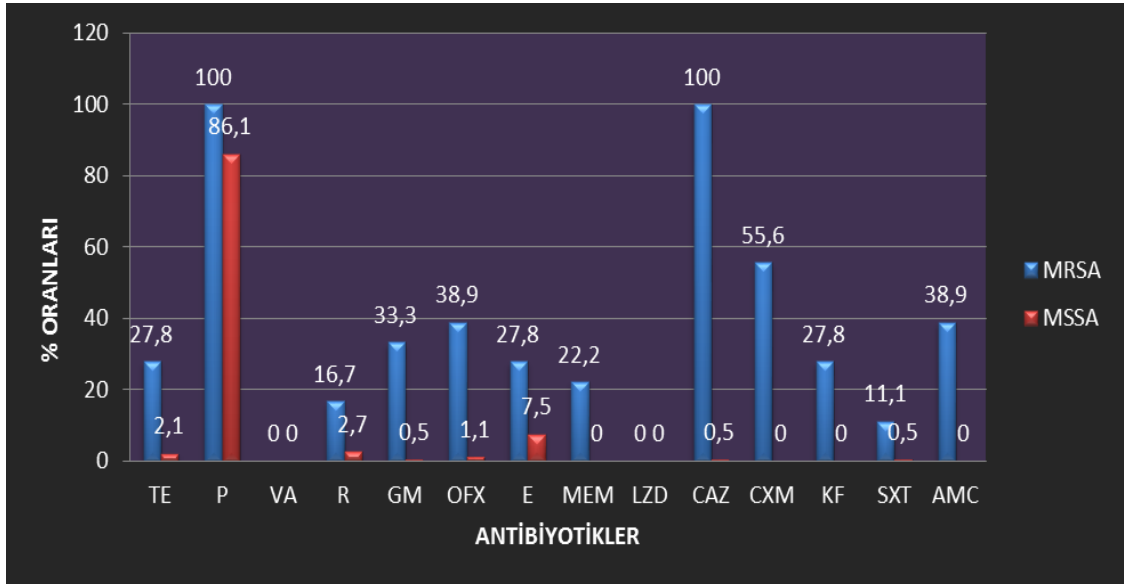
Çizelge 4.2.3. MRSA ve MSSA suşlarının kullanılan antibiyotiklere karşı dirençli suş sayıları ve % oranları

Antibiyotikler	MRSA (n=18)		Antibiyotikler	MSSA (n=187)	
	Sayı	%		Sayı	%
TE	5	27.8	TE	4	2.1
P	18	100	P	161	86.1
VA	0	0	VA	0	0
R	3	16.7	R	5	2.7
GM	6	33.3	GM	1	0.5
OFX	7	38.9	OFX	2	1.1
E	5	27.8	E	14	7.5
MEM	4	22.2	MEM	0	0
LZD	0	0	LZD	0	0
CAZ	18	100	CAZ	1	0.5
CXM	10	55.6	CXM	0	0
KF	5	27.8	KF	0	0
SXT	2	11.1	SXT	1	0.5
AMC	7	38.9	AMC	0	0

MRSA: Methicillin resistance *S. aureus*, MSSA: Methicillin sensitive *S. aureus*

Elde edilen sonuçlara göre MRSA suşlarının tamamı (%100) penisiline dirençli bulunurken MSSA suşlarında en yüksek direnç 161 suşla (% 86.1) penisiline karşı belirlendi. Yine MRSA suşlarının tamamının (%100) seftazidime karşı dirençli olduğu belirlenirken MSSA suşlarının sadece biri (% 0.5) bu antibiyotiğe direnç göstermiştir. MRSA suşlarının penisilin ve seftazidimden sonra en yüksek direnç oranının belirlendiği antibiyotik ise 10 suşla (% 55.6) sefuroksim olmuştur. MSSA suşlarında ise bu antibiyotiğe karşı herhangi bir direnç görülmedi. MRSA suşlarında ofloksasin ve amoksisilin/klavulanik asit'e karşı 7 suşun (% 38.9) dirençli olduğu tespit edilirken MSSA suşlarında ofloksasin'e karşı 2 suşun (1.1) dirençli olduğu, amoksisilin/klavulanik asite karşı hiçbir suşun direnç göstermediği tespit edildi.

MRSA ve MSSA suşlarındaki gentamisin direnci sırasıyla % 33.3, % 0.5, eritromisin direnci % 27.8, % 7.5, tetrasiklin direnci % 27.8, % 2.1, sefalotin direnci % 27.8, % 0, meropenem direnci % 22.2, % 0, rifampin direnci % 16.7, % 2.7 ve trimetoprim/sulfametoksazol direnci % 11.1, % 0.5 olarak tespit edildi. MRSA ve MSSA suşlarında vankomisine ve linezolid direnç saptanmadı (Çizelge 4.2.3).



Şekil 4.2.2. MRSA ve MSSA suşlarının kullanılan antibiyotiklere karşı belirlenen direnç % oranları

Klinik, süt ve dondurma örneklerden izole edilen toplam 205 *S. aureus* suşunun tamamının, kullanılan 14 farklı antibiyotiğe karşı gösterdiği durumlar genel olarak değerlendirildi. Sonuçlar Şekil 4.2.3’de gösterilmiştir. Buna göre 205 suşun, 179’u (% 87.3) penisiline karşı dirençli bulundu. Direnç bakımından bu antibiyotik ilk sırayı aldı. Toplam suşların 19’u (% 9.3) eritromisine ve yine 19 suş (% 9.3) seftazidime dirençli bulundu ve bu antibiyotiklere karşı direnç penisilinin ardından ikinci sırayı aldı. Direnç bakımından üçüncü sırayı 10 suş (% 4.9) ile sefuroksim, dördüncü sırayı ise 9’ar suş (% 4.4) ile tetrasiklin ve ofloksasin’in aldığı görüldü.

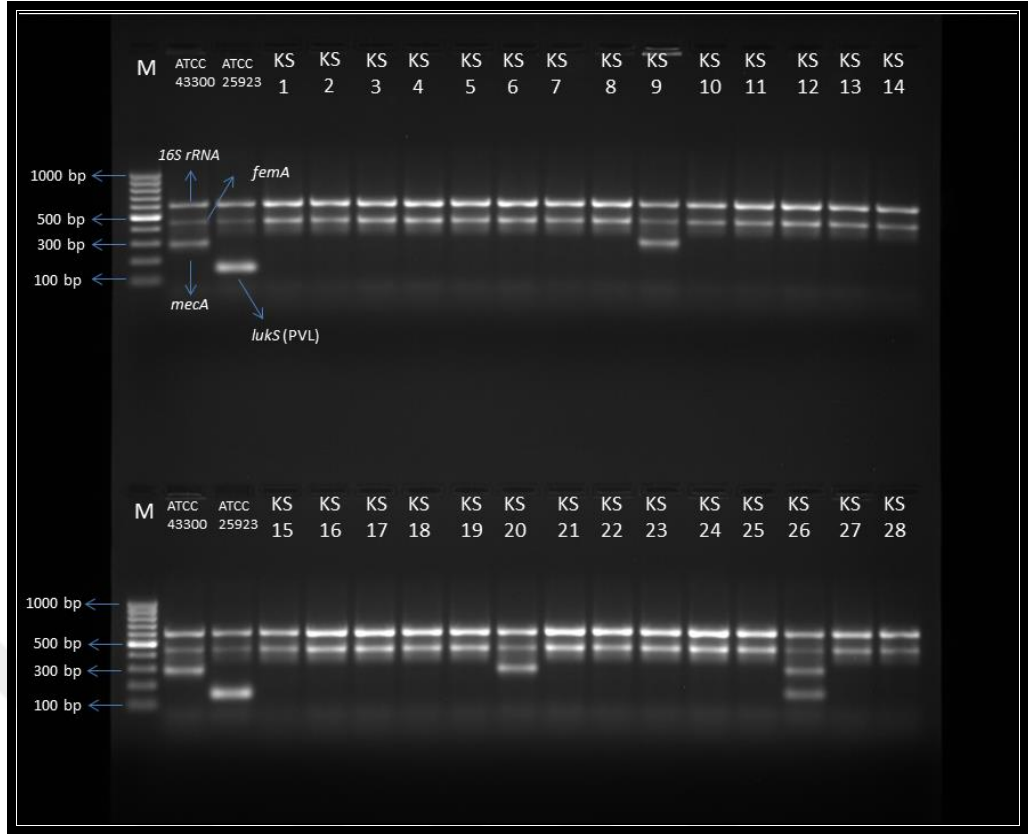
Antibiyotikler içerisinde, test edilen suşlar üzerinde en etkili antibiyotiklerin vankomisin ve linezolid olduğu tespit edildi. Suşların tamamının (% 100) bu antibiyotiklere duyarlı olduğu görüldü. Bunları ikinci sırada meropenem ve trimetoprim/sulfametoksazolün takip ettiği ve 201 suş (% 98) üzerinde etkili oldukları belirlendi. Sefalotin, 199 suş (% 97.1) ile üçüncü; Amoksisilin/klavulanik asitin ise 198 suş (% 96.6) ile dördüncü sırada yer aldığı saptandı (Şekil 4.2.3).



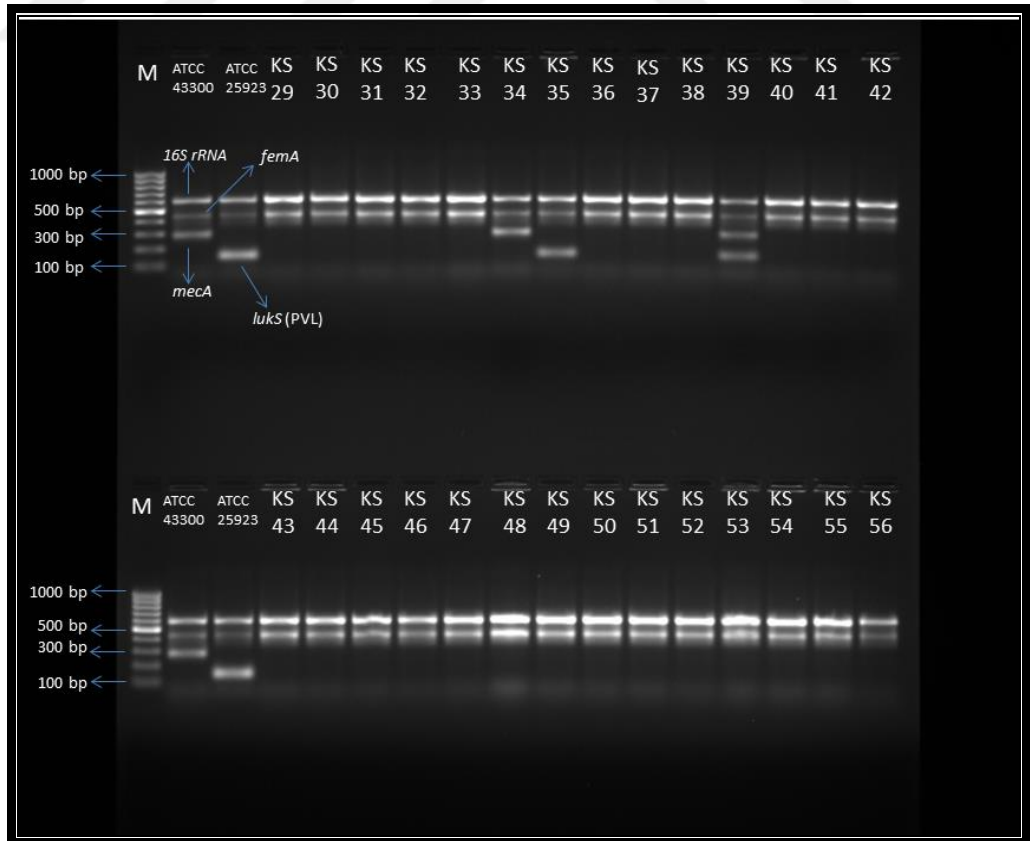
Şekil 4.2.3. Antibiyotiklere duyarlılık sonuçlarının genel değerlendirilmesi, a: Toplam duyarlı (S), orta duyarlı (I) ve dirençli (R) suş sayıları, b: % R oranları

4.3. *S. aureus* suşlarının multipleks PCR analizi

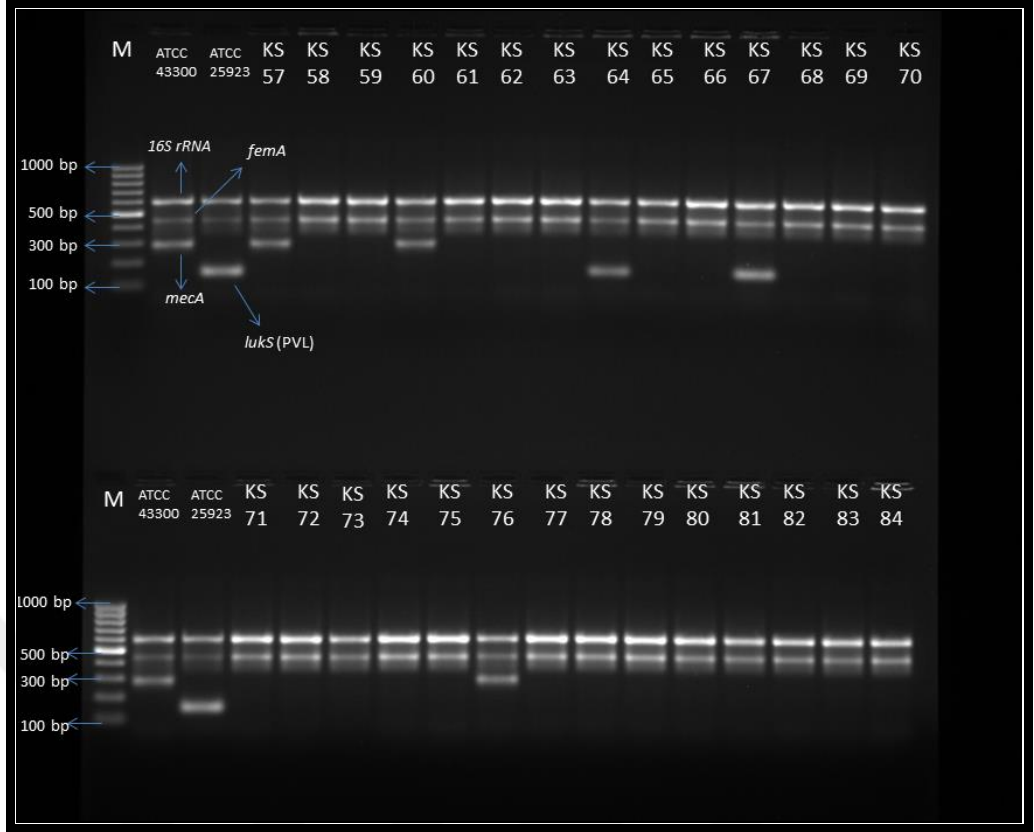
Çalışmada, izole edilen 205 *S. aureus* suşunda multipleks PCR'la 16S *rRNA*, *femA*, *mecA* ve *lukS* genlerinin varlığı belirlendi. Çalışmadan elde edilen jel görüntüleri Şekil 4.3.1 - 4.3.8' de verilmiştir.



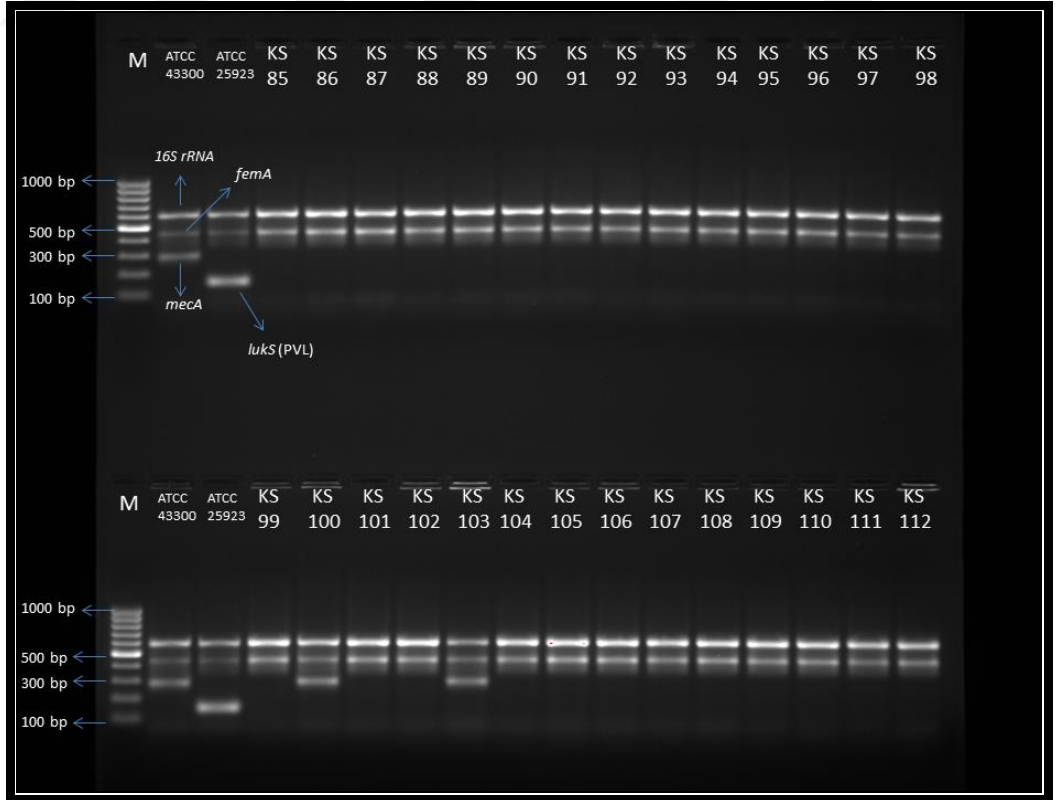
Şekil 4.3.1. *S. aureus* suşlarının multipleks PCR jel görüntüsü (Sırasıyla M: Marker, *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA), *S. aureus* 25923 (MSSA), KS: Klinik suş 1-28)



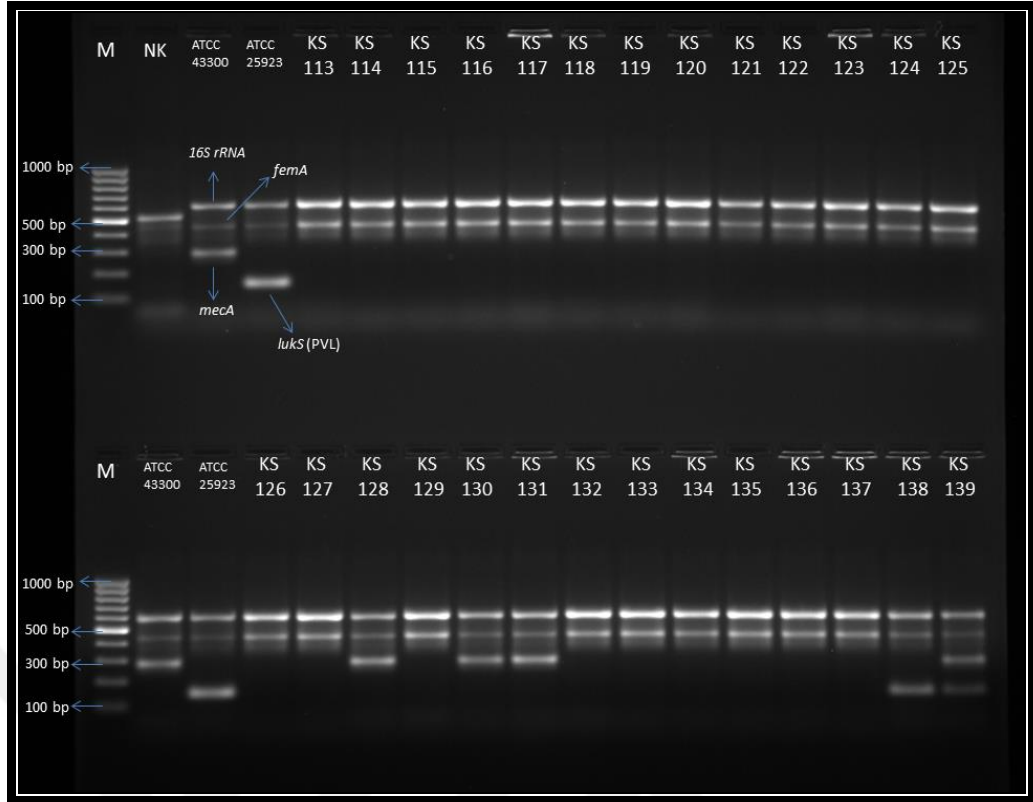
Şekil 4.3.2. *S. aureus* suşlarının multipleks PCR jel görüntüsü (Sırasıyla M: Marker, *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA), *S. aureus* 25923 (MSSA), KS: Klinik suş 29-56)



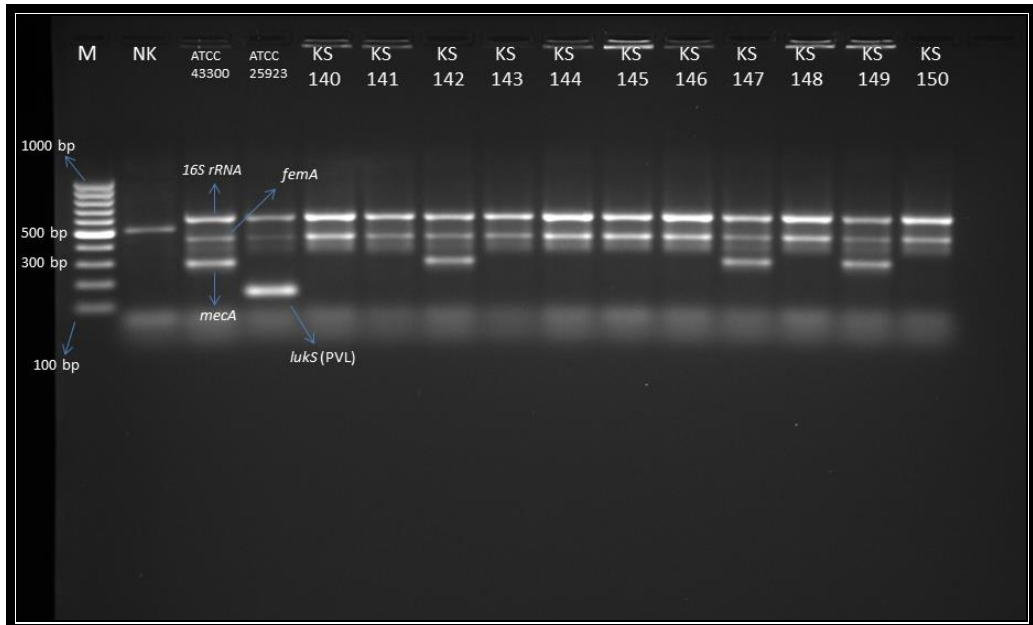
Şekil 4.3.3. *S. aureus* suşlarının multipleks PCR jel görüntüsü (Sırasıyla M: Marker, *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA), *S. aureus* 25923 (MSSA), KS: Klinik suş 57-84)



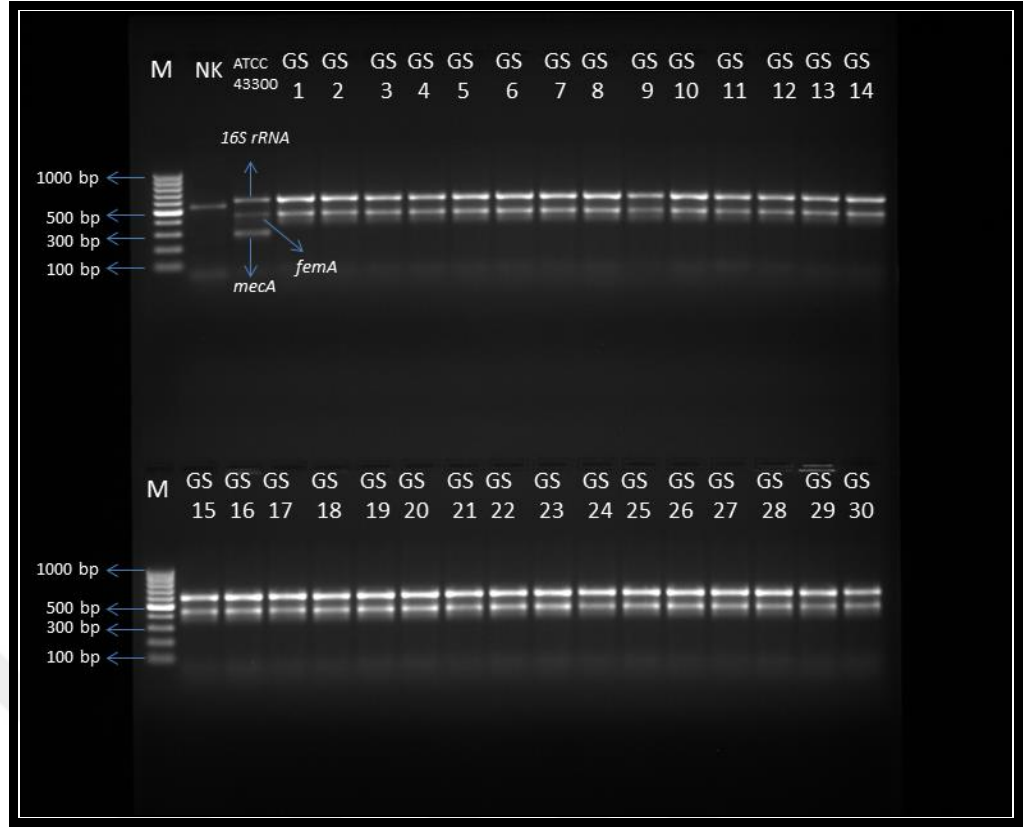
Şekil 4.3.4. *S. aureus* suşlarının multipleks PCR jel görüntüsü (Sırasıyla M: Marker, *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA), *S. aureus* 25923 (MSSA), KS: Klinik suş 85-112)



