

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Bakteriler zamanla antibiyotiklere karşı direnç geliştirmekte, bu durum, hem hasta hem de hekim açısından bazı sorunları beraberinde getirmektedir. Direnç, kişilerin tedavi süresini, hastanede yatış süresini uzatıp, ölüm oranlarını artırmakta, daha geniş spektrumlu ve daha pahalı olan antibiyotik kullanımına yol açmaktadır (1,2).

Son yıllarda metisiline dirençli stafilokok suşlarının aminoglikozitlere ve kinolonlara önemli ölçüde direnç gelişimi bildirilmektedir (3,4,5). Bu durumda tek seçenek vankomisin, teikoplanin gibi glikopeptitler kalmaktadır. Böylece MRSA ve metisiline dirençli KNS'lerin klinik laboratuarda epidemiyolojik olarak birbiri ile ilişkili olan suşların saptanması ve onların ilişkisiz suşlardan ayırt edilmesi büyük önem kazanmaktadır.

1940'larda nozokomiyal bakteriyemilerin en önemli patojeni olan *S. aureus*, 1960'larda penisilinaza dirençli penisilin ve sefalosporinlerin geliştirilmesiyle önemini yitirmeye başlamış ancak İngiltere ve diğer Avrupa Ülkelerinde metisiline dirençli *S. aureus*'a bağlı hastane salgınları gözlenmeye başlamıştır. Günümüzde MRSA tüm dünyada yaygın olarak görülmekte olup, prevalansı ülkeler arasında oldukça farklılıklar göstermektedir. Kuzey Avrupa ülkelerinde MRSA prevalansı %1'den düşük iken Güney Avrupa ülkelerinde, Amerika'da ve bazı Asya ülkelerinde bu oran % 50'leri aşmış durumdadır (6, 7).

Ülkemizde MRSA oranının eğitim hastanelerimizde %50'nin üzerinde seyrettiğini bildiren çalışmalar rapor edilmiştir (8-11). *S. epidermidis* ve *S. aureus*, hastane kaynaklı bakteriyemi nedenlerinin en önemlileri arasında yer almaktadır. Hastane çevresinden izole edilen *S. epidermidis* suşlarının yaklaşık %70'inin metisiline dirençli olduğu rapor edilmiştir (12).

Metisilin direncinin saptanmasında birçok yöntem kullanılmaktadır. (13-15). Bunlardan moleküler tiplendirme yöntemleri kökenler arasındaki klonal ilişkiyi ortaya koyarak, salgınların kaynak, bulaş yolları ve bulaşın derecesi hakkında oldukça yararlı bilgiler sunmaktadır.

KNS'ler diğer stafilokok türlerine antibiyotik direnç genlerini transfer eden rezervuar durumundadırlar bu nedenle de moleküler tiplendirilmesi önem taşımaktadır.

Hastane epidemiyolojisiyle ilgili birçok salgın araştırmasında, kaynağın endojen mi yoksa ekzojen mi olduğu, birden fazla klonun mevcut olup olmadığı gibi sorulara da yine ancak moleküler yöntemlerle cevap vermek mümkündür.

Bu yöntemler arasında ayırım gücü en yüksek olan PFGE yöntemidir. Bu yöntem altın standart olarak kabul edilmektedir. (13. 15-18.) Bu nedenle çalışmamızda PFGE yöntemi tercih edilmiştir.

Bu tez çalışması Gaziantep Üniversitesi Şahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesi Yoğun bakım ünitesi (YBÜ) 'lerinden izole edilen MRSA ve metisiline dirençli KNS'lerin moleküler analizi, hastane için klonal yayılmanın saptanmasına, klinik tedaviye yardımcı olmasına ve hastane infeksiyonlarını önleme çalışmalarına katkı amacıyla planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 STAFİLOKOKLARIN MİKROBİYOLOJİK ÖZELLİKLERİ

2.1.1 MORFOLOJİ: Tüm stafilokoklar hareketsiz, endospor oluşturmeyen, Gram pozitif, koklardır. Boyutları 0.5-1.5 µm çapında olup tek tek, ikili veya dördü gruplar halinde bulunabilecekleri gibi, üzüm salkımına benzer düzensiz kümeler de oluşturabilirler.

2.1.2 ÜREME ÖZELLİKLERİ: Aerobik veya mikraerobik olarak, rutin besiyerlerinde ve 37°C’de kolayca ürerler. Katı besiyerindeki kolonileri yuvarlak, düz, kabarık ve parlaktır. Gri’den koyu altın sarısına değişen renklerde pigment oluştururlar. Pigment oluşumu oda ısısında (20-25°C) ve uzamış inkübasyonlarda daha iyi görülür. Kanlı agarda değişik derecelerde hemoliz yapabilirler (15,28). Kuruluğa, ısıya (50°C’ye 30 dk.) ve NaCl (%9’luk) ’e nispeten dayanıklıdırlar. Kimyasal ajanlarla (ör: %3 heksaklorofen) kolayca inhibe olurlar (3,19).

2.1.3 BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ: Katalaz üretirler, oksidaz negatiftirler. Karbohidratları yavaş fermente ederler. Laktik asit üretirler, fakat gaz oluşturmazlar. Proteolitik aktiviteleri suştan suşa farklılıklar gösterir. Pek çok ekstrasellüler madde (hyaluronidaz, stafilokinaz, proteinaz vb.) üretirler (3,19).

2.1.4 ANTİJENİK YAPI: Stafilokokların hücre duvarlarında önemli antijenik polisakkaritler ve proteinler vardır. Polisakkarit polimerlerin birbirine bağlanmasıyla ortaya çıkan peptidoglikan, hücre duvarının iskeletini oluşturur. Peptidoglikana bağlanan teikoik asitler ise gliserol veya ribitol fosfat polimerleridir ve antijeniktirler. Güçlü asit veya lizozim, peptidoglikanı tahrip eder. Hücre duvarı bileşeni olan “proteinA”, IgG3 haricindeki IgG izotiplerinin Fc parçasına bağlanır. ProteinA immünolojik ve tanısal laboratuvar teknikleri açısından önemli bir ayıraçtır. Bazı suşların sahip olduğu kapsül polimorfonüveli lökositlerin fagositozunu inhibe eder. Çoğu suşun hücre duvarında koagülaz ve kümeleşme faktörü vardır (3,19).

2.1.5 TOKSİN VE ENZİMLER: Stafilokoklar ürettikleri ekstrasellüler maddeler (enzimler ve toksinler) ve dokular içinde yayılabilme özellikleri ile hastalıklara neden olurlar. Pek çok toksin genetik olarak plazmid kontrolü altındadır. Bazıları ise

hem kromozomal hem de plazmidlerle kontrol edilirler. Bazı toksinlerin genetik kontrol mekanizmaları ise henüz açıklanamamıştır (3,19).

Ekzotoksinleri hayvanlara injekte edildiğinde öldürücüdürler. Ayrıca ciltte nekroza neden olurlar. Alfa, beta, gama ve delta toksinleri vardır ve antijenik yapıları farklıdır. Alfa toksin (hemolizin), eritrosit lizisi ve platelet hasarından sorumlu heterojen bir proteindir. Öldürücüdür ve dermatonekrotik faktör de denir. Beta toksin sfingomyelinleri parçalar. Eritrositler dahil pek çok hücre için toksiktir. Çözünmüş hemolizinlerin elektroforezle ayrımı yapılabilir. Ekzotoksinlerin formalin ile muamele edildiklerinde toksisiteleri kaybolur ve toksoid haline gelirler. Fakat toksoid antijenik olmasına karşın klinik uygulamalarda kullanılamamaktadır (3,19). Lökosidin hayvanlarda lökositleri öldürebilmektedir, ancak patogenezdaki rolü kesin değildir. Toplum kaynaklı MRSA suşları Panton –Valentin Lökosidin genleri taşırlar Lökosidine karşı gelişen antikorlar rekürren stafilokok infeksiyonlarına dirençte rol oynayabilirler (3,19)

Eksfoliyatif toksin, haşlanmış deri sendromunda yaygın deskuamasyona neden olur ve en az iki protein alt birimden oluşur. Eksfoliyatif toksine spesifik antikorlar toksinin eksfoliyatif aktivitesine karşı koruyucudurlar (3,19).

Toksik Şok Sendrom Toksini (TSST-1), toksik şok sendromlu hastalardan izole edilen *S. aureus* izolatlarının çoğunda bulunur. Enterotoksin F veya pirojenik ekzotoksin C de denir. TSST-1, “süperantijen”lerin bir prototipidir (3,19)

Stafilokoklar bir çok enzimatik madde üretirler. Bunlardan “Katalaz” enzimi $H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2$ reaksiyonunu katalize eder. “Koagülaz” ise oksalat veya sitratlı plazmayı pıhtılaştıran enzim benzeri bir proteindir ve patojenite ile ilişkilidir. Enzimatik olmayan bir yolla fibrinojene bağlanır ve bakteri kümeleşmesini sağlar. Salınan diğer enzimler ise hyalüronidaz (yayılma faktörü), stafilokinaz, proteinaz, lipazlar ve β -laktamazdır (3,19)

2.1.6 ANTİBİYOTİK DİRENCİ: Stafilokok infeksiyonlarında hem tedavi etkinliğini arttırmak hem de gereksiz glikopeptid kullanımını önlemek için metisilin direncinin doğru olarak ortaya konması önemlidir. MRSA’lar Metisiline duyarlı stafilokoklardan farklı olarak 30-35°C’de ve %2 NaCl içeren buyyon veya %4 NaCl içeren katı besiyerinde daha iyi ürerler (3). *S. aureus*’larda metisilin direnci, 30-

35°C’de, 24 saatlik inkübasyonda ve %2-4 NaCl içeren Mueller Hinton agarda, metisiline göre daha dayanıklı olan oksasilin diskleri kullanılarak yapılan antibiyotik duyarlılık testiyle belirlenir (20). Metisiline dirençli suşların sefalosporinler de dahil olmak üzere diğer tüm beta laktam antibiyotiklere dirençli olduğu gösterilmiştir. Özellikle 1970’den sonra metisiline dirençli *S. aureus* suşları beta laktam antibiyotikler dışında aminoglikozidler, tetrasiklinler, kloramfenikol, makrolidler, linkozamidler gibi diğer bazı antibiyotiklere de direnç geliştirmişlerdir (5,12,20).

Metisilin direnci, metisiline duyarlı stafilokoklarda bulunmayan ve direnci fenotipik olarak etkileyen penisilin bağlayan protein 2a (PBP 2a) varlığına bağlıdır. PBP 2a bir transpeptidazdır ve beta laktam yapısındaki antibiyotiklere düşük ilgi göstermektedir. Bu protein kromozomal yerleşim gösteren *mecA* geni tarafından kodlanmaktadır (21. 22.23).

3. TIPLENDİRME YÖNTEMLERİ

MRSA suşları arasında ayırım yapmak için pek çok tiplendirme yöntemi tanımlanmıştır. Tiplendirme yönteminin etkinliği tiplendirebilme özelliğine, ayırım gücünün yüksekliğine, tekrar edilebilirliğine, kullanım ve yorum kolaylığına bağlıdır. İdeal bir tiplendirme yöntemi aynı zamanda hızlı sonuç verebilmeli, ucuz, teknik olarak basit ve yaygın olarak elde edilebilir bir sistem olmalıdır (15,24-29).

MRSA’ların tiplendirilmesinde kullanılan yöntemler iki gruba ayrılmaktadır.:

1. Geleneksel (fenotipik) yöntemler
2. Moleküler (genotipik) yöntemler

3.1. GELENEKSEL (FENOTİPİK) TIPLENDİRME YÖNTEMLERİ

Geleneksel veya konvansiyonel yöntemler olarak da bilinen fenotipik yöntemler, genetik bilginin ekspresyonu ile ortaya çıkan özelliklere göre mikroorganizmaların birbirleriyle ilişkili olup olmadıklarını ortaya koymaktadırlar. Mikroorganizmaların metabolik aktivitelerini ortaya koyan biyotipik profillerine, antibiyotik duyarlılıklarına, duyarlı oldukları faj tiplerine, protein içerikleri gibi birçok özelliklerine dayalı fenotipik yöntemler mevcuttur. Fenotipik farklılıkları ortaya

koyan tiplendirme yöntemlerinin dezavantajı ise mikroorganizmaların bu özelliklerinin değişebilir olmasıdır.. Bu değişiklikler önceden tahmin edilemez veya değişen çevre koşullarına bir cevap olarak oluşabilirler. Buna ilaveten serotiplendirme ve faj tiplendirme gibi pek çok fenotipik yöntem, çeşitli özgül reaktanlara gereksinim duyarlar. Ayrıca bir tek nükleotidde meydana gelen nokta mutasyonları herhangi bir fenotipten sorumlu genin fonksiyonunu veya regülasyonunu bozabilir. Böylece fenotipik olarak farklı, ancak buna karşılık genotipik olarak ayırt edilemez veya hemen hemen aynı olan izolatlar da ortaya çıkabilirler (24).

3.1.1 BİYOTİPLENDİRME

Biyotiplendirme ile bir izolatın biyokimyasal özellikleri, çevresel şartlara toleransı gibi özgül metabolik aktivite paterni ortaya konur. Biyotipik özelliklerden klasik olarak sınıflandırmada ve çoğu klinik mikrobiyoloji laboratuvarında rutin olarak türlerin identifikasyonunda yararlanılmaktadır. İdentifikasyonda güvenilir, otomatize veya modüler paneller kullanılmaktadır. Ancak tiplendirmede biyokimyasal reaksiyonların kullanımı yetersizdir (15,24). Ayrıca, MRSA suşlarının saptanmasında kullanılan, oldukça özgül ve duyarlı bir yöntem olan proteinA veya hücre yüzeyindeki kümeleşme faktörünün saptanmasına yönelik lateks agglutinasyon testleri ile de bazı MRSA suşlarının reaksiyon vermemesi nedeniyle stabilize sağlanamamıştır. (23,24,30,31).

3.1.2 ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIK TESTLERİ

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarları bakteriyel izolatların antimikrobiyal ajanlara duyarlılıklarını rutin olarak test etmektedirler. Bu amaçla konvansiyonel ve otomatize antibiyogram sistemlerinin her ikisi de yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu testler uygulanmaları kolay ve göreceli olarak daha ucuz testlerdir (29).

Bununla birlikte antibiyotik direnç fenotiplerindeki değişkenlikler nedeniyle antibiyotiplendirmenin epidemiyolojik olarak değeri sınırlıdır. Farklı izolatlar aynı direnç paternine sahip olabilecekleri gibi, bir izolat plazmid veya transpozonlar aracılığıyla çoklu antibiyotik direnci geliştirebilir (24).

Kalitatif antibiyotik duyarlılıklarına göre (duyarlı/dirençli) yapılan sınıflandırmalar ilişkisiz suşları ayırt etmede yetersizdirler. Bunun yerine, kantitatif antibiyogram yani antibiyotik duyarlılık zon çaplarına göre sınıflama yapmak, antibiyogramın tiplendirebilme gücünü artırır. (32,33). Blanc DS ve ark.'larının bir çalışmasına göre, kantitatif antibiyogram ribotiplendirme kadar kullanışlı bulunmuştur (32).

Sonuç olarak, MRSA'ların tiplendirilmesinde antibiyotikleme tek başına kullanılamaz, ancak bazen yeni veya alışılmadık bir antibiyotik direnç paterni tanımlandığında bir salgının ilk göstergesi olabilir (29,34). Bu durumda endemik veya epidemik bir klonun tanımlanmasında faydalı bir tarama yöntemi olabilir (32).

3.1.3 FAJ TİPLENDİRME

Bakteriyofajlar, bakteri hücrelerini infekte ederek çoğu kez bakteri hücrelerinin erimesine neden olan virüsler olarak tanımlanmaktadır. Epidemiyolojik çalışmalarda bakteriler değişik bakteriyofajlara olan duyarlılık ve dirençlerine göre tiplendirilirler. Stafilokoklarla ilgili tiplendirme sistemleri arasında sadece faj tiplendirilmesi standardize edilmiştir. "International Subcommittee on Phage Typing of Staphylococci" tarafından günümüzde kullanımı önerilen 23 adet standart faj bulunmaktadır (29,35). *S. aureus*'un epidemiyolojik analizinde bakteriyofaj tiplendirilmesinin yaygın kullanımı 1940'lı yıllarda olmuştur (29,36).

Faj tiplendirme yönteminin dezavantajları stok fajların ve kontrol suşlarının ancak referans laboratuvarlarında bulunması ve yöntemin tekrarlanmasındaki zorluklardır. (26,36).

3.1.4 KAPSÜLER SEROTİPLENDİRME

Kapsüler polisakkarit tiplendirmesini *S. aureus*'lar için ilk kez Karakawa ve Vann (1987) geliştirmişler, kapsül 5'e reaksiyon veren antikorlarla 7007 suşta 4 serotip bulmuşlardır.(26,29).Yapılan bir çalışmada 11 kapsüler tip tanımlanmış olup, *S. aureus* klinik izolatlarının %85-90'ı tip 5 ve 8 olarak bulunmuştur (17). Yapılan bazı çalışmalara göre diğer bakteriyel özelliklerle kapsüler tipler arasında güçlü bir korelasyon bulunmuştur. Özellikle bazı faj tipleri aynı kapsüler tipi göstermektedirler. MRSA'lar tipik olarak kapsüler tip 5'tir (38,39,40).Sonuç olarak, kapsüler tiplendirme ile ayırım gücü zayıftır ve epidemiyolojik çalışmalar için

kullanışlı bulunmamıştır. Bir diğer dezavantajı ise tiplendirmede kullanılan reaktiflerin ticari olarak elde edilememesidir (38,39,40)

3.1.5 TÜM HÜCRE PROTEİN ELEKTROFOREZİ

Tüm hücre protein elektroforezinde lizostafın aracılığıyla serbestleştirilmiş olan stafilokok proteinleri poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) yöntemi kullanılarak ayrıştırılırlar. Bu yöntemle yaklaşık 50 protein bandı görüntülenebilir ve tekrarlanabilir paternler oluşur. Çok sayıda band oluşmasına rağmen ilişkisiz MRSA izolatları arasındaki patern farkları azdır. Bu da zayıf bir ayırım gücüne yol açar. Ancak, bilgisayar yardımıyla band yoğunluğu da dikkate alındığında daha iyi bir ayırım yapılabilir. Elektroforez koşullarında meydana gelen küçük değişikliklerden etkilenmesi tüm hücre protein elektroforezinin bir diğer dezavantajıdır (29).

