



T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM/BİLİM DALI

**METİSİLİN DİRENÇLİ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
SUŞLARININ *SPA TYPİNG* VE *PULSED FIELD GEL
ELECTROPHORESİS* YÖNTEMLERİYLE KLONAL
İLİŞKİLERİNİN TESPİTİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Yıldız KALAYCI**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Akgün YAMAN**

ADANA-2015



T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM/BİLİM DALI

**METİSİLİN DİRENÇLİ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
SUŞLARININ *SPA TYPİNG* VE *PULSED FIELD GEL
ELECTROPHORESİS* YÖNTEMLERİYLE KLONAL
İLİŞKİLERİNİN TESPİTİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Yıldız KALAYCI**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Akgün YAMAN**

**Bu çalışma TF2012LTP40 nolu proje olarak Çukurova Üniversitesi Bilimsel
Araştırma Projeleri tarafından desteklenmiştir.**

ADANA-2015

TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanmasında benden yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerini paylaşan tez danışmanım sayın Prof. Dr. Akgün Yaman'a;

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında asistanlık eğitimim süresince yetişmemde büyük emekleri ve katkıları olan, engin bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım değerli hocalarım, Prof. Dr. Fatih Köksal, Prof. Dr. Fügen Yarkın ve Prof. Dr. Macit İlkit'e;

Asistanlığım süresince her zaman yardımlarını gördüğüm bölüm sekreterimiz Suna Gökmen'e;

Eğitim sürem boyunca pek çok şey paylaştığım değerli çalışma arkadaşlarım ve yakın dostlarım Yrd. Doç. Dr. Tülin Güven Gökmen'e, Uzman doktor Gökçe Benk'e, Uzman Öğr. Grv. Begüm Kayar'a, Arş. Grv. Melda Meral'e, Arş. Grv. Taylan Bozak'a, doktora öğrencisi Suna Kızılyıldırım'a;

Hayatım boyunca desteklerini hep yanımda hissettiğim anneme, sevgili eşim Hakan Kalaycı'ya ve biricik oğlum Mehmet Çınar'a sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Yıldız KALAYCI

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
TABLO LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ	vii
KISALTMA LİSTESİ	viii
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. Sınıflandırma	5
2.3. Mikroskopik Görünüm ve Boyanma	5
2.4. Kültür ve Üreme Özellikleri	5
2.5. Hücre Yapısı ve Virulans Faktörleri	6
2.5.1. Kapsül	6
2.5.2. Hücre Duvarı	7
2.5.2.1. Peptidoglikan Tabaka	7
2.5.2.2. Teikoik Asit	8
2.5.2.3. Protein A ve Diğer Yüzey Proteinleri	8
2.5.3. Enzimler	11
2.5.3.1. Katalaz	11
2.5.3.2. Koagülaz	12
2.5.3.3. Diğer Enzimler	12
2.5.4. Toksinler	13
2.5.4.1. Sitolitik Toksinler	13
2.5.4.1.1. Hemolizinler	13
2.5.4.1.2. <i>Panton-Valentine</i> Lökositidin (PVL)	13
2.5.4.2. Enteretoksinler	14

2.5.4.3. Eksfoltatif toksinler	14
2.5.5. Genom	15
2.6. Stafilocokların Neden Olduğu Hastalıklar	16
2.6.1. Staph. aureus’a Bağlı Enfeksiyonlar	16
2.6.1.1. Deri ve Yumuşak Doku Enfeksiyonları	16
2.6.1.2. Derin Doku ve Sistemik Enfeksiyonlar	18
2.6.1.2.1. Bakteriyemi	18
2.6.1.2.2. Endokardit	18
2.6.1.2.3. Perikardit	18
2.6.1.2.4. Menenjit	19
2.6.1.2.5. Pnömoni	19
2.6.1.2.6. Plevral Ampiyem	19
2.6.1.2.7. Kemik ve Eklem Enfeksiyonları	19
2.6.1.3. Toksine Bağlı Hastalıklar	20
2.6.1.3.1. Stafilocokal Haşlanmış Deri Sendromu	20
2.6.1.3.2. Toksik Şok Sendromu	20
2.6.1.3.3. Besin Zehirlenmesi	21
2.6.2. KNS’ların Neden Olduğu Hastalıklar	21
2.7. İmmunopatogenez ve İmmün Sistemden Kaçış	22
2.8. Tanı	27
2.8.1. Boyama	27
2.8.2. Kültür	27
2.8.3. Katalaz	28
2.8.4. Lizostafin	28
2.8.5. Furozolidon	28
2.8.6. Koagülaz	28
2.8.7. DNase	29
2.8.8. Termostabil Nükleaz (Termonükleaz)	29
2.8.9. Novobiosin Direnci	30
2.8.10. Ticari Biyokimyasal ve Nükleik Asit Test Yöntemleri	30
2.9. Duyarlılık Testleri	30
2.10. Moleküler Tiplendirme Testleri	31

2.10.1. Pulsed Field Jel Elektroforezi	32
2.10.2. Multilokus Dizi Tiplendirme	33
2.10.3. <i>spa</i> Dizi Tiplendirme	35
2.10.4. <i>SCCmec</i> Tiplendirme	37
2.11. MRSA Epidemiyolojisi	40
2.11.1. MRSA ile Kolonizasyon	40
2.11.2. MRSA Enfeksiyonlarının Moleküler Epidemiyolojik Sürveyansı	41
2.11.2.1. HK-MRSA Enfeksiyonları	43
2.11.2.2. TK-MRSA Enfeksiyonları	46
2.12. Tedavide Kullanılan Antibiyotikler ve Direnç Mekanizmaları	48
2.12.1. β -Laktamlar	48
2.12.1.1. Yeni Bir Penisilin Bağlayıcı Protein (PBP2a) Sentezi	48
2.12.1.2. Aşırı Miktarda β -laktamaz Salgılanması	50
2.12.1.3. PBP'lerdeki Yapısal Değişiklikler	51
2.12.2. Aminoglikozitler	51
2.12.3. Kloramfenikol Direnci	52
2.12.4. Makrolid, Linkozamid ve Streptogramin B (MLSB)	52
2.12.5. Tetrasiklin	53
2.12.6. Kinolonlar	53
2.12.7. Trimetoprim-Sülfametoksazol	53
2.12.8. Fusidik Asit	54
2.12.9. Mupirosin	54
2.12.10. Rifampin	54
2.12.11. Glikopeptidler	55
2.12.12. Oksazolidinon	56
2.12.13. Daptomisin	56
3. GEREÇ VE YÖNTEM	58
3.1. Örnek Toplanması	58
3.2. Klinik Örneklerden İzolasyon	58
3.2.1. Katalaz Testi	58
3.2.2. Plazma Koagülaz Testi	58
3.2.3. Vitek 2 Otomatize Sistem:	59