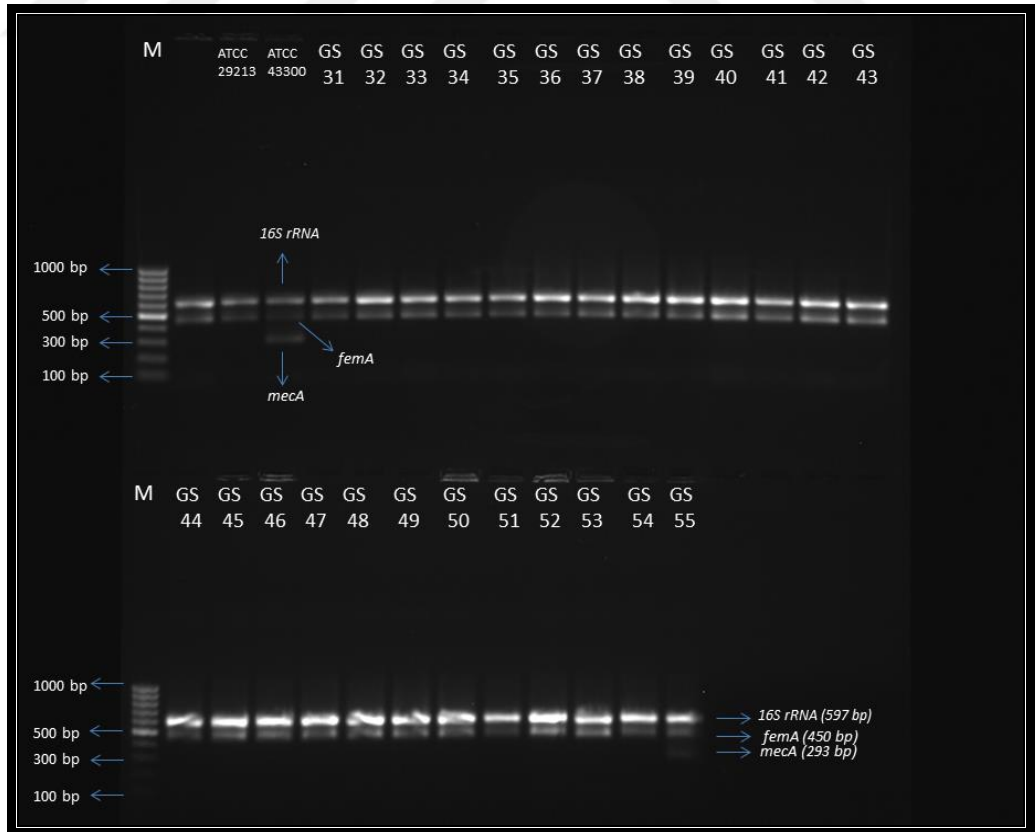
Şekil 4.3.5. *S. aureus* suşlarının multipleks PCR jel görüntüsü (Sırasıyla M: Marker, NK: Negatif kontrol *S. epidermidis* NRRL B-4268, *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA), *S. aureus* 25923 (MSSA), KS: Klinik suş 113-139)



Şekil 4.3.6. *S. aureus* suşlarının multipleks PCR jel görüntüsü (Sırasıyla M: Marker, NK: Negatif kontrol *S. epidermidis* NRRL B-4268, *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA), *S. aureus* 25923 (MSSA), KS: Klinik suş 140-150)



Şekil 4.3.7. *S. aureus* suşlarının multipleks PCR jel görüntüsü (Sırasıyla M: Marker, NK: Negatif kontrol *S. epidemidis* NRRL B-4268, *S. aureus* ATCC 43300, GS: Gıda suşu 1-30)

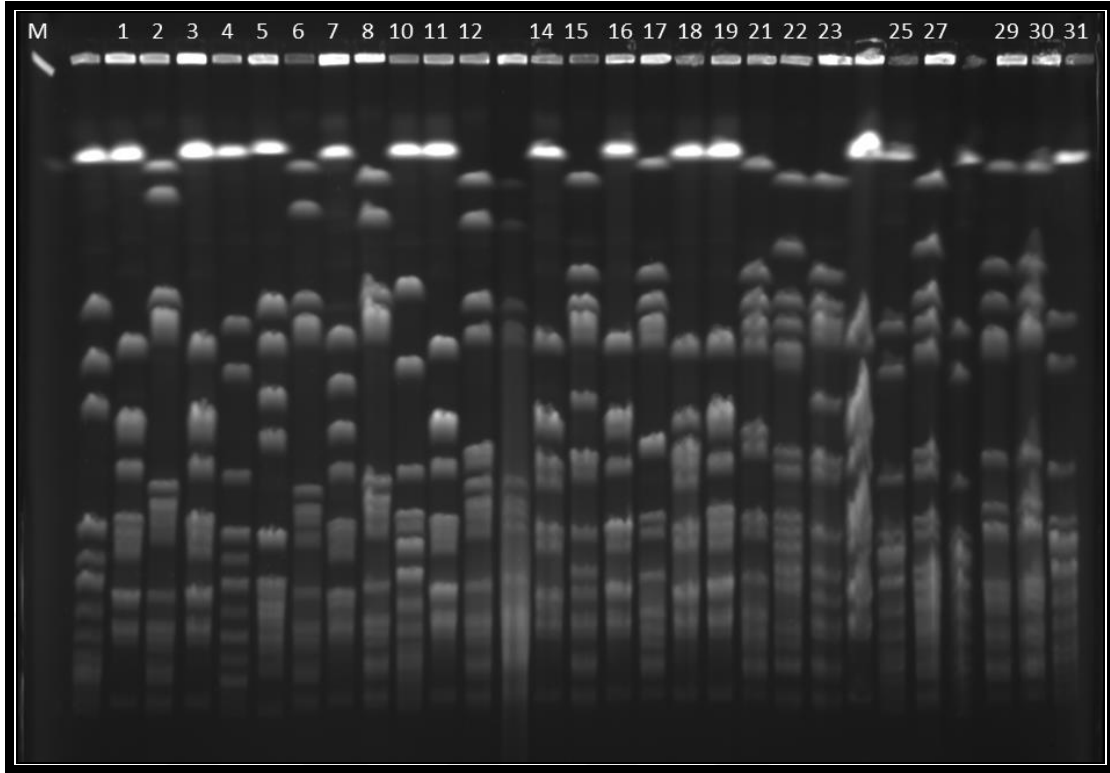


Şekil 4.3.8. *S. aureus* suşlarının multipleks PCR jel görüntüsü (Sırasıyla M: Marker, *S. aureus* 29213 (MSSA), *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA), GS: Gıda suşu 31-55)

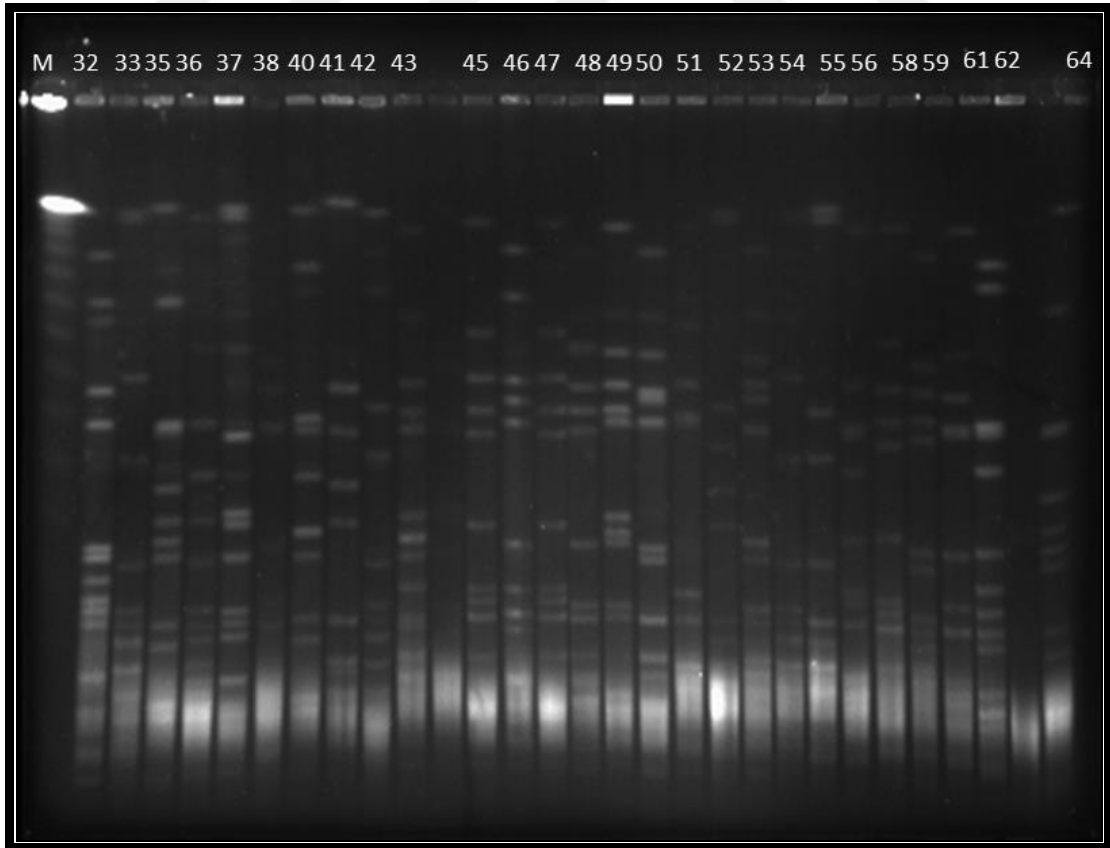
Elde edilen bulgulara göre çalışılan 205 *S. aureus* suşlarının tamamında 16s *rRNA* ve *femA* gen bölgesi belirlenmiştir. *mecA* geni ise KS9, KS20, KS26, KS34, KS39, KS57, KS60, KS76, KS100, KS103, KS128, KS130, KS131, KS139, KS142, KS147 ve KS149 no'lu suşlar olmak üzere toplam 17 klinik kaynaklı suşda tespit edildi. Gıda kaynaklı suşların ise sadece birinde (% 1.8) (GS55: dondurma izolatu) *mecA* geni saptandı. Böylelikle çalışılan 205 *S. aureus* suşunun 18'i metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) olarak belirlendi. Panton Valentin Toksin geni ise (*lukS*) klinik kaynaklı KS26, KS35, KS39, KS64, KS67, KS138 ve KS139 no'lu suşlarda (7 suş, % 4.6) tespit edildi. Gıda kaynaklı suşların hiç birinde PVL geni belirlenmedi (Şekil 4.3.1 - 4.3.8).

4.4. *S. aureus* suşlarının PFGE analiz sonuçları

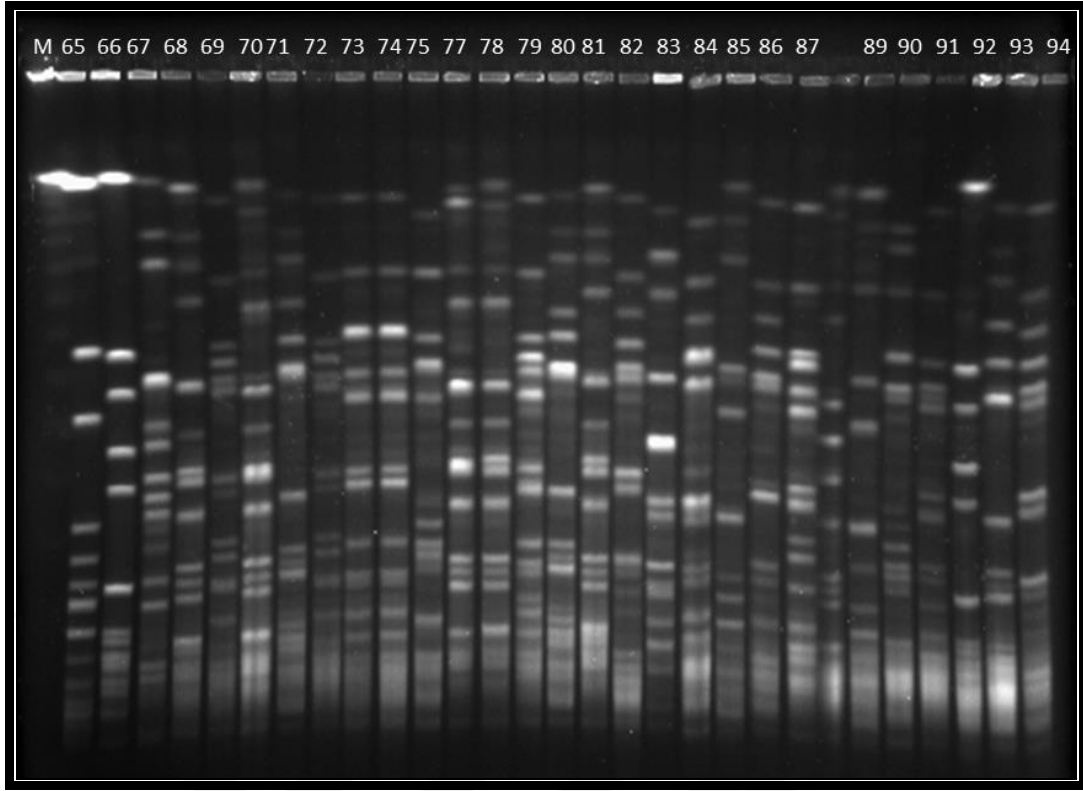
Çalışmada, Durmaz (2007) tarafından önerilen PFGE metodu, bazı modifikasyonlar yapılarak kullanıldı. PFGE analizinde, DNA fragmanları oluşturmak amacıyla; *Serratia marcescens* bakterisinden elde edilen *SmaI* restriksiyon enzimi kullanıldı. Elektroforez şartları: Başlangıç vuruş süresi 5.3 sn, bitiş vuruş süresi 34.9 sn, vuruş açısı 120°, akım 6 V/cm², sıcaklık 14 °C, elektroforez süresi 20 saat (TBE tamponu pH=8.0) şeklinde uygulandı. Belirtilen şartlar elektrotlar arasında sıralı olarak 20 saat boyunca devam etti. Elektroforez işlemi sonrasında boyanarak elde edilen jel görüntüleri Şekil 4.4.1-4.4.8'de gösterilmiştir. Suşlar arasındaki muhtemel klonal ilişkiyi belirlemek amacıyla, elde edilen bant profilleri GelCompar II (version 6.6) yazılımı kullanarak değerlendirildi. Değerlendirmede tolerans % 0.5 olarak uygulandı. UPGMA metodu ile dendrogram oluşturuldu ve kümeleşme analizi yapıldı. Dice benzerlik katsayısı (Dice similarity coefficient) kullanılarak suşlar arasındaki ilişki belirlendi. Eşik değer (cut-off) olarak % 80 alınarak genotipler (PFGE tipleri) ve bunlara bağlı alt tipler belirlendi (Carrico ve ark., 2005).



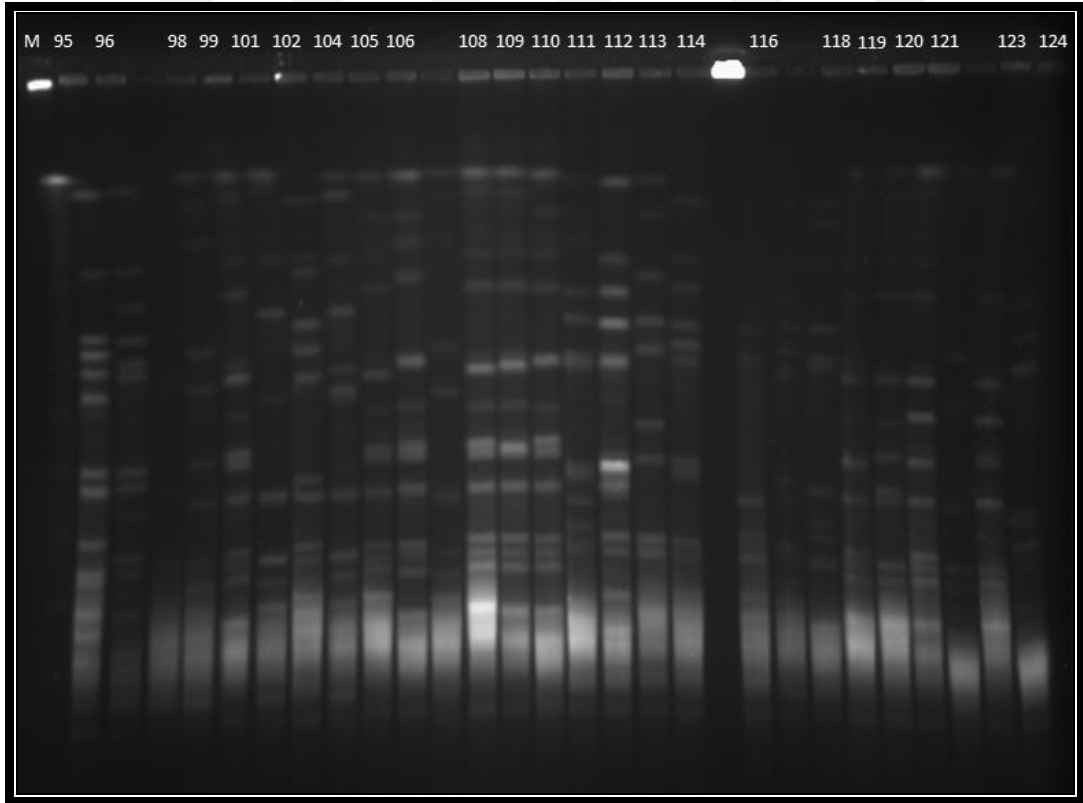
Şekil 4.4.1. M (Marker), KS (Klinik suş) 1-8, 10-12, 14-19, 21-23, 25,27 ve 29-31 no'lu suşların, SmaI ile elde edilen PFGE bant profilleri



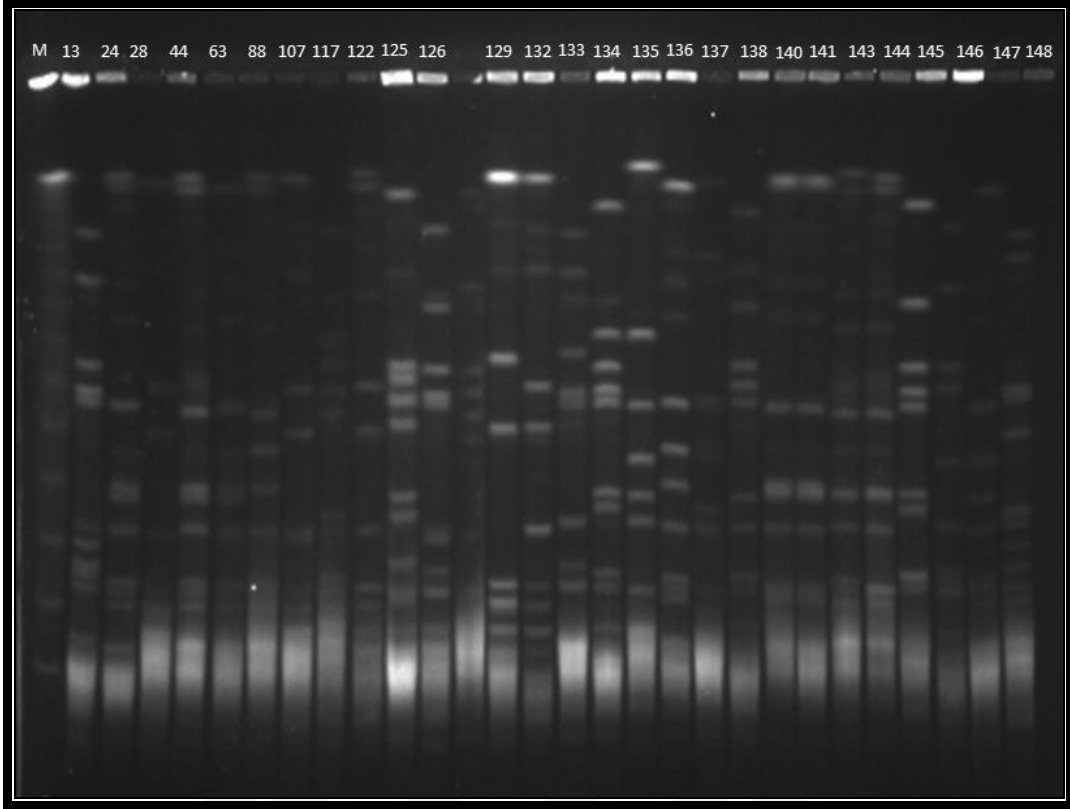
Şekil 4.4.2. Marker, KS (Klinik suş) 32,33, 35-38, 40-41, 45-56, 58, 59, 61, 62 ve 64 no'lu suşların, SmaI ile elde edilen PFGE bant profilleri



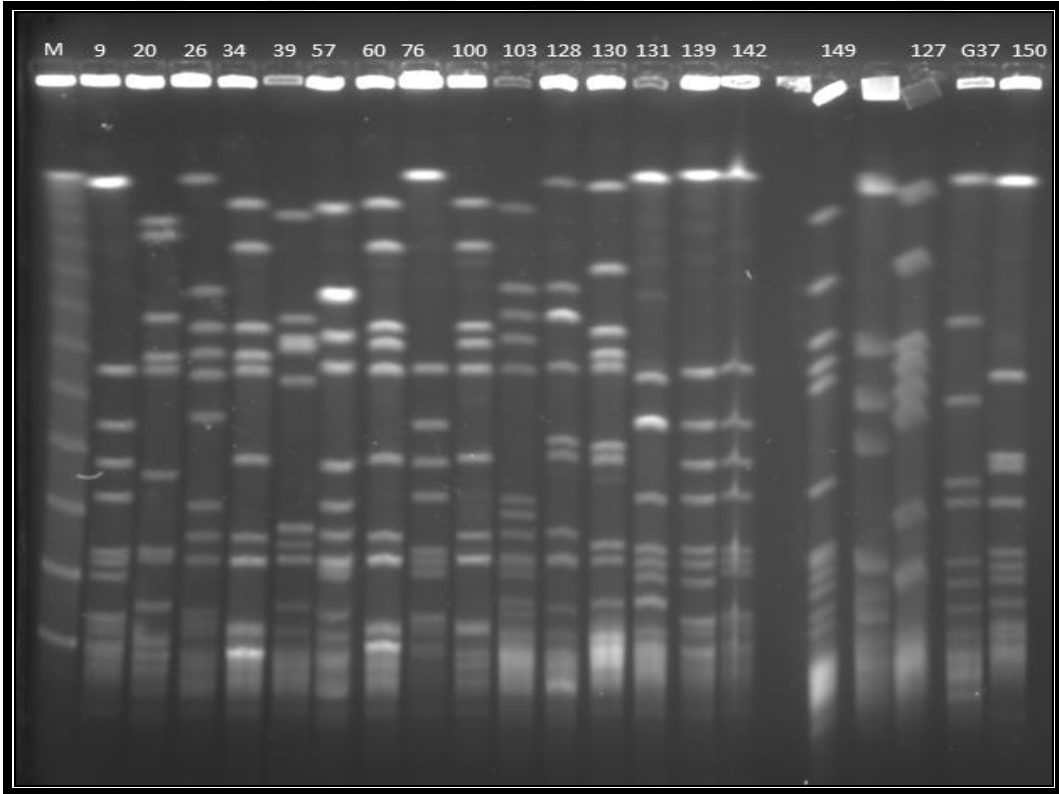
Şekil 4.4.3. Marker, KS (Klinik suş) 65-75, 77-87, 89-94 no'lu suşların, SmaI ile elde edilen PFGE bant profilleri