3.1.6 İMMUNOBLOT YÖNTEMİ (IMMUNOBLOTTING)

İmmunoblot yönteminde elektroforez işlemi sonrası bakteriyel proteinler nitrosellüloz bir membran üzerine aktarılır. Bu işleme “blotting” adı verilir. Membran daha sonra spesifik antikorlar içeren tavşan veya insan serumuyla karşılaştırılır. Membran zerindeki proteine bağlanmış spesifik antikorların varlığı enzimle işaretli anti-immünglobulinler yardımıyla saptanır (24). İmmunoblot yöntemi, elektroforez koşullarından diğer protein elektroforezine dayalı tiplendirme yöntemlerine göre daha az etkilenir. Ayrıca oluşan band sayısının daha az olması da yorum kolaylığı sağlar (29). Bu yöntem MRSA’ların epidemiyolojisi ile ilgili çalışmalarda etkili bir şekilde kullanılabilmektedir (24). Tüm MRSA izolatlarını bu yöntemle tiplendirmek mümkündür. Ancak salgın incelemelerinde ilişkisiz izolatları yeterince ayırt edemeyebilir. (29). Tenover’in çalışmasına göre fenotipik yöntemlerin en iyilerinden biri olan immunoblotting, bazı genotipik yöntemlerle kıyaslanabilecek kadar iyi sonuçlar vermektedir (15). Bununla birlikte bu yöntem çok az sayıda araştırmacı tarafından kullanılmıştır. Yaygın olarak kullanılmamasının birkaç nedeni vardır; öncelikle bu yöntem teknik olarak yoğun bir çaba gerektirmektedir, ekstraksiyon işleminde kullanılan yöntem ve spesifik antikoru elde edildiği kaynak gibi teknik faktörlerin etkileri tam olarak tanımlanmamıştır; ayrıca saptanan band paternleri kompleksir, küçük farklılıkların ortaya konması ve yorumlanması zordur (7).

3.1.7 MULTİLOKUS ENZİM ELEKTROFOREZİ (MEE)

Multilokus enzim elektroforezi, metabolik enzimlerin elektroforetik hareketliliklerindeki farklılığın analizine dayanır (24,26). Enzim hareketinin hızı enzimin aminoasit kompozisyonuna bağlıdır ve tek bir aminoasit değişikliği bile elektroforetik özelliklerdeki değişikliğe bakılarak saptanabilir (29). Enzimlerin “elektromorf” denilen elektroforetik hareketlilik değişiklikleri, tipik olarak enzimleri kodlayan kromozomal genlerdeki allelik değişikliklerden kaynaklanırlar. Böylece farklı elektromorfların oluşturduğu “elektroforetik tipler” ortaya çıkar (24,26).

Multilokus enzim elektroforezi, *S. aureus* dahil pek çok bakteriyel tür için kullanılabilir. MRSA izolatları için kullanıldığında tiplendirebilme yeteneği ve tekrarlanabilirliği iyidir. Ayrım gücü yöntemde kullanılan enzimlere bağlıdır. Bazı enzimler MRSA’ların çoğunda monomorfiktir; 12 ila 20 değişik enzim kullanılabilir, ancak bunların göreceli olarak ayırım güçleri henüz tam olarak değerlendirilmemiştir (29).

Salgın izolatlarında kullanıldığında, MEE epidemiyolojik ilişkili bakterileri doğru olarak sınıflayabilmektedir. Ancak bazı ilişkisiz izolatları da hatalı olarak ilişkili gruba dahil edebilmektedir (15,29). MEE paternleri göreceli olarak kolay elde edilse de okunması, yorumlanması, kıyaslanması zordur. En iyi çözüm, elde edilen elektroforetik paternlerin bir bilgisayar programı yardımıyla değerlendirilmesidir (15,29).

3.1.8 ZİMOTİPLENDİRME (ZYMOTYPING)

Zimotiplendirme, MEE’nin bir varyasyonu olup, bakteriyel elastaz enziminin elektroforetik özelliklerinin farklılığına dayanır. *S. aureus*, anoda olan afinitelerine göre A, B ve C olmak üzere üç elastaza sahiptir. MEE’de olduğu gibi bu yöntemde de enzimlerin elektroforezdeki hareketliliklerinde meydana gelen farklılıklara bakılarak izolatların ayırımı yapılır. Bu metodun MRSA ve metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA) ’lar için kullanımıyla ilgili deneyimlerin çoğu Branger ve ark.’na aittir (41,42). Bu yöntemle tüm izolatlar tiplendirilebilmektedir ve paternler stabil ve tekrarlanabilir. Ayrım gücü kapsüller tiplendirmeden iyiyse de faj tiplendirmesi veya “pulsed field gel electrophoresis” (PFGE) ’den belirgin olarak daha zayıftır. (43,44,18). Aynı zimotip içinde birkaç genotip olabileceği saptanmıştır, ancak aksi

gösterilememiştir. Ayrıca bu yöntemin sonuçlarıyla antibiyotik duyarlılık paternleri arasında uyum yoktur. Kısacası zimotipleme MRSA'ların tiplendirilmesinde yeterli ayırım gücüne sahip değildir ve tarama testi olarak kullanılamayacak kadar uzun bir prosedüre sahiptir (29).

3.2 MOLEKÜLER (GENOTİPİK) TİPLENDİRME YÖNTEMLERİ

Moleküler tiplendirme yöntemleri epidemiyolojik olarak ilişkisiz izolatlar arasındaki genetik farklılıkları ortaya koyarlar. Bu yöntemlerin temeli, mikroorganizmaların kromozomal ve ekstrakromozomal genetik elementleri arasındaki farklılığa dayanır. Pek çok yöntemde DNA'nın restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesim işlemi ya da nükleik asit amplifikasyon işlemi vardır (27,18).

3.2.1 PLAZMİD ANALİZİ

Bakteriyel plazmidler kendini eşletme yeteneğinde olan ekstrakromozomal genetik elementlerdir. Plazmidler değişik mekanizmalarla kazanılırlar ve genellikle proliferen olan konak suşlar arasında kalıtsal olarak aktarılırlar. Bununla birlikte kendiliğinden plazmid kayıpları da olabilir. Plazmidler genel olarak konak hücre için hayati değildir. Sıklıkla yapılarında mobil genetik elementler (transpozonlar) bulunan antibiyotik direnç determinanları taşırlar. Yoğun bir antibiyotik kullanımı olduğunda, plazmidler farklı suşlar arasında kolayca yayılırlar ve bir sağlık ünitesinde uzun süre kalıcılıkları devam eder. Plazmid DNA'sının kompozisyonu transpozonların kolayca kaybedilip kazanılması nedeniyle değişir (24,35,45). Plazmidler süperkoil, açık halka, lineer veya oligometrik gibi değişik moleküler formlarda olabilirler ve bu formların elektroforetik hareketleri, sayıları ve yoğunlukları farklılıklar gösterir (24,29).

Plazmid profil analizi teknik olarak basittir ve *S. aureus*'larda uygulanan ilk DNA'ya dayalı tiplendirme yöntemidir. Bu yöntemde öncelikle plazmid DNA'sı ekstrakte edilir ve daha sonra rutin agaroz jel elektroforeziyle bakterinin taşıdığı plazmidlerin sayısı ve büyüklükleri belirlenir (15,24,29). MRSA suşlarının %90'ından fazlasında plazmid bulunmaktadır. (15,24,29,46). Yöntemin ayırım gücü ve tekrar edilebilirliği ile ilgili problemler hemen hemen tüm çalışmalarda gösterilmiştir. Problemlerden birisi plazmid tiplendirilmesine ait bilgilerin yorumunun karışık olmasıdır (9,35,45). Zuccarelli ve ark. bu problemin çözümü için S1 nükleaz kullanımını önermişlerdir

(47). Plazmid analizinin ayırım gücü ve tekrar edilebilirliği, plazmidlerin restriksiyon enzimiyle kesilmesi ve oluşan restriksiyon parçalarının sayı ve büyüklüklerinin analiz edilmesiyle de arttırılabilir. Bu işleme “restriction enzyme analysis of plasmids” (REAP) denir. Teknik olarak basittir, az sayıda özel araç, gereç gerektirir ve göreceli olarak hızlı uygulanır (24,25,34).

Plazmid analizine göre tiplendirmedeki problemler, teknik konulardan çok plazmidin biyolojisindeki özelliklerden kaynaklanmaktadır. Plazmidlerin büyüklükleri doğru olarak ölçülse bile, aynı büyüklükteki plazmidler biyolojik farklılığa sahip olabileceklerinden suşlar arasında bu yöntemle ayırım yapılamayabilir. Ayrıca çoğu *S. aureus* izolatında sadece bir veya iki plazmid bulunur ve bu da suş ayırımında yetersiz kalmaktadır (21,48). Aynı kromozomal genotipe sahip ve epidemiyolojik olarak ilişkili izolatlar, tüm plazmidini kaybetmesi, yeni plazmid kazanması veya plazmid yapısında yeni bir düzenleme nedeniyle çok farklı plazmid profili gösterebilirler. Buna karşın farklı suşlar da aynı plazmid profiline sahip olabilirler. Bütün bunlara rağmen plazmid çalışmaları, sınırlı bir zamanda ve belli bir yerdeki salgına (örneğin tek bir hastane veya servisteki salgın) ait izolatların kısa sürede değerlendirilmesinde oldukça etkilidir (24).

3.2.2 KROMOZOMAL DNA’NIN RESTRIKSİYON ENZİM ANALİZİ

Kromozomal DNA bir bütün olarak analiz etmek için çok büyüktür. Bu nedenle pek çok genotipik yöntemin temelinde kromozomal DNA’nın restriksiyon endonükleaz enzimleriyle küçük parçalara kesim işlemi vardır. Restriksiyon endonükleazlar çift iplikli DNA’yı özgül tanıma bölgelerinden keserler. Restriksiyon parçalarının sayı ve büyüklükleri enzim tanıma bölgesi ve DNA kompozisyonuna bağlı olarak değişiklik gösterir. Restriksiyon parçaları değişik tip jel elektroforez yöntemlerinin kullanımıyla birbirlerinden ayrılabilirler. Aynı enzimle işleme alınmış farklı suşlara ait DNA parçaları kıyaslandığında, elektroforetik hareket ve oluşan parçalardaki farklılıklar ortaya çıkar. Farklı sayı ve büyüklüklerdeki parçaların oluşturduğu profil farklılıklarına “Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ” denir (24). Konvansiyonel restriksiyon enzim analizi (REA) ’nde, bakteriyel genomdan endonükleaz enzimi kesisiyle yaklaşık 0,5- 50 kb uzunluğunda yüzlerce parça oluşmaktadır. Farklı suşların REA profilleri de farklıdır. Çünkü suşların DNA

dizileri, dolayısıyla da restriksiyon bölgeleri ve oluşan DNA parçalarının büyüklükleri farklılıklar gösterir (29).

Tüm izolatlar REA ile tiplendirilebilir, ancak yüzlerce banttıan oluşan profili, ayrılmayan veya üst üste gelen bandlar nedeniyle yorumlamak zordur. Ayrıca, band paterni içinde plazmid veya kontamine DNA parçalarını restriksiyon parçalarından ayırmak zordur. Bu problemi ortadan kaldırmak için bilgisayar destekli bir sistem kullanılabilir, ancak bunu yapmak birçok laboratuvar için zordur. Genelde REA diğer genotipik tiplendirme yöntemleriyle birlikte kullanılmaktadır (24).

3.2.3 SOUTHERN BLOT ANALİZİ

Southern blot analizinde agaroz jel elektroforeziyle ayrıştırılan restriksiyon parçaları bir nitroselüloz membran üzerine aktarılır. Daha sonra prob adı verilen işaretli bir veya daha fazla sayıdaki oligonükleotide homolog diziyi taşıyan restriksiyon parçalarının varlığı araştırılır (24,27,29). Eğer özgül DNA dizilimleri varsa, bunların yeri işaretli DNA probları sayesinde gösterilmiş olur. Tüm suşlar bu şekilde tiplendirilebilir ve sonuçlar büyük oranda tekrar edilebilir. Yöntemin ayırım gücü bandların sayı ve büyüklükleriyle doğrudan ilişkilidir. Bu yöntemde önemli olan uygun probun seçimidir (18,24).

Yine RFLP'ye dayalı bir Southern blot yöntemi olan ribotiplendirmede ise suşların ribozomal operonlarına spesifik problar kullanılır. Ribozomal operonlar 16S rRNA, 23S rRNA ve ek olarak bir veya daha fazla tRNA'yı kodlayan nükleotid dizilerinden oluşurlar. Bütün stafilokoklar çok sayıda (beş-sekiz) ribozomal operon taşırlar ve bu nedenle de ribotiplendirme ile tiplendirilebilirler (24,29). Ribotipler biyolojik olarak çok stabildirler ve tekrar edilebilir paternler oluştururlar. Ribotiplendirme ve diğer Southern blot analizlerinin performans özellikleri hibridizasyon koşullarının sertliği (stringency), restriksiyon enzimi ve prob seçiminden doğrudan etkilenir. Zaman alıcı ve teknik olarak komplike olan ribotiplendirmede minör band farklılıklarının ne şekilde yorumlanacağı konusundaki kriterler de henüz standardize edilmemiştir (29). Bir salgında izole edilen tüm izolatlar genellikle aynı ribotipe sahiptirler. Bununla birlikte ilişkisiz suşların sıklıkla bir veya iki band farklılığıyla aynı paterni gösterebilmeleri ve epidemiyolojik olarak ilişkili izolatların da benzer minimal değişiklikler gösterebilmeleri nedeniyle bu yöntemin ayırım gücü ve teknik kullanımı

sınırlıdır. Bir çalışmaya göre, ribotiplendirme ile altı ribotipe ayrılan izolatlar PFGE ile 26 pulsotipe ayrılmıştır (49). Ribotiplendirmenin ayırım gücü MEE'den de belirgin bir şekilde daha azdır (15,24).

“Insertion Sequences (IS) ”ler ve transpozonlar da stafilokok izolatlarının tiplendirilmesinde prob olarak kullanılmaktadırlar (24,29). MRSA’larda IS431, IS256, IS1181 gibi birkaç IS elementi bulunmuşsa da tüm suşların tiplendirilmesinde yaygın olarak kullanılacak yeterli ayırım gücüne sahip tek bir element bulunamamıştır (15,24,29). PFGE ile IS tiplendirmenin birlikte kullanımının yararlı olduğu yönünde yayınlar da vardır (46). Tn554, spektinomisin direncini taşıyan transpozondur ve MRSA’ların %90’ından fazlasında bulunur (50). Tn554 ‘ün *ClaI* enzimiyle kesilmesinden sonra oluşan bandlar kıyaslanarak da tiplendirme yapılabilir (29). Ancak bu hareketli genetik elementlere dayalı tiplendirme yönteminin potansiyel komplikasyonu, bu hareketli genetik elementlerin bakteriyel kromozom dışında plazmid üzerinde de bulunabilmeleridir (24).

Bunlar dışında metabolik fonksiyonları veya virulans faktörlerini kodlayan genlere ait kromozomal lokuslar da tiplendirmede kullanılabilirler (15,24).

Özetle, ribozomal operonlara ilave olarak pek çok farklı genetik lokusun Southern blot analizi uygulaması *S. aureus*’ların tiplendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak özellikle herhangi bir yöntem diğerlerinden daha etkili bulunmamıştır. Southern blot analizi teknik aksesuarları ve ticari olarak elde edilen materyal ve ekipmanlarla kolaylaştırılmışsa da, uzmanlık ve özel araç, gereç gerektirdiğinden yaygın kullanım alanı bulamamıştır (24).

3.2.4 “PULSED FIELD GEL ELECTROPHORESIS” YÖNTEMİYLE TİPLENDİRME

Schwartz ve Cantor tarafından 1984’te geliştirilmiş olan “Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) ” yöntemi agaroz jel elektroforezinin bir varyasyonudur. Elektriksel alanın periyodik olarak (“pulsed”) yer değiştirdiği bu elektroforez yöntemiyle, normal agaroz jel elektroforezi ile ayrılamayan mega baz büyüklüğündeki (10 kb’dan 1,5 Mb’a kadar) DNA parçalarının ayırımını yapmak mümkündür (24,44,51). Bu yöntemde, mikroorganizma önce “plug” adı verilen agaroz bloklar içine gömülür, daha sonra enzimatik lizis ile bakteri duvarı parçalanır

ve hücrel proteinler sindirilir. Böylece DNA'nın fiziksel ve kimyasal etkiler nedeniyle kırılması önlenmiş olur. Daha sonra izole edilen bu genom yine bloklar içerisinde restriksiyon enzimleriyle kesilir (24,52). Yaklaşık 2800 kilo baz (kb) büyüklükte olan stafilokok kromozomu *Sma*I kesim (restriksiyon) enzimiyle (CCCGGG tanıma dizisi) kesildiğinde, büyüklüğü 10 ile 800 kb arasında 15-20 DNA parçasından oluşan bir restriksiyon profili ortaya çıkar (24,29).