3.2.4. Kullanılan Besiyerleri	59
3.2.4.1. Koyun Kanlı Agar	59
3.2.4.2. Endo Agar	60
3.2.4.3. Mannitollü Tuzlu Agar (Chapman)	60
3.3. Moleküler Yöntemler	61
3.3.1. PFGE	61
3.3.1.1. PFGE’de Kullanılan Solüsyonlar ve Kimyasal Madeler	61
3.3.1.2. PFGE Yönteminin Uygulanması	62
3.3.1.2.1. İzolatların Hazırlanması	62
3.3.1.2.2. İzolatların Agaroza Gömülmesi	62
3.3.1.2.3. Agaroza İçindeki Hücrelerin Parçalanması	63
3.3.1.2.4. Hücre Lizizinden Sonra Agaroza Kalıplarının Yıkanması	63
3.3.1.2.5. Agaroza Kalıpları İçindeki DNA’nın Enzimle Kesilmesi	63
3.3.1.2.6. Elektroforez Jelinin Hazırlanması ve Kalıpların Jele Yüklenmesi	64
3.3.1.2.7. Elektroforez	64
3.3.1.2.8. Sonucun Gözlenmesi ve Analiz	64
3.3.2. <i>spa</i> Dizi Analiz Yöntemi	66
3.3.2.1. İzolatların Hazırlanması ve DNA Ekstraksiyonu	66
3.3.2.2. PCR Yönteminin Uygulanması	66
3.3.2.3. Agaroza Jel Elektrofozi	67
3.3.2.4. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması	67
3.3.2.5. Dizi Analizi Çalışmaları	68
3.3.2.6. Dizi Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve <i>spa</i> Tiplerinin Tespiti	70
4. BULGULAR	72
5. TARTIŞMA	90
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	98
KAYNAKLAR	100
ÖZGEÇMİŞ	117

TABLO LİSTESİ

<u>Tablo No</u>		<u>Sayfa No</u>
Tablo 1.	<i>Staph. aureus</i> hücre yüzey proteinleri, fonksiyonları ve rolleri.	11
Tablo 2.	<i>Staph. aureus</i> 'da tespit edilen mobil genetik elementler.	16
Tablo 3.	Metisilin dirençli <i>Staph.aureus</i> tiplendirmesinde kullanılan moleküler yöntemlerin karşılaştırılması.	32
Tablo 4.	<i>ccr</i> gen kompleksi tipleri ve ilişkili olduğu <i>SCCmec</i> tipleri.	38
Tablo 5.	<i>mec</i> gen kompleksi sınıfları ve ilişkili olduğu <i>SCCmec</i> tipleri.	39
Tablo 6.	<i>SCCmec</i> tipleri ve içerdiği genler.	40
Tablo 7.	HK-MRSA klonların genotip özellikleri ve coğrafi dağılımı.	45
Tablo 8.	TK-MRSA klonlarının genotipik özellikleri ve coğrafik dağılımı.	47
Tablo 9.	Suşların kliniklere ve polikliniklere göre dağılımı.	72
Tablo 10.	Çalışmaya dahil edilen suşların izole edildiği hastaların yaş ve cinsiyet gruplarına göre dağılımı.	73
Tablo 11.	Çalışmaya dahil edilen suşların izole edildikleri örneklerle göre dağılımı.	73
Tablo 12.	Test suşlarının Vitek 2 otomatize sistemi sonuçlarına göre antibiyotik direnç profilleri.	74
Tablo 13.	Test izolatlarının <i>spa</i> tip dağılımları.	78
Tablo 14.	<i>Staph.aureus</i> suşlarının PFGE ve <i>spa</i> tiplendirmeye göre kıyaslanması.	82
Tablo 15.	İzole edilen materyallere göre <i>spa</i> tipi dağılımı.	84
Tablo 16.	<i>spa</i> tiplerinin poliklinik ve kliniklere dağılımı.	85
Tablo 17.	<i>spa</i> tiplerinin antibiyotip dağılımı.	86
Tablo 18.	Test suşlarının özellikleri ve sürveyans yöntemleri ile korelasyonları.	87
Tablo 19.	Hastane enfeksiyonu etkeni olan suşların özellikleri.	89

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil No</u>		<u>Sayfa No</u>
Şekil 1.	Peptidoglikan tabakanın şematik yapısı.	8
Şekil 2.	Protein A'nın yapısı.	10
Şekil 3.	Staph. aureus'a karşı oluşan erken immün yanıt.	24
Şekil 4.	<i>spa</i> gen şeması.	36
Şekil 5.	ECDC verilerine göre 2012 yılı katılımcı ülkelerin MRSA oranları.	42
Şekil 6.	HK-MRSA'nın dünya çapında prevalansı.	44
Şekil 7.	PFGE tekniğini aşamaları.	65
Şekil 8.	StaphType yazılımında <i>spa</i> tiplerinin tespiti.	70
Şekil 9.	BURP (Based Upon Repeat Patterns) algoritması ile <i>spa</i> CC (clonal complex)'lerin tespiti.	71
Şekil 10.	Agaroz jelde <i>Staph.aureus</i> suşlarının <i>Sma</i> -PFGE ile elde edilen DNA bant paternleri.	75
Şekil 11.	Suşların <i>Sma</i> -PFGE kümelerine ve kaynağa göre dağılımları.	76
Şekil 12.	<i>Sma</i> -PFGE ve <i>spa</i> tiplerinin korelasyonu.	80
Şekil 13.	<i>spa</i> klonal komplekslerinin dağılımı (BURP grafikleri).	83