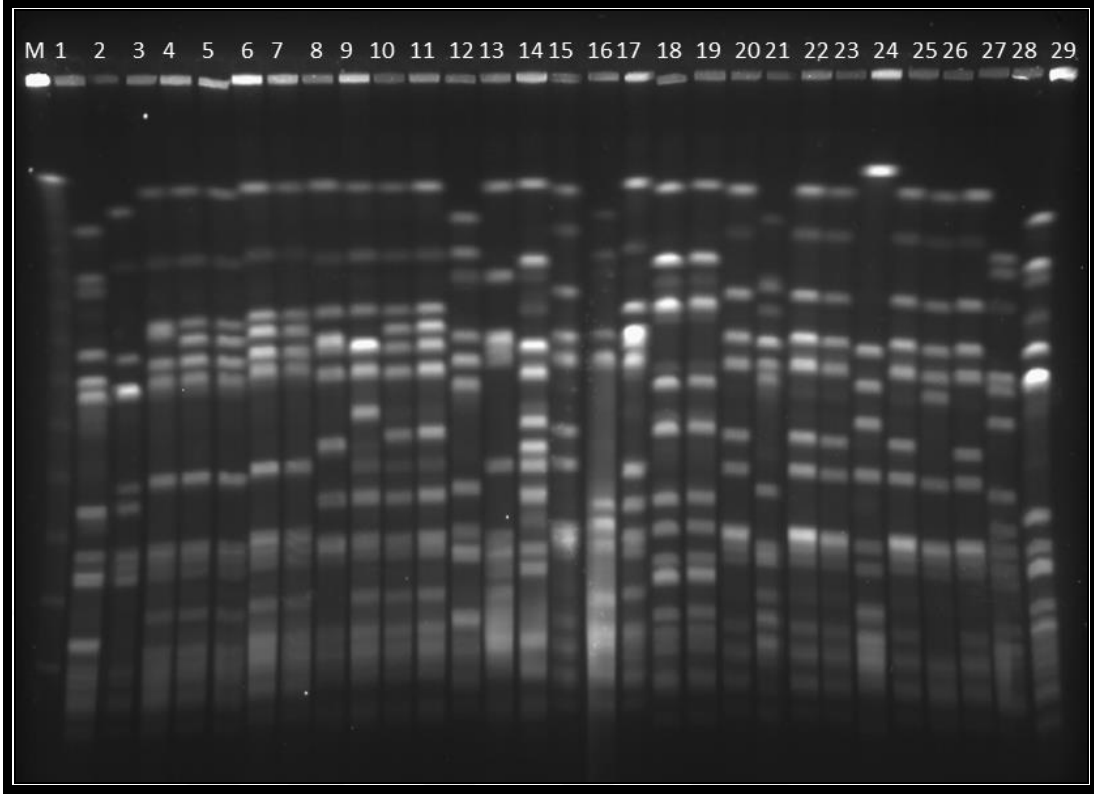
Şekil 4.4.4. Marker, KS (Klinik suş) 95, 96, 98, 99, 101, 102, 104-106, 108-114, 116, 118-121, 123, ve 124 no'lu suşların, SmaI ile elde edilen PFGE bant profilleri



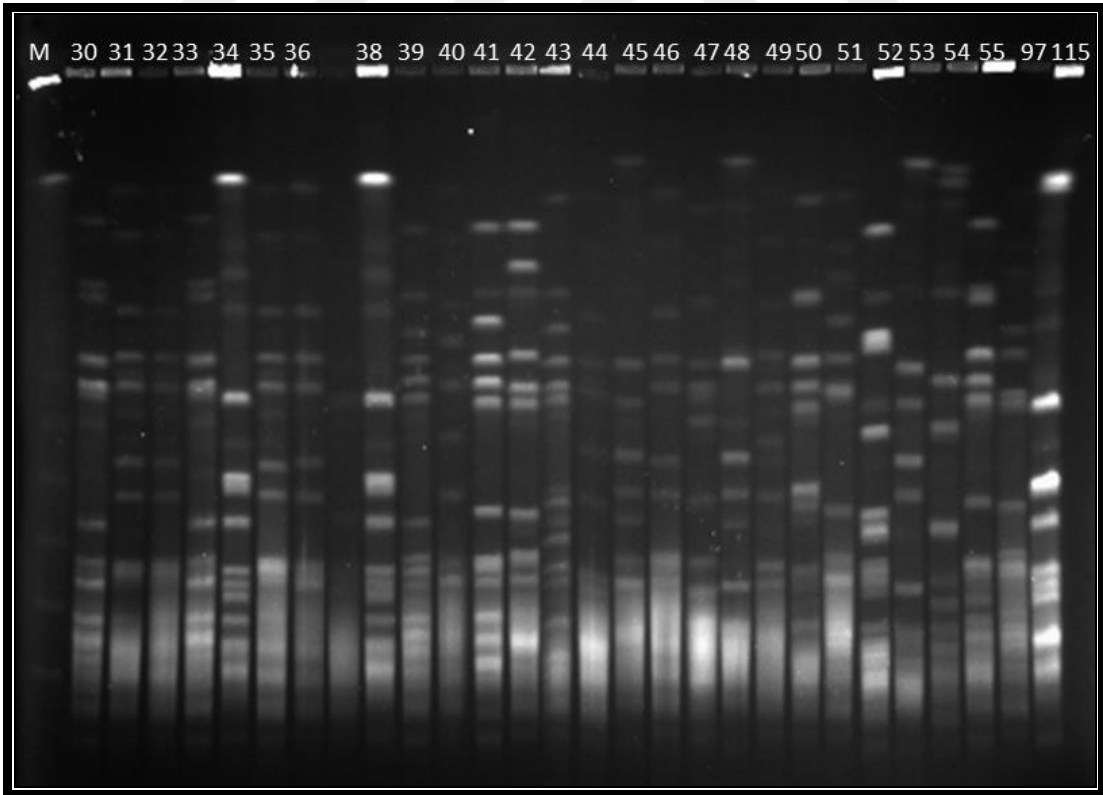
Şekil 4.4.5. Marker, KS (Klinik suş) 13, 24, 28, 44, 63, 88, 107, 117, 122, 125, 126, 129, 132-138, 140, 141, 143-146, 147 (MRSA) ve 148 no'lu suşların, SmaI ile elde edilen PFGE bant profilleri



Şekil 4.4.6. Marker, KS (Klinik suş) 9, 20, 26, 34, 39, 57, 60, 76, 100, 103, 128, 130, 131, 142 ve 149 (MRSA Suşları) 127, 150 ve GS (Gıda suşu) 37 no'lu suşların, SmaI ile elde edilen PFGE bant profilleri



Şekil 4.4.7. Marker, GS (Gıda suşu) 1-29 no'lu suşların, SmaI ile elde edilen PFGE bant profilleri



Şekil 4.4.8. Marker, GS (Gıda suşu) 30-36, 38-54, 55 (MRSA) ve KS (Klinik suş) 97 ve 115 no'lu suşların, SmaI ile elde edilen PFGE bant profilleri.

Gıdalardan izole edilen *S. aureus* suşlarının, *Sma*I enzimiyle oluşturulan bant profilleri Şekil 4.4.7 ve 4.4.8'de gösterilmiştir. Bu suşlardan elde edilen bant profillerine göre yapılan analiz sonucu oluşturulan dendogram Şekil 4.4.9'da verilmiştir.

Gıda suşları içerisinde, birbirinden farklı 43 pulso tip belirlendi (A-AP). Bu tiplerin de kendi içerisinde dokuz alt tipe ayrıldığı saptandı (Şekil 4.4.9). Bu gruplar içinde en fazla alt tipe sahip olan grubun, üç alt tipe AÖ grubu (AÖ1-AÖ3) olduğu belirlendi. GS 26 (AÖ1) ve GS 27 (AÖ2) no'lu suşlar arasındaki genetik benzerliğin % 88.9 olduğu ve bu iki suşun muhtemel ilişkili olduğu saptandı. GS 25 (AÖ3) no'lu suşun ise GS 26 ve GS 27 no'lu suşlar ile % 80.7 oranında benzer olduğu, yani bu iki suş ile muhtemel ilişkili olduğu tespit edildi. AÖ pulstotipine ait bu suşların aynı bölgeden toplanan sütlerden köken aldığı belirlenmiştir.

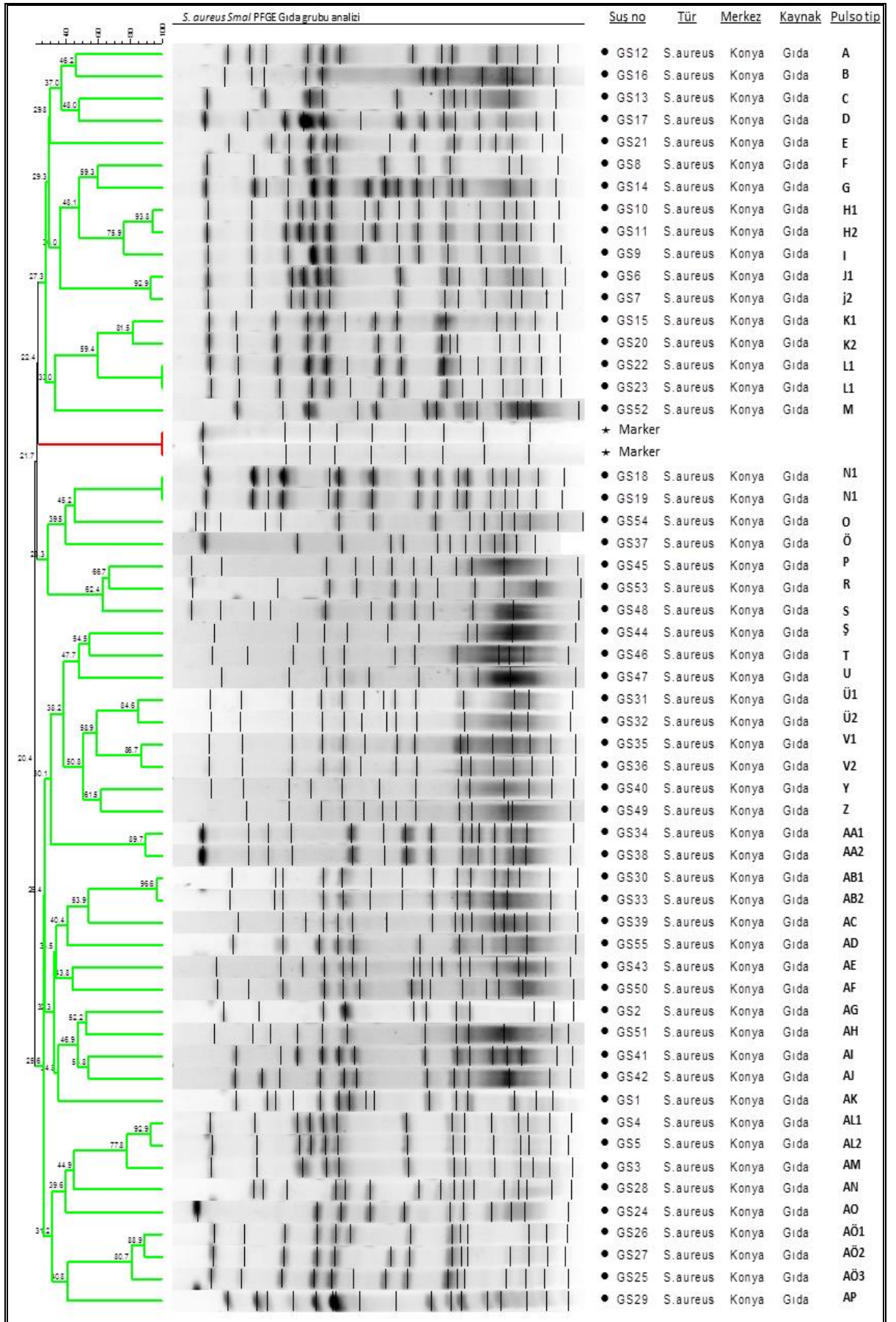
Alt tip oluşturan farklı bir pulstotip iki alt tipe sahip olan H grubudur (Şekil 4.4.9). H1 alt tipini gösteren GS 10 no'lu suş ve H2 alt tipini gösteren GS 11 no'lu suşların % 93.8 benzerlik oranına sahip olduğu yani bu iki suşun yakın ilişkili olduğu tespit edildi. Benzer şekilde yakın ilişkili suş durumu J pulstotipinde yer alan J1 (GS 6) ve J2 (GS 7) alt tipleri arasında da saptandı. Bu iki suş arasındaki klonal benzerliğin %92.9 olduğu belirlendi.

Yine iki alt tipe sahip olan K grubuna bakacak olursak, K1 alt tipini gösteren GS 15 ve K2 alt tipini gösteren GS 20 no'lu suşların % 81.5 ile muhtemel ilişkili izolat oldukları söylenebilir. Bu iki suş farklı bölgelerden toplanan süt örneklerinden izole edilmiştir.

GS 22 (L1) ve GS 23 (L1) no'lu suşlar arasında % 100 benzerlik oranı belirlendiğinden dolayı bu iki suşun aynı izolat olduğu saptandı. Benzer şekilde GS 18 (N1) ve GS 19 (N1) no'lu suşlarda % 100 benzerlik oranı ile aynı izolat oldukları belirlendi (Şekil 4.4.9).

Muhtemel ilişkili izolat durumu % 84.6 benzerlik oranı ile GS 31 (Ü1) ve GS 32 (Ü2) no'lu izolatlar arasında da belirlenmiştir. Bu izolatlar da aynı bölgeden alınan süt örneklerinden izole edilen suşlardır. GS 35 (V1) ve GS 36 (V2) no'lu suşlar ise % 86.7 benzerlik oranı ile muhtemel ilişkili izolat olarak saptandı. GS 34 (AA1) ve GS 38 (AA2) no'lu suşlar arasındaki benzerlik oranının 89.7 olduğu yani bu suşların da muhtemel ilişkili izolat oldukları tespit edildi.

GS 30 (AB1) ve GS 33 (AB2) no'lu suşların aynı kaynaktan geldiği, klonal olarak % 96.6 benzerlik oranına sahip ve yakın ilişkili oldukları tespit edildi. GS 4 (AL1) ve GS 5 (AL2) no'lu suşlarda ise % 92.9 oranında benzerlik görüldü (Şekil 4.4.9)



Şekil 4.4.9. Gıdalardan izole edilen *S. aureus* suşlarının klonal ilişkisini gösteren dendrogram (UPGMA, Dice, % 0.5 tolerans)

Yukarıda bahsedilen dokuz grup içinde yer alan alt tiplerin dışında kalan suşlar ise ilişkisiz izolatlar olarak tespit edildi. Bu suşlar arasındaki benzerlik oranının % 20.4-77.8 oranları arasında değiştiği belirlendi. Gıda izolatlarının bütününe bakıldığında birbirleri ile genetik çeşitliliğin fazla olduğu; buna bağlı olarak da klonal ilişkilerinin az olduğu görüldü. Daha çok aynı bölgeden toplanan sütlerden izole edilen izolatların birbirleri ile muhtemel ve yakın ilişkili olduğu belirlendi. Dondurma örnekleri ile süt örnekleri arasında herhangi bir muhtemel veya yakın ilişki durumu saptanmadı.

Çeşitli klinik kaynaklardan izole edilen *S. aureus* suşlarının, *Sma*I enzimiyle oluşturulan bant profilleri Şekil 4.4,1- 4.4.6'da gösterilmiştir. Bu suşlardan elde edilen bant profillerine göre yapılan analiz sonucu, oluşturulan dendogram Şekil 4.4.10'da gösterilmiştir.

Toplam 150 klinik *S. aureus* suşu 137 farklı pulsotip göstermiştir. Bu 137 grup içerisinde ise 12 grup kendi içerisinde alt gruplara ayrılmıştır (Şekil 4.4.10). En fazla alt tip bulunduran grup, üç alt tipe sahip olan PT 132 grubudur. Alt tiplerde KS 76 (PT 132a) ve KS 142 (PT 132b) suşları arasında % 87 oranında klonal benzerlik belirlendi. MRSA olarak saptanan bu iki suş yara örneğinden izole edilmiş olup bu suşların muhtemel ilişkili olabileceği düşünüldü. KS 9 (PT 132c) no'lu MRSA suşunun da bu suşlara olan akrabalık oranı % 80.9 olarak belirlenmiş olup mayi örneğinden izole edilen bu suşun da belirtilen suşlarla muhtemel ilişkili olabileceği düşünüldü.

İki alt tipe sahip olan PT 81 pulsotipini gösteren KS 60 (PT 81a) ve KS 100 (PT 81b) suşları % 88.9 benzerlik oranı ile muhtemel ilişkili olarak belirlenmişlerdir. İdrar kültüründen izole edilen bu suşlar metisiline dirençli suşlar olarak saptanmışlardır.

Kan örneğinden izole edilen KS 45 (PT 3a) no'lu suş ile yara örneğinden izole edilen KS 47 (PT 3b) no'lu suşlar arasındaki benzerlik oranı % 96 olarak belirlenmiş olup bu iki suşun yakın ilişkili suşlar olduğu sonucuna varılmıştır. Benzer şekilde yara kültüründen izole edilen KS 1 (PT 5a) no'lu suş ile kulak kültüründen izole edilen KS 3 (PT 5b) no'lu suşun akrabalık oranı % 94.7 olarak belirlenmiş olup bu suşlarında yakın ilişkili suşlar olduğu tespit edildi.

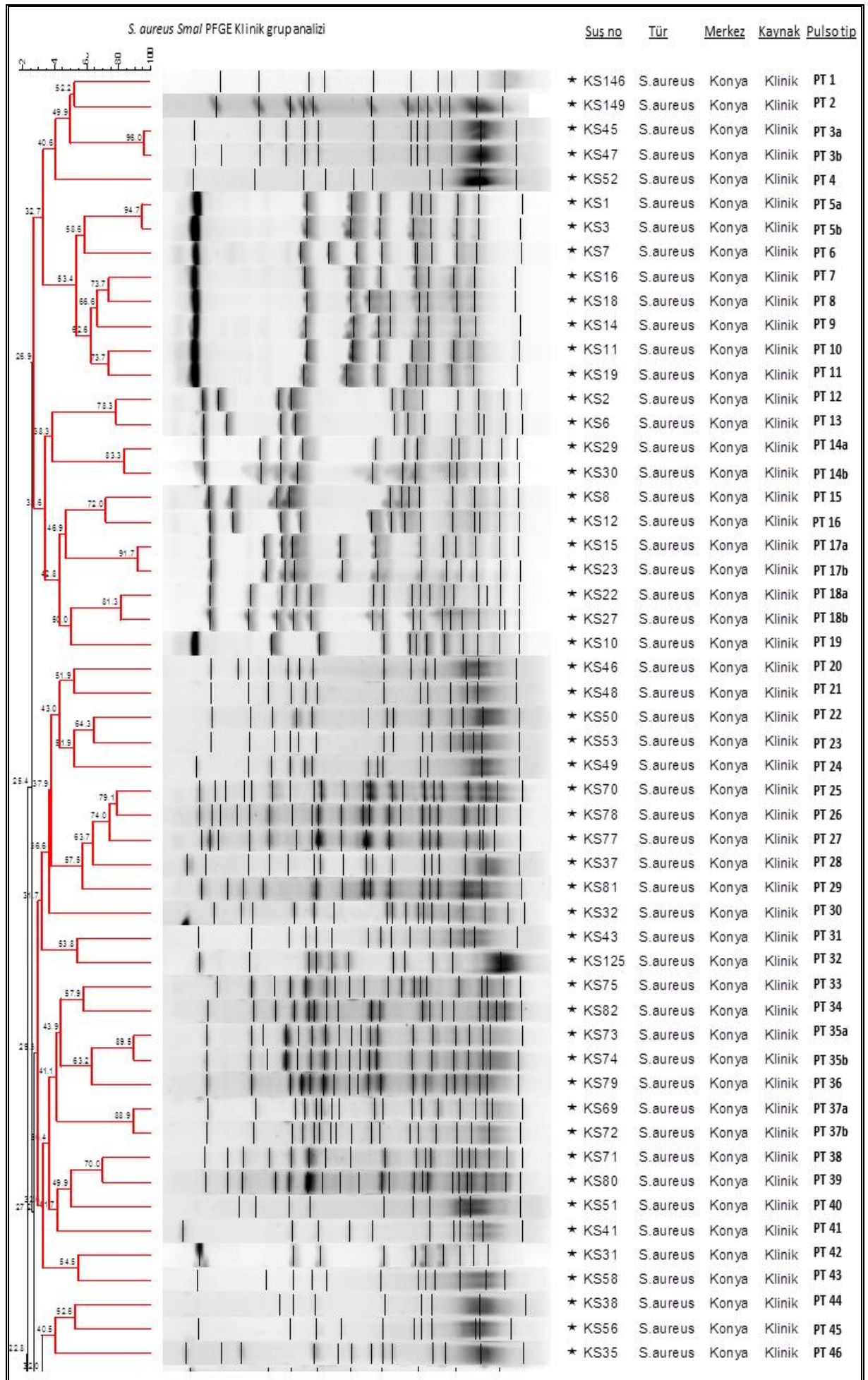
Başka bir alt tip oluşturan (PT 14a ve PT14b) gruba baktığımızda kan kültüründen izole edilen KS 29 (PT 14a) no'lu suş ile KS 30 (PT 14b) no'lu suşun aralarındaki benzerlik oranı ise % 83.3 olarak bulunmuş olup bu iki suşun muhtemel ilişkili olabileceği düşünüldü. Balgam örneğinden izole edilen KS 22 (PT18a) no'lu suş ve yara örneğinden izole edilen KS 27 (PT 18b) no'lu suşların benzerlik oranı ise % 81.3 olarak bulunmuş olup bu iki suşunda muhtemel ilişkili olabileceği kanısına varıldı.

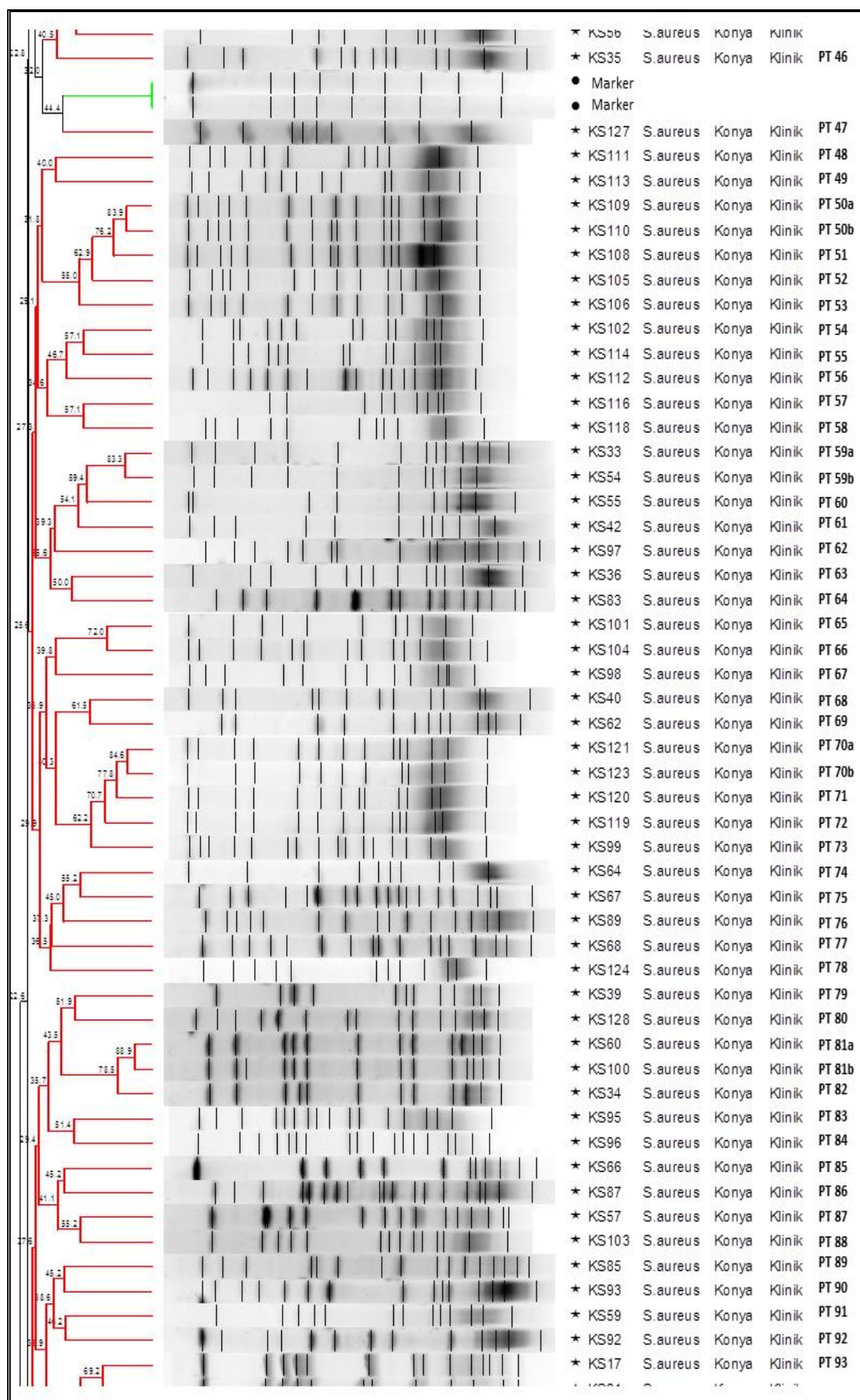
Burun kültüründen izole edilen KS 15 (PT 17a) no'lu suş ve idrar kültüründen izole edilen KS 23 (PT 17b) no'lu suşlar da % 91.7 akrabalık oranı ile yakın ilişkili suşlar olarak belirlendi.