PFGE'nin iki önemli kısıtlılığı vardır; İlki, agaroz bloklar içine tüm tampon ve enzimlerin yeterince difüze olabilmesi için uzun süren birkaç inkübasyon periyoduna gereksinim vardır. Günümüzde *S. aureus* için bu işlemler kısaltılmış olsa bile, 2 ile 4 günlük bir çalışma süresi gerektirir (24,52,53). Ancak blok içinde elde edilen DNA +4°C'de yıllarca stabil kalır ve diğer prosedürler için bu DNA kolayca elde edilebilir (52). Yöntemin ikinci kısıtlılığı, pahalı araç ve gereç gerektirmesidir (24). Bununla birlikte tekrarlanabilirlik, yüksek ayırım gücü gibi faktörler nedeniyle çoğu laboratuvarlarda stafilokokların tiplendirilmesinde PFGE tercih edilen bir sistem haline gelmiştir ve günümüzde moleküler tiplendirme yöntemleri içinde "altın standart" olarak kabul edilmektedir (16,24,27). Tüm stafilokok izolatları PFGE ile tiplendirilebilir. Diğer restriksiyon endonükleaz enzimine dayalı yöntemlerde olduğu gibi, elde edilen band paternlerinin tekrar edilebilirliği oldukça yüksektir. Southern blot analizinin her aşamasında belli artefaktlar oluşabilirken PFGE ile elde edilen paternler etidyum bromidle boyanarak basit bir şekilde gösterilebilir. Restriksiyon profilleri göreceli olarak daha basittir ve farklı suşlar arasındaki değişiklikler sıklıkla belirgin şekilde gösterilebilir (24).

Bir salgından elde edilen epidemiyolojik olarak ilişkili izolatların tanımlanmasında PFGE'nin yüksek etkinlik ve yüksek ayırım gücüne sahip olduğu bilinmektedir (15-18,24). Epidemiyolojik olarak ilişkisiz izolatların ayırımında kullanılan bir tiplendirme yönteminin ayırım gücü, ancak tekrar edilebilirliğin sınırlarını en uygun şekilde gösteren yorum kriterlerinin kullanımıyla ortaya konabilir (54). Önceleri iki suş, aralarında tek bir restriksiyon parçasının bile farklı olması durumunda ayrı genotipler olarak kabul edilmekteydi (55-57). Ancak son yıllarda Tenover ve arkadaşlarının önerdiği yorum kriterleri kullanılmaktadır (58). Bu kriterlere göre ;

a) Aynı sayı ve büyüklükte bandlara sahip izolatlar "ayırtdilemez" olarak,

- b) Üç parçaya kadar farklılık gösteren izolatlar “yakın ilişkili” olarak,
- c) Dört-altı band farkı gösteren izolatlar “muhtemelen ilişkili” olarak,
- d) Yedi ve üzeri band farklılığında izolatlar “ilişkisiz” olarak kabul edilirler (58).

Tek bir suşa ait izolatlarda minör farklılıklar birkaç farklı genetik olaya bağlı olarak ortaya çıkabilir (58). Nokta mutasyonu sonucu bir restriksiyon bölgesinde kayıp söz konusu olabilir. Bu durumda iki ayrı parça birleşerek daha büyük tek bir parça olarak görülebilir. Kazanılmış yeni bir restriksiyon bölgesi varsa, bu durumun tam tersi ortaya çıkar. Bu nedenle, iki izolat arasında eğer üç parçaya kadar farklılık varsa yakın ilişkili kabul edilir (24). Dört-altı parça farklılığında ise iki bağımsız genetik olay söz konusudur. Bu durumda iki izolat birbiriyle muhtemel ilişkili kabul edilir. Yedi veya üzerindeki parça farklılığında ise üç veya daha fazla genetik olay söz konusudur ve izolatlar birbiriyle “ilişkisiz” olarak değerlendirilirler (58).

MRSA’ların tiplendirilmesinde PFGE diğer yöntemlerden daha etkili bulunmuştur (49.50.59.60). Ancak, yapılan bazı çalışmalara göre ise farklı merkezlerin PFGE sonuçları birbirleriyle yeterince uyum göstermemiştir (47.61). Buna rağmen, PFGE bugün için MRSA’ların tiplendirilmesinde yaygın olarak ve etkin bir şekilde kullanılan en iyi yöntemdir (15-18,24)

3.2.5 POLİMERAZ ZİNCİR TEPKİMESİNE DAYALI TİPLENDİRME YÖNTEMLERİ

Stafilokokların tiplendirilmesinde standart kabul edilen PFGE’nin uzun zaman ve teknik imkanlar gerektiren bir yöntem olması nedeniyle, bu yöneme karşı alternatif yöntemler aranmıştır. Bunların en önemlisi “Polimeraz Zincir Tepkimesi (PCR) ”ne dayalı yöntemlerdir. PCR yönteminin temel özelliği, belirli bir DNA dizisinin hızlı bir şekilde çoğaltılması (ampifikasyonu) dır. Bu yöntemle, 48 saat içerisinde 50 kadar izolatu kolayca tiplendirmek mümkün olmaktadır (24,29,62).

PCR temeline dayanan yöntemlerde öncelikle mikroorganizmanın nükleik asidi elde edilir. Daha sonra nükleik asidin belirli bir bölgesine uygun olarak seçilmiş ve primer adı verilen oligonükleotidler (primerler tipik olarak 18-20 bp büyüklüğündedirler ve amplifiye edilecek DNA dizisine komplementer diziler içerirler) kullanılarak hedef DNA parçası çoğaltılır. Amplikon adı verilen bu PCR ürünleri genellikle 0,5-2 kb

büyükluğündedirler. Daha büyük DNA dizilerinin çoğaltılması zordur. Amplifikasyon için teorik olarak tek bir hedef DNA molekülünün bulunması bile yeterlidir. Amplifikasyon “thermal cycler” adı verilen programlanabilir ısı cihazı yardımıyla küçük plastik tüpler içinde gerçekleştirilir. Cihaz içindeki tüpler her döngüde üç değişik ısıya maruz kalırlar. İlk basamak denatürasyondur ve 94°C’a dek ısıtılan DNA’nın iki zinciri birbirinden ayrılır. İkinci basamak birleşme (annealing) dir. Bu basamakta, çoğaltılmak istenen DNA dizisine özgül iki primer, sıcaklığın (55-70°C’ye) düşürülmesiyle, denatürasyon basamağında birbirinden ayrılmış olan kalıp DNA tek ipliklerine bağlanırlar. Üçüncü basamak primerlerin uzamasıdır. Ortama konmuş ve optimum çalışma sıcaklığı 72°C olan *Thermus aquaticus* (Taq) DNA polimerazı (veya ısıya dayanıklı başka bir DNA polimeraz) bu ısıda primerlerden başlayarak 5’-3’ yönünde DNA sentezi yapar. Üç basamaktan oluşan bu döngünün her tekrarlanışında iki primer arasında kalan özgül DNA parçası iki katına çıkarılmış olur. Yani sentezlenen DNA bir sonraki döngüde kalıp olarak kullanılır ve DNA parçaları geometrik olarak artarlar. Yaklaşık birkaç saat içinde gerçekleştirilen 30-40 döngü sonrasında hedef DNA parçasığı yaklaşık 10⁹ kat çoğaltılmış olur. Elde edilen PCR ürünleri agaroz jel elektroforeziyle ayrıştırılırlar ve bir nükleik asit boyası (örneğin en sık kullanılan etidyum bromid) ile boyanarak UV ışığı altında görüntülenirler (24,63).

PCR yöntemi, infeksiyon hastalıklarının tanısında yaygın olarak kullanılan ve oldukça kullanışlı bir yöntemdir. Ancak tek bir lokusun analiz edilmesi epidemiyolojik ayırım için yeterli bilgi sağlamaz. Örneğin *mecA* geninin saptanması metisilin direnci hakkında bir fikir verebilirse de suşlar arasındaki ilişkinin ortaya konmasında yeterli olmaz. Suşların tiplendirilmesinde hedef dizilerin varlığı veya yokluğunun ötesinde bilgiye ihtiyaç vardır. Bunun için birkaç farklı PCR modifikasyonuna başvurulur (24,64,65). MRSA tiplendirilmesinde en çok kullanılan PCR modifikasyonları şunlardır:

3.2.5.1 Koagülaz Geninin PCR-RFLP İle İncelenmesi

Koagülaz üretimi *S. aureus*’un önemli bir virulans faktörüdür. Koagülaz tiplendirme, bu virulans faktörünü kodlayan gene ait spesifik bir bölgenin PCR ile çoğaltılması ve çoğaltılan ürünün bir RE enzimiyle kesilmesi temeline dayanır (39). Oluşan PCR ürünü genellikle tek parçadır, ancak bazen iki parça da olabilir (64). Bu yöntemde en

sık kullanılan RE *AluI*'dir ve genellikle dört veya daha az sayıda restriksiyon parçası oluşur. MRSA izolatlarının büyük bir kısmı koagülaz gen PCR ile tiplendirilebilirse de çok az sayıda izolatta orijinal primer seti kullanılmasına rağmen RE ile kesimi yapılacak PCR ürünü elde edilememektedir (66,67). Bu problem daha sonra gerçekleştirilmiş çalışmalarda tekrar gözlenemediğinden, bu yöntemin *S. aureus*'ların tiplendirilmesinde universal olarak kullanılabileceği düşünülmüştür. Sonuçlar oldukça stabildir (68,69,64) ve epidemiyolojik olarak ilişkili izolatlar bu yöntemle gruplanabilirler (15,64,66). Koagülaz geninin PCR-RFLP ile incelenmesi PFGE yöntemiyle karşılaştırıldığında daha düşük bir ayırım gücüne sahip bulunmuştur (15,64,68). Ancak bu dezavantajına karşılık daha hızlı ve daha düşük maliyettedir (70). Ayrıca band sayısının az olması farklı laboratuvarların elde ettikleri sonuçları karşılaştırmayı kolaylaştırmaktadır (68). Ayırım gücünün artırılması için farklı bir RE enzimi kullanımı veya birden fazla enzimin kombine kullanımı gibi denemeler başarıya ulaşmamıştır (69).

Koagülaz gen tiplendirme, epidemik ve sporadik MRSA'lar arasında ayırım yapmak için de kullanılabilmektedir. Epidemik suşlara özel farklı paternler gösterilebileceğinden bu yöntem bilinen bir suş için tarama testi olabilir (69). Bununla birlikte, tek başına kullanıldığında ve doğrudan klinik örneklerde duyarlılığı çok düşüktür (71).

3.2.5.2 Protin A Geninin PCR-RFLP İncelemesi

PCR'a dayalı diğer bir tiplendirme yöntemi olan bu yöntemin hedefi X gen bölgesidir. Bu bölge protein A'yı kodlayan *spa* genine ait ve yüksek değişkenlik özelliği gösteren bir bölgedir (65). PCR ürünleri *RsaI* enzimiyle kesildiğinde üç parça oluşur. Bunlardan ikisi değişmez, ancak en büyük parçanın uzunluğu değişkenlik gösterir (65). Bu yöntemin iki ana problemi vardır. Bunlardan ilki ayırım gücünün zayıf olması, diğeri ise sonuçların diğer yöntemlerin sonuçlarıyla uyum göstermemesidir (29).

3.2.5.3 Random Amplification of Polymorphic DNA Yöntemi

“Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) ” ile tiplendirme “Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR) ” olarak da bilinir. Bu yöntemde genomik DNA'ya rastgele bağlanan primerlerin kullanımıyla PCR işlemi gerçekleştirilir. Ortaya çıkan PCR

ürünleri elektroforez işlemiyle birbirlerinden ayrılırlar ve görüntülenirler. Oluşan band paternleri, sayı ve büyüklüklerine göre birbiriyle karşılaştırılırlar (29).

RAPD ile hemen tüm MRSA'lar tiplendirilebilmekte ve aynı laboratuvar içinde elde edilen sonuçlar tekrarlanabilmektedir (72). RAPD, bir salgın bölgesinde kullanıldığı zaman epidemiyolojik olarak ilişkili mikroorganizmaları sınıflandırabilir ve ilişkisiz olan izolatları ayırabilir (72,73). Bu yöntemin en belirgin avantajı diğer yöntemlere göre oldukça hızlı sonuç vermesi ve teknik olarak basit olması ve tiplendirilecek mikroorganizma ile ilgili genom bilgisine gereksinim göstermemesidir. (73). Ayrım gücü kullanılan primerlerin baz dizilimine ve sayısına bağlıdır. Ancak üç veya daha fazla primer kullanılması hem zaman alıcıdır, hem de bu şekilde bile ayrım gücü PFGE'den daha düşüktür (60,62). Farklı merkezlerde yapılan yarı standardize yöntemlerden alınan sonuçlar karşılaştırıldığında, MRSA'lar için RAPD yönteminin tekrarlanabilirliğinin çok zayıf olduğu görülmüştür (72). Bunun nedeni zayıf bantları yorumlamadaki güçlük veya band ayrımını ve farklılığını etkileyen elektroforez koşullarındaki değişiklikler olabilir. Aynı laboratuvar da bile farklı zamanlarda yapılan RAPD tiplendirme sonuçları arasında değişiklikler olabilmektedir (62). Tekrarlanabilirliğin düşük olması ve laboratuvarlar arası standardizasyonun zor olması nedeniyle RAPD bir referans yöntem olmak için uygun görülmemektedir. (72). Ancak bölgesel olarak endemik olduğu bilinen bir suş için spesifik primerlerin kullanımıyla hızlı bir tarama testi olarak kullanılabilir.

3.2.5.4 rep-PCR Yöntemi

Bu yöntem kromozom üzerindeki farklı sayı ve pozisyondaki tekrarlayan dizilere uyan primerlerin kullanıldığı bir PCR yöntemidir. PCR işlemi belirli bölgelere spesifik primerlerle yüksek sertlikte (high strengency) gerçekleştirilir (74). Bu yöntemin tekrarlanabilirliği RAPD'den daha iyidir. MRSA'ların tiplendirilmesinde hangi primer kullanıldığında bu yöntemin daha yararlı olabileceği konusu henüz tam açıklık kazanmamıştır (67).

3.3 TIPLENDİRME YÖNTEMLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Bakteriyel enfeksiyona bağlı olduğu düşünülen bir salgının araştırılmasında, salgınla ilişkili suşları tanımlamak ve epidemik olanlarla endemik veya sporadik olan izolatların ayrımını yapmak için tiplendirme yöntemlerine gereksinim bulunmaktadır

(25). Kullanılan pek çok tiplendirme yönteminden hangisinin daha iyi performansa sahip olduğunu değerlendirecek objektif kriterler bulunmamaktadır. Yapılan çalışmalarda özel koşullar altında, seçilmiş bir grup izolat kullanılarak bir yöntemin diğerine göre daha iyi veya daha kötü olduğu ortaya konmaktadır. Ancak bir tiplendirme yöntemini değerlendirecek veya pozitif ve negatif sonuçlarını doğrulayacak “altın standart” bir tiplendirme yöntemi henüz tanımlanmamıştır. Bu nedenle “duyarlılık” ve “özgüllük” gibi özelliklerin bu amaçla kullanılması çok uygun değildir. Tiplendirme yöntemlerinin değerlendirilmesinde kullanılan bazı kriterler şunlardır: (18,25,27).

1) Tiplendirebilirlik: Tiplendirebilirlik, kullanılan yöntemin bir tür içindeki tüm mikroorganizmaları tiplendirebilme yeteneğidir. Bir yöntemin ayırım gücü ve tekrarlanabilirliği yüksek olsa bile tür içindeki izolatların yalnızca %50-60’ını tiplendirebiliyorsa epidemiyolojik araştırmalarda kullanımı kısıtlıdır (43).

2) Tekrarlanabilirlik: Tekrarlanabilirlik, belirli bir suş ile yapılan tekrarlar da aynı sonucun alınabilmesidir. Tekrarlanabilirlik özellikle karşılaştırmaya imkan tanıyan güvenilir veri tabanları oluşturmak için önemlidir. Ancak tiplendirme yöntemlerinde aynı koşullar uygulansa bile farklı günlerde yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar arasında uyumsuzluklar olabilmekte, sonuçların güvenilirliği azalmaktadır. Özellikle hücre duvarı sentezini etkileyen antibiyotiklerle yapılan tedaviler tiplendirme yöntemlerinin tekrarlanabilirliğini etkileyebilmektedirler (43). Bir yöntemin tekrarlanabilirlik ve stabilite düzeyini değerlendirmek için herhangi bir standart bulunmamaktadır. Bu nedenle de bu özellik açısından yöntemler arasında kıyaslama yapmak zordur (29).

3) Ayırım gücü: Ayırım gücü, tiplendirme yönteminin bir türün farklı suşları arasında etkin ayırım yapabilme özelliğidir. Kullanılacak yöntemin ayırım gücü yüksek olmalı, ortak bir kaynaktan infekte olan kişilere ait izolatlar arasındaki bağlantıyı gösterebilmelidir. Aynı zamanda salgın kaynağından tamamen farklı bir coğrafi bölgeden izole edilen, epidemiyolojik olarak ilişkisiz izolatları açık olarak ayırt edebilmelidir. Aynı tür içindeki suşlar arasındaki maksimum ayırım çoğunlukla hiyerarşik bir düzen içerisinde ve en az iki tiplendirme yönteminin kullanılmasıyla başarılabilmektedir. Birinci yöntemle temel grup belirlenirken ikinci yöntemle bu grup içindeki farklı tiplerin birbirinden ayırımı sağlanır. Ayırım gücü

tekrarlanabilirlikle ilişkilidir ve tekrarlanabilirlik azaldığında ayırım gücü kaybolur (25,43). Ayırım gücünün değerlendirilmesi için standart ölçü olarak “Simpson’un Farklılık İndeksi” (Simpson’s Index of Diversity) kullanılmaktadır (48,75). Bu ölçünün kullanılması için çok sayıda ilişkisiz organizmanın test edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle de nadir olarak kullanılmaktadır (29).

4) Uygulama kolaylığı: Uygulama kolaylığı, bir yöntemin araç, gereç ve çözümlerinin maliyeti, teknik ayrıntıları ve yöntemin öğrenilip laboratuvara adapte edilebilmesiyle ilgili bir kriterdir. Tiplendirme yöntemi aynı zamanda basit ve ekonomik de olmalıdır. Çünkü kolay uygulanabilirlikle yaygın kullanım arasında pozitif bir ilişki vardır (18,43).

5) Yorum kolaylığı: Bir yönteme ait sonuçlar elde edildikten sonra en önemli iş elde edilen verilerin doğru olarak yorumlanmasıdır. Bunun için ortaya konmuş standart kriterler olmalıdır. Örneğin, PFGE görüntülerinin değerlendirilmesine yönelik genel kabul görmüş kriterler yayınlanmışken, RAPD paternlerinin yorumlanmasında henüz standart bir yaklaşım yoktur (18).