KISALTMALAR

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
BURP	: <i>Based upon repeat pattern</i>
CC	: Clonal Complex
CDC	: <i>Centers for Disease Control</i>
CF	: <i>Clumping Factor</i>
CRF	: <i>Coagulase-Reacting Factor</i>
ÇİD-MRSA	: Çoklu ilaç dirençli MRSA
Eburst	: Based Upon Related Sequence Types
HE	: Hastane enfeksiyonu
HK-MRSA	: Hastane kökenli MRSA
KNS	: Koagülaz Negatif Stafilokoklar
MGE	: Mobil genetik elementler
MHC-2	: <i>Major Histocompatibility Complex 2</i>
MLSB	: Makrolid, Linkozamid ve Streptogramin B
MLST	: Multilocus sequence typing
MRSA	: Methicillin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
MSCRAMMs	: <i>Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules</i>
MSSA	: Methicillin Sensitive <i>Staphylococcus aureus</i>
NAGA	: N-Asetil Glikozamin
NAMA	: N-Asetil Muramik asit
NK	: <i>Natural Killer</i>
PAMPs	: <i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>
PBP2a	: Penisilin Bağlayan Protein 2a
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PFGE	: Pulsed-field jel elektroforez
PI	: Patojenite adası
PRR	: <i>Pattern Recognition Receptors</i>
PVL	: <i>Panton-Valentine Leukocidin</i>
SCCmec	: <i>Staphylococcal Cassette Chromosome mec</i>

SpA	: Stafilokokal protein A
ST	: Sekans tipi
<i>Staph. aureus</i>	: <i>Staphylococcus aureus</i>
TK-MRSA	: Toplum kaynaklı MRSA
TŞST	: Toksik Şok Sendromu Toksini
UHESA	: Ulusal Hastane Enfeksiyonları Sürveyans Ağı
VISA	: <i>Vancomycin intermediate Staph. Aureus</i>
VRSA	: <i>Vancomycin-resistant Staph.aureus</i>

ÖZET

Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus* Suşlarının *spa* Typing ve Pulsed Field Gel Electrophoresis Yöntemleriyle Klonal İlişkilerinin Tespiti

Amaç: İlk olarak İngiltere’de ortaya çıkan Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus* enfeksiyonu başta diğer Avrupa ülkeleri olmak üzere bütün dünyada hızla yayılmıştır. Hem toplumda hem de hastanelerde görülen Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus* nedenli enfeksiyonların risk yönetiminde, etkenin kaynağının ve bulaş yollarının moleküler yöntemlerle hızlı tespiti enfeksiyon kontrolünde anahtar veriler sağlamaktadır. Çalışmamızda hastanemizde izole edilen Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarının klonal ilişkileri Pulsed Field Gel Electrophoresis ve *spa* tiplendirme yöntemi ile tespit edilerek, hastanemizde ve bölgemizde baskın olan klonların isimlendirilmesi ve yöntemlerin kıyaslanması amaçlanmaktadır.

Gereç ve yöntem: Hastanemizde rutin olarak kullanılmakta olan Vitek 2 sistemi ile tanımlanan 75 Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus* izolatu SmaI enzimi kullanılarak Pulsed Field Gel Electrophoresis ile tiplendirildi. *spa* gen bölgeleri amplifiye edilerek sekans analizi yapıldı. Elde edilen veriler StaphType (Ridom) yazılım programıyla değerlendirildi ve *spa* tipleri tespit edildi.

Bulgular: İncelenen 75 örneğin Pulsed Field Gel Electrophoresis ile 11 küme içerisinde toplandıkları ve birbirlerine % 84,1 oranında benzeyen A (n:19) ve B (n:27) kümelerinin tüm suşların % 61,3’ünü oluşturduğu tespit edildi. Tüm isolatlar *spa* tiplendirme ile de değerlendirildiğinde suşların 18 *spa* tipine dağıldığı tespit edildi. En büyük *spa* kümesi 31 izolat (% 41,3) ile t030 iken, bunu 9 izolat ile t223 (% 12) tipinin izlediği görüldü.

Sonuçlar: İzolatların genotipik incelemeleri, antibiyotik direnç profilleri ve hastane enfeksiyonu olarak tanımlanan olgulardan izole edilme oranları değerlendirilerek t030’un % 41,3’lük insidans ile dominant genotip olduğu ve bu gen kümesinin hastane klonu olduğu düşünülmüştür. Toplum kökenli olduğu düşünülen *spa* tiplerinin ise t223 ve t127 oldukları ve sırasıyla % 12 ve % 9,3 oranlarında görüldükleri tespit edildi. Kısa dönemli salgın incelemelerinde ve uzun dönemli soy ilişkisi araştırmalarında *spa* tiplendirme yönteminin Pulsed Field Gel Electrophoresis ile birlikte kullanılmasının ve bu çalışmanın daha uzun süre ve daha fazla örnek kullanılarak toplum ve hastane klonlarının takibinde kullanılmasının faydalı olacağı düşünülmüştür.