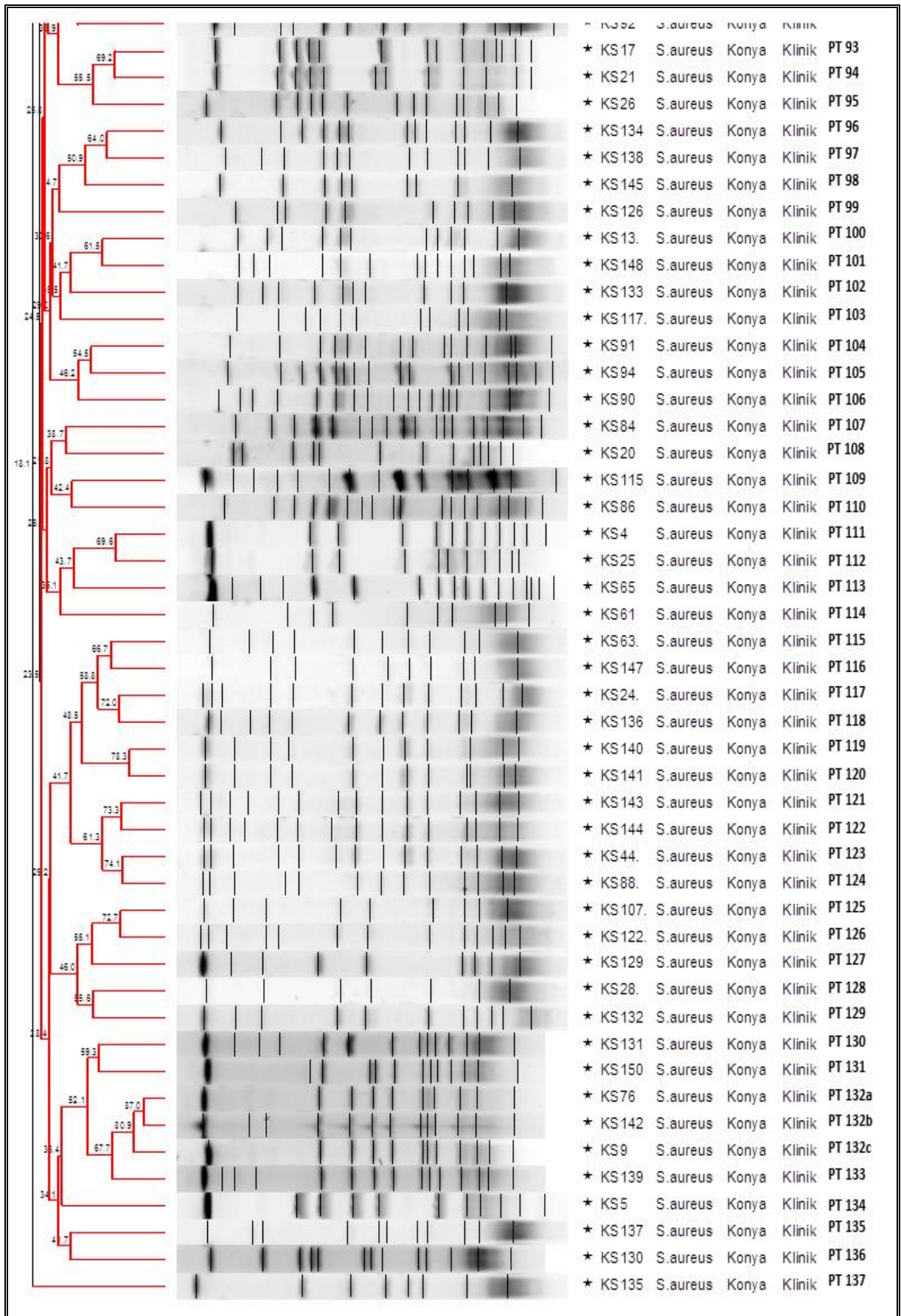
KS 73 ve KS 74 no'lu suşların bulunduğu PT 35 pulstotipide iki alt tipe ayrılmıştır (PT 35a ve PT 35b). Kan örneklerinden izole edilen bu suşlar arasındaki benzerlik oranı % 89.5 olarak belirlendi ve bu suşların muhtemel ilişkili olduğu saptandı. Yine iki alt tipe ayrılan PT 37'de bulunan KS 69 (PT 37a) ve KS 72 (PT 37b) suşları idrar kültüründen izole edilmiş olup aralarındaki % 88.9'luk akrabalık oranıyla muhtemel ilişkili suşlar olarak belirlendi. İdrar kültüründen izole edilen KS 109 (PT 50a) ve kan kültüründen izole edilen KS 110 (PT 50b) no'lu suşlar % 83.9 benzerlik oranı ile farklı materyallerden izole edilmesine rağmen muhtemel ilişkili olarak saptandı.

Mayi kültüründen izole edilen KS 33 (PT 59a) ve KS 54 (PT 59b) no'lu suşlar % 83.3 benzerlik oranı ile muhtemel ilişkili olarak belirlendi. Kulak kültüründen izole edilen KS 121 (PT 70a) ve yara kültüründen izole edilen KS 123 (PT 70b) no'lu suşlar % 84.6 akrabalık oranı ile muhtemel ilişkili olarak tespit edildi.

Belirtilen suşların dışındakiler ise ilişkisiz izolatlar olarak saptandı. Suşların çoğunun benzer klinik materyallerden izole edilmesine rağmen, klinik suşlar arasında muhtemel ilişkili, yakın ilişkili, veya aynı suş tespit edilmedi. Klinik kaynaklı suşların genetik çeşitliliğinin oldukça yüksek, klonal ilişkilerinin ise zayıf olduğu sonucuna varıldı (Şekil 4.4.10).

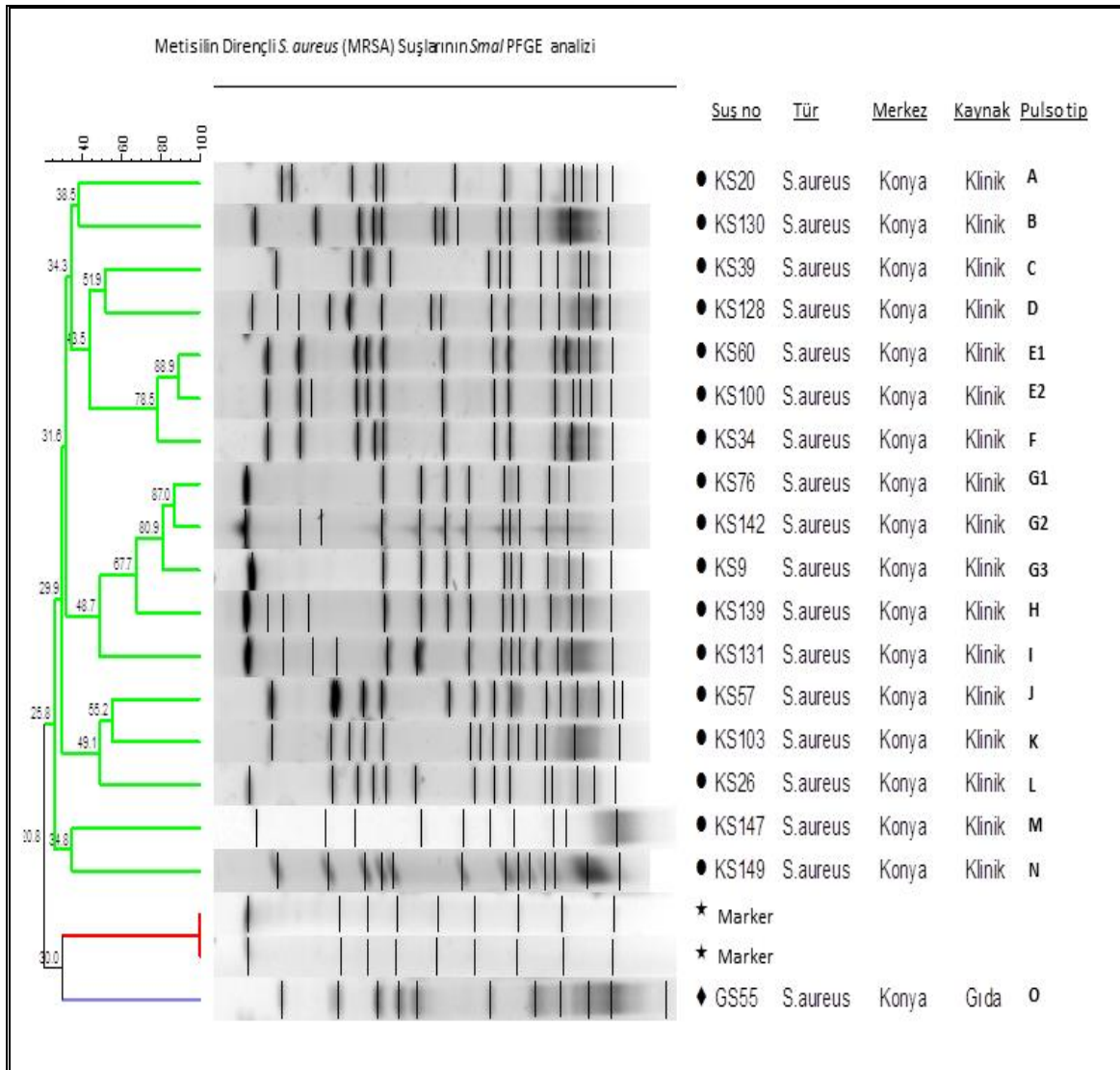






Şekil 4.4.10. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *S. aureus* suşlarının klonal ilişkisini gösteren dendrogram (UPGMA; Dice, % 0.5 tolerans)

Metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) suşlarına ait dendrogram ise şekil 4.4.11’da gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 18 MRSA suşu 15 pulsotip göstermiş olup bu tipler de kendi aralarında iki alt tip göstermiştir. En fazla alt tipe sahip olan üç alt tipe G pulsotipidir (G1, G2, G3). KS 76 (G1) ve KS 142 (G2) MRSA suşları % 87 benzerlik oranı ile muhtemel ilişkili olarak belirlendi. KS 9 (G3) Suşu ise bu suşlara olan % 80.9 akrabalık oranı ile muhtemel ilişkili olarak belirlendi. Diğer alt tip gösteren E pulsotipine (E1, E2) bakıldığında KS 60 (E1) ve KS 100 (E2) MRSA suşları arasında belirlenen % 88.9 benzerlik oranı ile muhtemel ilişkili suşlar olarak belirlendi. Diğer MRSA suşları arasında muhtemel veya yakın ilişkili ya da aynı izolat tespit edilmedi (Şekil 4.4.11).

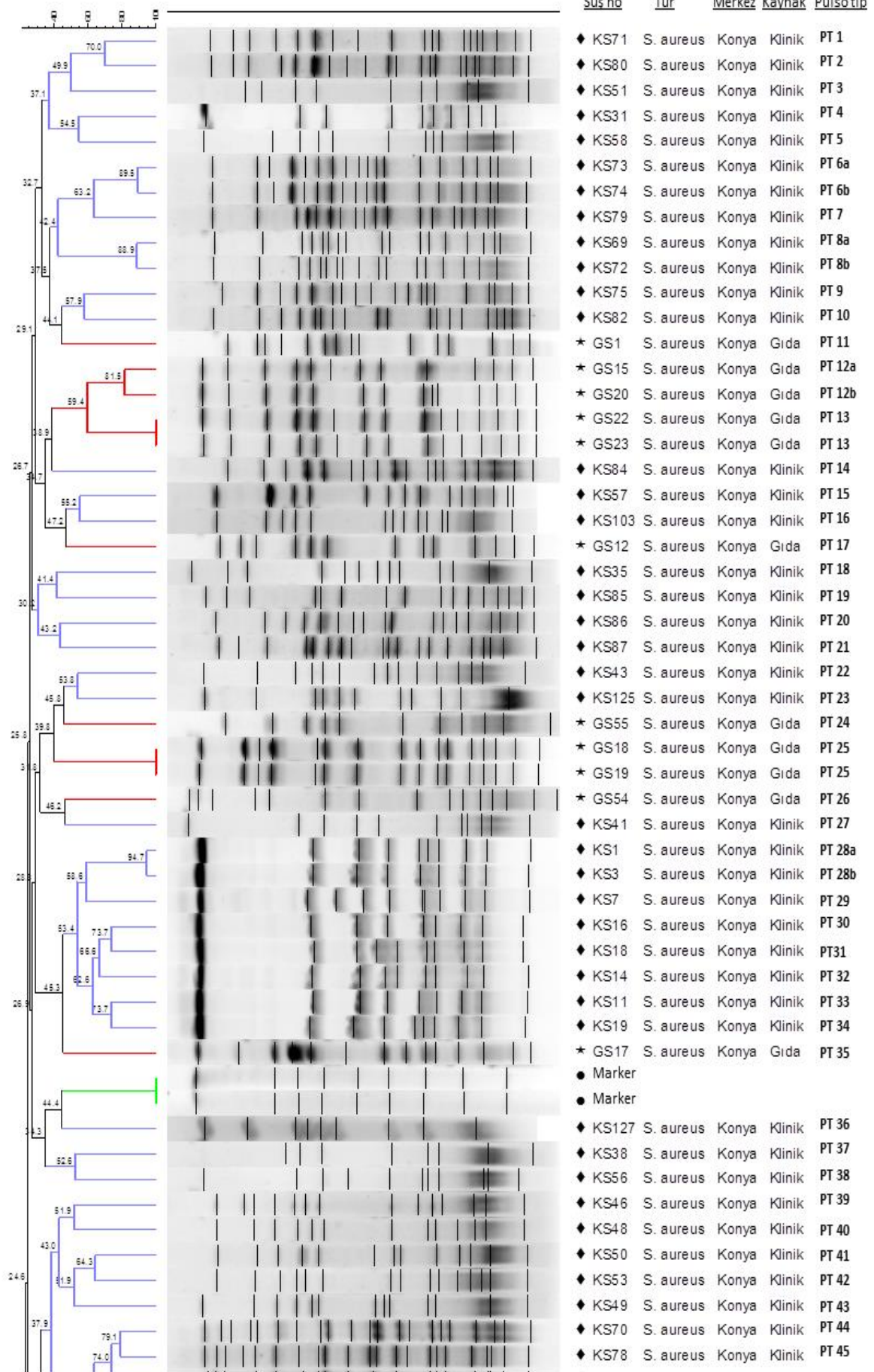


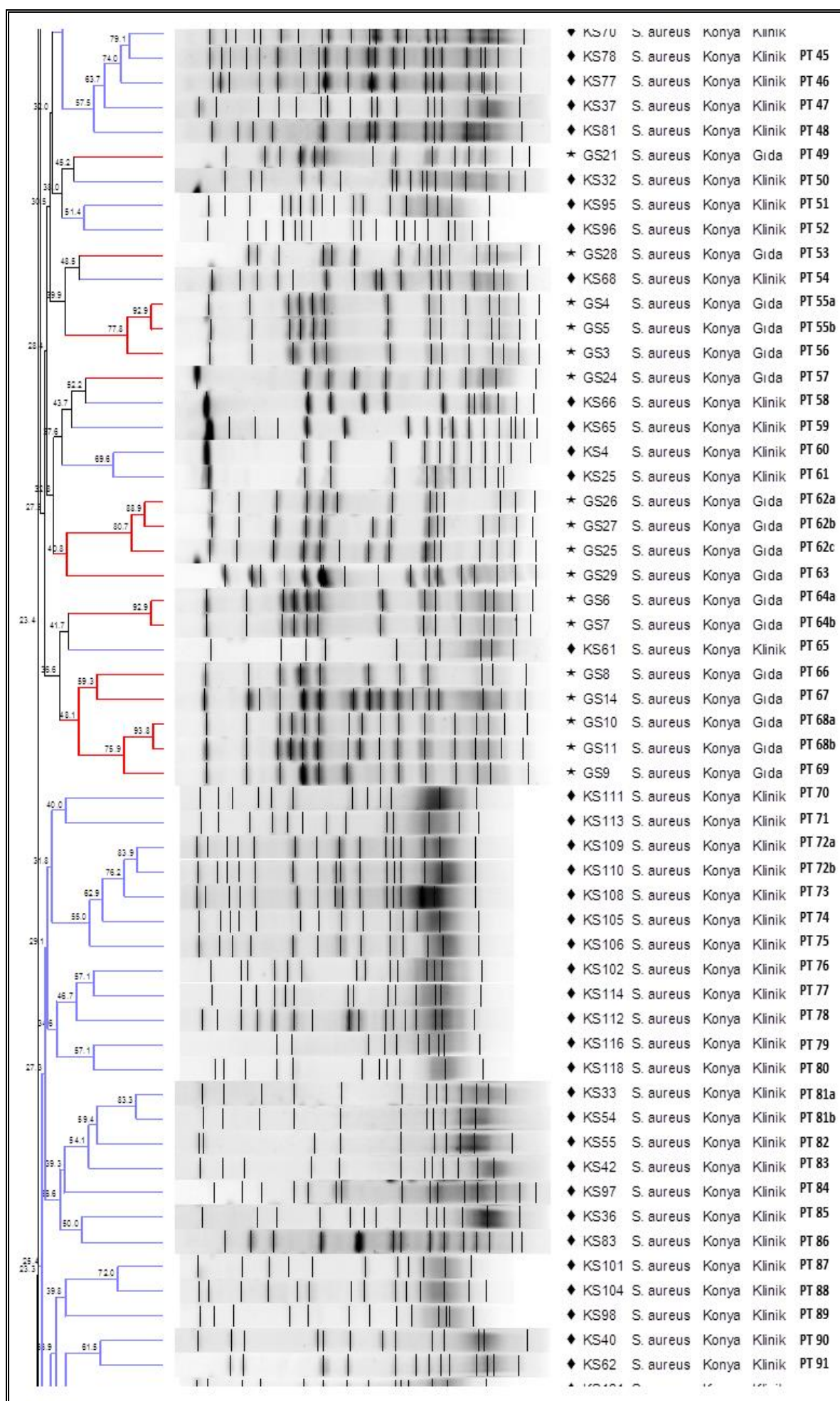
Şekil 4.4.11. Metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) suşlarının klonal ilişkisini gösteren dendrogram (UPGMA; Dice, % 0.5 tolerans)

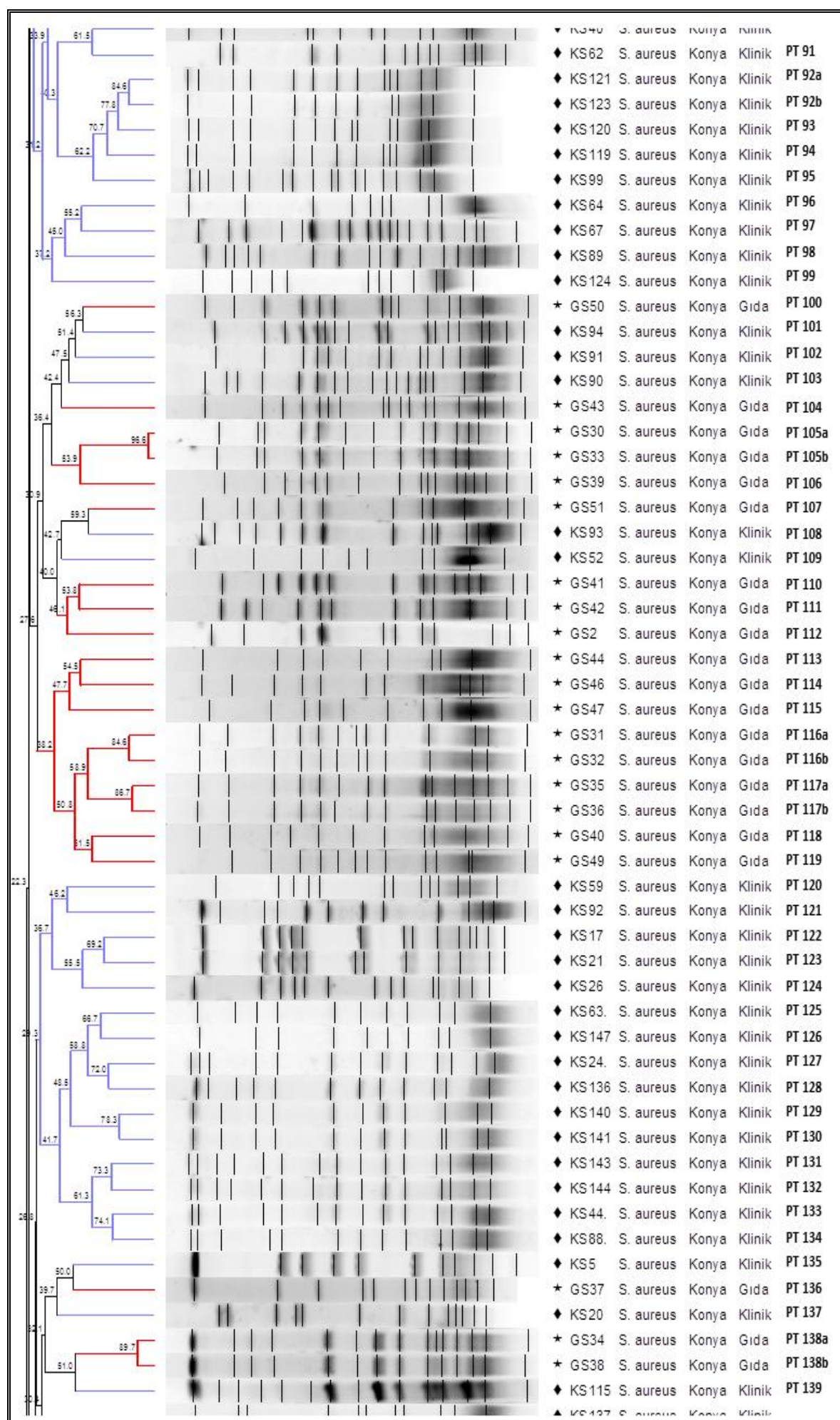
Çalışmada kullanılan tüm Gıda ve klinik suşlara ait klonal analizler, UPGMA yöntemine göre tek bir analizle değerlendirilerek, bütün suşların birbirlerine göre olan genetik akrabalıkları yeniden değerlendirildi. Değerlendirme sonucu elde edilen birleşik analiz dendogramı ve oluşan pulso tipler Şekil 4.4.12'de gösterilmiştir.