Yukarıda bahsedilen tiplendirme yöntemlerinden sadece faj tiplendirme yöntemi uluslararası kullanım için standardize edilmiştir. Ancak tiplendirilemeyen izolatların oranının fazla olması ve zayıf tekrarlanabilirlik bu yöntemin temel dezavantajlarıdır. Diğer fenotipik yöntemlerin güvenilirliği ise çok azdır. Buna karşın genotipik yöntemler fenotipik yöntemlerden daha yüksek ayırım gücü ve tekrarlanabilirliğe sahiptirler. Ancak hiçbir yöntem ideal yöntem olmak için gerekli kriterlere tam olarak uymamaktadır. Özellikle geliştirilen bir yöntemin laboratuvarlar arası karşılaştırmalar için standardize edilmesi oldukça zordur (29). Genotipleme yöntemlerinin henüz ticari olarak bulunmayışı ve in house protokollerin kullanımı, çalışmalar arasında standardizasyonu güçleştirmektedir.

Tablo-1 Tiplendirme Yöntemlerinin Karşılaştırılması (36)

Tiplendirme Yöntemi	Değerlendirme Kriterleri				
	Tiplendirebilme	Tekrarlanabilme	Ayrım Gücü	Yorum Kolaylığı	Uygulama Kolaylığı
Biyotiplendirme	Tüm izolatlar	Zayıf	Zayıf	Orta	Kolay
Antibiyotipleme	Tüm izolatlar	İyi	Zayıf	Kolay	Kolay
Serotiplendirme	Çoğu izolatlar	İyi	Vasat	Orta	Orta
Plazmid analizi	Çoğu izolatlar	İyi	İyi	Orta	Orta
Kromozomal DNA'nın REA	Tüm izolatlar	İyi	İyi	Zor	Orta
RFLP ve DNA Prob Analizi	Tüm izolatlar	Mükemmel	Orta→ Mükemmel	Orta	Zor
PFGE	Tüm izolatlar	Mükemmel	Mükemmel	Orta	Orta
AP-PCR (RAPD)	Çoğu izolatlar	İyi	İyi	Orta	Orta

Bununla birlikte son zamanlarda PFGE yöntemi MRSA'lar için “altın standart” olarak kabul edilmeye başlanmıştır. PFGE ile tiplendirmenin özellikle bölgesel salgınlarda yüksek ayrım gücü ve performans gösterdiği ifade edilmektedir (20). PFGE, çok zaman alıcı ve laboratuvarlar arası standardizasyonunun zayıf olmasına rağmen diğer metodlarla karşılaştırıldığında yararlı bir referans yöntemi olmuştur (76).

Sonuç olarak, hızlı yöntemlerden bir grubunu kombine şekilde kullanarak benzer suşları ayırt etmek yararlı olacaktır. Ancak unutulmaması gereken en önemli nokta, bütün tiplendirme yöntemlerinin, epidemiyolojik bir araştırmada epidemiyolojik veriler ışığı altında değerlendirilmesi gereken yardımcı araçlar olduğudur.

5. MATERİYAL VE METOT

5.1 İZOLATLAR:

Gaziantep Üniversitesi Şahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesi YBÜ'lerinde yatan hastalardan Ekim-Aralık 2004 tarihleri arasında 3 ay süre ile kan kültürü şişelerinde laboratuvara gönderilen kan örnekleri çalışmaya alındı. BacT Alert 3D otomotize kan kültür sisteminde (BioMerieux, Fransa) 7 gün süreyle inkübe edilerek üreme sinyali veren şişelerden steril enjektörle 2-3 ml örnek alınıp steril tüpte 3000 devir/dakika'da 5 dakika santrifüj edildi, tüpün dip kısmından bir öze ile alınarak % 5 koyun kanlı agara ekimleri yapıldı. 37 °C de bir gece inkübe edildi, inkübasyon sonunda morfolojik olarak stafilokok olduğu düşünülen koloniler Gram boyası, katalaz ve plazma koagülaz testleri yapılarak ayrıldı. KNS tiplendirmeleri ise Vitek2 (BioMerieux, Fransa) Gram pozitif identifikasyon paneline alınarak prosedürüne uygun olarak yapıldı.

İzole edilen *S. aureus* ve diğer tüm KNS'lerin disk difüzyon yöntemi ile oksasiline ve sefoksitine duyarlılıkları çalışıldı

5.2 Oksasilin disk difüzyon yöntemi

Bu yöntemde metisilin dirençli *S. aureus* izolatlarının saptanması amacıyla 1 µg oksasilin diski kullanıldı. 0,5 Mc Farland bulanıklığa ayarlanmış olan bakteri süspansiyonundan Mueller Hinton agara (MHA) 1 ml ekim yapıp steril eküvyonla besiyerinin yüzeyine yayıldı. Plaklar 35 °C'de 24 saat inkübe edildi. Standart suş olarak ATCC 25923 kullanıldı. Oksasilin disk difüzyon yöntemi için CLSI tarafından belirlenen direnç sınır değerlerine göre inhibisyon zon çapları değerlendirildi.(77,78).

Tablo 2: Oksasilin disk difüzyon yönteminde kullanılan zon çap değerleri (CLSI)

	Dirençli	Orta duyarlı	Duyarlı	Mikroorganizma
1µg Oksasilin	≤ 10 mm	11-12 mm	≥ 13 mm	<i>S. aureus</i>
1µg Oksasilin	≤ 17 mm		≥ 18 mm	KNS

5.3 Sefoksitin disk difüzyon yöntemi

Bu yöntemde 30 µg sefoksitin diski kullanıldı. 0,5 Mc Farland bulanıklığa ayarlanmış olan bakteri süspansiyonundan MHA'a ekim yapıldıktan sonra, plaklar 35 °C'de 24 saat inkübe edildi. Sefoksitin disk difüzyon yöntemi için CLSI tarafından belirlenen direnç sınır değerlerine göre inhibisyon zon çapı ≤ 21 mm olan izolatlar dirençli, ≥ 22 mm olan izolatlar ise duyarlı olarak kabul edildi (77,78).

Tablo 3: Sefoksitin disk difüzyon yönteminde kullanılan zon çap değerleri (CLSI)

	Dirençli	Duyarlı	Mikroorganizma
30 µg Sefoksitin	≤ 21 mm	≥ 22 mm	<i>S. aureus</i>
30 µg Sefoksitin	≤ 24 mm	≥ 25 mm	KNS

5.4 PCR ile mec geni araştırılması

Bakteri DNA İzolasyonu

- 1- 24 saatlik bakteri kültüründen tek koloni MHB'a süspanse edilip, 37 °C'de inkübe edildi.
- 2- İnkübasyondan sonra 15 dak. 3000 rpm 'de santrifüj edilir. Üst sıvı dökülür, üzerine 1ml TE buffer eklenir ve vortekslenir, 1.5 ml'lik ependorf tüpe aktarılır.
- 3- Süspansiyon tekrar 10 dak. 10000 rpm'de santrifüj edilip, süpernatant atılır.
- 4- 100µg/ml 'lik lizostafinden 50µl eklenip, vortekslendikten sonra 10 dak. 37°C'lik sıcak su banyosunda bekletilir.
- 5- Vortekslendikten sonra üzerine 100µg/ml Proteinaz K'dan 50µl eklenip, vortekslendikten sonra 10 dak. 37°C'lik sıcak su banyosunda bekletilir.
- 6- Daha sonra kaynayan suda 15 dakika kaynatılır.
- 7- Kaynadıktan sonra 10 dak. mikrosantrifüjde çevirip, süpernatant pelete dokunmadan alınır, hazırlanan DNA kullanılıncaya kadar -20 °C'de bekletilir

PCR Primerleri

2 Oligonükleotid primeri *S. aureus* TK784'ün *mecA* geninin DNA sekansına göre sentezi yaptırılmıştır. Primer 1 (5'-GTTGTAGTTGTCGGGTTTGG-3') sekansına sahip olan *mecA* geni 37-57 arası nükleotidlerdir. Primer 2 (5'-CCACCCAATTTGTCTGCCAGTTTCTCC-3') sekansı ile 1827-1854 arası nükleotidlerin ters komplementidir (79,80).

PCR protokolü

Amplifikasyon karışımının hazırlanması

Eppendorf tüpünde toplam hacim 50 µl olacak şekilde aşağıda gösterdiği gibi hazırlanmıştır.

Distile su	22 µl
PCR tampon (10 x)	5 µl
dNTP mix 2 mM	5 µl
25 mM MgCl ₂	3 µl
Primer Sens (5 µM)	5 µl
Primer Antisens (5 µM)	5 µl
taq DNA polimeraz (5U)	0,5 µl
total DNA'dan	5 µl

Tablo 4: Amplifikasyon Programı

1 Döngü	Denatürasyon	94 ⁰ C	4 dakika
	denatürasyon	94 ⁰ C'	30 saniye
30 Döngü	primer bağlanma	55 ⁰ C	30 saniye
	primer uzama	72 ⁰ C	2 dakika
1 Döngü	Son uzama	72 ⁰ C	5 dakika

PCR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezi ile analiz edilmiştir.

Amplifikasyon sonucunun gözlenmesi

12 µl amplifikasyon ürünü yaklaşık 2 µl loading dye ile karıştırılıp ve % 2 lik agaroz gel [2 gr agaroz üzerine 100 ml 1xTAE (1mM Tris-acetate + 1 mM EDTA 100 ml'ye kadar distile su ilave edilerek hazırlanır)] ve toplam hacim içerisindeki konsantrasyonu 5 µM etidyum bromür olacak şekilde hazırlandı. Elektroforez işlemi (100 Volt'da 1 saat) sonucunda jel bir transilüminatör üzerine alınarak UV ışığı (~304 nm) altında fotoğraf çekildikten sonra amplifiye edilen DNA'nın molekül ağırlığı, moleküler ağırlık standardı (HaeΦX174 DNA size marker) ile karşılaştırılarak yaklaşık olarak belirlenmiştir. 1107 bp büyüklüğünde bant görülmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir.

5.5 PFGE YÖNTEMİ İLE MOLEKÜLER ANALİZ

PFGE yöntemi ile MRSA,MRSE ve metisiline dirençli KNS olmak üzere toplam 57 suşun moleküler analizi yapılmıştır.

5.5.1 Gereçler:

Bakteri saklama tüpleri	(Mast Cryobank/Almanya)
Blok hazırlama kalıpları	(BKMM/GATA/Türkiye)
Elektroforez tankı ve güç kaynağı	(Mini Sub Cell GT System/BioRad/ABD)
Görüntü analizi için yazılım	(Quantity One/BioRad/ABD)
Hassas terazi	(Precisa 125 A SCS/İsveç)
Jel görüntüleme sistemi	(GelDoc/BioRad/ABD)
Muhtelif Mikropipetler	(Biohit Proline Pipette/Finlandiya)
PFGE Cihazı CHEF-DR II	(BioRad/ABD)
pHmetre	(EMAF/Türkiye)
Santrifüj	(Eppendorf Centrifuge 5417R/Almanya)
Spektrofotometre	(Jenway/İngiltere)
Yatay çalkalayıcı	(OXOID/Almanya)

5.5.2 Reaktifler:

Etidyum Bromid (Boehringer Mannheim GmbH/Almanya) : 10 mg/ml (steril distile su içinde, w/v)

Lizostafin (Sigma/Almanya) : 10 mg/ml (steril distile su içinde)

Lizozim (Serva/Almanya) : 10 mg/ml (steril distile su içinde)

“Low Melting” Agaroz (Sigma/Almanya) : % 1,5 (steril distile su içinde,w/v)

Mueller Hinton Agar (DIOMED/Türkiye)

Proteinaz K (Sigma/Almanya) : 20 mg/ml (steril distile su içinde)

PFGE ölçü birimi (Lambda fajına ait) (Fluka/İsviçre) : 50-1000 kb arası

“Pulsed Field Certified” Agaroz (BioRad/ABD)

Ribonükleaz A (Ambresco/ABD) : 10 mg/ml (steril distile su içinde)

*Sma*I Restriksiyon Enzimi (Sigma/ABD) : 10 IU/μl

Tryptic Soy Sıvı besiyeri (TSB) (DIFCO/ABD)

10X TBE: Tris (Sigma/Almanya) 108 gr/lt

Borik asid (Sigma/Almanya) 55 gr/lt

EDTA (Sigma/Almanya) 20 ml/lt [0,5 M (pH: 8,0)]

EC solüsyonu: Tris (Sigma/Almanya) 6 mM (pH: 8,0)

NaCl (MERK/ABD) 1 M

EDTA (Sigma/Almanya) 0,1 M (pH: 8,0)

Na deoksikolat (Ambresco/ABD) % 0,2 (w/v)

Na lauril sarkozin (Sigma/Almanya) % 0,5 (w/v)

0,2 μm’lik filtreden geçirilerek sterilize edildi.

EC-lizis solüsyonu: EC solüsyonuna kullanım gününde 50 μg/ml ribonükleaz A, 100μg/ml lizozim, 100 μg/ml lizostafin eklenerek elde edildi.

ES solüsyonu: EDTA (Sigma/Almanya) 0,5 M (pH: 9,0)

Na lauril sarkozin (Sigma/Almanya) % 1 (w/v)

0,2 μm’lik filtreden geçirilerek sterilize edildi.

ESP solüsyonu: ES solüsyonuna kullanım gününde 2 mg/ml konsantrasyonunda proteinaz K eklenerek elde edildi.

PIV solüsyonu: Tris (Sigma/Almanya) 0,01 M (pH: 8,0)

NaCl (MERK/ABD) 1 M

0,2 μm’lik filtreden geçirilerek sterilize edildi.

*Sma*I Enzim Tamponu: Tris (Sigma/Almanya) 6 mM (pH: 8,0)

KCl (Sigma/Almanya) 20 mM

MgCl₂ (Sigma/Almanya) 6 mM

TE: Tris (Sigma/Almanya) 10 mM (pH: 7,5)

EDTA (Sigma/Almanya) 1 mM (pH: 8,0)

5.5.3 PFGE İşlemi İçin Kromozomal DNA İzolasyonu:

DNA izolasyonu, Goering RV. ve ark.'nın ve de Lencastre H. ve ark.'nın tanımladıkları yöntemlerden modifiye edilerek gerçekleştirildi (24.38)

1. Bakteri saklama tüplerinde -20°C 'de saklanan MRSA suşları Mueller Hinton agara ekilerek canlandırıldı. Ekimler 24 saat süreyle 37°C 'de normal atmosfer koşullarında inkübe edildi.
2. İnkübasyondan sonra saf kültür halinde üreyen suşlardan birkaç koloni 3 ml TSB besiyerine ekildi. İnkübasyon dakikada 200 kez çalkalanacak şekilde 37°C 'de bir gece sürdürüldü.
3. TSB'deki bakteri süspansiyonundan 1000 μl 'si santrifüj tüplerine alındı ve 7000 rpm'de 2 dk. süreyle santrifüj edildi.
4. Üst sıvı atıldı ve elde edilen bakteri pelleti, üzerine 1000 μl PIV solüsyonu eklenerek yıkandı. Tekrar 7000 rpm'de 2 dk. süreyle santrifüj edildi.
5. Üst sıvı atıldı ve pellet 400 μl PIV solüsyonu ile süspanse edildi.
6. Süspansiyonun 10 μl 'si optik dansite değeri ölçümü için içinde 2 ml PIV bulunan tek kullanımlık spektrofotometre küvetine konarak homojenize edildi. Ölçümler 620 nm dalga boyunda gerçekleştirildi. İzolatlardan standart miktarda hücre içeren süspansiyonları hazırlayabilmek için her bir 400 μl PIV solüsyonu içerisindeki bakteri süspansiyonu üzerine eklenecek PIV miktarı şu formüle göre belirlendi:
Eklenecek miktar (μl) = (Ölçülen OD değeri x 50 x 210) – 210
7. Hesaplanan miktarda PIV solüsyonu eklendikten sonra elde edilen standart bakteri süspansiyonunun 300 μl 'si, 50°C 'de tutularak dengelenen % 1,5'luk "low melting point" agaroz ile eşit hacimde karıştırılarak süspanse edildi.
8. Elde edilen süspansiyon "plug" adı verilen blokları oluşturmak için tasarlanmış kalıplara döküldü. Kalıplar 5 dk.süreyle $+4^{\circ}\text{C}$ 'de, 5 dk. süreyle de -20°C 'de bekletildi.
9. Katılaştıran bloklar 1 ml EC-lizis solüsyonu içeren 1,5 ml'lik konik santrifüj tüplerine konarak 37°C 'de 5 saatlik inkübasyona bırakıldı.
10. İnkübasyon sonunda tüplerdeki EC-lizis solüsyonları aspire edildi ve bloklar üzerine 1 ml ESP solüsyonu eklendi. 50°C 'de bir gecelik inkübasyona bırakıldı (en az 18 saat).

11. İnkübasyonun tamamlanmasından sonra bloklar 1X TE tamponuyla 4 kez vidalı kapaklı, 50 ml’lik steril plastik tüpler içinde yıkandı. Yıkamalar arasında blokların bulunduğu tüpler +4°C’de tutuldu.

12. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra bloklar 1 ml 1X TE tamponu içerisine alınarak enzimle kesim işlemine kadar +4° C’de saklandı.

5.5.4 Restriksiyon Enzim Kesisi:

1. DNA blokları 400 µl *SmaI* enzim tamponu içeren 1,5 ml’lik konik plastik santrifüj tüplerine konarak yarım saat oda ısısında (25° C) bekletildi.

2. Daha sonra olan bu tampon pipetle boşaltıldı ve yerine 30 IU *SmaI* enzimi ve 300 µl 1X ticari enzim tamponu konuldu. Bloklar 37°C’de bir gecelik (en az 18 saat) inkübasyona bırakıldı.

3. İnkübasyon bitiminde DNA blokları 20 ml 1X TE tamponu ile bir kez yıkandı.