Anahtar Kelime: *spa* tiplendirme, PFGE, MRSA, Protein A, Epidemiyoloji

ABSTRACT

Detection of Clonal relationship of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Strains with *spa* Typing and Pulsed Field Gel Electrophoresis Methods

Aim: Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* infection, first emerged in England, has spread rapidly throughout the world including other European countries primarily. Rapid detection of agent sources and transmission routes by molecular methods, provide a key data about the infection control for active risk management of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*-induced infections in both community and also hospitals. This study aims to refer the dominant clones of our region and compare methods by determining clonal relationship of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* strains, that have been isolated from our hospital, using Pulsed Field Gel Electrophoresis and *spa* typing methods.

Material and Methods: Seventy five Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* isolates identified by Vitek 2 system, which has been routinely used in our hospital, were typed by Pulsed Field Gel Electrophoresis using *Sma*I enzyme. Sequence analysis was performed after amplification of *spa* gene regions. Obtained data was evaluated by StaphType (Ridom) software and *spa* types were identified.

Results: It is found that 75 samples analyzed by Pulsed Field Gel Electrophoresis, were gathered in 11 clusters and also A (n = 19) and B (n = 27) clusters which were similar to each other in the ratio of 84,1% were constituted the 61,3% of all strains. It is detected that all isolates were also distributed in 18 *spa* types when evaluated by *spa* typing. It is observed that the largest *spa* cluster was t030 with 31 isolates (41.3%) and it was followed by t223 type with 9 isolates (12%).

Conclusions: By evaluation of the genotypic investigations of the isolates, antibiotic resistance profiles and isolation rate from cases defined as hospital infection, it is considered that t030 was dominant genotype with the incidence rate of 41,3 % and this gene cluster generated the hospital clones. t223 and t127 were considered to be community-associated *spa* types and they were determined in ratio of 12 % and 9,3% respectively. It is thought to be beneficial using *spa* typing methods with Pulsed Field Gel Electrophoresis in short-term epidemic studies, in the research of long-term clonal relations and also using this study with more examples and for longer time to monitor community and hospital associated clones.

Keywords: *spa* typing, PFGE, MRSA, Protein A, Epidemiology

1. GİRİŞ

İnsanlarda deri ve müköz membranlarda kommensal flora bakterisi olarak görülen *Staph. aureus* steril alanlara translokasyon sonucu deri ve yumuşak doku enfeksiyonları ile yüksek mortalite ile seyreden piyojenik karakterli pnömoni, bakteriyemi, endokardit ve osteomyelit gibi ciddi enfeksiyonlara yol açar¹. Konak-mikroorganizma ilişkisini düzenleyen hücre duvarında eksprese edilen ve/veya üreme ortamına sekrete edilen çok sayıda enzim ve toksine sahip olan *Staph. aureus* suşlarını toplum sağlığı açısından özellikle hastane hizmetlerine bağlı olarak gelişen enfeksiyonlarda (HE) major tehdit haline getiren özellik, bu mikroorganizmalarda başta penisilinler olmak üzere sefalosporinler, karbapenemler gibi beta-laktam (β -laktam) grubu antibiyotiklere, aminoglikozidler ve kinolonlar gibi klinikte ciddi enfeksiyonlarda sık olarak kullanılan antibiyotik gruplarına kısa sürede direnç geliştirebilme yeteneğidir. β -laktam grubu antibiyotiklere direncin kriteri olan metisiline karşı bu antibiyotikğin tanımlandığı 1959 yılından 2 yıl sonra İngiltere’de klinik izolatların % 1’inde görülen direnç, günümüzde bir çok hastanede % 50’lerin, yoğun bakım ünitelerinden (YBU) izole edilen suşlar arasında ise % 90’ların üzerine çıkmıştır²⁻⁴. Günümüzde bu tehditi trajedi haline getiren gelişme hastanelerde ciddi tedavi yetersizlikleri ve ekonomik kayıplara sebep olan *Methicillin Resistant Staph. aureus* (MRSA) klonlarının topluma yayılması ve toplum kökenli MRSA enfeksiyonlarının insidansındaki artıştır.^{3,5-7}.

MRSA suşlarında metisilin direnci, *Penicillin Binding Protein 2a* (PBP2a)’yı kodlayan *mecA* geni ile kazanılır. *mecA* geni *Staphylococcal Chromosomal Cassette mec* (SCCmec) olarak tanımlanan bir mobil genetik element ile taşınır. Bilinen 11 SCCmec kasetinden en küçüğünün kolay transfer edilebilmesi sebebi ile baskın suşlarda görüldüğü, bu sebeple bu kaseti taşıyan suşlarda bir klonal genişlemenin olabileceği düşünülmektedir. Hastane (HK-MRSA) ve toplum kökenli MRSA (TK-MRSA) suşlarının kontrol altına alınması mikroorganizmanın epidemiyolojik özelliklerinin tespiti ile mümkündür. Bu bağlamda genotipik sürveyans, kaynak tespiti açısından da önemlidir^{8,9}. Bu amaca yönelik olarak yapılan ilk epidemiyolojik izlem çalışmalarında faj tipleri ve antibiyotik duyarlılık kalıpları gibi fenotipik özellikler baz alınmıştır. Günümüzde gende spesifik bölgelerin in-vitro şartlarda çoğaltılmasına imkan veren tekniklerin gelişmesi ile tek nokta mutasyonlarının bile kolaylıkla gösterildiği yüksek

ayırım gücüne sahip gen düzeyinde izlem mümkün hale gelmiştir. Bu teknikler arasında SmaI makro-restriksiyon *Pulse Field Gel Electrophoresis* (PFGE) analizi yüksek ayırım gücü sebebi ile özellikle lokal kısa dönemli epidemiyolojik analizlerde altın standart yöntem olarak kabul edilmiş, PFGE protokolünün ve makrorestriksiyon paternlerinin yorumlanmasının standardize edilmesi için çok sayıda çalışma yapılmıştır. Ancak sonuçların yorumlanmasında laboratuvarlar arasında tekrarlanabilirliğin ve genel bir isimlendirmenin zor olduğu bildirilmiştir. Ayrıca PFGE yönteminin zaman alıcı olması ve pahalı ekipman gerektirmesinin de diğer dezavantajları olduğu belirtilmiştir^{10,11}.