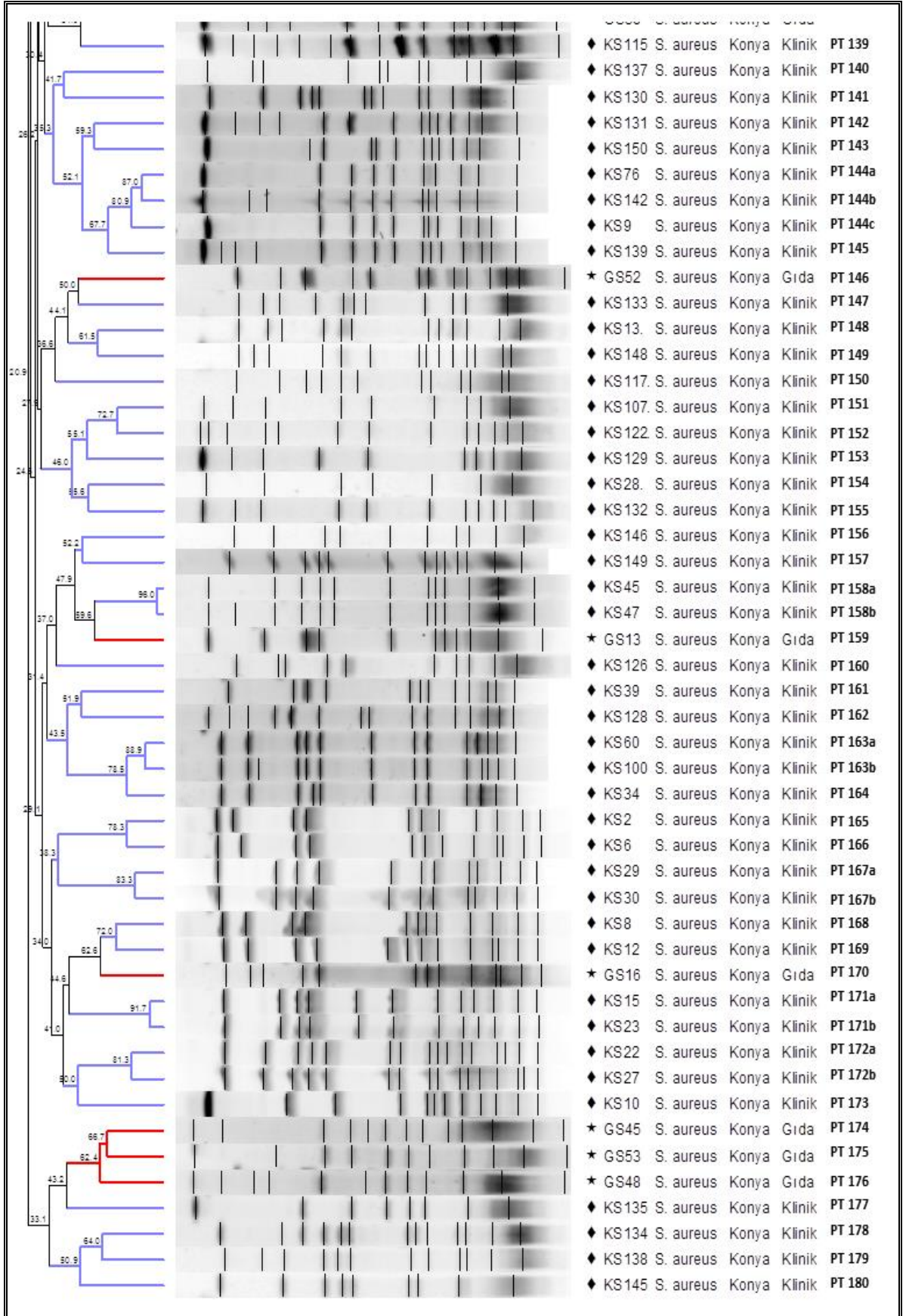


S. aureus Smal PFGE gıda, klinik birleşik analiz









Şekil 4.4.12. Çalışmada kullanılan tüm *S. aureus* suşlarının klonal ilişkisini gösteren birleşik dendrogram ve oluşturulan pulso tipler (UPGMA; Dice, % 0.5 tolerans)

Oluşturan dendogramdan elde ettiğimiz veriler doğrultusunda; izole edilen 205 *S. aureus* suşları arasında toplam 180 pulso tip belirlendi (Şekil 4.4.12). Bu pulso tiplere ait olan 21 alt tip saptandı. 180 farklı pulso tipin ortaya çıkması, klonal ilişki bakımından incelenen suşlar arasındaki genetik benzerliğin oldukça düşük olduğunu gösterdi. Bu nedenle PFGE yönteminin çalışılan suşları ayırabilme gücünün oldukça yüksek olduğu ve bu suşların genetik çeşitliliğini belirlemede önemli bir yöntem olduğu belirlendi.

Tüm suşların olduğu birleşik dendogram, klinik ve gıda örneklerinin bireysel analizlerinin ortalamasına dayandığından; bu suşlar için ayrı ayrı değerlendirilen analizlere oldukça yakın klonal ilişkiler birleşik olarak yapılan dendogramda da görüldü. Birleşik analizde dikkat çeken durum ise; gıda izolatları ile klinik izolatlar arasında değişen oranlarda benzerliklerin olmasına rağmen, bu oranların düşük olduğu görüldü. Değerlendirme kriterlerinde göre, genetik benzerliğin; suşların aynı, yakın ve muhtemel ilişkili olarak belirlenebilmesi için en az % 80 olması gerekmektedir. (Akçimen ve ark., 2010). Buna dayanarak; gıda ve klinik izolatlar arasındaki genetik benzerlik oranının % 80' den az olduğundan , yakın veya muhtemel ilişkili hiçbir suşa rastlanılmadı ve bu suşların ilişkisiz suşlar oldukları saptandı. Yine dondurma örneğinden izole edilen MRSA suşu ile klinik kaynaklı MRSA suşları arasında yakın ve muhtemel ilişki görülmemiştir. Hem gıda hem de klinik suşların, kendi grupları içerisinde yakın ve muhtemel ilişkili izolatlarla alt tipler oluşturduğu belirlendi.

S. aureus insanlarda nozokomiyal ve toplum kaynaklı enfeksiyonlara neden olan oldukça önemli patojen bir bakteridir. Metisilin kullanıma girmesinden kısa süre sonra ortaya çıkan metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) izolatları, ülkemizde ve tüm dünyada giderek artan bir sorun haline gelmiştir. MRSA enfeksiyonları, hastalar üzerinde mortalite ve morbiditeyi artırmaktadır. Bu nedenle enfeksiyon kaynağının ve yayılma yollarının belirlenmesi oldukça önemlidir. Epidemiyolojik çalışmalar için farklı fenotipik ve genotipik yöntemler kullanılmaktadır (Ichiyama ve ark., 1991). Bu yöntemler içinde altın standart olarak kabul edilen PFGE yöntemi mikroorganizmaların genotipik karakterizasyonları için yaygın olarak kullanılmaktadır. Yüksek ayırım gücü ve tekrarlanabilirlik gibi avantajlarından dolayı, birçok patojen bakterinin analizinde oldukça sık kullanılan bir metottur. Salgınla ilgili çalışmalarda çok önemli bir yöntem olmasına rağmen sadece bu çalışmalarda değil; aynı zamanda çevre kaynaklı mikroorganizmalardaki klonal ilişkiyi ve genetik çeşitliliği tespit etmede de önemli bir yöntemdir (Goering, 2010). Çalışmamızda; gıda ve klinik kaynaklı *S. aureus* suşlarının

PFGE yöntemi ile benzerlik ve farklılıklarının belirlenmesi ve bu amaçla klon kaynakları konusunda daha detaylı bilgilere ulaşmak hedeflenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, izole edilen *S. aureus* suşları arasında yüksek oranda genetik çeşitlilik saptanmıştır.

Bilinen patojenlerin neden olduğu gıda kaynaklı hastalıklar; sağlık açısından önemli etkileriyle, büyüyen bir halk sağlığı problemi olarak ortaya çıkmaktadır. Bu mikroorganizmaları alt tiplere ayırmak için moleküler metotlar, çoğu laboratuvar da geleneksel tekniklere ilave metotlar haline gelmiştir. Gıda patojenlerini belirlemek ve teşhis etmek için kullanılan moleküler tekniklerden biri Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)'tir. PFGE genellikle *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* (O157 içeren), *Campylobacter* ve *Listeria* gibi gıda zincirinde karşılaşılan patojenleri izlemek için uygulanmaktadır. Bu organizmaların epidemiyolojik çalışmalarında altın standart yöntem olarak belirtilmiştir (Peters, 2009). Çalışmamızda da tüm gıda izolatları PFGE yöntemi ile tiplendirilebilmiş, aralarındaki muhtemel ve yakın ilişkiler ortaya konulabilmiştir.

Yaptığımız çalışmada süt ve dondurma örneklerinden elde ettiğimiz 55 *S. aureus*'un 43 farklı pulsotip ve bunlara bağlı 9 alt tip gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.4.9). Macaristan'da yapılan bir çalışmada Peles ve ark., (2007), sığır sütlerinden izole ettikleri 59 *S. aureus* suşunun PFGE yöntemi ile genetik ilişkisini inceledikleri çalışmalarında 22 farklı pulsotip tespit etmişler, bunların 14 tanesinin ana tip, 8 tanesinin ise alt tip olduğunu belirtmişlerdir. Benzer bir çalışmada Aires de sosa ve ark.,(2007) mastitisli çeşitli hayvan sütlerinden izole edilen 30 *S. aureus* suşunda, PFGE yöntemi ile genetik çeşitlilik oranının, 5 farklı pulsotip ile düşük olduğunu; gıda ve insan kaynaklı suşlar arasında ise benzerlik bulunmadığını ortaya koymuşlardır. Gıda kaynaklı suşlar ile yapılan farklı araştırmalarda, Li ve ark., (2009), 75 *S. aureus* suşunun 16 farklı pulsotip; Shin ve ark., (2016) 36 MRSA suşunda 18 pulsotip; Chiou ve ark., (2000) 71 *S. aureus* suşunda 22 pulsotip; McMillan ve ark., (2016) 30 *S. aureus* suşunda 11 farklı pulsotip; Souza ve ark., (2012) 103 *S. aureus* suşunda 32 pulsotip; Lange ve ark., (1999) 66 *S. aureus* örneğinin 33 pulsotip oluşturduğunu ortaya koymuşlardır. Yine Andre ve ark., (2008) 73 *S. aureus* suşu arasında genetik çeşitliliğin fazla olduğunu belirtmişlerdir. Yapılan çalışmalar ile kıyaslandığında, çalışmamızda test edilen gıda kökenli *S. aureus* suşlarının da genetik olarak oldukça heterojenite gösterdiği yani genetik çeşitliliğin fazla olduğu görülmüştür. Bu durum yukarıda bahsi geçen araştırmacıların sonuçları ile uyumlu bulunmuştur. Bu noktada PFGE yöntemi

gıda kaynaklı suşların ayırımında oldukça başarılı bir sonuç ortaya koymuştur. PFGE değerlendirme kriterlerinden de bilindiği üzere, çalışılan suşlarda meydana gelebilecek genetik değişiklikler olası bant farklılıklarına; dolayısı ile suşların genetik olarak birbirinden uzaklaşmasına neden olmaktadır. Bunun da genetik heterojeniteyi artırdığı söylenebilir.

Çalışmamızda analiz edilen klinik kaynaklı toplam 150 *S. aureus* suşunun 137 pulsotip meydana getirdiği görülmüştür. Suş sayısına bakıldığında farklı pulsotip oranının oldukça fazla olduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde Bazzoun ve ark., (2014) klinik kökenli 60 *S. aureus* suşunun PFGE yöntemi ile 46 pulsotip; İchiyama ve ark., (1991) 111 MRSA suşunun 31 pulsotip ortaya koyduğunu belirtmişlerdir. Bu durum çalışmamızdaki genetik çeşitliliğin fazla olması ile uyumludur. Bu yüksek genetik çeşitliliğin örneklerin farklı çevrelerden, farklı hastanelerden ve farklı hastalık materyallerinden toplanmasından kaynaklı olabileceği düşünülmüştür. Farklı çalışmalarda Seidl ve ark., (2015) 146 MRSA suşunda 22 pulsotip; Xie ve ark., (2011) 108 *S. aureus* suşunun 25 pulsotip oluşturduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar, coğrafi dağılımlar dikkate alınmadan da suşların yüksek genetik çeşitlilik gösterebileceğini söyleyerek bulgularımızı desteklemiştir. Hem gıda hem de klinik kökenli toplam 205 *S. aureus* suşunun birlikte değerlendirildiği çalışmamızda, 180 farklı pulsotip ve bunlara bağlı 21 alt tip ortaya konmuştur. Klinik ve gıda suşları arasında yakın ve muhtemel bir ilişki görülmemiştir. Çalışmamıza benzer nitelikte yapılan bir araştırmada Ünal ve İstanbulluoğlu, (2009) insan ve sığır kökenli 96 *S. aureus* izolatının 42 farklı PFGE tipi ortaya koyduğunu belirlemişler ve izolatların çoğunun 13 büyük pulsotip grubunda olduklarını saptamışlardır. Sonuçları kıyaslandığında iki çalışmanın bulguları birbirini destekler niteliktedir.

Genomik DNA'nın enzimlerle kesimine dayanan PFGE yöntemi; ilk geliştirildiği ve kullanıldığı günden bu yana, klinik suşların epidemiyolojik ilişkilerinin belirlenmesinde en çok tercih edilen ve bu ilişkiyi en güvenilir şekilde ortaya koyan ayırım gücü ve tekrarlanabilirliği yüksek bir metod olduğundan dolayı moleküler yöntemler içinde altın standart bir metot haline gelmiştir. Ancak, sistemin laboratuvarıdan laboratuvara değişkenlik göstermesi, optimizasyon problemlerinin olması, pahalı ekipmanlara gerek olması, zaman alıcı ve zahmetli olması, sonuçlarının yorumlanmasının zor olması gibi dezavantajları da bulunmaktadır. Bazı durumlarda ise tiplendirilemeyen suşların olması da sistemin kullanımını sınırlandırmaktadır. Sonuç olarak bu gibi durumların üstesinden gelmek ve geniş çapta mikroorganizma grubunu

tiplendirebilmek için PFGE'nin, PCR tabanlı bazı moleküler tekniklerle kombine olarak kullanımının faydalı olacağı belirtilmiştir (Wu ve Della-Latta, 2006).

Çalışmamızda, gıda ve klinik örneklerden izole ettiğimiz 205 *S. aureus* suşunun multipleks PCR yöntemi ile *Staphylococcus* cinsine özgü *16S rRNA* geni, *S. aureus*'a özgü *femA* geni, metisilin direncini belirlemek için *mecA* geni ve Panton Valentine Toksini varlığını tespit etmek için *lukS* geni belirlenmeye çalışılmıştır. Elde ettiğimiz bulgulara göre suşların tamamında *16S rRNA* ve *femA* geni, 18 suşda *mecA* geni ve yedi klinik suşda PVL (*lukS*) toksin geni tespit edilmiştir (Şekil 4.3.1 - 4.3.8). Çalışmamızda Al-Talib ve ark., (2009)'nın metodu bazı modifikasyonlarla uygulanmış, tasarladıkları primerler kusursuzca çalışmış ve hedeflenen gen bölgeleri elektroforez sonrası görüntülenmiştir. Metisiline dirençli suşlar ve PVL geni taşıyan suşlar hızlı bir şekilde tespit edilebilmiştir. Vannuffel ve ark. (1998), endotrakeal sıvılardan metisiline dirençli *S. aureus*'ların erken ve hızlı identifikasyonu için *femA* ve *mecA* genlerini multipleks PCR'la belirlemişlerdir. 60 örneğin 57'sinde *mecA* ve *femA* amplifikasyonunun konvansiyonel testlerle uyumlu olduğunu tespit etmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlar yoğun bakım unitelerinde sürveyansın kontrolünde ve MRSA enfeksiyonlarının moleküler teşhisinde yaptıkları çoklu PCR yönteminin çok hızlı sonuçlar verdiğinin altını çizmişlerdir. MRSA enfeksiyonlarının hızlı bir şekilde belirlenmesinin sadece salgıların teşhisinde değil, izolasyon ve tedavinin maliyetini azaltmada da önemli olduğunu vurgulamışlardır. Yaptığımız çalışmada araştırmacıların bulgularına benzer şekilde multipleks PCR yöntemi ile metisiline dirençli *S. aureus* suşları hızlı bir şekilde tespit edilmiş, zamandan ve kullanılan malzemelerden tasarruf edilmiştir. Multipleks PCR metoduyla yapılan başka bir çalışmada *S. aureus*'ta *16S rRNA*, *coa*, *mecA* ve bazı enterotoksin genleri tespit edilmeye çalışılmış ve sonuçta 71 *S. aureus* suşunun 28'inde *mecA* geninin varlığı ortaya konulmuştur (Fan ve ark., 2008). Yapılan bu çalışmada ise 18 suşda *mecA* geni tespit edilmiş olup metisiline dirençli olarak belirlenmiştir. *S. aureus* bakterisinin enterotoksin, exfoliatif toksin, toksik şok sendromu toksini ve metisilin direnç genini multipleks PCR yöntemiyle belirlenmeye çalışıldığı başka bir çalışmada ise 176 klinik izolat çalışılmış ve çalışma sonucunda bu yöntemin klinik laboratuvarlarda stafilokokkal toksin genlerinin belirlenmesinde kullanılan konvansiyonel PCR yöntemine göre daha spesifik, çabuk, güvenilir ve ucuz olduğunu belirtmişlerdir (Mehrotra ve ark., 2000).

Xu ve ark., (2014), 360 gıda kaynaklı stafilokok izolatını *16S rRNA*, *femA*, *mecA* genlerini multipleks PCR yöntemiyle analiz ederek metisiline dirençli *S. aureus*

suşlarını ve koagülaz negatif stafilokokları *S. aureus* suşlarından eş zamanlı olarak ayırt etmeye çalışmışlardır. Çalışma sonucunda 254 MSSA, 25 MRSA, 81(22 metisiline dirençli koagülaz negatif stafilokok) koagülaz negatif stafilokok suşu tespit etmişlerdir. Tüm suşlarda 16S rRNA genini, 279 *S.aureus* suşunun tamamında *femA* genini belirlemişlerdir. Koagülaz negatif stafilokoklarda *femA* geni varlığını tespit etmemişlerdir. Bu testin, yayılan MRSA suşlarının belirlenmesinde ve sürveyansının tespit edilmesinde etkili bir şekilde kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Araştırmacıların bulgularına paralel olarak fenotipik testlerle *S. aureus* olarak belirlediğimiz tüm suşlarda 16S rRNA geni ve *femA* geni varlığı gösterilmiştir (Şekil 4.3.1 - 4.3.8). Fenotipik olarak tanımlanan izolatlar moleküler olarak da tanımlanmıştır. Ayrıca çalışmamızda gıda kaynaklı örneklerden sadece bir tanesi MRSA olarak tespit edilmiş; bu oran araştırmacıların bulduğu orana göre daha düşüktür. İtalya’da yapılan bir çalışmada, hayvan kaynaklı ürünlerden izole edilen 160 *S. aureus* suşunun 6’sında (% 3.75) *mecA* geni pozitif bulunmuştur (Normanno ve ark., 2007). Sonuçlarımıza göre 55 gıda kaynaklı izolattan sadece bir tanesi (dondurma izolatu) MRSA olarak bulunmuş olup gıda örneklerindeki MRSA oranı (% 1.8), araştırmacının bulgularıyla benzer olarak düşük oranda saptanmıştır.

Yapılan farklı çalışmalarda; Vorobieva ve ark., (2008) 91 klinik *S. aureus* izolatının 16’sı MRSA, 75’i MSSA olarak tespit edilmiş olup, MSSA suşlarının 40 tanesinin PVL pozitif olduğunu; Yao ve ark., (2010) ise 111 *S. aureus* izolatının 60’ının *mecA* geni taşıdığı ve 26 suşun aynı zamanda PVL pozitif olduğunu saptamışlardır. Mevcut çalışmamızda klinik kaynaklı izolatlardan 17 MRSA suşu tespit edilmiş PVL (7 suş) oranı araştırmacının bulgularıyla kıyaslandığında daha düşük bulunmuştur.

S.aureus suşları tarafından salgılanan Panton-Valentine lökositin (PVL) önemli bir virülans faktörüdür. PVL; konak savunmasında önemli polimorfnükleer (PMNL), bazofil lökosit, monosit ve makrofajlar üzerine sitolitik etkisi ile porlar oluşturarak lizise neden olmaktadır. Bu sayede PVL, *S.aureus*’un immün sistemden kaçışı için kritik role sahiptir. PVL pozitif *S.aureus* suşlarına bağlı enfeksiyonların klinik seyri daha şiddetli olma eğilimindedir (Duman ve ark., 2013). Bu nedenle toplum ve hastane kökenli *S.aureus* suşlarında PVL varlığı ve sıklığı araştırılarak, klonal ilişkinin belirlenmesi oldukça önem taşımaktadır.

PVL ile ilgili ülkemizde yapılan çalışmalara bakıldığında; Özkul ve ark., (2007) multipleks PCR ile belirledikleri % 5 olan PVL pozitifliği oranının sadece bir yıl sonra %10’a çıktığını belirtmişlerdir. Deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarından izole edilen

285 *S. aureus* izolatu analiz edildiği çalışmada ise Gülmez ve ark., (2012) PVL oranını % 2 olarak saptarken; Yılmaz ve ark., (2012b) bu oranı % 4 olarak saptamışlardır. Buna rağmen Tekeli ve ark., (2009) ve Kırdar ve ark., (2009) alışmalarında *S. aureus* suşlarının hiçbirinde PVL pozitifliğini saptamamışlardır. Çalışmamızda 150 klinik kaynaklı *S. aureus* suşunun 7 (% 4.6)'sinde PVL geni pozitif olarak bulunmuş olup gıda izolatlarının hiçbirinde PVL geni saptanmamıştır. Bulduğumuz % 4.6'lık düşük PVL pozitifliği oranı ülkemizdeki araştırıcıların buldukları sonuçlarla uyum göstermektedir. Yapılan çalışmalarda bulunan düşük PVL pozitifliği oranı sevindiricidir ama her geçen gün PVL pozitif suşların hastane ortamlarında yayılımı artmaktadır.

Uluslararası PVL toksin araştırmalarına baktığımızda ise; İngiltere'de PVL pozitifliğinin istikrarlı bir artış kaydettiği, 2005 yılında TK-*S.aureus* izolatlarında % 39 olan PVL gen varlığının, 2010 yılında % 62'ye çıktığı bildirilmektedir. Afrika'da ise PVL pozitif *S.aureus* suşları oldukça yaygın olarak tespit edilmekte; rneğin PVL pozitifliği Cezayir'de % 72'lere varırken Batı Afrika'da % 30 olarak bildirilmiştir (Duman ve ark., 2013). Uganda'da yapılan bir çalışmada bu oran % 49.3 (Asiimwe ve ark., (2017), Yunanistan'daki bir araştırmada ise çalışılan 88 *S. aureus* suşunun tamamında (%100) PVL pozitif olduğu tespit edilmiştir (Vourli ve ark., 2007). Belirlenen bu yüksek oranalara rağmen, Cui ve ark., (2009) ve Bardiau ve ark., (2013) alışmalarında ise *S. aureus* suşlarında PVL geni tespit edememişlerdir. PVL pozitif *S.aureus* suşlarına karşı hızlı ve etkin bir şekilde, enfeksiyon kontrol önlemlerinin zamanında uygulanması sağlanarak hastane ortamında yayılmaları ve bu suşların seleksiyonunun önlenmesi gerektiği, toplum ve hastane kökenli *S.aureus* izolatu kaynaklı enfeksiyonlarda, tedavinin düzenlenmesi ve komplikasyon gelişiminin önlenmesi için PVL pozitif MRSA ve MSSA izolatlarının dikkatlice izlenmesinin gerektiği belirtilmiştir (Duman ve ark., 2013)..

Yaptığımız çalışmada hem fenotipik hem de genotipik yöntemlerle izole ettiğimiz tüm *S. aureus* suşlarında MRSA oranı belirlenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre klinik kaynaklı suşların 17'sinin (% 11.3), gıda kaynaklı suşların ise sadece bir (%1.8) tanesinin MRSA olduğu tespit edilmiştir. Ülkemizdeki MRSA oranı ile ilgili yapılan çalışmalara bakacak olursak; Aydın ve ark., (2001) eşitli klinik kaynaklardan izole ettikleri *S. aureus* izolatlarında MRSA oranını % 10.9; Altoparlak ve ark., (2002) % 58; Ozkalp ve Baybek (2003) % 20.6, Arıdoğan ve ark., (2004) ise % 41 olarak belirlemişlerdir. Ülkemizde yapılan başka bir çalışmada ise 2005-2007 yıllarında klinik örneklerden izole edilen 936 *S. aureus* suşunun 721'i (% 77) metisiline duyarlı, 215'i

(% 23) metisiline dirençli bulunmuştur. Metisiline dirençli suş oranları 2005, 2006 ve 2007 yıllarında sırasıyla % 34, % 14 ve % 21 olarak belirlenmiştir (Dündar ve Tamer, 2009). Duman ve ark., (2009) klinik suşlardaki MRSA oranını % 36.4 olarak belirlerken, Gunes ve Durak, (2013) % 15 olarak saptamışlardır. Çetinkol ve ark., (2013) 2008-2012 yılları arasında kan kültürlerinden izole edilen *S.aureus* suşlarının metisiline direnç oranını sırasıyla % 35.1, % 29.3, % 24.4, % 20.4 ve % 18.5 olarak belirlemişlerdir. Belirtilen çalışmalardan anlaşıldığı üzere metisiline direnç oranı % 10.9 ile % 58 arasında değişmektedir. En düşük MRSA oranı Aydın ve ark., (2001) yaptığı çalışmada görülmektedir. Yaptığımız çalışmada, çeşitli klinik örneklerden izole ettiğimiz 150 *S. aureus* suşunun metisiline direnç oranı ise 11.3 olarak saptanmıştır. Bulduğumuz bu direnç oranı araştırmacıların çalışmasıyla benzerlik göstermektedir.