5.5.5 PFGE İşlemi:

PFGE işlemi de Lencastre H. ve ark.’nın tanımladıkları şekilde gerçekleştirildi (38).

1. RE kesimi tamamlanan DNA blokları, 0,5X TBE tamponuyla hazırlanmış %1’lik “pulsed field certified” agaroz jeldeki kuyucuklara dikkatlice yerleştirildi.

2. İlk ve son kuyucuklara lambda ladder içeren PFGE ölçü birimi kondu.

3. Elektroforez işlemi, CHEF-DR II PFGE cihazıyla 0,5X TBE tamponu kullanılarak 14°C’de, 6 V/cm, 20 saat süreyle, başlangıç değişim zamanı 5,3 sn. ve bitiş değişim zamanı 34,9 sn. olacak şekilde gerçekleştirildi (25).

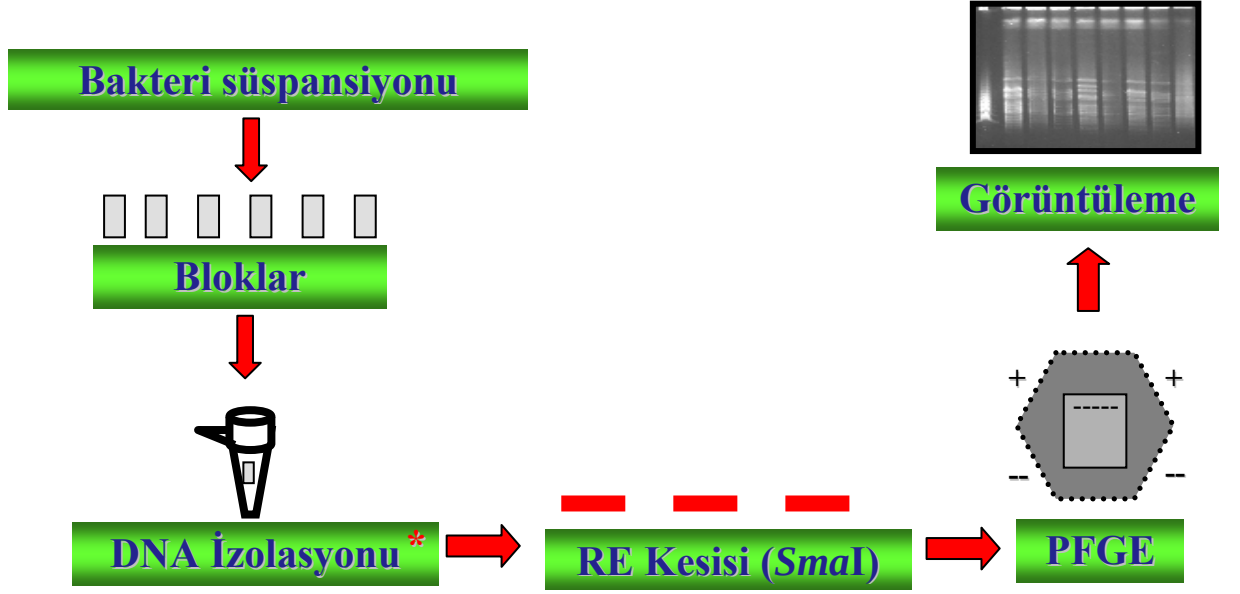
4. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jel önce 0,5 µg/ml etidyum bromid içeren 250 ml 0,5X TBE tamponu içinde 30 dk. süreyle boyandı, daha sonra distile su ile yine 30 dk. süreyle yıkandı.

5. Band görüntüleri UV ışık altında GelDoc görüntüleme sistemi yardımıyla bilgisayar ortamına aktarıldı.

6. Quantity One isimli yazılım ile görüntü analizi yapıldı.

7. Tiplendirme işlemi Tenover kriterlerine göre gerçekleştirildi. (58).

Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)



Şekil 1: Pulse Field Jel Elektroforez yönteminin şematik görünümü (48).

6.BULGULAR

Çalışmamızda YBÜ'lerde yatan hastalardan alınan kan örneklerinden izole edilen 25 *S. aureus*, 32 KNS izolatu olmak üzere toplam 57 stafiloc izolatında oksasilin disk difüzyon testi, sefoksitin disk difüzyon testi ve PCR ile mec A geni aranması yöntemleriyle metisilin direnci belirlenmeye çalışılmıştır.

Stafilokok izolatlarının seçiminde öncelikle oksasiline dirençli olan izolatlar temel olarak alınmıştır. oksasilin ve sefoksitin disk difüzyon testleri eş zamanlı olarak çalışılmıştır. 57 *S. aureus* ve KNS izolatlarının tamamı oksasiline dirençli iken 3'ü *S. aureus*, 3'ü KNS olmak üzere toplam 6 izolat Sefoksitine duyarlı olduğu saptanmıştır.

Tablo 5: *S. aureus* suşlarında oksasilin ve sefoksitin duyarlılık sonuçları

Suş	Protokol no		OX	FOX
1	17	<i>S. aureus</i>	R	R
2	27	<i>S. aureus</i>	R	R
3	38	<i>S. aureus</i>	R	R
4	65	<i>S. aureus</i>	R	R
5	154	<i>S. aureus</i>	R	R
6	648	<i>S. aureus</i>	R	R
7	678	<i>S. aureus</i>	R	R
8	703	<i>S. aureus</i>	R	R
9	1008	<i>S. aureus</i>	R	R
10	8638	<i>S. aureus</i>	R	25mm S
11	8676	<i>S. aureus</i>	R	25mm S
12	8830	<i>S. aureus</i>	R	R
13	8847	<i>S. aureus</i>	R	R
14	8848	<i>S. aureus</i>	R	R
15	8850	<i>S. aureus</i>	R	R
16	8873	<i>S. aureus</i>	R	R
17	8882	<i>S. aureus</i>	R	R
18	8890	<i>S. aureus</i>	R	R
19	9105	<i>S. aureus</i>	R	22mm S
20	9161	<i>S. aureus</i>	R	R
21	9950	<i>S. aureus</i>	R	R
22	10267	<i>S. aureus</i>	R	R
23	11536	<i>S. aureus</i>	R	R
24	57484	<i>S. aureus</i>	R	R
25	100206	<i>S. aureus</i>	R	R

OX:Oksasilin

FOX:Sefoksitin

Tablo 6: Koagülaz negatif stafilokokların duyarlılık Sonuçları

Suş	Protokol no		OX	FOX
1	56	<i>S. haemolyticus</i>	R	R
2	69	<i>S. epidermidis</i>	R	R
3	85	<i>S. haemolyticus</i>	R	R
4	857	<i>S. epidermidis</i>	R	R
5	8324	<i>S. hominis</i>	R	R
6	8371	<i>S. epidermidis</i>	R	R
7	8392	<i>S. haemolyticus</i>	R	R
8	8418	<i>S. epidermidis</i>	R	R
9	8652	<i>S. haemolyticus</i>	R	R
10	8679	<i>S. epidermidis</i>	R	R
11	8698	<i>S. hominis</i>	R	R
12	8907	<i>S. epidermidis</i>	R	R
13	8977	<i>S. haemolyticus</i>	R	R
14	9265	<i>S. epidermidis</i>	R	R
15	9344	<i>S. epidermidis</i>	R	R
16	9622	<i>S. auricularis</i>	R	R
17	9822	<i>S. cohnii</i>	R	R
18	9939	<i>S. epidermidis</i>	R	R
19	9974	<i>S. epidermidis</i>	R	26 mm S
20	10021	<i>S. auricularis</i>	R	R
21	10469	<i>S. epidermidis</i>	R	30mm S
22	10511	<i>S. epidermidis</i>	R	26 mm S
23	11067	<i>S. epidermidis</i>	R	R
24	11082	<i>S. auricularis</i>	R	R
25	11301	<i>S. warneri</i>	R	R
26	11372	<i>S. epidermidis</i>	R	R
27	11497	<i>S. epidermidis</i>	R	R
28	11640	<i>S. epidermidis</i>	R	R
29	88741	<i>S. epidermidis</i>	R	R
30	9625	<i>S. epidermidis</i>	R	R
31	8767	<i>S. auricularis</i>	R	R
32	11501	<i>S. cohnii</i>	R	R

KNS izolatlarından Sefoksitine duyarlı olan 3 izolat ta *S.epidermis*'tir. Diğer KNS'lerde ise Sefoksitine duyarlı herhangi bir izolat saptanmamıştır.

Tablo 7: İzolatların Yoğun Bakım Ünitelerine göre dağılımı

YBÜ	MRSA	KNS	Toplam izolat (%)
Dahili Yoğun Bakım Ünitesi	16	13	29 (50.8)
Cerrahi Dahili Yoğun Bakım Ünitesi	6	11	17 (29.8)
Pediyatrik Yoğun Bakım Ünitesi	3	7	10 (17.6)
Yenidoğan Bakım Ünitesi	-	1	1 (1.8)
Toplam	25	32	57

YBÜ’lerde izole edilen 57 *S. aureus* ve KNS’lerin 29’u (%50.8) DYBÜ’den izole edilirken 17’si (%29.8) CYBÜ’den, 10’u (%17.6) PYBÜ’den 1 tanesi ise YYBÜ’den izole edilmiştir. 25 *S. aureus*’un 16’sı DYBÜ’den izole edilirken 6’sı CYBÜ’den izole edilmiş olup 3 izolat ise PYBÜ’den izole edilmiştir. Yine KNS’lerin 13’ü DYBÜ’den, 11’i CYBÜ’den, 7’si PYBÜ’den ve 1’i ise YYBÜ’den izole edilmiştir.

Tablo 8: KNS lerin tür dağılımı

KNS	n (%)
<i>S. epidermidis</i>	18 (56.1)
<i>S. haemolyticus</i>	5 (15.1)
<i>S. auricularis</i>	4
<i>S. hominis</i>	2
<i>S. cohnii</i>	2
<i>S. warneri</i>	1

YBÜ’lerden izole edilen 32 KNS izolatının 18’i (%56.1) *S. epidermidis*, 5’i (15.1) *S. haemolyticus*, 4’ü *S. auricularis*, 2’si *S. hominis*, 2’si *S. cohnii* ve 1’i *S. warneri* olduğu saptanmıştır.

Tablo 9: YBÜ kan örneklerinden izole edilen 57 Stafilokok izolatlarının Oksasilin Sefoksitin Disk difüzyon testi ve PCR yöntemi ile metisilin direncinin saptama sonuçlarının kıyaslanması

Mikroorganizma	Yöntem		Disk difüzyonla duyarlılık	mec A + (%)	mec A - (%)
<i>S. aureus</i> n=25	Oksasilin	R	25	19 (76)	6 (24)
		S	-----	-----	-----
	Sefoksitin	R	22	18 (81.8)	4 (18.2)
		S	3	1	2
KNS n=32	Oksasilin	R	32	19 (59.3)	13 (40.7)
		S	-----	-----	-----
	Sefoksitin	R	29	16 (55.2)	13 (44.8)
		S	3	3	0

Oksasiline dirençli olan 25 *S. aureus* izolatının 3'ünün Sefoksitine duyarlı olduğu, 6'sında ise mec A genin olmadığı saptanmıştır. Sefoksitne duyarlı 3 *S. aureus* izolatının 1'inde mec A geni tespit edilmiştir. Oksasiline dirençli 32 KNS izolatının 3'ünün Sefoksitine duyarlı olduğu, 13'ün de ise mec A geninin olmadığı saptanmıştır. Sefoksitne duyarlı 3 KNS izolatının tamamında mecA geni olduğu saptanmıştır.

Tablo-10: PFGE ve PCR sonuçlarına *S. aureus* tipleri

No	Protokol no		OX	FOX	mec A	PFGE tipleri	Alt tipler
1	17	<i>S. aureus</i>	R	R	Negatif	TipA	A1
2	27	<i>S. aureus</i>	R	R	Pozitif	TipA	
3	38	<i>S. aureus</i>	R	R	Pozitif	TipA	
4	65	<i>S. aureus</i>	R	R	Negatif	TipA	A1
5	154	<i>S. aureus</i>	R	R	Pozitif	TipA	
6	648	<i>S. aureus</i>	R	R	Negatif	Tip B	B1
7	678	<i>S. aureus</i>	R	R	Pozitif	Tip B	
8	703	<i>S. aureus</i>	R	R	Pozitif	TipA	
9	1008	<i>S. aureus</i>	R	R	Pozitif	TipA	
10	8638	<i>S. aureus</i>	R	25mm S	Pozitif	Tip B	
11	8676	<i>S. aureus</i>	R	25mm S	Negatif	TipA	A1
12	8830	<i>S. aureus</i>	R	R	Pozitif	TipB	
13	8847	<i>S. aureus</i>	R	R	Pozitif	TipA	
14	8848	<i>S. aureus</i>	R	R	Pozitif	TipA	
15	8850	<i>S. aureus</i>	R	R	Pozitif	Tip B	
16	8873	<i>S. aureus</i>	R	R	Pozitif	Tip B	
17	8882	<i>S. aureus</i>	R	R	Pozitif	TipA	
18	8890	<i>S. aureus</i>	R	R	Pozitif	TipA	
19	9105	<i>S. aureus</i>	R	22mm S	Negatif	Tip B	B1
20	9161	<i>S. aureus</i>	R	R	Negatif	TipA	A1
21	9950	<i>S. aureus</i>	R	R	Pozitif	Tip B	
22	10267	<i>S. aureus</i>	R	R	Pozitif	TipA	
23	11536	<i>S. aureus</i>	R	R	Pozitif	TipA	
24	57484	<i>S. aureus</i>	R	R	Pozitif	TipA	
25	100206	<i>S. aureus</i>	R	R	Pozitif	TipA	

17 *S. aureus* izolatının PFGE sonuçlarına göre Tip A olduğu, 8 izolatın ise Tip B olduğu saptanmıştır.

Tablo 11: *S. aures* tiplerinin Yoğun Bakım ünitelerine göre dağılımı

	CYBÜ	DYBÜ	PYBÜ
Tip A	6	10	1
Tip A1	1	2	1
Tip B	1	6	1
Tip B1		1	1
Toplam	7	16	2

Tip A olarak saptanan 17 izolatın 4'ünde mec A geni saptanmamış olup bunlar Tip A1 olarak adlandırılmıştır. Tip B olarak saptanan 2 izolatta mec A geni saptanmamış olup Tip B1 olarak adlandırılmıştır.

Tablo 12: Oksasilin, sefoksitin ve mec A geni sonuçlarının karşılaştırılması

	mec APozitif (%)	OX dirençli (%)	FOX dirençli (%)
S. aureus	19 (76)	25 (100)	22 (88)
KNS	19 (59.4)	32 (100)	29 (90.6)

25 S. aureus'un 19'ü nda (%76) mec A geni,32 KNS izolatının 19'unda (%59.4) mec A geni saptanmıştır.

Tablo 13: S. epidermidis 'lerin PCR mec A geni sonuçları

	Protokol no		OX	FOX	mec A
1	69	<i>S. epidermidis</i>	R	R	Negatif
2	857	<i>S. epidermidis</i>	R	R	Pozitif
3	8371	<i>S. epidermidis</i>	R	R	Pozitif
4	8418	<i>S. epidermidis</i>	R	R	Pozitif
5	8679	<i>S. epidermidis</i>	R	R	Negatif
6	8907	<i>S. epidermidis</i>	R	R	Pozitif
7	9265	<i>S. epidermidis</i>	R	R	Negatif
8	9344	<i>S. epidermidis</i>	R	R	Pozitif
9	9939	<i>S. epidermidis</i>	R	R	Pozitif
10	9974	<i>S. epidermidis</i>	R	26 mm S	Pozitif
11	9994	<i>S. epidermidis</i>	R	R	Pozitif
12	10469	<i>S. epidermidis</i>	R	R	Negatif
13	10511	<i>S. epidermidis</i>	R	26 mm S	Pozitif
14	11067	<i>S. epidermidis</i>	R	R	Negatif
15	11372	<i>S. epidermidis</i>	R	R	Pozitif
16	11469	<i>S. epidermidis</i>	R	30mm S	Pozitif
17	11497	<i>S. epidermidis</i>	R	R	Negatif
18	11640	<i>S. epidermidis</i>	R	R	Pozitif