Son yıllarda *Multilocus Sequence Typing* (MLST), *spa* tiplendirme gibi sekans bazlı yöntemlerin *Staph. aureus* tiplendirmesinde kullanılması ile tekrarlanabilirlikte, kullanım kolaylığında ve sonuçların kıyaslanabilirliğinde önemli bir gelişme elde edilmiştir^{12,13,14}. Ayrıca MLST tipleri için eBURST (*Based Upon Related Sequence Types*) analiz, *spa* tipleri için BURP (*Based Upon Repeat Pattern*) analiz diye adlandırılan ve ilişkili sekans tiplerini gruplayan yazılım algoritmalarının da uygulanmasıyla izolatların soy ilişkilerinin tespiti de mümkün hale gelmiştir¹⁵.

Daha önce yapılan çalışmalarda *spa* tiplendirme ile elde edilen sonuçlarla MLST ve PFGE ile elde edilen sonuçlar arasında yüksek korelasyon bulunmaktadır^{17,18,19,20,21}. Ayrıca *spa* tiplerinin BURP analizinden elde edilen gruplar ile MLST-eBURST analizi ve SmaI makrorestriksiyon paterni küme analizinden elde edilen sonuçlar da genellikle uyumlu bulunmaktadır^{15,16,22,23}.

Bu çalışmada Ç.Ü. Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi'ne başvuran hastalardan izole edilen MRSA suşlarının klonal ilişkileri PFGE ve *spa* tiplendirme yöntemi ile tespit edilerek hastanemizde ve bölgemizde baskın olan klonların isimlendirilmesi ve *spa* tiplendirme yönteminin altın standart yöntem olan PFGE ile kıyaslanması amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

Stafilokoklar dış çevre şartlarına, kuruluğa, yüksek tuz konsantrasyonlarına dayanıklı olan ve doğada yaygın olarak görülen mikroorganizmalardır. Genellikle insan ve hayvanların deri ve mukozalarında normal flora elemanı olarak bulunurlar. İnsanda nazofarinkste, deri, giysiler, vajina, rektum, perine ve burunda yaygın kolonizasyon gösterirler. Özellikle *Staph. aureus*, genel toplumun % 33'ünün, burun mukozasında kolonize halde bulunmaktadır. Enfeksiyon etkeni olarak da en sık izole edilen mikroorganizmalardan birini oluşturur. İnsandan insana hava yoluyla ve direk temas ile bulaşabilirler. İnsanda en virülen türler *Staph. aureus* ve *Staph. lugdunensis*'dir. *Staph. epidermidis* ve *Staph. saprophyticus* yabancı cisim enfeksiyonlarında önemli etken olmalarına rağmen *Staph. aureus* kadar yıkıcı enfeksiyonlara sebep olmazlar²⁴.

2.1. Tarihçe

Stafilokoklar, ilk kez impetigolu hastaların sürüntü örneklerinde 1878'de Robert Koch tarafından tanımlanmıştır. Kısa bir süre sonra stafilokoklar in-vitro şartlarda Pasteur L. (1880) tarafından sıvı besiyerinde üretilmiştir. İskoçyalı genel cerrahi uzmanı olan Alexander Ogston (1881), post-op cerrahi alan enfeksiyonlarından aldığı sürüntü örneklerini patates üzerine inoküle etmek sureti ile beyaz ve sarı renkte koloniler oluşturan stafilokokları görmüş ve izolatları fare ve kobaylara inoküle ederek Koch postülatını gerçekleştirmiş, yani *Staph. pyogenes albus* olarak adlandırdığı etkenin pü oluşumundan sorumlu bir patojen olduğunu göstermiş, çalışmalarını bir kitapta toplayarak yayınlamıştır. Daha sonra üçlü isim tanımlamasının kaldırılması ile Rosenbach (1884)'ın kültürde üreyen beyaz renkli kolonileri *Staph. albus*, altın sarısı pigment oluşturan kolonileri ise *Staph. aureus* olarak isimlendirilmesi teklifi literatüre yerleşmiştir. Günümüzde ise bilinen en az 33 türü bulunmaktadır. Ancak enfeksiyon etkeni olarak çoğunlukla *Staph. aureus* izole edilmiş olduğundan çalışmalar daha çok bu bakteri üzerinde yoğunlaşmış ve bunun dışında kalan stafilokok alt grupları genel bir isimlendirme ile Koagülaz Negatif Stafilokoklar (KNS) olarak adlandırılmışlardır^{25,26}.

Penisilinin 1940'lı yıllarda kemoterapotik ajan olarak tıbbın kullanımına girmesi ile stafilokok enfeksiyonlarına karşı tedavide büyük beklentiler oluşmuş ve mortalite oranlarında büyük düşüşler yaşanmıştır. Ancak 1944 yılında klinik materyallerden izole