1997-1999 yılları arasında yapılan çalışmalarda çeşitli ülkelerdeki MRSA oranları; İsviçre, Hollanda, Almanya, Kanada, Avusturya, İspanya, Fransa, Belçika, İngiltere, İtalya, Portekiz, Taiwan, Japonya ve Hong Kong'da sırasıyla, % 1.8, % 2, % 4.9, % 5.7, % 9.4, % 19.3, % 21.4, % 25.6, % 27.5, % 50.5, % 54.4, % 61.1, % 71.6 ve % 73.8 olarak bildirilmiştir (Diekema ve ark., 2001). Ülkemizde ise 1996- 1999 yılları arasındaki yapılmış çalışmalarda saptanan MRSA oranlarının ortalaması % 47.5 olarak bildirilmiş, 2000-2003 yılları arasında gerçekleştirilen çalışmalarda bulunan ortalamanın belirtilen bu orana oldukça yakın olduğu (% 46.6) belirtilmiştir. 2003-2004 yıllarında yapılan yayınlardan elde edilen veriler MRSA oranının % 52'ye yükseldiğini göstermiştir (Derbentli, 2005). Türkiye hariç 26 Avrupa Ülkesinde MRSA oranının araştırıldığı başka bir çalışmada en düşük MRSA oranları; İzlanda, Danimarka, Hollanda, İsveç ve Estonya'da sırası ile % 0.5, % 0.6, % 0.6, % 0.8 ve % 0.9 olarak saptanmıştır. En Yüksek MRSA oranları ise İtalya, İrlanda, İngiltere, Malta ve Yunanistan'da sırası ile % 40.9, % 41.2, % 41.5, % 43.8 ve % 44.4 olarak bildirilmiştir (Tiemersma ve ark., 2004). Ülkemizde 2007-2017 yılları arasında yapılan bazı çalışmalarda bulunan MRSA oranlarının ortalamasına baktığımızda bu oranının % 34.3 olduğunu görmekteyiz (Kurutepe ve ark., 2007; Ekşi ve ark., 2008; Duman ve ark., 2009; Gunes ve Durak, 2013; Ozansoy ve ark., 2015; Dokutan ve ark., 2017). Çalışmamızda klinik örneklerden izole ettiğimiz suşlardaki MRSA oranı belirtilen çalışmalardaki ortalamaya göre daha düşük bulunmuştur.

Gıda kaynaklı *S. aureus* suşlarındaki MRSA oranına bakıldığında Normanno ve ark., (2007)% 3.75, Kumar ve ark., (2010)% 10.2, Türkyılmaz ve ark., (2010) % 17.2 olarak belirlemişler; Ünal ve Yıldırım, (2010); Spanu ve ark., (2010); Özdemir ve

Keyvan, (2016) ve Gunes ve Durak, (2013) ise çalışmalarında gıda suşlarında MRSA tespit edememişlerdir. Çalışmamızda ise süt ve dondurma örneklerinden izole edilen *S. aureus* suşlarında MRSA oranı (% 1.8), MRSA varlığı gösteren çalışmalara kıyasla oldukça düşük olarak belirlenmiştir.

Metisiline dirençli *S. aureus* suşlarının çoklu antibiyotik dirençleri sebebiyle, tedavi aşamasında meydana getirdikleri sorunlar her geçen gün artmaktadır. MRSA suşlarının günümüzde tek tedavi seçeneği glikopeptid grubu antibiyotiklerdir. Glikopeptid antibiyotiklerin çok yaygın bir şekilde kullanımı sonucunda, duyarlılığı azalmış suşlar ve dirençli suşlar gündeme gelmeye başlamıştır. Hem glikopeptid grubu antibiyotiklerin gereksiz kullanımından kaçınmak hem de hastaya en uygun tedaviyi verebilmek için metisilin/oksasilin direncinin hızlı ve doğru bir şekilde belirlenmesi gerekmektedir. Metisilin direncinin belirlenmesinde, agar tarama, disk difüzyon ve dilüsyon testleri gibi fenotipik yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadırlar. MRSA suşları fenotipik yöntemlerle her zaman doğru bir şekilde tanımlanamamaktadır. Bu nedenle stafilokoklardaki, metisilin direncini belirlemek için PCR yöntemi ile *mecA* geninin saptanması altın standart olarak kabul edilmiştir (Sevgican ve ark., 2009).

Çalışmamızda PCR yöntemi ile *mecA* geni belirlenmesi referans test olarak alınarak, agar tarama ve oksasilin disk difüzyon yöntemlerinin duyarlılık ve özgüllükleri belirlenmeye çalışılmıştır. Elde ettiğimiz bulgulara göre agar tarama referans testle birebir uyumlu sonuçlar vermiş olup duyarlılık ve özgüllüğü % 100 olarak saptanmıştır. Disk difüzyon yönteminin referans teste göre duyarlılığı % 83.3, özgüllüğü ise % 99.4 olarak belirlenmiştir.

PCR ile *mecA* geni tespiti referans alınarak yapılan bazı çalışmalara bakıldığında; Swenson ve ark., (2001) metisilin direncini sekiz farklı yöntemle belirlemeye çalıştıkları çalışmalarında agar tarama yönteminin duyarlılığını % 90 ve özgüllüğünü % 92 olarak bulurlarken, disk difüzyon yönteminin duyarlılığını % 100, özgüllüğünü ise % 89 olarak tespit etmişlerdir. Araştırmacıların sonuçları ile karşılaştırıldığında; çalışmamızda agar tarama yönteminin duyarlılık ve özgüllüğü daha yüksek bulunmuştur. Farklı yöntemlerin karşılaştırıldığı bir başka çalışmada ise disk difüzyon yönteminin duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla % 96.4 ve %97.1 olarak belirlenmiştir (Felten ve ark., 2002). Telli ve ark., (2006) yaptıkları çalışmalarında disk difüzyon yönteminin duyarlılık ve özgüllüğünü % 98.8 ve % 99.1 olarak belirlerken, agar tarama yönteminin duyarlılık ve özgüllüğünü ise % 98.8 ve % 98.3 olarak belirlemişlerdir. Çalışmamızda disk difüzyon yönteminin duyarlılığı araştırmacılara göre

daha düşük bulunmasına rağmen özgüllük benzer oranlarda tespit edilmiştir. Yöntemlerin karşılaştırıldığı başka bir çalışmada ise disk difüzyon yönteminin duyarlılık ve özgüllüğü % 100 ve % 89 bulunurken, agar tarama yönteminin duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla % 99.50 ve % 100 olarak bulunmuştur (Adaleti ve ark., 2008). Cauwelier ve ark., (2004), yaptıkları çalışmalarında disk difüzyon testinin duyarlılık ve özgüllüğünü % 83.5 ve % 100 olarak belirlemişlerdir. Çalışmamızda disk difüzyon yönteminin duyarlılığı araştırmacıların bulguları ile benzerlik göstermektedir. Yapılan çalışmalara bakıldığında disk difüzyon ve agar tarama yöntemlerinin duyarlılık ve özgüllükleri farklılık göstermektedir. Disk difüzyon yöntemindeki önemli bir problem özgüllüğünün duyarlılığından daha yüksek çıkabilmesi yani, yanlış pozitif sonuç verme olasılığının, yanlış negatif sonuç verme olasılığından daha yüksek çıkmasıdır (Telli ve ark., 2006). Yaptığımız çalışmada agar tarama testi referans testle yüzde yüz uyumlu bulunmuştur. Sonuçlarımıza göre bu testin daha güvenilir olduğu söylenebilir. Ayrıca kullanım kolaylığı ve zaman açısından disk difüzyon yöntemine göre daha kolay ve daha az zaman alıcı bir yöntem olduğu belirlenmiştir.

Çalışmamızda yaptığımız antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarına bakıldığında ise; gıda izolatlarının % 69.1'inin penisiline (38 suş), % 4.6'sı tetrasikline (2 suş) direnç gösterirken, Gentamisin, seftazidim ve sefuroksime karşı birer suş (% 2) dirençli olarak tespit edilmiştir. Vankomisin, rifampin ofloksasin, eritromisin, meropenem, linezolid, sefalotin, trimetoprim/sulfametoksazol ve amoksisilin/klavulonik asit'e karşı herhangi bir direnç saptanmamıştır (Çizelge 4.2.2). Gıda ve klinik izolatlar kıyaslandığında, gıda izolatlarının klinik izolatlara göre kullanılan antibiyotiklere daha duyarlı olduğu sonucuna varılmıştır.

Mashouf ve ark., (2015), toplam 1050 farklı gıda örneğinden izole ettikleri 98 *S. aureus* izolatının antibiyotik duyarlılıklarını inceledikleri çalışmalarında, eritromisine % 30.6, tetrasikline % 29.6, gentamisine % 27.6, rifampine % 24.5 ve trimetoprim-sulfametoksazole % 14.3 oranında direnç tespit etmişlerdir. Martins ve ark., (2015), koyun sütlerinden izole ettikleri 20 *S. aureus* suşunun penisilin, rifampin, eritromisin, gentamisin, linezolid ve vankomisin antibiyotiklerine karşı herhangi bir direnç göstermediğini sadece bir suşun tetrasikline dirençli olduğunu belirlemişlerdir. Xu ve ark., (2014) 78 *S. aureus* suşunun penisilin, eritromisin, tetrasiklin, trimetoprim/sulfametoksazol, amoksisilin/klavulonik asit ve gentamisine sırasıyla; % 74.4, % 59, % 24.4, % 10.3, % 7.7 ve % 1.3 oranında dirençli olduğunu, tüm izolatların ise vankomisine duyarlı olduğunu belirlemiştir. Zhang ve ark., (2012) *S. aureus*

suşlarının % 90'ının penisiline, % 85.6'sının eritromisine ve % 45.6'sının ofloksasine karşı direnç gösterdiğini; vankomisin ve trimetoprim/sulfametoksazole tüm suşların duyarlı olduğunu saptamıştır. Rahimi ,(2013) yaptığı çalışmada tüm suşların % 40'ının tetrasikline, % 30'unun penisiline, % 25'inin trimetoprim/sulfametoksazole ve eritromisine ve % 15'inin gentamisine dirençli olduğunu belirlerken, vankomisine dirençli herhangi bir suş tespit etmemiştir. Hamid ve ark., (2017) penisilin direncini % 94.4, MRSA oranını ise % 27.7 olarak belirlenirken; Mohsenzadeh ve ark, (2015) penisilin direncini % 90.3, MRSA oranını % 29 olarak bulmuştur. Ayrıca % 19.4 oranında tetrasikline direnç tespit edilmiş, gentamisin ve vankomisine direnç belirlenmemiştir. Çalışmamızda ise penisilin direnci % 69.1 olarak belirlenirken tetrasikline % 4.6 ve gentamisine % 2 oranında direnç gözlenmiştir. Kendi sonuçlarımızla mukayese ettiğimizde araştırmacıların belirlediği direnç oranlarının yüksek olduğu görülmektedir. Araştırmacıların bulgularına dayanarak gıda kaynaklı *S. aureus* suşlarının vankomisine karşı direnç göstermediği, bizim sonuçlarımız tarafından da desteklenmiştir.

Klinik kaynaklı örneklerle baktığımızda; çalışmamızda, penisilin, eritromisin, seftazidim, ofloksasin, sefuroksim, rifampin, tetrasiklin, amoksisilin/klavulonik, gentamisin, sefalotin, meropenem ve trimetoprim/sulfametoksazole karşı belirlenen direnç oranları sırasıyla: % 94, % 12.7, % 12, % 6, % 6, % 5.3, % 4.7, % 4.7, % 4, % 3.3, % 2.7 ve % 2 olarak tespit edilmiştir. Vankomisin ve linezolidde dirençli suş belirlenmemiştir (Çizelge 4.2.1).

Belbase ve ark., (2017) klinik örneklerden izole ettikleri 76 *S. aureus* suşunun penisiline % 97.4, gentamisine % 31.6, eritromisine % 55.3, tetrasikline % 1.3 oranında direnç belirlerken, vankomisin ve linezolidde direnç tespit etmemişlerdir. Dekker ve ark., (2016) penisiline % 98.2, tetrasikline % 57.1, trimetoprim/sulfametoksazole % 46.4, eritromisine % 3.6 oranında direnç belirlemiş, gentamisin, rifampin, vankomisin ve linezolidde direnç tespit etmemiştir. Klinik örneklerden izole edilen *S. aureus* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları ile ilgili başka bir çalışmada penisiline % 62.8, eritromisine % 41.1, gentamisine % 20.1, tetrasikline % 18.2, trimetoprim/sulfametoksazole % 16.8, rifampine % 7.3 ve linezolidde % 3.4 oranında direnç belirlenirken vankomisine direnç tespit edilmemiştir (Al-Zoubi ve ark., 2015). Ayepola ve ark., (2015) *S. aureus* suşlarının penisiline % 97.2, trimetoprim/sulfametoksazole % 84.3, tetrasikline % 13.4, gentamisine % 4.6 oranında direnç belirlerken vankomisin, linezolid, rifampin ve eritromisine karşı direnç

saptamamışlardır. Brown ve Ngeno, (2007) *S. aureus* izolatları arasında penisiline % 60, trimetoprim/sulfametoksazole % 22.5, gentamisin ve tetrasikline % 13.8 eritromisine % 8.8 direnç belirlerken vankomisine dirençli suş saptamamışlardır. Tekin ve ark., (2014) metisilin, vankomisin ve linezolid direncini araştırdıkları çalışmalarında *S. aureus* suşlarının hiç birinde vankomisin duyarlılığı belirlenmezken metisiline dirençli suşların % 1.7'sinde linezolide direnç tespit etmiştir. Çalışmamızla kıyasladığımızda benzer şekilde penisilin direnci yüksek bulunmuştur. Araştırmacılara benzer olarak çalışmamızda vankomisin ve linezolid direnci görülmemiş, bazı çalışmalar dışında rifampin, trimetoprim/sulfametaksazol ve gentamisin direncinde çok düşük değerlerde bulunmuştur.

MRSA suşlarının neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde glikopeptid grubu antibiyotik olan vankomisin yıllardır kullanılmaktadır. 1997 yılında vankomisine orta düzey direnç gösteren ilk *S. aureus* (VISA) suşu Hiromatsu ve ark., (1997), tarafından bildirilmiş, vankomisine dirençli ilk *S. aureus* suşu (VRSA) ise 2002 yılında bildirilmiştir (CDC, 2002). Sonraki yıllarda farklı merkezlerden VRSA izolatları bildirilmeye başlamıştır.

Ülkemizde vankomisine karşı azalmış direnç ilk kez Gülay ve ark., (1998) tarafından bildirilmiş olup, yapılan çalışmada, vankomisine % 5.3 oranında orta düzey duyarlılık saptamışlardır. Torun ve ark., (2005) yaptıkları çalışmada iki vankomisine orta duyarlı *S. aureus* izolatu bildirmişlerdir. Sancak ve ark., (2005) vankomisine heterojen direnç gösteren MRSA izolatını saptamışlardır. Ülkemizde hala vankomisine tam bir direnç gösteren VRSA suşu tespit edilmemiştir (Tekin ve ark., 2014). Kurutepe ve ark., (2007), Ekşi ve ark., (2008) ile Duman ve ark., (2009), yaptıkları çalışmalarında vankomisine dirençli suş bildirmemişlerdir. Fakat yurt dışında yapılan bazı çalışmalarda vankomisine değişik oranlarda dirençler rapor edilmektedir (Kahsay ve ark., 2014; Pournajaf ve ark., 2014) Yaptığımız çalışmada da vankomisine dirençli *S. aureus* suşuna rastlanmaması ülkemizde yapılan çalışmaları destekler niteliktedir.

MRSA ve MSSA suşlarının antibiyotiklere duyarlılık oranlarının da karşılaştırıldığı çalışmamızda bu oranlara bakacak olursak; MRSA ve MSSA suşlarında sırası ile penisiline; % 100, % 86, seftazidime; % 100, % 0.5, sefuroksime; % 55.6, % 0, ofloksasine; % 38.9, % 1.1, amoksisilin/klavulanik asite; % 38.9, % 0, gentamisine; % 33.3, % 0.5, eritromisine; % 27.8, % 7.5, tetrasikline; % 27.8, % 2.1, sefalotine; % 27.8, % 0, meropeneme; % 22.2, % 0, rifampine; % 16.7, % 2.7, trimetoprim/sulfametoksazole; % 11.1, % 0.5 oranında direnç saptanırken hem MRSA

hem de MSSA suşlarının hiç birinde linezolid ve vankomisine karşı direnç belirlenmemiştir (Çizelge 4.2.3). MRSA suşlarında kullanılan antibiyotiklere direnç oranının MSSA suşlarına göre daha yüksek olduğu ayrıca MRSA suşlarındaki çoklu antibiyotik direncinin oldukça fazla olduğu tespit edilmiştir.

Perwaiz ve ark., (2007) klinik kaynaklardan izole ettikleri MRSA ve MSSA suşlarındaki antibiyotik duyarlılıklarını belirledikleri çalışmalarında MRSA ve MSSA suşlarındaki direnç oranlarını sırası ile penisiline; % 100, % 81, eritromisine % 95, % 12, gentamisine; % 93 % 5, ofloksasine; % 92 % 5 olarak bulurlarken vankomisine karşı direnç tespit etmemişlerdir. Yine klinik örneklerden izole edilen MRSA ve MSSA suşları ile yapılan bir çalışmada penisiline; % 87.5, % 68.6, eritromisine; % 81.1, % 57.1, gentamisine; % 62.5, % 45.7, tetrasikline; % 87.5, % 34.3 oranında direnç bulunurken vankomisin direnci saptanmamıştır (Olowe ve ark., 2007). Hafeez ve ark.,(2004)'nın yaptıkları çalışmada ise eritromisine % 85.5 , % 50.9, gentamisine % %83.2, % 70.1, ofloksasine % 52.6, % 33.1, trimetoprim/sulfametaksazole % 81, % 72.2 direnç oranları tespit edilirken vankomisine direnç saptanmamıştır. Yüksekaya ve ark., (2017) beş yıllık dönem süresinde izole edilen 409 *S.aureus* suşunun % 33'ü metisilin dirençli olarak bulunmuşlar, MRSA suşlarının trimetoprim-sulfametoksazol, gentamisin, eritromisin, tetrasiklin ve rifampin direnç yüzdeleri sırasıyla % 25.7, % 64, % 83.4 , % 39, % 51.4 olarak belirlemişlerdir. MSSA suşlarının ise trimetoprim-sulfametoksazol, gentamisin, eritromisin, tetrasiklin ve rifampin direnç oranları sırasıyla % 11, % 26.2, % 40.3, % 26 ve % 23.4 olarak tespit etmişlerdir. MRSA ve MSSA suşlarında vankomisin ve linezolid direnci saptamamışlardır. Araştırmacıların çalışmalarında bulmuş oldukları penisilin direnç oranları çalışmamızdaki oranla örtüşmektedir. Yapılan çalışmalarda MRSA suşlarındaki eritromisin, gentamisin trimetoprim/sulfametoksazol ve ofloksasin direnç oranlarının, çalışmamızda bulduğumuz direnç oranlarından daha yüksek olduğu görülmektedir. Ayrıca belirtilen çalışmalarda hem MRSA hem de MSSA suşlarında vankomisin direncinin görülmemesi sonuçlarımızı destekler niteliktedir.

Çalışmamızda, MRSA suşlarının gösterdiği çoklu antibiyotik direnci, MSSA suşlarına göre oldukça yüksek oranda tespit edilmiştir.Yaptığımız çalışmada vankomisin ve linezolid direnci görülmemesi önem arz etmektedir. MRSA enfeksiyonlarının tedavisinde glikopeptidler hala altın standart tedavi yöntemidir, fakat glikopeptidlere dirençli MRSA suşları rapor edilmeye başlanmıştır. Linezolid MRSA enfeksiyonu tedavilerinde uygun bir alternatif olarak görülmekte ve direnç durumunun

takip edilmesi gerekmektedir. Direncin gelişiminin en büyük sebebi bilinçsiz antibiyotik kullanımıdır. Mikroorganizmaların kullanılan antibiyotiklere karşı çok hızlı bir şekilde direnç kazandığı göz önüne alınırsa, ilerleyen zamanda enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde antibiyotiklerin yetersiz kalacağı açıktır. Her geçen gün artan direnç oranları sebebiyle hastalara antibiyogram testi yapılmadan tedaviye başlanması, tedavinin başarısız olmasına ve direnç gelişiminin artmasına neden olmaktadır. Belirli periyotlarla hem klinik hem de çevresel suşlarda, artan antibiyotik direnç takibi yapılmasının faydalı ve gerekli olduğu görüşündeyiz.



5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

Bu çalışmada, çiğ sütlerden, açıkta satılan dondurmalarından ve çeşitli klinik kaynaklardan izole edilen toplam 205 *S. aureus* suşunun PFGE yöntemi ile genetik ilişkileri, multipleks PCR yöntemi ile metisilin direncinin belirlenmesi ve PVL toksin üreten suşların tespiti ayrıca antibiyotik duyarlılık profilleri araştırılmıştır. Genetik ilişkileri değerlendirildiğinde, gıda ve klinik izolatlarının birbirinden farklı oldukları belirlenmiştir. Gıda ve klinik kaynaklı izolatların sadece kendi grupları içinde alt tip oluşturdukları saptanmıştır. Bulgular göre gıda suşları içerisinde birbirinden farklı 43 pulso tip belirlendi, bu tiplerin de kendi içerisinde 9 alt tipe ayrıldığı tespit edildi. Klinik suşlar değerlendirildiğinde ise; toplam 150 klinik *S. aureus* suşunun 137 farklı pulsotip gösterdiği, bu 137 tipinde kendi içerisinde ise muhtemel veya yakın ilişkili olarak 12 alt tipe ayrıldığı görülmüştür. Gıda ve klinik kaynaklı izolatlar kıyaslandığında, genetik olarak belirli oranda benzerlikler görülmesine rağmen, bu oranlar yakın veya muhtemel ilişkili izolat olarak değerlendirebilmek için yeterli olmamış ve bu nedenle ilişkisiz olarak değerlendirilmiştir. Tüm izolatlar değerlendirildiğinde, toplam 205 *S. aureus* suşlarının 180 pulsotip gösterdiği, bu pulsotiplere ait de 21 alt tipin olduğu belirlendi. 180 farklı pulso tipin ortaya çıkması, klonal ilişki bakımından incelenen suşlar arasındaki genetik çeşitliliğin oldukça fazla olduğunu gösterdi. PFGE yönteminin gıda ve klinik kaynaklı suşlar arasındaki genetik ilişki ve çeşitliliğin belirlenmesi bakımından başarılı bir yöntem olduğu görüşüne varıldı. Multipleks PCR yöntemi bulgularına bakıldığında; tüm suşların 16s *rRNA* ve *femA* genlerini taşıdığı, klinik suşların 17'sinin (% 11.3), gıda suşlarının sadece 1'inin *mecA* geni taşıdığı, toplamda 18 (% 8.8) izolatın MRSA olduğu saptanmıştır. Klinik izolatlardan 7'si PVL toksin genini taşıırken, gıda izolatlarının hiçbirinde PVL toksin geni tespit edilmemiştir. Antibiyotiklere karşı duyarlılık sonuçlarına bakıldığında, klinik izolatlar arasında en yüksek direnç oranı % 94 ile penisiline karşı belirlenirken, ikinci sırayı % 12.7 ile eritromsin almıştır. Gıda izolatlarında da en yüksek direnç oranı % 69.1 ile penisiline karşı belirlenmiş olup kullanılan diğer antibiyotiklerin çoğuna ya tamamen duyarlı ya da çok düşük oranlarda direnç gösterdikleri tespit edilmiştir. Gıda ve klinik kaynaklı suşlar birlikte değerlendirildiğinde ise en yüksek direnç oranının yine % 87.3'le penisiline karşı olduğu, klinik ve gıda kaynaklı hiçbir suşun vankomisin ve linezolid direnç

göstermediği tespit edilmiştir. MRSA ve MSSA suşları karşılaştırıldığında; MRSA suşlarındaki çoklu antibiyotik direncinin MSSA suşlarına göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. Tüm MRSA suşları penisilin ve seftazidime dirençli bulunurken, direnç oranı bakımından ikinci sırayı sefuroksim (% 55.6), üçüncü sırayı ise ofloksasin ve amoksasilin/klavulanik asit (% 38.9) almıştır. MSSA suşlarının kullanılan antibiyotiklere karşı MRSA suşlarına göre daha duyarlı oldukları belirkenirken, hem MRSA hemde MSSA suşlarının hiçbirinde vankomisin ve linezolid direnci saptanmamıştır.

5.2 Öneriler

Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) hastane ve toplum kaynaklı enfeksiyona sebep olan ajanların başında yer almaktadır. Bu nedenle MRSA suşlarının doğru bir şekilde tanımlanması oldukça önem taşımaktadır. Çalışmamızda PCR'la *mecA* geninin tespiti referans alınarak yapılan çalışma sonucunda agar tarama testinin yüzde yüz uyumlu olduğu görülmüştür. Bu sonuca dayanarak rutin olarak yapılan deneylerde ve laboratuvarında moleküler yöntemi uygulamak için gerekli malzeme ve ekipmanları bulunmayan hastanelerde agar tarama yönteminin kullanılabilmesi önerilebilir. Çalışmamızda PVL oranı da araştırılmış olup, bu oran düşük bulunmuştur. Toplum ve hastane kökenli *S.aureus* izolatları sebebiyle ortaya çıkan enfeksiyonlarda, tedavinin düzenlenmesi ve çeşitli komplikasyonun ortaya çıkmasının önlenmesi amacıyla PVL pozitif MRSA ve MSSA izolatlarının dikkatlice takip edilmesi gerekmektedir.