18 S. epidermidis izolatının 3'ü Sefoksitine duyarlı iken 6 izolatta mec a geni saptanamamıştır.

Tablo 14: S. epidermidis dışındaki diğer KNS'lerin PCR mec A geni sonuçları

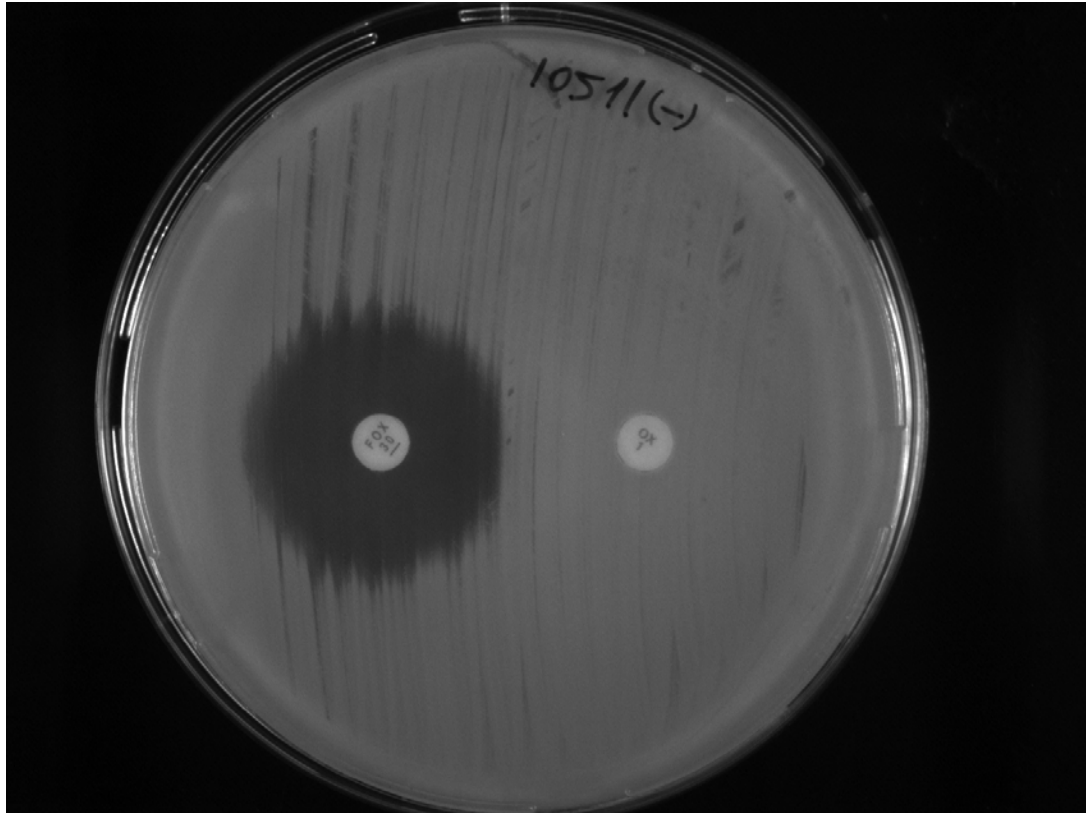
	Protokol no		OX	FOX	mec A
1	56	<i>S. haemolyticus</i>	R	R	Negatif
2	85	<i>S. haemolyticus</i>	R	R	Pozitif
3	8392	<i>S. haemolyticus</i>	R	R	Pozitif
4	8652	<i>S. haemolyticus</i>	R	R	Pozitif
5	8977	<i>S. haemolyticus</i>	R	R	Pozitif
1	9622	<i>S. auricularis</i>	R	R	Pozitif
2	10021	<i>S. auricularis</i>	R	R	Negatif
3	11082	<i>S. auricularis</i>	R	R	Negatif
4	8767	<i>S. auricularis</i>	R	R	Pozitif
1	8324	<i>S. hominis</i>	R	R	Negatif
2	8698	<i>S. hominis</i>	R	R	Pozitif

1	9822	<i>S. cohnii</i>	R	R	Negatif
2	11501	<i>S. cohnii</i>	R	R	Negatif
1	11301	<i>S.warneri</i>	R	R	Negatif

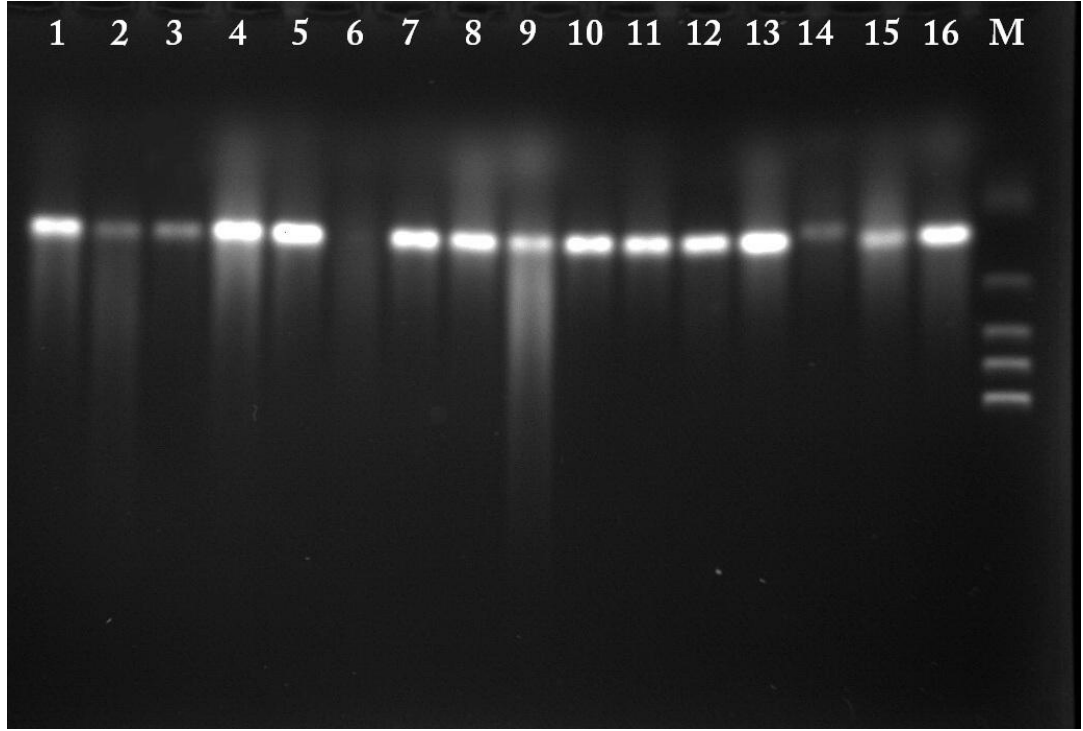
Beş *S. haemolyticus* izolatının tamamı hem oksasiline hem de Sefoksitine dirençli iken 1 izolatta mec A geni saptanamamıştır. 4 *S. auricularis* izolatının tamamı hem oksasiline hem de Sefoksitine dirençli iken, 2 izolatta mec A geni saptanamamıştır.

Tablo 15: KNS'lerin mec geni pozitiflik oranları

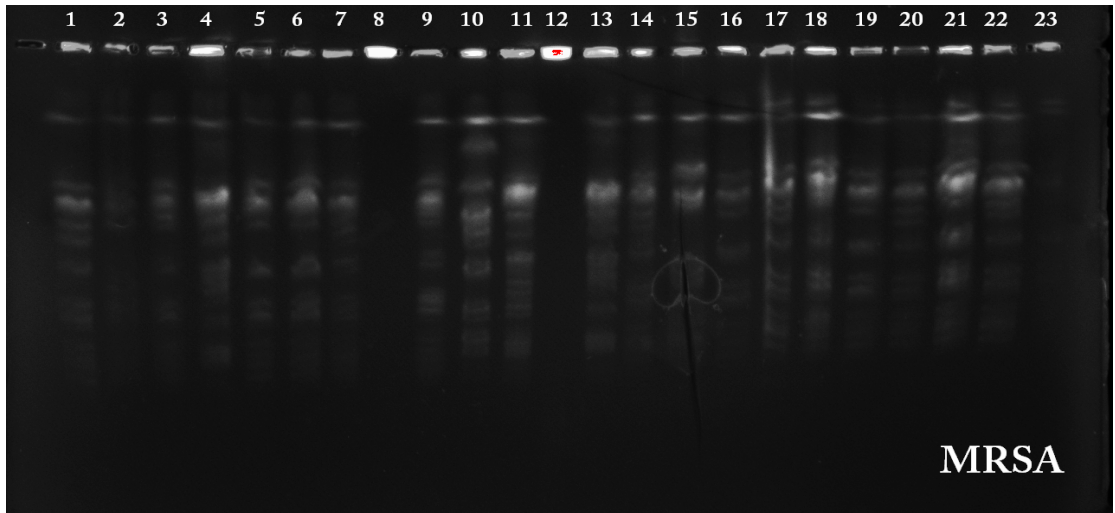
	mec A pozitif (%)	mec A negatif (%)	Toplam
<i>S. epidermidis</i>	12 (66,6)	6 (34,4)	18
<i>S. haemolyticus</i>	4 (80)	1 (20)	5
<i>S. auricularis</i>	2 (50)	2 (50)	4
<i>S. hominis</i>	1 (50)	1 (50)	2
<i>S. cohnii</i>	0 (0)	2 (100)	2
<i>S.warneri</i>	0 (0)	1 (100)	1
Toplam	19 (59,4)	13 (40,6)	32



Resim1: Disk diffüzyon testi

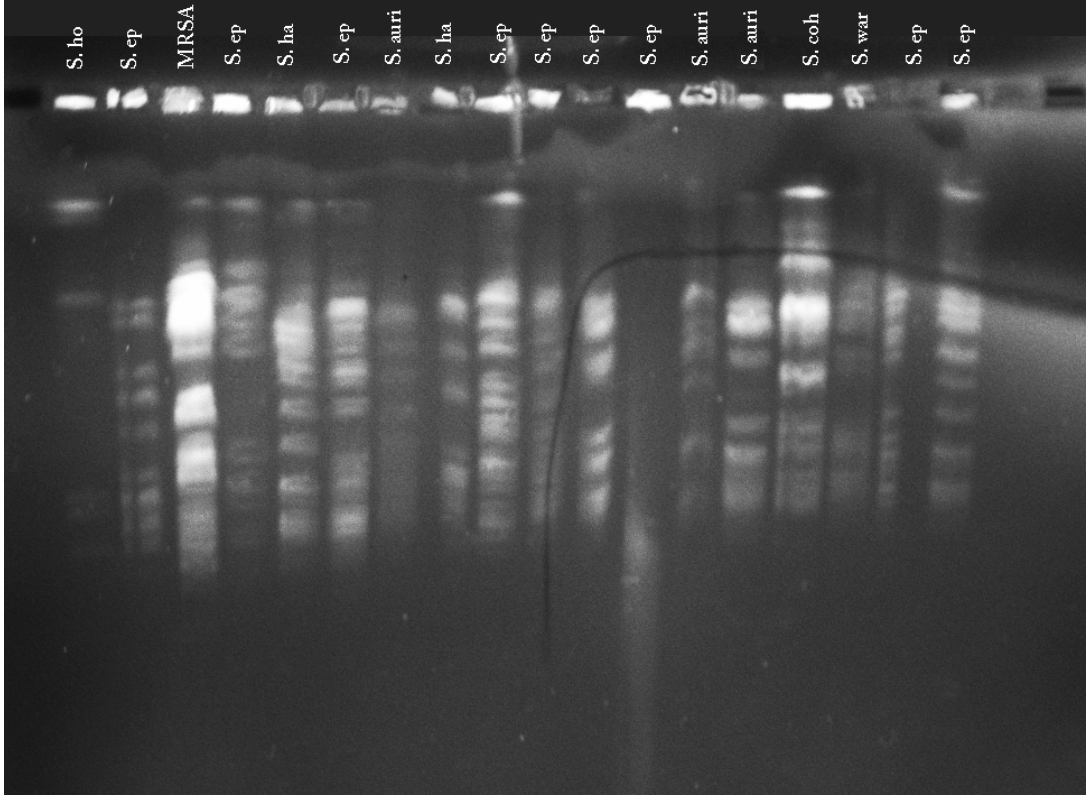


Resim 2: PCR mec A gen sonuçları

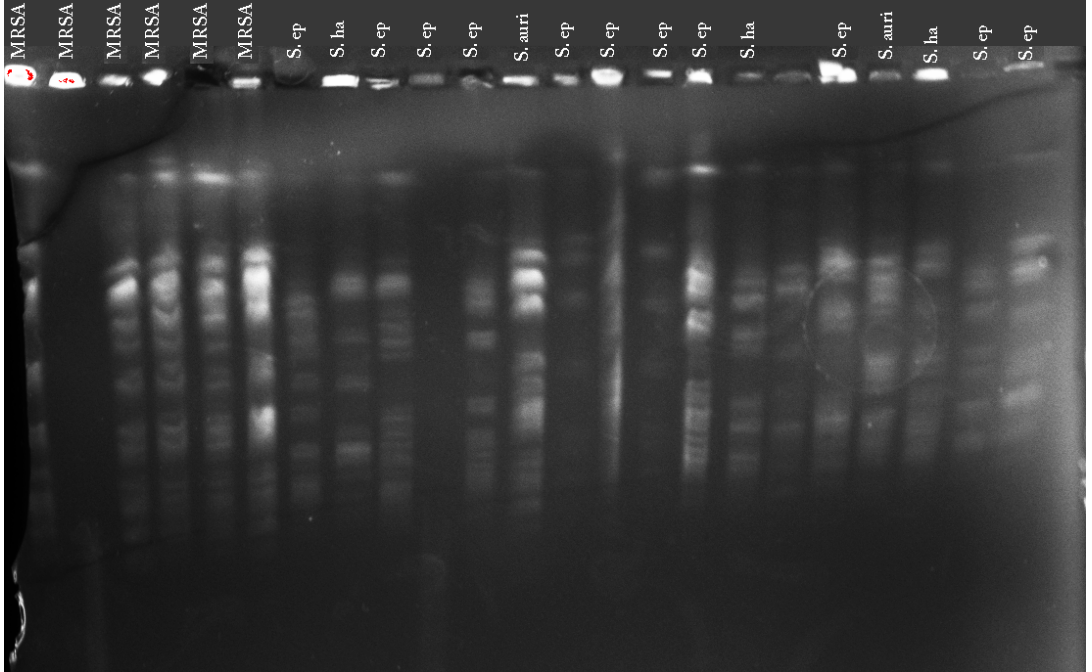


Resim3: PFGE *S. aureus* jel görüntüsü

Tenover kriterlerine göre 2,3,5,6,7,9,16,17,18,19,20,21,22 nolu izolatların aynı (Tip A), 1,4,10,11,13,14,15 nolu izolatların ise birbirleri ile aynı suşlar (Tip B) olarak belirlenmiştir.



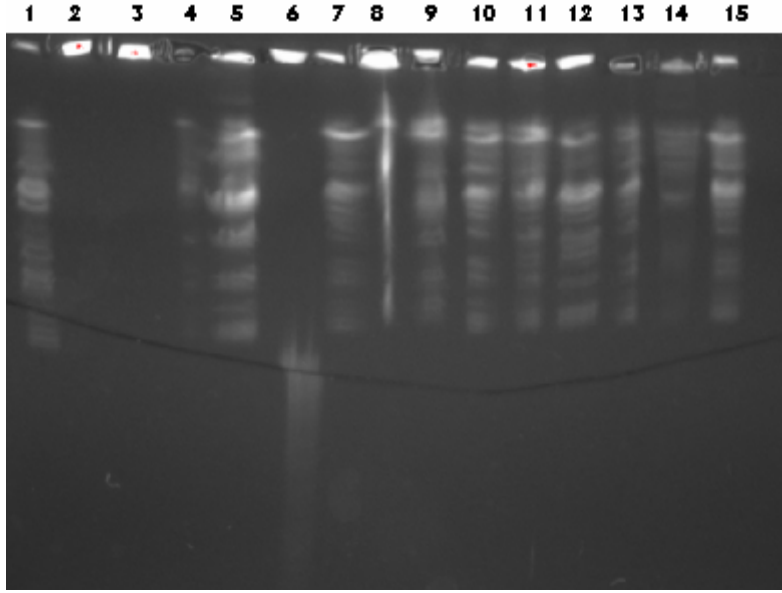
Resim 4: PFGE KNS jel görüntüsü



Resim5: PFGE *S.aureus* ve KNS jel görüntüleri

3,4,5,6 nolu izolatlar Tip A ile aynı olarak belirlenmiştir.

KNS izolatlarından 5,6,7 nolu izolatlar tenover kriterlerine göre aynı suş olduğu diğerlerinin ise tamamen birbirlerinden farklı olduğu belirlenmiştir.



Resim: 6 *S.aureus*'a ait tekrarlanan PFGE jel görüntüsü

1,7,9,10,11,12,13,14,15 nolu izolatlar Tip A, 4 ve 5 izolatlar Tip B olarak belirlenmiştir.

7.TARTIŞMA VE SONUÇ

Yoğun bakım enfeksiyonları antibiyotik tedavisindeki gelişmeler, destek ve koruyucu önlemlerin yaygın olarak kullanılmasına rağmen mortalitenin en önemli nedenlerindendir (81). Yoğun Bakım Üniteleri (YBÜ) hastane kaynaklı enfeksiyonlar için yüksek riskli alanlar olup, hastane kaynaklı enfeksiyon (HKİ) 'ların %20-25'ı YBÜ'de gelişmektedir. Yine YBÜ'de hastane kaynaklı enfeksiyon gelişme riski diğer kısımlardan 5-7 kat daha fazladır (33,82). Yoğun Bakım Ünitelerinde gelişen hastane enfeksiyonları sıklığı hastaneden hastaneye değişiklik göstermektedir. Avrupadaki 1747 YBÜ'ni kapsayan bir çalışmada hastane enfeksiyon hızı %20.6 olarak saptanmıştır (9,83). Türkiye'de bazı merkezlerde yapılan çalışmalara göre, YBÜ hastane enfeksiyon oranlarının %5.3-56.1 arasında değiştiği bildirilmektedir (84). Türkiye'de hastaneler arasında bu derece farklılıkların görülmesi sürveyans standartlarının zaman zaman yenilenmesi ve her merkezin bu standartlara yeteri kadar uyup uymaması ile ilişkili olabilir. Nerkaju ve arkadaşlarının Türkiye'de yaptıkları bir çalışmada en yüksek hastane enfeksiyon hızının Plastik Cerrahisi ve Yanık Yoğun Bakım Ünitesinde (%53), en az enfeksiyon hızının ise Kalp Damar Cerrahisi ve Kardiyoloji YBÜ'nde (%3.7) olduğu saptanmıştır (10). Çalışmamızda en fazla Dahili Yoğun Bakım Ünitesinde (%49.2), en az ise Yenidoğan YBÜ'de (%1.6) oranında MRSA ve metsiline dirençli KNS saptanmıştır.

YBÜ'lerinde mekanik ventilasyon, trakeostomi, kateter uygulaması benzeri invaziv girişimler ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı gibi dirençli patojenlerin ortaya çıkmasına neden olabilecek koşulların hemen hepsi vardır (70,85). ABD'nde yıllık olarak 2 milyonun üzerinde hastada, hastane enfeksiyonu gelişmekte ve bunun %5-35'i YBÜ'nde oluşmaktadır. Washington Tıp Enstitüsüne göre hastane enfeksiyonları yıllık 44.000-98.000 ölüme ve 17-29 milyar dolarlık maliyete neden olmaktadır (86). Antibiyotik tedavisinde ulusal ve uluslararası kılavuzlar, lokal veriler, mikrobik etken ve direnç profili ve antibiyotik kullanım prensipleri önemli etkenlerdir (87). Uygun ve yeterli antibiyotik kullanımı için lokal antibiyotik direnç profilinin bilinmesi hem ampirik antimikrobiyal tedavinin seçimi hem de direnç oranlarını azaltmak için gereklidir (88,89). Gram pozitif bakterilerden KNS düşük virulansa

sahip bir patojen olmasına rağmen son 20 yılda hastane kaynaklı enfeksiyonların yaygın sebebi olarak artış göstermektedir (85,90).