edilen stafilocok suşlarında plazmid kaynaklı bir penisilinazın üretilmesiyle gelişen penisilin direnci tespit edilmiş, 1950'lerin sonlarında dirençli izolat oranları % 50'nin üzerine çıkmıştır. Avrupa'dan başlayarak Amerika ve tüm dünyada gittikçe artan sıklıkla izole edilmeye başlanan penisilin dirençli stafilocok oranı 1966-1967 yıllarında % 80'e kadar ulaşmıştır²⁷. Stafilocokal β -laktamaz enzimine dirençli olup ilk klinik kullanıma giren (1959) penisilin olan 2,6-dimetoksifenilpenisilin (metisilin), penisiline dirençli suşların tedavisin de yeni umut olmuş, ancak bu beklenti kısa süre sonra (1961) klinik örneklerden izole edilen suşlarda metisilin direncinin tespiti ve bu ilacın interstisyel nefrite yol açması sebebi ile hayal kırıklığına dönüşmüştür. Metisilin günümüzde sadece laboratuvarlarda anti-stafilocokal penisilinlere veya daha geniş anlamda β -laktam grubu ilaçlara karşı direncin tespitinde temel kriter olarak kullanılmaktadır. Hastanelerde 1980'lerde sporadik olarak izole edilen MRSA 1982 yılından itibaren epidemik suşa dönüşmüştür^{28,29}. HK-MRSA suşlarının β -laktam grubu antibiyotiklerin yanı sıra kinolonlar, klindamisin, makrolidler, kloramfenikol, tetrasiklinler, aminoglikozidler, trimetoprim-sulfametoksazol ve rifampisin gibi antibiyotiklere karşı da direnç geliştirerek çoklu ilaç dirençli (ÇİD-MRSA) suşlar haline gelmeleri epidemilerin ve tehditin boyutlarını artırmıştır. MRSA suşlarının hastane dışında kazanılan enfeksiyonlarda görülmemesi sevindirici bulunurken, 1990'lı yılların sonlarına doğru toplum kökenli enfeksiyonlardan *Panton-Valentine Leukocidin* (PVL) üreten TK-MRSA suşları izole edilmeye başlanmıştır. Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) 1999 yılında dört çocuğun TK-MRSA suşlarının etken olarak izole edildiği enfeksiyonlar sebebi ile ölümü tehditin önemsenmesini sağlamıştır. Bu suşlar daha sonra sağlık kurumlarındaki hastalardan da izole edilmeye başlanmıştır. İlk yıllarda TK-MRSA klonları ile HK-MRSA klonları sahip oldukları metisilin direncini kodlayan mobil element *SCCmec* farklılıklarına göre ayırt ediliyorlardı. Ancak son yıllarda MRSA suşları arasında dirence sebep olan 11'den fazla mutant *SCCmec* kaseti olduğu ancak bir çok ülkede klonal daralmanın görüldüğü ve TK-MRSA ile HK-MRSA suşlarının klonal farkının azaldığı belirlenmiştir³⁰.

Gerek hastane gerekse toplum kökenli MRSA suşlarına bağlı enfeksiyonların artması sıklıkla tedavi başarısızlıklarına yol açması sebebi ile aslında 1956 yılında keşfedilen ancak toksik yan etkileri sebebi ile klinik kullanıma giremeyen glikopeptid grubu antibiyotiklerin öncüsü olan Vankomisin MRSA enfeksiyonlarında yeniden

değerlendirilmiştir. Bu suşların etken olduğu hastanede kazanılmış enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Ancak 1995’de Fransa’da³¹, 1996’da Japonya’da³², 1997 yılı içinde ABD³³, Hong Kong³⁴ ve Kore’de³⁵ vankomisine azalmış duyarlılık (VISA: *Vancomycin Intermediate Staph. aureus*) gösteren MRSA suşlarının izole edilmesi *Staph. aureus* suşlarında direnç probleminin ne kadar önemli olduğunu ortaya koymuştur. Nitekim kısa bir süre sonra, Haziran 2002’de ABD de, diyaliz tedavisi gören 40 yaşındaki bir erkek hastanın kateter ucundan vankomisine dirençli ilk *Staph. aureus* (VRSA) suşu izole edilmiştir³⁶. Direnç probleminin artmasıyla birlikte MRSA tüm dünyada HK ve TK enfeksiyonlara neden olan ciddi bir sağlık sorunu haline gelmiştir.

2.2. Sınıflandırma

Bacilli sınıfının, Bacillales alt grubunun, Staphylococcaceae ailesine ait bir tür olan stafilokoklar günümüzde 33 tür ve 13 alt türe ayrılmıştır. Uzun yıllar Micrococcaceae ailesi içerisinde tanımlanmış olan stafilokoklar, kendileri gibi katalaz pozitif koklardan oluşan bu aileden anaerobik ortamda glukozdan asit oluşturmaları, furozolidon ve lizostafine duyarlı oldukları halde lizozime direnç göstermeleri ve 0,4 µg/ml eritromisin içeren ortamda gliserolden asit oluşturmaları ile ayrılırlar. Ayrıca mikrokokların aksine basitrasin dirençlidirler. İnsanlarda piyogenik karakterli enfeksiyonların majör patojeni olan *Staph. aureus* katalaz, koagülaz ve DNaz pozitif olmasının yanı sıra % 12 NaCl içeren ortamda üreyebilmesi, mannitol ve trehalozdan asit oluşturabilmesi ile diğer stafilokok türlerinden ayrılır^{37-39,40}.

2.3. Mikroskopik Görünüm ve Boyanma

Stafilokoklar birden fazla düzlemde bölünerek üzüm salkımı şeklinde düzensiz kümeler oluşturan, kok şeklinde ve 0,5-1,5 µm çapında, hareketsiz Gram pozitif [G(+)] koklardır³⁷⁻³⁹.

2.4. Kültür ve Üreme Özellikleri

Bakteriyolojik üreme besiyerinde zorunlu anaerob olan *Staph. aureus subsp. anaerobius* ve *Staph. saccharoliticus* hariç, aerobik veya mikroaerofilik şartlar altında rahatlıkla üreyebilen stafilokok türleri kanlı agardaki 18-24 saatlik inkübasyonlarında

genellikle yuvarlak, düzgün, 1-4 mm çapında hafif konveks koloniler yaparlar. Gliserol mono asetat gibi yağ asitleriyle zenginleştirilmiş besiyerlerinde 37°C’de üretildiklerinde karotenoidlerinden dolayı pigment oluştururlar. Anaerop şartlarda ya da buyyonda üretildiklerinde pigment oluşturmazlar. *Staph. aureus* altın renginde, *Staph. epidermidis* ise tebeşir beyazı renginde koloniler oluşturur. *Staph. simulans*, *Staph. intermedius* ve *Staph. hyicus subsp. hyicus* pigment oluşturmaz. Pigment üretimi oda ısısında ve gün ışığındaki 24-48 saatlik inkübasyonlarda artar. *Staph. aureus* suşlarının çoğu at, koyun ya da insan kanlı agar plaklarında 24-36 saatlik inkübasyonlar sonucunda beta hemoliz oluşturur. Bazen diğer türlerde de hemoliz izlenmektedir. Kapsüllü oldukları zaman mukoid koloniler oluşturabilirler. Aminoglikozid tedavisinden sonra pigment oluşturmayan, nonhemolitik küçük koloni varyantları oluşturabilirler. Bu koloni formları, besiyerine hemin ve menadion (K3 vitamini) ilavesi ile normal forma dönerler.^{37-39,40}