Çiğ süt örnekleri ve dondurma örneklerinde *S. aureus* kontaminasyonunun görülmesi sık rastlanan bir durumdur. Bunun önüne geçilmesi için hijyen şartlarına uyulmasının ve önlemlerin daha da artırılmasının uygun olacağı görüşündeyiz. Özellikle sütün sağımından itibaren son tüketiciye kadar geçen aşamalarda hem hijyene hem de soğuk zincire oldukça dikkat edilmesi gerekmektedir. İncelediğimiz gıda örneklerinden elde ettiğimiz suşlarla klinik örneklerden elde ettiğimiz suşlar arasında PFGE yöntemi ile yakın bir ilişkinin saptanmaması sevindiricidir. Bu farklı kaynaklardan izole edilen suşların bir ortamdan diğer bir ortama taşınmadığını göstermektedir. Günümüzde moleküler tiplendirme yöntemleri arasında PFGE altın standart olarak kabul edilmekte ve çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgular değerlendirildiğinde, PFGE yönteminin tiplendirebilme ve yüksek ayırım gücü dikkat çekmektedir.

MRSA suşlarındaki antibiyotik direnci literatürlerden de elde ettiğimiz verilere göre her geçen gün artmaktadır. Bu durumun önüne geçilebilmesi için antibiyotiklerin çok yoğun bir şekilde ve bilinçsizce kullanılmasının önlenmesi ve özellikle klinik ve laboratuvar iş birliği artırılarak antibiyotik tedavisi gerekli görülen hastalarda antibiyogram testi yapılmadan tedaviye başlanmamalıdır. Özellikle geniş spektrumlu antibiyotikler konusunda oldukça dikkatli olunmalıdır. Eş, dost ve arkadaş tavsiyesi ile rastgele antibiyotik kullanılmamalı, ve her enfeksiyon antibiyotikle tedavi edilmemelidir. Özellikle virüs, fungus ve parazitlerin neden olduğu enfeksiyonlarda antibiyotik kullanımının hiçbir yararı yoktur. Antibiyotik kullanımı konusunda sağlık, veteriner, ziraat ve temel bilimlerde uzman kişilerle toplumda bilinçlenmeye yönelik faaliyetlere hız verilmelidir. Çalışmamızda vankomisin ve linezolid dirençli izolatın görülmemesi sevindiricidir. Linezolidin MRSA suşlarının glikopeptid antibiyotiklere direnç geliştirme potansiyelleri göz önünde bulundurulduğunda, MRSA enfeksiyonlarının tedavisinde alternatif olabileceği düşünülmektedir. Bu antibiyotiğe direnç durumunun takip edilmesi önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Adaleti, R., Nakipoglu, Y., Karahan, Z. C., Tasdemir, C. ve 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 (01), 046-050.
- Aires-de-Sousa, M., Parente, C. E., Vieira-da-Motta, O., Bonna, I. C., Silva, D. A. ve de Lencastre, H., 2007, Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from buffalo, bovine, ovine, and caprine milk samples collected in Rio de Janeiro State, Brazil, *Applied and environmental microbiology*, 73 (12), 3845-3849.
- Akçimen, B., NAĞIYEV, T., BİÇER, A. T., Erkan, Y., YAMAN, A. ve KÖKSAL, F., 2010, Adana Çukurova Üniversitesi Hastanesinde hastane infeksiyonuna yol açan metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarının pulsed field jel elektroforezi yöntemi ile genotiplendirilmesi, *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 30 (5), 1581-1586.
- Aklilu, E., Zakaria, Z., Hassan, L. ve Cheng, C. H., 2012, Molecular relatedness of methicillin-resistant *S. aureus* isolates from staff, environment and pets at University Veterinary Hospital in Malaysia, *PloS one*, 7 (8), e43329.
- Al-Talib, H., Yean, C. Y., Al-Khateeb, A., Hassan, H., Singh, K.-K. B., Al-Jashamy, K. ve Ravichandran, M., 2009, A pentaplex PCR assay for the rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and Pantone-Valentine Leucocidin, *BMC microbiology*, 9 (1), 113.
- Al-Zoubi, M. S., Al-Tayyar, I. A., Hussein, E., Al Jabali, A. ve Khudairat, S., 2015, Antimicrobial susceptibility pattern of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens in Northern area of Jordan, *Iranian journal of microbiology*, 7 (5), 265.
- Altöparlak, Ü., Uslu, H., Kireççi, E. ve Aktaş, F., 2002, Klinik örneklerden izole edilen stafilkoklarda antibiyotik direnci, *Ankem Derg*, 16 (1), 69-72.
- André, M. C. D., Campos, M. R. H., Borges, L. J., Kipnis, A., Pimenta, F. C. ve Serafini, A. B., 2008, Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsed-field gel electrophoresis following *SmaI* digestion, *Food Control*, 19 (2), 200-207.
- Andrei, A. ve Zervos, M. J., 2006, The application of molecular techniques to the study of hospital infection, *Archives of pathology & laboratory medicine*, 130 (5), 662-668.
- Appelbaum, P. C., 2007, Microbiology of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*, *Clinical Infectious Diseases*, 45 (Supplement 3), S165-S170.
- Arıdoğan, A., Atasever, L. ve Bal, Ç., 2004, Klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarının antibiyotiklere dirençleri, *Türk mikrobiyol cem derg*, 34 (1), 20-23.
- Asiimwe, B. B., Baldan, R., Trovato, A. ve Cirillo, D. M., 2017, Molecular epidemiology of Pantone-Valentine Leukocidin-positive community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates in pastoral communities of rural south western Uganda, *BMC Infectious Diseases*, 17 (1), 24.
- Aslantaş, Ö. ve Demir, C., 2016, Investigation of the antibiotic resistance and biofilm-forming ability of *Staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis cases, *Journal of Dairy Science*, 99 (11), 8607-8613.

- Aydın, N., Gültekin, B., Eyigör, M. ve Gürel, M., 2001, Klinik örneklerimizden izole edilen stafilocokların antibiyotik direnci.
- Ayepola, O. O., Olasupo, N. A., Egwari, L. O., Becker, K. ve Schaumburg, F., 2015, Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of Staphylococcus aureus isolates from clinical infection and asymptomatic carriers in Southwest Nigeria, *PLoS one*, 10 (9), e0137531.
- Bannerman, T. L., Hancock, G. A., Tenover, F. C. ve Miller, J. M., 1995, Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of Staphylococcus aureus, *Journal of clinical microbiology*, 33 (3), 551-555.
- Barcia-Macay, M., 2007, Activity of antibiotics towards extracellular and intracellular Staphylococcus aureus, *Citeseer*.
- Bardiau, M., Yamazaki, K., Duprez, J. N., Taminiau, B., Mainil, J. ve Ote, I., 2013, Genotypic and phenotypic characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolated from milk of bovine mastitis, *Letters in applied microbiology*, 57 (3), 181-186.
- Barski, P., Piechowicz, L., Galiński, J. ve Kur, J., 1996, Rapid assay for detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus using multiplex PCR, *Molecular and cellular probes*, 10 (6), 471-475.
- Basım, E. ve Basım, H., 2001, Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) technique and its use in molecular biology, *Turkish Journal of Biology*, 25 (4), 405-418.
- Bazzoun, D. A., Harastani, H. H., Shehabi, A. A. ve Tokajian, S. T., 2014, Molecular typing of Staphylococcus aureus collected from a Major Hospital in Amman, Jordan, *The Journal of Infection in Developing Countries*, 8 (04), 441-447.
- Belbase, A., Pant, N. D., Nepal, K., Neupane, B., Baidhya, R., Baidya, R. ve Lekhak, B., 2017, Antibiotic resistance and biofilm production among the strains of Staphylococcus aureus isolated from pus/wound swab samples in a tertiary care hospital in Nepal, *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 16 (1), 15.
- Bilgehan, H., 2000, Klinik mikrobiyoloji: Özel bakteriyoloji ve bakteri enfeksiyonları, (uygulama konuları ile), Fakülteler Kitapevi, Barış yayınları, p.
- Brown, P. D. ve Ngeno, C., 2007, Antimicrobial resistance in clinical isolates of Staphylococcus aureus from hospital and community sources in southern Jamaica, *International Journal of Infectious Diseases*, 11 (3), 220-225.
- Busch, U. ve Nitschko, H., 1999, Methods for the differentiation of microorganisms, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 722 (1), 263-278.
- Carrico, J. A., Pinto, F. R., Simas, C., Nunes, S., Sousa, N. G., Frazao, N., de Lencastre, H. ve Almeida, J. S., 2005, Assessment of band-based similarity coefficients for automatic type and subtype classification of microbial isolates analyzed by pulsed-field gel electrophoresis, *Journal of clinical microbiology*, 43 (11), 5483-5490.
- Cauwelier, B., Gordts, B., Descheemaeker, P. ve Van Landuyt, H., 2004, Evaluation of a disk diffusion method with cefoxitin (30 µg) for detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus, *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 23 (5), 389-392.
- CDC, 2002, Centers for Disease Control Prevention. Staphylococcus aureus resistant to vancomycin--United States, 2002, *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 51 (26), 565.
- Cengiz, A., Mısırlıgil, A. ve Aydın, M., 2004a, Tıp ve Dişhekimliğinde Genel ve Özel Mikrobiyoloji, *Güneş Kitapevi, Ankara*, 17-57.

- Cengiz, A., Mısırlıgil, A. ve Aydın, M., 2004b, Tıp ve Dişhekimliğinde Genel ve Özel Mikrobiyoloji, *Güneş Kitapevi, Ankara*, 344-350.
- Chambers, H. F., 1997, Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications, *Clinical microbiology reviews*, 10 (4), 781-791.
- Chiou, C.-S., Wei, H.-L. ve Yang, L.-C., 2000, Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and coagulase gene restriction profile analysis techniques in the molecular typing of *Staphylococcus aureus*, *Journal of clinical microbiology*, 38 (6), 2186-2190.
- CLSI, 2008, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2008, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Eighteenth informational supplement, CLSI document M100-S18, Wayne, PA, 34-38., Clinical and Laboratory Standards Institute, p.
- Cui, S., Li, J., Hu, C., Jin, S., Li, F., Guo, Y., Ran, L. ve Ma, Y., 2009, Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from swine and workers in China, *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 64 (4), 680-683.
- Çetinkol, Y., Çakır, F. Ö. ve Enginyurt, Ö., 2013, Kan Kültürlerinden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarında Metisiline Direncin Yıllara Göre Değişimi, *Ankem Derg.*, 27 (1), 38-42.
- Çiftçi, İ. H., ALTINDİŞ, M., Çetinkaya, Z., Gülşah, A. ve Aktepe, O. C., 2009, Klinik Örneklerden İzole Edilen Stafilokoklarda mecA Varlığının Araştırılması, *Kocatepe Tıp Dergisi*, 10 (1).
- David, M. Z. ve Daum, R. S., 2010, Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic, *Clinical microbiology reviews*, 23 (3), 616-687.
- De Sousa, M. A. ve Lencastre de, H., 2004, Bridges from hospitals to the laboratory: genetic portraits of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones, *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 40 (2), 101-111.
- Dekker, D., Wolters, M., Mertens, E., Boahen, K. G., Krumkamp, R., Eibach, D., Schwarz, N. G., Adu-Sarkodie, Y., Rohde, H. ve Christner, M., 2016, Antibiotic resistance and clonal diversity of invasive *Staphylococcus aureus* in the rural Ashanti Region, Ghana, *BMC Infectious Diseases*, 16 (1), 720.
- Derbentli, Ş., 2005, Stafilokoklarda Antibiyotik Direnci 2003-2004 Türkiye Haritası, *Ankem Dergisi*, 19, 54-60.
- Deurenberg, R., Vink, C., Kalenic, S., Friedrich, A., Bruggeman, C. ve Stobberingh, E., 2007, The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Clinical Microbiology and Infection*, 13 (3), 222-235.
- Deurenberg, R. H. ve Stobberingh, E. E., 2008, The evolution of *Staphylococcus aureus*, *Infection, genetics and evolution*, 8 (6), 747-763.
- Diekema, D., Pfaller, M., Schmitz, F., Smayevsky, J., Bell, J., Jones, R. ve Beach, M., 2001, Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–1999, *Clinical Infectious Diseases*, 32 (Supplement 2), S114-S132.
- Dokutan, A., Haciseyitoğlu, D., Çağ, Y., Yıldırım, E. P., Batirel, A., Özer, S. ve Gönüllü, N., 2017, Klinik örneklerden izole edilen stafilokoklarda linezolid direnci ve antibiyotik duyarlılıkları, *Ortadoğu Tıp Dergisi*, 9 (1), 19-23.

- Duman, Y., Serindağ, A. ve Tekerekoğlu, M. S., 2009, Klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus*' ların antimikrobiyallere direnç durumu, *İnönü Üni Tıp Fak Derg*, 16 (3), 145-148.
- Duman, Y., Tekerekoğlu, M. S. ve Otlı, B., 2013, Toplum ve Hastane Kökenli *Staphylococcus aureus* Klinik İzolatlarında Panton-Valentine Lökosidin Varlığının ve Klonal İlişkinin Araştırılması, *Mikrobiyol Bul*, 47 (3), 389-400.
- Durmaz, B. ve Durmaz, R., 2001, Pulsed-Field Gel Electrophoresis Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kurs Kitabı Nobel Tıp Kitapevleri, *Ankara, Sayfa*, 161-168.
- Durmaz, R., 2001, Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji, *Nobel Tıp Kitabevi*.
- Durmaz, R., 2007, Moleküler tiplendirmenin temel ilkeleri, IV. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kursu, 3-7 Eylül 2007, Malatya, 27-38., p.
- Dündar, D. ve Tamer, G. S., 2009, Klinik Örneklerden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarının Antimikrobiyal Duyarlılıkları: Üç Yıllık Değerlendirme, *Ankem Derg*, 23 (1), 8-12.
- Ekşi, F., Gayyurhan, E. D. ve Bayram, A., 2008, Gaziantep Üniversitesi Hastanesinde İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarının Antimikrobiyal Duyarlılıkları, *Ankem Derg*, 22 (4), 203-208.
- El-Adawy, H., Ahmed, M., Hotzel, H., Monecke, S., Schulz, J., Hartung, J., Ehricht, R., Neubauer, H. ve Hafez, H. M., 2016, Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from healthy turkeys and broilers using DNA microarrays, *Frontiers in Microbiology*, 7.
- Elements, 2009a, International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements
- Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53 (12), 4961-4967.
- Elements, I.-S. I. W. G. o. t. C. o. S. C. C., 2009b, Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53 (12), 4961-4967.
- Ellington, M. J., Hope, R., Ganner, M., Ganner, M., East, C., Brick, G. ve Kearns, A. M., 2007, Is Panton–Valentine leucocidin associated with the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* bacteraemia in the UK?, *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 60 (2), 402-405.
- Enright, M. C., Robinson, D. A., Randle, G., Feil, E. J., Grundmann, H. ve Spratt, B. G., 2002, The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99 (11), 7687-7692.
- Fagundes, H., Barchesi, L., Nader Filho, A., Ferreira, L. M. ve Oliveira, C. A. F., 2010, Occurrence of *Staphylococcus aureus* in raw milk produced in dairy farms in São Paulo state, Brazil, *Brazilian Journal of Microbiology*, 41 (2), 376-380.
- Fan, Y., Pan, F., Paoli, G. C., Xiao, Y., Sheng, H. ve Shi, X., 2008, Development of a multiplex PCR method for detection of the genes encoding 16S rRNA, coagulase, methicillin resistance and enterotoxins in *Staphylococcus aureus*, *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*, 16 (4), 394-411.
- Felten, A., Grandry, B., Lagrange, P. H. ve Casin, I., 2002, Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test, *Journal of clinical microbiology*, 40 (8), 2766-2771.

- Fluit, A. C. ve Schmitz, F.-J., 2003, MRSA: current perspectives, Horizon Scientific Press, p.
- Genestier, A.-L., Michallet, M.-C., Prévost, G., Bellot, G., Chalabreysse, L., Peyrol, S., Thivolet, F., Etienne, J., Lina, G. ve Vallette, F. M., 2005, Staphylococcus aureus Panton-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils, *The Journal of clinical investigation*, 115 (11), 3117-3127.
- Goering, R. V., 2004, Pulsed-field gel electrophoresis, *Molecular microbiology: diagnostic principles and practice*. ASM Press, Washington, DC, 185-196.
- Goering, R. V., 2010, Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease, *Infection, genetics and evolution*, 10 (7), 866-875.
- Goni, P., Vergara, Y., Ruiz, J., Albizu, I., Vila, J. ve Gomez-Lus, R., 2004, Antibiotic resistance and epidemiological typing of Staphylococcus aureus strains from ovine and rabbit mastitis, *International journal of antimicrobial agents*, 23 (3), 268-272.
- Gunes, E. ve Durak, Y., 2013, Investigation of Methicillin Resistance of Staphylococcus aureus Strains Isolated from Various Sources by Different Methods, *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 7 (4), 2815-2823.
- Gülay, Z., Atay, T. ve Yuluğ, N., 1998, Staphylococcus aureus suşlarında vankomisin direncinin araştırılması, *Ankem Derg*, 12, 101.
- Gülmez, D., Sancak, B., Ercis, S., Karakaya, J. ve Hascelik, G., 2012, Investigation of SCCmec types and Panton-Valentine leukocidin in community-acquired and nosocomial Staphylococcus aureus strains: comparing skin and soft tissue infections to the other infections, *Mikrobiyoloji bulteni*, 46 (3), 341-351.
- Hafeez, R., Chughtai, A. ve Aslam, M., 2004, Prevalence and antimicrobial susceptibility of methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA), *Int J Pathol*, 2 (1), 10-15.
- Hamid, S., Bhat, M. A., Mir, I. A., Taku, A., Badroo, G. A., Nazki, S. ve Malik, A., 2017, Phenotypic and genotypic characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus from bovine mastitis, *Veterinary World*, 10 (3), 363.
- Hartman, B. J. ve Tomasz, A., 1986, Expression of methicillin resistance in heterogeneous strains of Staphylococcus aureus, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 29 (1), 85-92.
- Hiramatsu, K., Cui, L., Kuroda, M. ve Ito, T., 2001, The emergence and evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus, *Trends in microbiology*, 9 (10), 486-493.
- Hiraramatsu, K., Hanaki, H., Ino, T., Yabuta, K. ve T. Oguri, a. F. T., 1997, Methicillin-resistant staphylococcus aureus clinical strain with reduced vancomycin susceptibility, *J. Antimicrob. Chemother*, 40, 135-136.
- Ichiyama, S., Ohta, M., Shimokata, K., Kato, N. ve Takeuchi, J., 1991, Genomic DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis as an epidemiological marker for study of nosocomial infections caused by methicillin-resistant Staphylococcus aureus, *Journal of clinical microbiology*, 29 (12), 2690-2695.
- Inegöl, E. ve Türkyılmaz, S., 2012, Determination of SCCmec types in methicillin resistant staphylococci isolated from cows and farm workers, *Ankara Univ Vet Fak Derg*, 59, 89-93.
- Ito, T., Katayama, Y., Asada, K., Mori, N., Tsutsumimoto, K., Tiensasitorn, C. ve 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 (5), 1323-1336.
- Jackson, C. R., Davis, J. A. ve Barrett, J. B., 2013, Prevalence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from retail meat and humans in Georgia, *Journal of clinical microbiology*, 51 (4), 1199-1207.
- Jevons, M. P., Coe, A. ve Parker, M., 1963, Methicillin resistance in staphylococci, *The Lancet*, 281 (7287), 904-907.
- Johnson, A. P., 1999, Quinupristin/dalfopristin, a new addition to the antimicrobial arsenal, *The Lancet*, 354 (9195), 2012-2013.
- Kahsay, A., Mihret, A., Abebe, T. ve Andualem, T., 2014, Isolation and antimicrobial susceptibility pattern of *Staphylococcus aureus* in patients with surgical site infection at Debre Markos Referral Hospital, Amhara Region, Ethiopia, *Archives of Public Health*, 72 (1), 16.
- Kirdar, S., Arslan, U., Tuncer, I., Findik, D. ve Bozdoğan, B., 2009, Investigation of the clonality and Panton-Valentine leukocidin toxin among nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains, *Mikrobiyoloji bulteni*, 43 (4), 529-533.
- Köksal, F., 1993, Moleküler Biyolojik Tiplendirme Yöntemlerinin Hastane infeksiyonlarında Kullanımı, *Hastane infeksiyonları Dergisi*, 3, 189-195.
- Kumar, R., Yadav, B. ve Singh, R., 2010, Genetic determinants of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from milk of mastitic crossbred cattle, *Current microbiology*, 60 (5), 379-386.
- Kurutepe, S., Sürücüoğlu, S., Gazi, H., Teker, A. ve Özbakkaloğlu, B., 2007, Metisiline-dirençli ve duyarlı *Staphylococcus aureus* suşlarının antibiyotiklere direnç oranları, *İnfeksiyon Derg*, 21 (4), 187-191.
- Lange, C., Cardoso, M., Senczek, D. ve Schwarz, S., 1999, Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil, *Veterinary microbiology*, 67 (2), 127-141.
- Li, J.-p., Zhou, H.-j., Yuan, L., He, T. ve Hu, S.-h., 2009, Prevalence, genetic diversity, and antimicrobial susceptibility profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Zhejiang Province, China, *Journal of Zhejiang University Science B*, 10 (10), 753-760.
- Liu, Y., Xu, Z., Yang, Z., Sun, J. ve Ma, L., 2016, Characterization of community-associated *Staphylococcus aureus* from skin and soft-tissue infections: a multicenter study in China, *Emerging Microbes & Infections*, 5 (12), e127.
- Louie, L., Goodfellow, J., Mathieu, P., Glatt, A., Louie, M. ve Simor, A., 2002, Rapid detection of methicillin-resistant staphylococci from blood culture bottles by using a multiplex PCR assay, *Journal of clinical microbiology*, 40 (8), 2786-2790.
- Makgotlho, P. E., 2010, Molecular characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains.
- Martins, K. B., Faccioli-Martins, P. Y., Riboli, D. F. M., Pereira, V. C., Fernandes, S., Oliveira, A. A., Dantas, A., Zafalon, L. F. ve Cunha, M. d. L. R. d., 2015, Clonal profile, virulence and resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from sheep milk, *Brazilian Journal of Microbiology*, 46 (2), 535-543.
- Mashouf, R. Y., Hosseini, S. M., Mousavi, S. M. ve Arabestani, M. R., 2015, Prevalence of enterotoxin genes and antibacterial susceptibility pattern of *Staphylococcus aureus* strains isolated from animal originated foods in West of Iran, *Oman medical journal*, 30 (4), 283.

- McMillan, K., Moore, S. C., McAuley, C. M., Fegan, N. ve Fox, E. M., 2016, Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from raw milk sources in Victoria, Australia, *BMC microbiology*, 16 (1), 169.
- Mehrotra, M., Wang, G. ve Johnson, W. M., 2000, Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance, *Journal of clinical microbiology*, 38 (3), 1032-1035.
- Mendem, S. K., Gangadhara, T. A., Shivannavar, C. T. ve Gaddad, S. M., 2016, Antibiotic resistance patterns of *Staphylococcus aureus*: A multi center study from India, *Microbial pathogenesis*, 98, 167-170.
- Mohsenzadeh, M., Ghazvini, K. ve Azimian, A., 2015, Frequency of specific agr groups and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in the northeast of Iran, *Veterinary Research Forum*, 295.
- Molina, K. C. ve Huang, V., 2016, Resistance to Non-glycopeptide Agents in Serious *Staphylococcus aureus* Infections, *Current infectious disease reports*, 18 (12), 47.
- Mongkolrattanothai, K., Boyle, S., Murphy, T. V. ve Daum, R. S., 2004, Novel non-mecA-containing staphylococcal chromosomal cassette composite island containing pbp4 and tagF genes in a commensal staphylococcal species: a possible reservoir for antibiotic resistance islands in *Staphylococcus aureus*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48 (5), 1823-1836.
- Murray, P., Rosenthal, K. ve Pfaller, M., Medical Microbiology, ed 5, Philadelphia, 2005, Elsevier, Inc.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S. ve Pfaller, M. A., 2015, Medical microbiology, Elsevier Health Sciences, p. 172-180
- Nakipoğlu, Y., İğnak, S., Gürler, N. ve Gürler, B., 2012, Klinik *Staphylococcus aureus* Suşlarında Antiseptik Direnç Genlerinin (qacA/B ve smr) ve Antibiyotik Maddelere Direnç Prevalansının Araştırılması, *Mikrobiyol Bul*, 46 (2), 180-189.
- Normanno, G., Corrente, M., La Salandra, G., Dambrosio, A., Quaglia, N., Parisi, A., Greco, G., Bellacicco, A., Virgilio, S. ve Celano, G., 2007, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy, *International journal of food microbiology*, 117 (2), 219-222.
- Olowe, O., Eniola, K., Olowe, R. ve Olayemi, A., 2007, Antimicrobial Susceptibility and Beta-lactamase detection of MRSA in Osogbo. SW Nigeria, *SKIN*, 12 (6), 9.0.
- Ozansoy, F. A., Cevahir, N. ve Kaleli, İ., 2015, Klinik Örneklerden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarında Makrolid, Linkozamid ve Streptogramin B Direncinin Fenotipik ve Genotipik Yöntemlerle Araştırılması, *Mikrobiyol Bul*, 49 (1), 1-14.
- Ozkalp, B. ve Baybek, H., 2003, Klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarının çeşitli antibiyotiklere in vitro duyarlılıkları, *Gen Tıp Derg*, 13 (2), 65-68.
- Özdemir, H. ve Keyvan, E., 2016, Isolation and characterisation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from beef, sheep and chicken meat, *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 63 (4), 333-338.
- Özkul, H., Öktem, İ. A. ve Gülay, Z., 2007, Klinik Örneklerden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarında Panton-Valentin Lökositin (PVL) Varlığının Araştırılması, *Mikrobiyol Bul*, 41.
- Panton, P. ve Valentine, F., 1932, Staphylococcal toxin, *The Lancet*, 219 (5662), 506-508.