ABD YBÜ'lerinde yapılan NNIS (National Nosocomial Infections Surveillance) ve SCOPE çalışmalarında KNS'lerin hastane kaynaklı bakteriyemilerin en sık neden olduğunu belirtilmiştir (91,92). Yine EPIC (Europe Prevalance Infection Committee) çalışmasında KNS'nin HKİ'nun en sık dördüncü sebebi olduğunu bildirilmiştir (33). KNS'nin oksasilin (metisilin) dirençli suşları tüm dünyada endemik olarak görülmektedir (90). Oksasilin dirençli KNS'ler diğer antibiyotiklerin çoğuna da dirençlidir (73). Çok düşük oranlarda da olsa glikopeptid direnci de rapor edilmiştir. SENTRY çalışmasının Avrupa merkezlerinden toplanan 2068 KNS suşunun sadece dokuz tanesinde (%0.4) teikoplanin direnci saptanırken suşların hiçbirinde vankomisin direnci saptanmamıştır (93). Uzun ve ark. Türkiye'de yapmış oldukları araştırmada KNS'lerin en duyarlı olduğu antibiyotiklerin vankomisin ve teikoplanin iken en dirençli ajanların oksasilin ve amoksisilin /klavulanat olduğu saptanmıştır (81).

S. aureus insan bakteriyemileri arasında en önde gelen patojenlerden biridir (94). *S. aureus*'ta metisilin direnci tüm dünyada major problemdir. EPIC çalışmasında metisilin direnci % 60 bulunmuştur. Avrupa'daki birçok YBÜ'de metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) oranı %50'nin üzerinde rapor edilmekle beraber en yüksek direnç oranları Güney Avrupa ülkelerinde görülmektedir (33,95). Ülkemizde yapılan iki çalışmada üretilen *Staphylococcus* suşlarında MRSA %72,1 ve %82 rapor edilmiştir (9,81). MRSA'ların çoğu çoklu antibiyotik direncine sahiptir ve çok ilaca direnç özellikleri bölgeden bölgeye değişiklik gösterir. MRSA'da glikopeptid direnci görülmemekte veya çok nadir görülmektedir. 15000'den fazla *S. aureus* suşunun toplandığı dünya çapında çok merkezli SENTRY çalışmasında suşların hiçbirinde vankomisin direnci yok iken teikoplanin direnci sadece %0.03 olarak saptanmıştır (93).

Ülkemizde İstanbul'da Köksal ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada metisiline dirençli KNS oranını %67.5 olarak bulmuşlardır. (96) Konya Selçuk Üniversitesi Hastanesi Göğüs Hastalıkları YBÜ'sinde Uzun ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada oksasilin (metisilin) direnci KNS'de %80 *S. aureus*'ta %66.7

olarak belirlenirken hem KNS hem de *S. aureus*'un vankomisin ve teikoplanine %100 duyarlı olduğu ortaya konmuştur (81).

Gaziantep Üniversitesi Hastanesi YBÜ'lerinde Zer ve ark.nın 2001'de yapmış oldukları araştırmada MRSA oranının %88 olduğu ve 2003'te aynı hastanede Namıduru ve ark. larının yapmış olduğu diğer bir araştırmada MRSA oranı %82 olarak rapor edilmiştir (9,11). Nerkaju ve ark.larının 2004 yılında Ankara'da yapmış oldukları çalışmada MRSA oranını %89.3 olarak saptanırken KNS'de metisilin direnci % 72.7 olarak bildirilmiştir (10).

Metisilin direncinin heterojen olarak ortaya çıkması, klinik mikrobiyoloji laboratuvarında bu suşların tayinini zorlaştırmaktadır. Uygunsuz saklanmış beta-laktam antibiyotiklerin kullanımı, inkübasyon süresinin kısa tutulması (24 saat yerine 18 saat), inkübasyon derecesinin 37°C olması veya inokulum miktarının az olması yanlış sonuçların elde edilmesine yol açabilmektedir (97,98).

Günümüzde metisilin direncinin saptanmasında *mecA* geninin moleküler yöntemlerle saptanması altın standart olarak kabul edilmektedir. Ancak bu yöntemlerin klinik laboratuvarlarda uygulanması oldukça zordur. Bu nedenden dolayı klinik laboratuvarlarda *S. aureus*'un metisilin direncinin saptanmasında çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Disk difüzyon yöntemi, klinik laboratuvarlarda en sık kullanılan yöntemdir (99). Oksasilin ve sefoksitin disk difüzyon yöntemleridir (97,100).

Oksasilin PSPs (penisilnaz stabil penisilinler) 'ye dirençliliğin belirlenmesinde fenotipik test olarak CLSI tarafından önerilmiştir. Oksasilin'in stabilitesinin ve duyarlılığının diğer PSPs'ye duyarlılık için kullanılan yöntemlerin üstünde olduğu belirten çalışmalar bulunmaktadır (22,23). Bununla beraber Oksasilin testlerinde duyarlılık ve dirençlilik arasındaki ayrım için tekniklerin gelişmesine rağmen değerlendirme zorluğu oldukça sık rapor edilen bir gerçek olarak karşımızda durmaktadır (22,23) Oksasilin bulunan hem MIC panelleri hem de disk difüzyon plakları herhangi bir direncin saptanabilmesi için çok dikkatlice incelenerek test edilmelidir (22,23). CLSI dilüsyon yada disk difüzyon testinin kullanılmasının yanında oksasilin agar screen testini ek olarak önermektedir (22). Bununla beraber oksasilin agar screen testi sadece *S. aureus* için önerilmiş olup ancak heterorezistan olan suşların okunmasında güçlükler olduğu rapor edilmiştir (22).

Bilindiği gibi mec A geni PCR ile *S. aureus* izolatlarının belirlenmesinde altın standarttır. Bununla birlikte, *mecA* geni bulunan ancak bunu eksprese etmeyen duyarlı suşların bulunabileceği unutulmamalıdır (101-103).

Çalışmamızda oksasiline dirençli izolatlar seçilmiştir. Ancak bunlardan 3 *S. aureus* izolatı, 3'ü KNS olmak üzere toplam 6 stafilokok izolatı Sefoksitin disk testinde duyarlı bulunmuştur. Tüm izolatlarda yapılan PCR'la *mecA* gen varlığı araştırılmıştır. 38 Stafilokok izolatında mec A geni varlığı bulunurken 19 Stafilokok izolatında mec A geni saptanamamıştır. Oksasilin dirençli 25 *S. aureus* izolatının 3'ü Sefoksitin disk testinde duyarlı olarak belirlenirken, 6'sında da mec A bulunamamıştır. 25 *S. aureus* izolatının 19'unda mec A geni saptanmıştır. *S. aureus* izolatlarından Sefoksitine duyarlı olan 3 izolatın sadece 1'inde mec A geni saptanırken diğer 2'sinde *mecA* geni saptanamamıştır.

Toplam 32 KNS izolatının tamamı Oksasiline dirençli iken 3 izolat Sefoksitine duyarlı olduğu ortaya konmuştur. KNS izolatlarının 19'unda mec A geninin varlığı saptanmıştır. 13 KNS izolatında ise mec A geninin olmadığı belirlenmiştir. KNS izolatlarından Sefoksitin'e duyarlı olan 3 izolatın tamamında PCR ile mec A geninin varlığı bulunmuştur. Gerek Sefoksitin disk difüzyon testi ile mec A aracılıklı direnç saptanmasında gerekse Oksasilin disk difüzyon testi ile mec A aracılıklı direnç saptanmasında kesin mec A varlığını göstermedeki yanlış sonuçların olabileceğine yönelik birçok çalışma bulunmaktadır (102,104). Bizim çalışmamızda da yine Oksasilin dirençli izolatlarda mec A geni olmayan suşlar bulunmuştur. Sefoksitin dirençli saptanan izolatlarda da mec A geni olmayan suşların bulunması ile beraber Sefoksitin'e duyarlı izolatlarda mec A genin saptanmış olması diğer çalışmalarla uyumlu bulunmuştur (102,104).

Bu araştırma sonuçlarına göre hem sefoksitin disk difüzyon testinin hem de Oksasilin disk difüzyon testinin gerek *S. aureus*'larda gerekse KNS izolatlarında mec A aracılıklı direncin saptanmasındaki alınan sonuçların kesinlik vermeyebileceği, hatalı sonuçlar olabileceği görülmüştür. PCR temelli *mecA* saptama testleri yaygındır ancak her mikrobiyoloji laboratuvarında gerekli donanım ve tecrübeli teknik eleman bulunamadığından rutin olarak yapılma olanakları oldukça azdır. Sefoksitin disk difüzyon testi Oksasilin disk difüzyon testine göre daha kolay okunabilirliği ve

okumada transmisyon ışığı ihtiyacı duyulmaması uygulanabilme kolaylığı nedeniyle tercih edilebileceği sonucuna varılmıştır.

Yukarıda gerek ülkemizde gerekse yurt dışında yapılan çalışmalarda da görüldüğü gibi MRSA ve metisilin dirençli KNS oranlarının oldukça yüksek olması bu infeksiyonların önemli bir sağlık problemi olarak devam etmesinin yanı sıra hastane içi yayılmanın anlaşılması açısından moleküler analiz oldukça önemlidir.

PFGE yöntemi, moleküler yöntemler arasında bakterilerin tiplendirmesinde yüksek tekrarlanabilirlik ve yüksek ayırım gücüne sahip olan ve bakteriyofaj tiplendirmesinin yerine altın standart olması çalışmamızda bu yöntemi seçme nedenimizi oluşturmuştur. PFGE yönteminin tiplendirebilirliği literatürde ulaşılabildiğimiz çalışmaların tümünde %100 olarak bulunmuştur (15-18).

Bizim çalışmamızda da 25 metisilin dirençli *S. aureus* ve 32 metisilin dirençli KNS izolatının tamamı tiplendirilmiştir. Bu tiplendirme sonuçları diğer çalışmalara tam olarak uymaktadır (15-18). Standart DNA izolasyon tekniği ve elektroforez parametreleri uygulandığında PFGE'nin tekrarlanabilir oluşu bir çok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (15-18). Ancak PFGE yönteminin uygulanması oldukça büyük bir emek ve tecrübe, yüksek kurulum ve çalışma maliyeti gerektirmektedir. Çalışmamızda Ekim-Kasım 2004 tarihleri arasında toplanan oksasiline dirençli olduğu saptanan 25 *S. aureus* izolatı ve oksasiline dirençli 32 KNS suşu PFGE ile yeniden tanımlanmıştır. Bunlardan PCR'la mec A varlığı 19 *S. aureus* izolatında 19 KNS izolatında saptanmıştır. Bu sonuçlara göre toplam 57 Stafifolokok izolatlarında 38'inin gerçek anlamda metisilin dirençli olduğu PCR sonuçlarına göre söylenebilir. PFGE ile MRSA'ların 17'sinin (%68) birbiri ile aynı klon olduğu (TipA) belirlenirken, diğer 8'inin (%42) de birbiri ile aynı olduğu (Tip B) ortaya konmuştur. Ancak PCR sonuçları dikkate alınarak metisilin dirençli izolatlardan 13 *S. aureus* izolatının Tip A olduğu 6 izolatın da Tip B olduğu görülmüştür. Yine PCR sonuçlarına göre metisiline duyarlı 6 *S. aureus* izolatının 4'ünün PFGE'ye göre Tip A'ya benzerlik gösterdiği ve 2'sinin ise Tip B'ye benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Bu sonuçlara göre hastanemiz YBÜ'lerinde saptanan *S. aureus* izolatlarının PCR sonuçları ile birlikte değerlendirildiğinde 2 farklı klonun olduğu ancak her iki klonun birer alt tipi olduğu kanıtlanmıştır. Klon 1 TipA içinde mec A pozitif olan izolatlar ve yine bu tip içerisinde mec A negatif izolatlar oluşturmaktadır. Klon 2 ise Tip B

mec A pozitif olan izolatlar oluşturmakta olup bunun alt tipini ise Tip B1 mec A negatif izolatlardan meydana geldiği belirlenmiştir.. DYBÜ'den izole edilen toplam 16 S. aureus izolatının 10'u Tip A bunlarında 2'sinin Tip A1 olduğu, 6 izolatın Tip B bunların ise birinin Tip B1 olduğu saptanmıştır. CYBÜ'den izole edilen toplam 7 izolatın 6'sının Tip A bunlardan birinin Tip A1 olduğu, bir tanesinin ise Tip B olduğu saptanmıştır. PYBÜ'den izole edilen 2 S. aureus izolatlarının birinin Tip A1 olduğu diğerinin ise Tip B1 olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlara göre Tip A ve onun alt tipi olan Tip A1'in hastanemiz de bulunan tüm YBÜ'lerden izole edilmiş olup en fazla izolatın DYBÜ'de görüldüğü, en az izolatın ise PYBÜ'den izole edildiği görülmektedir. Yine Tip B izolatları da en fazla DYBÜ'den izole edilmiş olup ve yine en az izolat ise PYBÜ'den izole edilmiştir. Hem Tip A'nın hem de Tip B'nin en fazla DYBÜ'den izole edilmiş olması bu YBÜ ünitesinde S. aureus izolatlarının cansız ortamlarda kolonize olmuş olabileceğini, üniteye çalışan sağlık personellerinin taşıyıcı olmuş olabileceğini düşündürmektedir. Bununla tespit edilen diğer bütün Tip'lerin hastanemiz tüm yoğun bakım ünitelerinde tespit edilmiş olması özellikle sağlık personelinin kolonize olmuş olma hipotezini desteklemektedir

.Bu sonuçlar doğrultusunda sağlık personelinin özellikle YBÜ'nde görev yapan tüm çalışanların taşıyıcı olup olmadıklarının taranması gerektiği bununla beraber cansız ortam ve bu ünitelerde kullanılan invaziv girişim aletlerinin taranmasının yararlı olacağı kanaatindeyiz.

8. KAYNAKLAR

1. Murray, BE.:New aspects of antimicrobial resistance and the resulting therapeutic dilemmas. J.Infect Dis, 163:1185-1194, 1991
2. Jacoby, GA., Archer, GL.:New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. New Engl J Med, 324:601-612, 1991
3. Mandell, GL., Bennett, JE., Dolin, R.: Principles and Practice of Infectious Diseases , 5 th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Inc; 2000 p. 2069.
4. Ermertcan, Ş., Limoncu, MH., Coşar, G.:*Staphylococcus aureus* Kökenlerinde Florokinolonlarla Karşılaşma Sonrasında Yüksek Düzey Oksasilin Direncinin Araştırılması. Enfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection), 17 (4): 437-441, 2003.
5. Sancak, B.,Güenalp, A.:Çeşitli Klinik Örneklerinden izole edilen Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus* izolatlarının Mupirosin ve Diğer Antibiyotiklere Olan Duyarlılıkları. Mikrobiyoloji Bülteni, 34:209-213, 2000.
6. Appelbaum, PC.: Microbiology of antibiotic resistance in *Staphylococcus. aureus*. Clin Infect Dis, 45 Suppl 3: S165-70, 2007.
7. Shorr, AF.: Epidemiology of staphylococcal resistance. Clin Infect Dis , 45 Suppl 3:S171-6, 2007.
8. Ustaçelebi, Ş.:Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Güneş Kitapevi,1999. 734-736
9. Namıduru, M., Karaoğlu, İ., Göksu, S., Dikensoy Ö., Karaoğlu M., Cerrahi Yoğun bakım Ünitesinde Hastane Enfeksiyon Etkeni Olan Bakteriler ve Antibiyotiklere Direnç Durumları.Turkish Journal of Infections . 17(1):39-44, 2003.
10. Nerkaju, V., Kılıç, A., Küçükarslan, A., Baysallar, M., Doğanç, L.:Bir Askeri Hastanenin Yoğun Bakım Ünitelerindeki Hastane enfeksiyonlarının Değerlendirilmesi. Gülhane Tıp dergisi,46(4):305-310, 2004 .

11. Zer, Y., Bayram, A., Balcı İ.:Yoğun Bakım Ünitesinde Yatan Hastalara Ait Trakeal Aspirasyon Örneklerinden En sık İzole Edilen Bakteriler ve Çeşitli Antibiyotiklere Direnç Durumları. *İnfeksiyon Dergisi*, 15 (3):307- 310, 2001.
12. Miragaia, M., Couto, I., Pereira,S F F., Kristinsson, KG., Westh H., Jarløv, JO., Carriço, J., Almeida, J., Santos-Sanches I and Lencastre H., Molecular Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* Clones: Evidence of Geographic Dissemination *Journal of Clinical Microbiology*. p. 430-438, Vol. 40, No.2, February 2002.
13. Durmaz, R., Dirençli bakteri Suşları Arasındaki Klonal İlişkinin Belirlenmesi. *Ankem Derg*, 21(Ek 2):178-183, 2007.
14. Telli, M., Sümerkan, B., Eşel D.: *Staphylococcus aureus*'ta Metisilin Direncinin Belirlenmesinde Sefoksitin Disk, Oksasilin Disk, Oksasilin Agar Tarama Ve Pbp2a Lateks Testlerinin Karşılaştırılması. *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection)*, 20 (2): 93-96, 2006.
15. Tenover, F.C., Arbeit, RD., Archer, G., Biddle, J., Byrne, S., Goering, R., Hancock, G., Hebert, GA., Hill, B., Hollis., R., Jarvis, WR., Kreiswirth,B., Eisner, W., Maslow, J., McDougal, LK., Miller, JM., Mulligan, M., Pfaller, MA.: Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol*,32: 407-415,1994
16. Bannerman, TL., Hancock, GA., Tenover, FC., Miller JM.: Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol*, 3:551-555, 1995.
17. Schlichting, C., Branger ,C., Fournier, JM.: Typing of *Staphylococcus aureus* by pulsed field gel electrophoresis, zymotyping, capsular typing and phage typing: resolution of clonal relationships. *J. Clin. Microbiol*, 31: 551-555, 1993.
18. Tenover, FC., Arbeit, RD., Goering, RV.: How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: A review for healthcare epidemiologists.*Infect. Cont. Hosp. Epidemiol*, 18: 426-439, 1997.