Stafilokoklar, streptokoklardan farklı olarak katalaz üretmektedirler. Ayrıca stafilokoklar yavaş bir şekilde karbonhidratları asit oluşturarak fermente ederler, fakat gaz üretmezler^{39,40}.

Stafilokoklar kuru hava şartlarına, ısıya (50°C’ye 30 dakika) ve % 9 sodyum klorüre dayanıklıdır. Fakat % 3 Heksaklorofen gibi güçlü kimyasallar ile kolayca inaktive edilebilirler²⁵.

2.5. Hücre Yapısı ve Virülans Faktörleri

Stafilokoklar konakta enfeksiyon oluştururken hücre duvarında yer alan birçok yapısal elemandan, enzimlerinden ve toksinlerinden yararlanır. Bu patojenite faktörleri sayesinde fagositozdan kaçabilir, deri ve deri altına kolayca yayılabilir ve tipik apse formunu oluşturabilirler. Ayrıca toksin ve invazinleri aracılığı ile derin dokulara yayılarak özellikle hematojen yol kaynaklı farklı enfeksiyonlara ve toksemilere sebep olurlar²⁴.

2.5.1. Kapsül

Stafilokokların % 90’dan fazlasında bulunan polisakkarit yapıdaki kapsül bakteriyi fagositozdan korurken konak hücreye ve tanı veya tedavi amaçlı kullanılan tıbbi enstrümanların yüzeylerine tutunmasını da sağlar²⁵. Bilinen 11 tipi olmasına

rağmen yapılan çalışmalarda enfeksiyonlardan izole edilen tüm stafilokokların % 70-85 oranında, MRSA'ların ise % 80-90 oranında tip 5 ve tip 8 kapsüle sahip olduğu gösterilmiştir⁴¹.

2.5.2. Hücre Duvarı

G(+) bir kok olan stafilokoklar tipik olarak N-Asetil Glikozamin (NAGA) ve N-Asetil Muramik asit (NAMA)'in heteropolimerinden oluşan tek tabakalı yaklaşık olarak 10 nm kalınlığında son derece rijit bir yapı olan peptidoglikan hücre duvarına sahiptir.

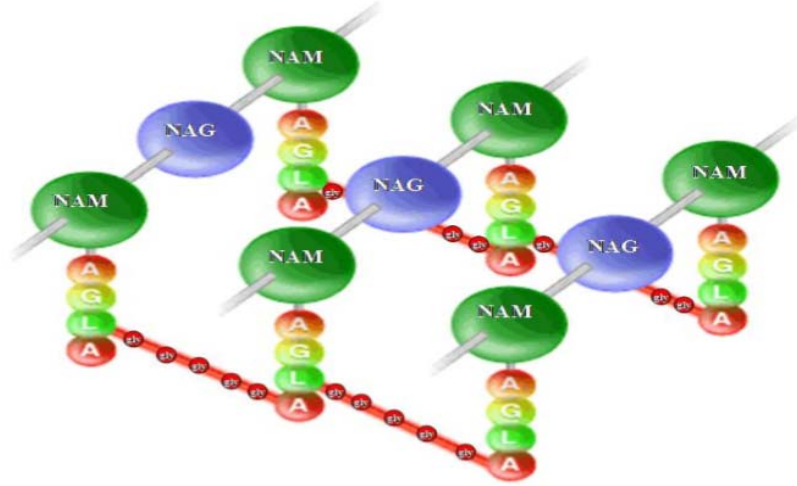
2.5.2.1. Peptidoglikan Tabaka

Peptidoglikan tabaka hücre duvarının esas yapısını ve % 50'den fazlasını oluşturur. NAGA ve NAMA'nın 1-4 β glikozid zincirler ile bağlanmasından oluşan polisakkarit iskelet yapı heteropolimerdeki NAMA moleküllerinin L-alanin, D-glutamik asit, L-lizin, D-alanin, D-alanin'den oluşan pentapeptid ve glisinden oluşan tetrapeptid yan zincirler ile çapraz olarak bağlanmaları sonucu güçlendirilmiştir (Şekil 1). Bir zincirdeki D-alanin ile diğer zincirdeki L-lizin arasındaki çapraz bağ glisin zinciri ile bağlanarak hücre duvarı sağlamlılığı arttırılmış ve pentalizin bağları içeren diğer G(+) bakterilerin aksine stafilokok hücre duvarına lizozime karşı direnç kazandırılmıştır. Peptidoglikan bakteriye şeklini verir ve bakteriyi % 20 sükröz konsantrasyonuna denk olan ozmotik basınçtan ve konak savunmasından korur. Bakteriye özgü olduğu için antibiyotiklerin de hedef bölgesidir^{38,39}.

Staph. aureus hücre duvarındaki peptidoglikan, endotoksin benzeri etki gösterir ve monositlerden İnterlökin-1 (IL-1) salınımını, kompleman aktivasyonunu, opsonik antikorların üretimini, fagositer hücrelerden proinflamatuvar sitokinlerin salınımını sağlar²⁴. *Staph. aureus* hücre duvarı yüzeyinde plazma proteinleri ve konak hücre membranında yer alan yapı elemanlarına bağlanabilen çok sayıda protein eksprese eder. Bu yapılar immun sistemden kaçış, hasarlı dokuya kolonizasyon ile konak hücre ve trombositlere adezyon gibi konak-mikroorganizma ilişkisinin düzenlenmesi ve patogeneizde rol oynar.