- Peles, F., Wagner, M., Varga, L., Hein, I., Rieck, P., Gutser, K., Keresztúri, P., Kardos, G., Turcsányi, I. ve Béri, B., 2007, Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk in Hungary, *International journal of food microbiology*, 118 (2), 186-193.
- Perez-Roth, E., Claverie-Martin, F., Villar, J. ve Mendez-Alvarez, S., 2001, Multiplex PCR for Simultaneous Identification of *Staphylococcus aureus* and Detection of Methicillin and Mupirocin Resistance, *Journal of clinical microbiology*, 39 (11), 4037-4041.
- Perwaiz, S., Barakzi, Q., Farooqi, B. J., Khursheed, N. ve Sabir, N., 2007, Antimicrobial susceptibility pattern of clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, *JOURNAL-PAKISTAN MEDICAL ASSOCIATION*, 57 (1), 2.
- Peters, T. M., 2009, Pulsed-field gel electrophoresis for molecular epidemiology of food pathogens, *Molecular Epidemiology of Microorganisms: Methods and Protocols*, 59-70.
- Pires, F. V., de Souza, M. d. L. R., Abração, L. M., Martins, P. Y., Camargo, C. H. ve Fortaleza, C. M. C. B., 2014, Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* in Botucatu, Brazil: a population-based survey, *PloS one*, 9 (3), e92537.
- Pournajaf, A., Ardebili, A., Goudarzi, L., Khodabandeh, M., Narimani, T. ve Abbaszadeh, H., 2014, PCR-based identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains and their antibiotic resistance profiles, *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 4, S293-S297.
- Predari, S., Ligozzi, M. ve Fontana, R., 1991, Genotypic identification of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci by polymerase chain reaction, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35 (12), 2568-2573.
- Prevost, G., Jaulhac, B. ve Piemont, Y., 1992, DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis is more effective than ribotyping in distinguishing among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates, *Journal of clinical microbiology*, 30 (4), 967-973.
- Prevost, G., Bouakham, T., Piemont, Y. ve Monteil, H., 1995, Characterisation of a synergohymenotropic toxin produced by *Staphylococcus intermedius*, *FEBS letters*, 376 (3), 135-149.
- Rahimi, E., 2013, Enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* isolated from traditional and commercial dairy products marketed in Iran, *Brazilian Journal of Microbiology*, 44 (2), 393-399.
- Revazishvili, T., Bakanidze, L., Gomelauri, T., Zhgenti, E., Chanturia, G., Kekelidze, M., Rajanna, C., Kreger, A. ve Sulakvelidze, A., 2006, Genetic background and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* strains isolated in the Republic of Georgia, *Journal of clinical microbiology*, 44 (10), 3477-3483.
- Sancak, B., Ercis, S., Menemenlioğlu, D., Çolakoğlu, Ş. ve Hasçelik, G., 2005, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin in a Turkish university hospital, *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 56 (3), 519-523.
- Sancak, B., 2007, *Staphylococcus aureus*' ta metisilin ve vankomisin direnci, *Hacettepe Tıp Dergisi*, 38 (3), 127-134.
- Sancak, B., 2012, MRSA DİRENÇ MEKANİZMALARI: DÜNYADA VE TÜRKİYE'DE EPİDEMİYOLOJİSİ, *ANK EM Derg*, 26, 38-47.
- Schwartz, D. C. ve Cantor, C. R., 1984, Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis, *cell*, 37 (1), 67-75.

- Seidl, K., Leimer, N., Marques, M. P., Furrer, A., Holzmann-Bürge, A., Senn, G., Zbinden, R. ve Zinkernagel, A. S., 2015, Clonality and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at the University Hospital Zurich, Switzerland between 2012 and 2014, *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 14 (1), 14.
- Serhat, Ü., 2009, MRSA PROBLEMİ, 23(Ek 2), 1-12.
- Sevgican, E., Sınırtaş, M., Özakin, C. ve Gedikoğlu, S., 2009, *Staphylococcus* Türlerinde Metisilin Direncinin Farklı Yöntemlerle Saptanması, *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection)*, 23 (2), 63-68.
- Shimizu, A., Fujita, M., Igarashi, H., Takagi, M., Nagase, N., Sasaki, A. ve Kawano, J., 2000, Characterization of *Staphylococcus aureus* coagulase type VII isolates from staphylococcal food poisoning outbreaks (1980–1995) in Tokyo, Japan, by pulsed-field gel electrophoresis, *Journal of clinical microbiology*, 38 (10), 3746-3749.
- Shin, E., Hong, H., Park, J., Oh, Y., Jung, J. ve Lee, Y., 2016, Characterization of *Staphylococcus aureus* faecal isolates associated with food- borne disease in Korea, *Journal of applied microbiology*, 121 (1), 277-286.
- Souza, V., Nader Filho, A., Melo, P. d. C., Ferraudo, G. M., Ferraudo, A. S., Conde, S. d. O. ve Fogaça Junior, F. A., 2012, Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* isolates at different sites in the milk producing dairy farms, *Brazilian Journal of Microbiology*, 43 (4), 1646-1650.
- Spanu, V., Viridis, S., Scarano, C., Cossu, F., De Santis, E. P. L. ve Cosseddu, A., 2010, Antibiotic resistance assessment in *S. aureus* strains isolated from raw sheep's milk cheese, *Veterinary research communications*, 34 (1), 87-90.
- Stapleton, P. D. ve Taylor, P. W., 2002, Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation, *Science progress*, 85 (1), 57-72.
- Stranden, A., Frei, R. ve Widmer, A., 2003, Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: can PCR replace pulsed-field gel electrophoresis?, *Journal of clinical microbiology*, 41 (7), 3181-3186.
- Swenson, J. M., Williams, P. P., Killgore, G., O'Hara, C. M. ve Tenover, F. C., 2001, Performance of Eight Methods, Including Two New Rapid Methods, for Detection of Oxacillin Resistance in a Challenge Set of *Staphylococcus aureus* Organisms, *Journal of clinical microbiology*, 39 (10), 3785-3788.
- Tekeli, A., Koyuncu, E., Dolapci, I., Akan, O. A. ve Karahan, Z. C., 2009, Molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from blood cultures between 2002-2005 in Ankara University Hospital, *Mikrobiyoloji bulteni*, 43 (1), 1-10.
- Tekin, A., Dal, T., Deveci, Ö., Tekin, R., Özcan, N., Atmaca, S. ve Dayan, S., 2014, In vitro susceptibility to methicillin, vancomycin and linezolid of staphylococci isolated from bloodstream infections in eastern Turkey, *Brazilian Journal of Microbiology*, 45 (3), 829-833.
- Telli, M., Sümerkan, B. ve Eşel, D., 2006, *Staphylococcus aureus*' ta metisilin direncinin belirlenmesinde sefoksitin disk, oksasilin disk, oksasilin agar tarama ve PBP2a lateks testlerinin karşılaştırılması, *İnfeksiyon Derg*, 20 (2), 93-96.
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H. ve Swaminathan, B., 1995, Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing, *Journal of clinical microbiology*, 33 (9), 2233.
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D. ve Goering, R. V., 1997, How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial

- infections a review for healthcare epidemiologists, *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 18 (06), 426-439.
- Thompson, R. L., Cabezudo, I. ve Wenzel, R. P., 1982, Epidemiology of nosocomial infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Annals of Internal Medicine*, 97 (3), 309-317.
- Thong, K. L., Junnie, J., Liew, F. Y., Yusof, M. Y. ve Hanifah, Y. A., 2009, Antibigrams and molecular subtypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in local teaching hospital, Malaysia, *J Microbiol Biotechnol*, 19 (10), 1265-1270.
- Tiemersma, E. W., Bronzwaer, S. L., Lyytikäinen, O., Degener, J. E., Schrijnemakers, P., Bruinsma, N., Monen, J., Witte, W., Grundmann, H. ve Participants, E. A. R. S. S., 2004, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999–2002, *Emerging infectious diseases*, 10 (9), 1627.
- Torun, M. M., Bahar, H., Demirci, M., Altaş, K., Bağdatlı, Y. ve Kocazeybek, B., 2005, Two heterogeneously vancomycin-intermediate clinical isolates of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Turkish university hospital: brief report of a surveillance study, *International journal of antimicrobial agents*, 26 (6), 508-510.
- Towner, K., Talbot, D., Curran, R., Webster, C. ve Humphreys, H., 1998, Development and evaluation of a PCR-based immunoassay for the rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Journal of Medical Microbiology*, 47 (7), 607-613.
- Trindade, P., McCulloch, J., Oliveira, G. ve Mamizuka, E., 2003, Molecular techniques for MRSA typing: current issues and perspectives, *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 7 (1), 32-43.
- Tsubakishita, S., Kuwahara-Arai, K., Sasaki, T. ve Hiramatsu, K., 2010, Origin and molecular evolution of the determinant of methicillin resistance in staphylococci, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54 (10), 4352-4359.
- Turlej, A., Hryniewicz, W. ve Empel, J., 2011, Staphylococcal cassette chromosome mec (Sccmec) classification and typing methods: an overview, *Pol J Microbiol*, 60 (2), 95-103.
- Tünger, A., Çavuşoğlu, C. ve Korkmaz, M., 2005, Asya Mikrobiyoloji, *İzmir, Asya Tıp Kitabevi*, 71-80.
- Türkyılmaz, S., Tekbıyık, S., Oryasin, E. ve Bozdoğan, B., 2010, Molecular Epidemiology and Antimicrobial Resistance Mechanisms of Methicillin- Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Milk, *Zoonoses and public health*, 57 (3), 197-203.
- Unal, S., Hoskins, J., Flokowitsch, J., Wu, C., Preston, D. ve Skatrud, P., 1992, Detection of methicillin-resistant staphylococci by using the polymerase chain reaction, *Journal of clinical microbiology*, 30 (7), 1685-1691.
- Ünal, N. ve İstanbulluoğlu, E., 2009, İnsan ve sığır kökenli *Staphylococcus aureus* izolatlarının fenotipik ve genotipik özelliklerinin araştırılması, *Ankara Ün. Vet. Fak. Derg*, 56, 119-126.
- Ünal, N. ve Yıldırım, M., 2010, İneklerin süt, meme başı derisi ve burun mukozalarından izole edilen stafilokok türlerinin antibiyotik direnç profilleri, *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg*, 16.
- Ünal, N., 2013, Subklinik mastitisli inek sütlerinden izole edilen *Staphylococcus aureus* izolatlarında bazı toksin genleri ve metisilin direnç geninin araştırılması, *Ankara Univ Vet Fak Derg*, 60, 21-26.

- Van de Velde, H., 1894, Etude sur le mécanisme de la virulence du Staphylocoque pyogene, *La Cellule*, 10, 402-460.
- Vannuffel, P., Gigi, J., Ezzedine, H., Vandercam, B., Delmee, M., Wauters, G. ve Gala, J.-L., 1995, Specific detection of methicillin-resistant Staphylococcus species by multiplex PCR, *Journal of clinical microbiology*, 33 (11), 2864-2867.
- Vannuffel, P., Laterre, P.-F., Bouyer, M., Gigi, J., Vandercam, B., Reynaert, M. ve Gala, J.-L., 1998, Rapid and specific molecular identification of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in endotracheal aspirates from mechanically ventilated patients, *Journal of clinical microbiology*, 36 (8), 2366-2368.
- Vautor, E., Abadie, G., Guibert, J.-M., Huard, C. ve Pepin, M., 2003, Genotyping of Staphylococcus aureus isolated from various sites on farms with dairy sheep using pulsed-field gel electrophoresis, *Veterinary microbiology*, 96 (1), 69-79.
- Vautor, E., Jay, C., Chevalier, N., Visomblin, N., Vernet, G. ve Pépin, M., 2005, Characterization of 26 isolates of Staphylococcus aureus, predominantly from dairy sheep, using four different techniques of molecular epidemiology, *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 17 (4), 363-368.
- Vorobieva, V., Bazhukova, T., Hanssen, A.-M., Caugant, D., Semenova, N., Haldorsen, B. C., Simonsen, G. S. ve Sundsfjord, A., 2008, Clinical isolates of Staphylococcus aureus from the Arkhangelsk region, Russia: antimicrobial susceptibility, molecular epidemiology, and distribution of Pantone-Valentine leukocidin genes, *Apmis*, 116 (10), 877-887.
- Vourli, S., Vagiakou, H., Ganteris, G., Orfanidou, M., Polemis, M., Vatopoulos, A. ve Malamou-Ladas, H., 2007, High rates of community-acquired, Pantone-Valentine leukocidin (PVL)-positive methicillin-resistant S. aureus (MRSA) infections in adult outpatients in Greece, *Euro Surveill*, 14 (2).
- Weller, T., 2000, Methicillin-resistant Staphylococcus aureus typing methods: which should be the international standard?, *Journal of Hospital Infection*, 44 (3), 160-172.
- Wu, F. ve Della-Latta, P., 2006, Pulsed-field gel electrophoresis, In: Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology, Eds: Springer, p. 143-157.
- Xie, Y., He, Y., Gehring, A., Hu, Y., Li, Q., Tu, S.-I. ve Shi, X., 2011, Genotypes and toxin gene profiles of Staphylococcus aureus clinical isolates from China, *PloS one*, 6 (12), e28276.
- Xu, J., Shi, C., Song, M., Xu, X., Yang, P., Paoli, G. ve Shi, X., 2014, Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance traits of foodborne Staphylococcus aureus isolates from Shanghai, *Journal of food science*, 79 (4), M635-M642.
- Yao, D., Yu, F.-y., Qin, Z.-q., Chen, C., He, S.-s., Chen, Z.-q., Zhang, X.-q. ve Wang, L.-x., 2010, Molecular characterization of Staphylococcus aureus isolates causing skin and soft tissue infections (SSTIs), *BMC Infectious Diseases*, 10 (1), 133.
- Yılmaz, S., Kılıç, A., Karagöz, A., Bedir, O., Güçlü, A. Ü. ve Başustaoğlu, A. C., 2012a, Hastane ve Toplum Kaynaklı Staphylococcus aureus İzolatlarında Çeşitli Virülans Faktörlerinin Gerçek Zamanlı PCR Yöntemiyle Araştırılması, *Mikrobiyol Bul*, 46 (4), 532-545.
- Yılmaz, S., Kılıç, A., Karagöz, A., Bedir, O., Uskudar, G. A. ve Başustaoğlu, A., 2012b, Investigation of various virulence factors among the hospital and community-acquired Staphylococcus aureus isolates by real-time PCR method, *Mikrobiyoloji bulteni*, 46 (4), 532-545.
- Yüksekkaya, Ş., Opuş, A., Güvenç, H. İ., Kaya, M., Akkaya, O., Güzelant, A. ve Kurtoğlu, M. G., 2017, 2009-2013 Yılları Arasında Konya Eğitim ve Araştırma

- Hastanesinde Kan Kùltürlerinden İzole Edilen Staphylococcus aureus Suşlarının Antimikrobiyal Ajanlara Duyarlılıklarının Değerlendirilmesi, *Ankem Derg*, 31 (1), 1-6.
- Zhang, C., Song, L., Chen, H., Liu, Y., Qin, Y. ve Ning, Y., 2012, Antimicrobial susceptibility and molecular subtypes of Staphylococcus aureus isolated from pig tonsils and cow's milk in China, *Canadian Journal of Veterinary Research*, 76 (4), 268-274.
- Zhang, K., Sparling, J., Chow, B. L., Elsayed, S., Hussain, Z., Church, D. L., Gregson, D. B., Louie, T. ve Conly, J. M., 2004, New quadriplex PCR assay for detection of methicillin and mupirocin resistance and simultaneous discrimination of Staphylococcus aureus from coagulase-negative staphylococci, *Journal of clinical microbiology*, 42 (11), 4947-4955.



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Erdoğan GÜNEŞ
Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : Bartın / 20.07.1985
Telefon : 0332 223 1885
e-mail : erdogangunes@selcuk.edu.tr

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: Bartın Köksal Toptan Süper Lisesi (YDA) Bartın	2003
Üniversite	: Selçuk Üniversitesi /Selçuklu /Konya	2008
Yüksek Lisans	: Selçuk Üniversitesi /Selçuklu /Konya	2011
Doktora	: Selçuk Üniversitesi /Selçuklu /Konya	2017

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2010	Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi	Araştırma Görevlisi

UZMANLIK ALANI

Mikrobiyoloji, Moleküler Mikrobiyoloji

YABANCI DİLLER

İngilizce

YAYINLAR

Gunes, E., Durak, Y., Uysal, A., Aladağ, M. O., Akin, D., 2011, Investigation of methicillin resistance by different methods in *Staphylococcus aureus* strains which isolated from various sources, *Microbiologia Balkanika 2011 (7th Balkan Congress of Microbiology)*, Book of Abstract, page 21, 25-29 Ekim, Belgrad, Sırbistan (Poster bildirisi) **Yüksek Lisans Tezinden.**

Aladağ, M. O., Durak, Y., Uysal, A., Gunes, E., 2011, Detection of ESBL producing and antibiotic susceptibilities in *Klebsiella pneumoniae* isolated from urinary system infection, *Microbiologia Balkanika 2011 (7th Balkan Congress of Microbiology)*, Book of Abstract, page 15, 25-29 Ekim, Belgrad, Sırbistan (Poster bildirisi).

Gunes, E., Durak, Y. (2013). Investigation of Methicillin Resistance of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Various Sources by Different Methods. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 7(4), 2815-2823. **Yüksek Lisans Tezinden.**

Aladağ M.O., Uysal, A., Dündar, N., Durak Y., Gunes, E. (2013). Characterization of *Klebsiella pneumonia* strains Isolated from urinary Tract infections Detection of ESBL Characteristics Antibiotic susceptibility and RAPD Genotyping. *Polish Journal of Microbiology*, 62(4), 401-409.

Zengin, G., Uysal, A., Gunes, E., Aktümsek, A. (2014). Survey of Phytochemical Composition and Biological Effects of Three Extracts from a Wild Plant *Cotoneaster nummularia* Fisch et Mey A Potential Source for Functional Food Ingredients and Drug Formulations. *PLoS ONE*, 9(11), 113527, Doi: 10.1371/journal.pone.0113527.

Zengin, G., Sarıkürkcü C., Gunes, E., Uysal, A., Ceylan R., Uysal, Ş., Güngör, H., Aktümsek, A. (2015). Two *Ganoderma* species profiling of phenolic compounds by HPLC DAD antioxidant antimicrobial and inhibitory activities on key enzymes linked to diabetes mellitus Alzheimer s disease and skin disorders. *Food Funct.*, 6(8), 2794-2802., Doi: 10.1039/c5fo00665a.

Uysal, A., Gunes, E. (2015). Antimicrobial and Anti MRSA Effects of Three Extracts of Some *Hypericum* species Against Standard Microorganisms and Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Strains. *Current Bioactive Compounds*, 11(3), 146-151.

Uysal, A., Gunes, E., Sarıkürkcü, C., Çelik, H., Durak, Y., Uren, M.C. (2016). New Prospective Materials for Chemoprevention Three Phlomis. *British Journal of Pharmaceutical Research*, 10(3), 1-13., Doi: 10.9734/BJPR/2016/23963.

Akın, S.D., Durak, Y., Uysal, A., Gunes, E., Aladağ, M.O. (2016). Assessment of antimutagenic action of *Celtis glabrata* Steven ex Planch Cannabaceae extracts against base pair exchange and frame shift mutations on *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 strains by Ames test. *Drug and Chemical Toxicology*, 39(3), 312-321., Doi: 10.3109/01480545.2015.1121273.

Uysal, A., Lazarova, I., Zengin, G., Gunes, E., Aktümsek, A., Gevrenova, R. (2016). New Perspectives on *Asphodeline lutea* from Bulgaria and Turkey Anti mutagenic Anti microbial and Anti methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* MRSA Activity. *British Journal of Pharmaceutical Research*, 10(3), 1-10., Doi: 10.9734/BJPR/2016/23957.

Uysal, Ahmet., Zengin, G., Gunes, E., Ekşinar Uysal, N. (2016). Natural two *Taraxacum* species effective against frame shift and base pair substitution mutations mutagenic antimutagenic and antioxidant evaluation. *Marmara Pharmaceutcal Journal*. 20(3), 311- 319., Doi: 10.12991/mpj.20162068040.

Mocan, A., Zengin, G., Uysal, A., Gunes., E., Mollica, A., Değirmenci, N.S., Lokman, A., Aktümsek, A. (2016). Biological and chemical insights of *Morina persica* L A source of bioactive compounds with multifunctional properties. *Journal of Functional Foods*, 25, 94-109., Doi: 10.1016/j.jff.2016.05.010.

Uysal, A., Zengin, G., Mollica, A., Gunes, E., Marcello, L., Yılmaz, T., Aktümsek, A. (2016). Chemical and biological insights on *Cotoneaster integerrimus* A new epicatechin source for food and medicinal applications. *Phytomedicine*, 23(10), 979-988., Doi: 10.1016/j.phymed.2016.06.011.

Uysal, Ahmet., Gunes, E., Durak. Y. (2016). Antimicrobial and Anti Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Activities of *Phlomis pungens* WILLD var *pungens* WILLD Extracts. *International Conferance On Biological Sciences* (Özet Bildiri/Poster).

Durak, Y., Uysal, A., Gunes, E. (2016). Investigation Mutagenic And Antimutagenic Potentials Of Root Methanol Extract Of *Ferula Elaeochytris* Korovin By *Salmonella* Microsome Test System. *European Biotechnology Congress*, Doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.05.074 (Özet Bildiri/Sözlü Sunum).

Durak, Y., Acar, S., Uysal, A., Gunes, E., Aladağ, M.O. (2015). In Vitro Cholesterol assimilation Of Some Commercial Yoghurt Starter Cultures. *9th Balkan Congress Of Microbiology*.

Gunes, E., Uysal, A., Durak, Y., Yıldızıtugay, E. (2015). Assesment Of Mutagenic and Antimutagenic Potentials of Taraxacum Mirabile and Taraxacum Farinosum Extracts by Ames Test. *2nd International Conference On Natural Products Utilization: From Plants To Pharmacy Shelf*.

Uysal, A., Gunes, E., Çelik, H. (2015). Centaurea Pterocaula Evaluation of Mutagenic and Antimutagenic Activity of Three Extracts by Salmonella typhimurium Strains Indicator of Base Pair Substitution and Frame Shift Mutations. *2nd International Conference On Natural Products Utilization: From Plants To Pharmacy Shelf*.

Uysal, A., Lazarova, I., Zengin, G., Gunes, E., Aktümsek, A., Gevrenova, R. (2015). A Source Of Natural Anti Mutagenic Anti Microbial and Anti Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Agents Asphodeline lutea. *2nd International Conference On Natural Products Utilization: From Plants To Pharmacy Shelf*.

Uysal, A., Durak, Y., Gunes, E., Yıldızıtugay, E., Aladağ, M.O., Küçüködük, M. (2016)., Biodiversty an Overview, Bölüm adı:(survey of mutagenic and antimutagenic potential of methanol extracts of three Hypericum species from Turkey (Hypericum pruinatum Boiss.&Bal., Hypericum olimpicum L. and Hypericum scabrum L.) by Ames test). Oxford Book Campany, Editör: Shyam S. Khinchi, Meenu Tanwar, Basım sayısı:1, Sayfa Sayısı 200, ISBN:9789350302446, İngilizce(Bilimsel Kitap).

Güneş, E., Zengin, G., Uysal, A., Aktümsek, A., Durak, Y. (2014). Hyoccyamus reticulatus'un Hekzan ve Su Özütlelerinin Antioksidan ve Antimikrobiyal Özellikleri Üzerine Bir Çalışma. *Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Dergisi*, 38, 21-29.