29. Weller, TMA.: Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* typing methods: which should be the international standart? J. Hosp. Infect., 44: 160-172. 2000.
30. Schwartzkopf, A., Karc, H., Schmidt, H.: Phenotypical and genotypical characterization of epidemic clumping factor negative, oxacillin resistant *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 31: 2281-2285, 1993.
31. Wagner, AR., Morris, SL., Ericsson C.: Latex agglutination-negatif methicillin resistant *Staphylococcus aureus* recoverd from neonate: epidemiologic features and comparison of typing methods. J. Clin. Microbiol, 30: 2583-2589, 1992.
32. Blanc,DS., Petignat, C., Moreillon, P., Wenger, A., Bile, J., Francioli, P.: Quantitative antibiogram as a typing method for the prospective epidemiological surveillance and control of MRSA: Comparison with molecular typing, Infect. Cont. Hosp. Epidemiol. 17: 654-659, 1996.
33. Vincent, JL., Bihari, DJ., Suter, PM., The Prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. JAMA 274:639-44, 1995.
34. Back, N.A., Linnemann, CC., Pfaller, NA.: Recurrent epidemics caused by a single strain of erithromycin resistant *Staphylococcus aureus*: the impotance of molecular epidemiology, JAMA, 270: 1329-1336, 1993.
35. Giallulya de, CJ., Loulerguea, G., Bruantb, L., Mereghettib, S., Massuarda,N. van der Meeab., Auduriera, A., Quentinb, R.:Identification of new phages to type *Staphylococcus aureus* strains and comparison with a genotypic method .,Journal of Hospital Infection. 55, 61–67 2003.
36. Haşcelik, G.: Hastane infeksiyonlarında laboratuvarın rolü, Hast. İnfekt. Der., 1: 21-30, 1997.
37. Fournier J M., Bouvet A., Boutonnier A.,Audurier A., Goldstein F.,Pierres A J., Lebrun B L., Hochkeppelx H. K., Predominance Of Capsular Polysaccharide Type 5 AmongOxacillin-Resistant *Staphylococcus. Aureus* Journal Of Clinical Microbiology, P. 1932-1933 Vol. 25, No. 10,Oct. 1987.

38. Arbeit, RD., Karakawa, WW., Vann, WF., Robbins, JB.: Predominance of two newly described capsular polysaccharide types among clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis, 2: 85-89, 1984.
39. Lee, JC., Liu, MJ., Parsonnet, J., Arbeit, R.D.: Expression of types 8 capsular polysaccharide and production of toxic shock syndrome toxin-1 among vaginal isolates of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol, 28: 2612-2620, 1990.
40. Sompolinski, D., Sarma, Z., Karakawa, WW.: Encapsulation and capsular types in isolates of *Staphylococcus aureus* from different sources and relationship to phage types. J. Clin. Microbiol, 22: 828-835, 1985.
41. Branger, C., Gouillet P.: Esterase electrophoretic polymorphism of methicillin sensitive and methicillin resistant strains of *Staphylococcus aureus*. J. Med. Microbiol, 24: 275-281, 1987.
42. Branger, C., Gouillet P.: Genetic heterogeneity in methicillin resistant strain *Staphylococcus aureus* revealed by esterase electrophoretic polymorphism, J. Hosp. Infect., 14: 125-134, 1989.
43. Durmaz R.: Moleküler epidemiyolojinin prensipleri. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji, Rıza Durmaz (Ed)., 2nci Baskı, Malatya, , 139-147, 2001.
44. Tang, YW., Waddington, MG., Smith, DH., Manahan, JM., Kohner, PC., Highsmith, LM., Li H., Cockerill, III FR., Thompson, RL., Montgomery SO., Persing DH.: Comparison of protein A gene sequencing with pulsed-field gel electrophoresis and epidemiologic data for molecular typing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol, 38: 1347-1351, 2000.
45. Trindade, PA., McCulloch, GA., Oliveira and E. M. Mamizuka., Molecular Techniques for MRSA Typing: Current Issues and Perspectives, The Brazilian Journal of Infectious Diseases. 7(1):32-43, 2003
46. Morvan, A., Aubert, S., Godard, C., El Sohl N.: Contribution typing method based on IS256 probing of *Sma*I digested cellular DNA to discrimination of

- European phage type 77 methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains, J. Clin. Microbiol, 35: 1415-1423, 1997.
47. Zuccarelli, A.J., Roy, I., Harding, GP., Couperus JJ.: Diversity and stability of restriction enzyme profiles of plasmid DNA from methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Clin. Microbiol., 28: 97-103, 1990.
 48. Goering, RV. and Duensing T.D.: Rapid field inversion gel electrophoresis in combination with an rRNA gene probe in the epidemiological evaluation of Staphylococci. J. Clin. Microbiol., 28: 426-429, 1990.
 49. Prevost, G., Pottecher B., Dahlet M.: Pulsed field gel electrophoresis as a new epidemiologic tool for monitoring methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in an intensive care unit. J. Hosp. Infect, 17: 255-259, 1991.
 50. Kreiswirth, B., Kornblum, J., Arbeit, RD., Eisner, W., Maslow, JN., McGeer A., Low DE., Novick RP.: Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Science, 259: 227-230, 1993.
 51. Sambrook, J., Fritsch, EF., Maniatis, T.: Pulsed-field gel electrophoresis, In: Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 6.50-6.59. 1989.
 52. Maslow, JN., Slutsky, AM., Arbeit, RD.: The application of pulsed field gel electrophoresis to molecular epidemiology, In: Persing D.H., Smith T.F., Tenover, FC., White, TJ. (eds): Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications. American Society of Microbiology, Washington DC, 563-583, 1993,
 53. Leonard, RB., Mayer, J., Sasser, M.: Comparison of MIDI Sherlock system and pulsed-field gel electrophoresis in characterizing strains of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* from a recent hospital outbreak. J. Clin. Microbiol, 33: 2723-2728, 1995.
 54. Hunter, P.R.: Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. J. Clin. Microbiol, 28: 1903-1905, 1990.

55. Ichiyama, S., Ohta, M., Shimokata, K.: Genomic DNA fingerprinting by pulsed field gel electrophoresis as an epidemiological marker for study of nosocomial infections caused by methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, J. Clin. Microbiol, 29: 2690-2699, 1991.
56. Prevost, G., Jaulhac, B., Piemont, Y.: DNA fingerprinting by pulsed field gel electrophoresis is more effective than ribotyping in distinguishing among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates. J. Clin. Microbiol, 30: 967-972, 1992.
57. Wei, MQ. and Grubb W.B.: Typing of Australian methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains by pulsed field gel electrophoresis, J. Med. Microbiol, 37: 187-192, 1992.
58. Tenover, FC., Arbeit, RD., Goering, RV., Mickelsen, PA., Murray, BE., Persing, DH., Swaminathan, B.: Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing, J. Clin. Microbiol., 33: 2233-2239, 1995.
59. Coia, JE., Noor, HI., Platt, DJ.: Plasmid profiles and restriction enzyme fragmentation patterns of plasmids of methicillin sensitive and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates from hospital and the community, J. Med. Microbiol., 27: 271-279, 1988.
60. Saulnier, P., Bourneix, C., Prevost, G., Andremont, A.: Random amplified polymorphic DNA assay is less discriminant than pulsed-field gel electrophoresis for typing strains of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, J. Clin. Microbiol., 31: 982-985, 1993.
61. Boyce, JM., Opal, SM., Potter-Bynoe, G., Medeiros, AA.: Spread of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in a hospital after exposure to a health care worker with chronic sinusitis, Clin. Infect. Dis, 17: 496-502, 1993.
62. Struelens, MJ., Bax, R., Deplano, A., Quint, W., van Belkum, A.: Concordant clonal delineation of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* by macrorestriction analysis and polymerase chain reaction genome fingerprinting, J. Clin. Microbiol, 31: 1964-1970, 1993.

63. Derbentli, Ş.: Stafilokoklarda ve enterokoklarda antibiyotik duyarlılık deneylerinin özellikleri, ANKEM Derg., 10: 211-219, 1996
64. Schwartzkopf, A., Karc H.: Genetic variation in *Staphylococcus aureus* coagulase genes: Potential and limits for use as epidemiological marker, J. Clin. Microbiol., 32: 2407-2412, 1994.
65. Frenay, HM., Theelen, JPG., Schouls, LM.: Discrimination of epidemic and non epidemic methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains on the basis of protein A gene polymorphism. J. Clin. Microbiol., 32: 846-847, 1994.
66. Goh, S., Byrne, S., Zhang, JL., Chow, AW.: Molecular typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of coagulase gene polymorphisms. J. Clin. Microbiol., 30: 1642-1645, 1992.
67. Kobayashi, N., Taniguchi, K., Kojima, K.: Analysis of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* by a molecular typing method based on coagulase gene polymorphisms, Epidemiol. Infect., 115: 419-426, 1995.
68. Hoefnagels-Schuermans, A., Peetermans, WE., Struelens, MJ., Van Lierde S., Van Eldere, J.: Clonal analysis and identification of epidemic strains of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* by antibiotyping and determination of protein A gene and coagulase gene polymorphisms. J. Clin. Microbiol., 35: 2514-2520, 1997.
69. Hokey, JV., Richardson, JF., Cookson, BD.: Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. J. Clin. Microbiol., 36: 1083-1089, 1998.
70. Harmanci, A., Harmanci, Ö., Akova, M. Hospital acquired pneumonia :challenges and options for diagnosis and treatment .Journal of Hospital Infection, 51:160-7 2002.
71. Lawrence, C., Cosseron, M., Mimoz, O.: Use of coagulase gene typing method for detection of carriers of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. J. Antimicrob. Chemoth, 33: 687-696, 1996.

72. van Belkum, A., Kluytmans, J., van Leeuwen W., Bax, R., Quint, W., Peters E., Fluit, A., Vandenbroucke-Grauls, C., van den Brule, A., Koeleman, H., Melchers, W., Meis, J., Elaichouni, A., Vaneechoutte, M., Moonens, F., Maes, N., Struelens, M., Tenover, FC., Verbrugh, H.: Multicentre evaluation of arbitrarily primed PCR for typing of *Staphylococcus aureus* strains, J. Clin. Microbiol, 33: 1537-1547, 1995.
73. Tambic, A., Power, EGM., Tambic, T., Snur, I., French, GL.: Epidemiological analysis of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in a Zagreb Trauma Hospital using randomly amplified polymorphic DNA typing method, Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis, 18: 335-340, 1999.
74. van der Zee, A., Verbakel, H., van Zon, J., Frenay, I., van Belkum, A., Peeters, M., Buiting, A., Bergmans, A.: Molecular genotyping of *Staphylococcus aureus* strains: Comparison of repetitive element sequence based PCR with various typing methods and isolation of a new epidemicity marker. J. Clin. Microbiol., 37: 342-349, 1999.
75. Hunter, PR. and Gaston, MA.: Numerical index of discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's Index of Diversity, J. Clin. Microbiol., 26. 2465-2466, 1988.
76. Cookson, B., Aparicio, P., Deplano, A., Struelens, M., Gering, R., Marples, R.: Inter-centre comparison of pulsed field gel electrophoresis for typing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. J. Med. Microbiol, 44: 179-184, 1996.
77. Clinical and Laboratory Standart İnstitute. Antimikrobik Duyarlılık Testleri İçin Uygulama Standartları ;On beşinci bilgi eki, Wayne , CLSI, M100-S15 2005.
78. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Seventeenth informational supplement. M100-S17. Wayne, PA: CLSI; 2007
79. Ünal, S., Hoskins, J., Flokowitsch, j., Ernie WCY., Preston DA., Skatrudl PL., Detection of Methicillin-Resistant Staphylococci by Using the Polymerase

Chain Reaction. Journal of Clinical Microbiology, P. 1685-1691 Vol. 30, No. 7, July 1992

80. Schoechtman, G., Qu, CY., and Jones, WK., Polymerase chain reaction. J. Infect. Dis. 158:1154-1157. 1988
81. Uzun, K., Teke, T., Yavuz, Z., Göğüs Hastalıkları yoğun bakım ünitesinde izole edilen patojen mikroorganizmalar arasında antibiyotik direnç ve duyarlılık oranları. Tıp Araştırmaları Dergisi 4(3):8-13, 2006.
82. Struelens MJ. The epidemiology of antimicrobial resistance in hospital acquired infections: Problems and possible solutions. Br. Med J 317 : 652-4 1998.
83. Archibald, L., Phillips, L., Monnet, D., McGowan, JE., Tenover, F., Gaynes, R., Antimicrobial resistance in isolates from inpatients in the United States: increasing importance of the Intensive Care Unit. Clin Infect Dis, 24:211-5, 1997
84. Akalın, H., Yoğun Bakım Ünitesi Enfeksiyonları :Risk Faktörleri ve Epidemiyolojisi ,Hastane Enfeksiyon Dergisi, 5:5-16, 2001.
85. Hanberger, H., Diekema, D., Fluit, A., Surveillance of antibiotic resistance in European ICUs. Journal of Hospital Infection 48: 161-76 2001.
86. Eggimann, P., Pittet, D., Infection Control in the ICU. Chest, 120 (6):2059-2093, 2001
87. Köseoğlu, O., Kocagoz, S., Gur ,D., Nosocomial bloodstream infections in a Turkish University Hospital :Study of gram negative bacilli and their sensitivity patterns .Int J Antimicrob Agents 17:477-81 2001.
88. Jones, RN., Resistance patterns among nosocomial pathogens. Trends over the past few years. Chest 119:397-404 2001.
89. Livermore, DM., Yuan, M., Antibiotic resistance and production of extended-spectrum B-lactamases among Klebsiella spp. From intensive care units in Europe .J Antimicrob Chemother, 38:409-24 1996.

90. Hanberger, H., Erlandsson, M., Burman, LG., High antibiotic susceptibility among bacterial pathogens in Swedish ICUs. *Scand J Infect Dis* 36:24-30 2004.
91. Edmond, MB., Wallance, SE., McClish, DK., Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals : a three-year analysis. *Clin Infect Dis.* 29:239-44 1999
92. Fridkin, SK., Steward, CD., Edwards, JR., Surveillance of antimicrobial use and antimicrobial resistance in United States Hospitals : Project ICARE Phase 2. *Clin Infect Dis.* 29:245-52 1999
93. Diekema, DJ., Pfaller, MA., Schmitz, FJ., 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 for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis.* 32:S114-S132 2001
94. Rubin, RJ., Harrington, CA, Poon A., The Economic impact of *Staphylococcus aureus* infection in New York City hospitals. *Emerg infect Dis.* 5:9-17 1995.
95. Voss, A., Milatovic, D., Wallrauch –Schwarz, C., Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 13:50-5, 1994.
96. Köksal, F., Yaşar, H., Samastı, M., Antibiotic resistance patterns of coagulase-negative staphylococcus strains isolated from blood cultures of septicemic patients in Turkey. *microbiol Res* 2006;(2007), doi:10.1016/j.micres.2007.03.004
97. Chambers, HF: Methicillin-resistant *Staphylococci*. *Clin Microbiol Rev* 1988;1:173-186.
98. Hackbarth, CJ., Miick, C and Chambers, HF.: Altered production of penicillin-binding protein 2a can affect phenotypic expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 38:2568-2571, 1994
99. Brown, DF., Edwards, DI., Hawkey, PM., Morrison, D., Ridgway, GL., Towner, KJ, Wren, MW.; Joint Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy; Hospital Infection Society; Infection Control Nurses Association:

Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). J Antimicrob Chemother 56:1000-18, 2005.

100. McDougal, LK and Thornsberry ,C.: The role of betalactamase in staphylococcal resistance to penicillinase resistant penicillins and cephalosporins. J Clin Microbiol, 23:832-839 1986.
101. Pottumarthy, S., Fritsche, TR., Jones, RN.: Evaluation of alternative disk diffusion methods for detecting mecA-mediated oxacillin resistance in an international collection of staphylococci: validation report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Diagn Microbiol Infect Dis 51:57-62 2005.
102. Velasco D, del Mar Tomas M, Cartelle M, Beceiro A, Perez A, Molina F, Moure R, Villanueva R, Bou G. Evaluation of different methods for detecting methicillin (oxacillin) resistance in *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother, 55:379-82 2005.
103. Bignardi, GE., Woodford, N., Chapman, A., Johnson, AP, Speller, DC.: Detection of the mec-A gene and phenotypic detection of resistance in *Staphylococcus aureus* isolates with borderline or low-level methicillin resistance. J Antimicrob Chemother, 37:53-63 1996.
104. Skov, R., Smyth, R., Clausen, M., Larsen, AR., Frimodt-Miller N, Olsson-Liljequist, B., Kahlmeter, G.: Evaluation of a cefoxitin 30 microg disc on Iso-Sensitest agar for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother, 52:204-7 2003.

ÖZGEÇMİŞ

1974 yılında Gaziantep'in Nizip ilçesinde doğdu. İlk ve orta öğreniminden sonra girmiş olduğu Fırat Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü 1995 yılında bitirdi.1996 -2000 yılları arasında Ordu ve Gaziantep'te olmak üzere 4 yıl öğretmen olarak görev yaptı. Öğretmenlik görevini yaparken 1998 yılında Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Yüksek Lisans programına giriş sınavını kazanarak eğitime başladı. 2000 yılında Yüksek Lisans öğrenimini tamamladı.Gaziantep Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ABD'nda Araştırma görevlisi olarak göreve başladı.2002-2003 Eğitim yılında Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji ABD'nda Doktora eğitimine başladı.2007-2008 Eğitim yılı I.dönem sonunda doktora eğitimini tamamladı.

Halen Gaziantep Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ABD'nda Araştırma görevlisi olarak çalışmalarına devam etmektedir.