Mikroorganizma yüzeyinde yer alan adeziv matriks proteinleri (MSCRAMMs: *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*) olarak tanımlanan bu yapılar içerisinde *Clumping factor A ve B* (ClfA ve ClfB), Fibronectin

Bağlayan Protein *A* ve *B* (*FnBPA* ve *FnBPB*), *Staph. aureus* surface protein *G* (*SasG*) ve *Staphylococcal protein A* (*SpA*) gibi adeziv ve antijenik özelliğe sahip proteinler yer alır. Bakteri virülansı için son derece önemli olan hücre duvarı bakteri-konak ilişkisinin düzenlenmesinde rol oynar²⁴.



Şekil 1. Peptidoglikan tabakanın şematik yapısı. NAM; N-asetil muramik asit, NAG; N-asetil glikozamin, A; Alanin, G; Glutamat, L; Lizin, Gly; Glisin.

2.5.2.2. Teikoik Asit

Stafilokoklara somatik antijen özelliği kazandıran teikoik asit, hücre duvarı ağırlığının % 50'ye yakın kısmını oluşturur. Antijenik yapı şeker-alkol-fosfat polimerleridir. Hücre duvarından uzanan ribitol veya gliserol teikoik asit ve hücre membranından uzanan lipoteikoik asit olmak üzere iki tiptir. Teikoik asit; *Staph. aureus*'da özgün ribitol (5-karbon monosakkarid) fosfat polimeri yapısında iken, *Staph. epidermidis*'de gliserol fosfat yapısındadır. Sadece G(+) bakterilerin hücre duvarında bulunan bu yapı kompleman aktivasyonu ve mukozal yüzeylere özgül reseptörleri aracılığı ile yapışmada rol oynar^{24,39,40}.

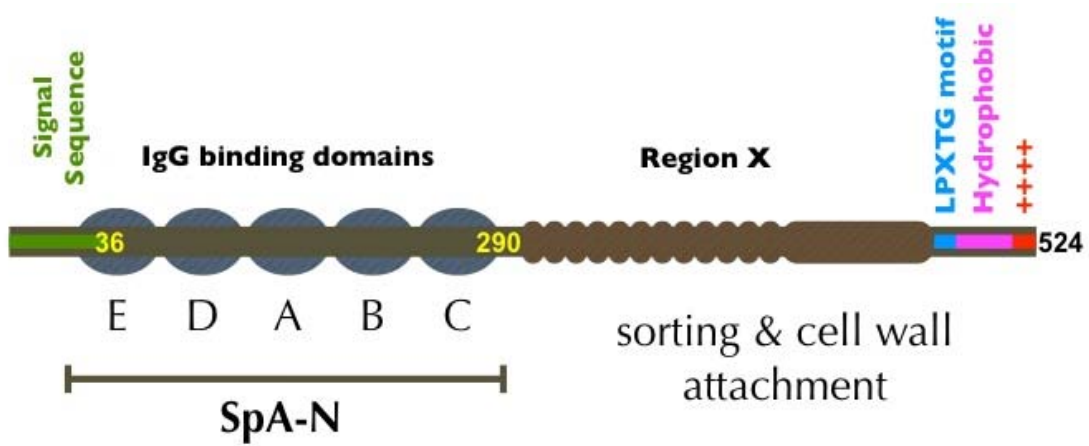
2.5.2.3. Protein A ve Diğer Yüzey Proteinleri

Staph. aureus'a özgü bir yapı olan ve 2,15 kb büyüklüğündeki *spa* geninde kodlanan, serbest ve membran bağımlı formları bulunan 42000 Da ağırlığındaki tek bir polipeptid zincirden oluşan SpA, MSCRAMMs'ın önemli bir üyesi ve virülans

faktörüdür. SpA; insan immunglobulinlerinden IgM, IgA, IgE ve özellikle IgG2a ve IgG2b'nin, Fc ayağındaki C_H2 ve C_H3 yüzeyinde yer alan Fcγ zincirine non spesifik olarak bağlanır. SpA proteinin asli görevi immün sistemde insan IgG'lerinin (IgG3 hariç) Fc kısmına bağlanarak opsonizasyona bağlı fagositozu inhibe etmesidir⁴². Ekstrasellüler olarak da salgılabilen SpA, burada antikorlara bağlanarak immün kompleksler oluşturur. Bu kompleks de komplemanı yıkan bir etki gösterir. SpA; insan IgM'in Fab kolunun ağır zincirinin değişken bölgesinde yer alan ve V_H genlerinin yarısından fazlasında atasal olarak görülen V_H3 bölgesine ve bu bölge ile homolog diziler taşıyan diğer memeli hücrelerine de bağlanabilir. B lenfosit klonları ile SpA arasındaki bu ilişki, Toksik Şok Sendromu Toksini-I (TŞST-I), enterotoksin ve eksfoliyatif toksin gibi süper antijenler ile T lenfositler arasındaki ilişkiye benzer sonuçlar doğurarak B hücre fraksiyonlarında proliferasyonunu ve apoptozu uyarır. SpA üzerindeki Fab bağlayan bölgelerin Fc bağlayan bölgelerden daha farklı ve konservatif oldukları gösterilmiştir⁴². Trombositlere bağlanarak onları damar duvarının hasarlı bölgelerinde immobilize edip kümelendirerek kan pıhtısı oluşmasını sağlayan ve insanlarda hemostazis de son derece önemli role sahip olan von Willebrand faktör (vWF) proteini aracılığı ile trombositlere de bağlanan SpA, *Staph. aureus* endokarditinde kritik öneme sahiptir. Ayrıca *Staph. aureus*'un bunu immün sistemden kaçış tekniği olarak kullandığı da düşünülmektedir^{38,40,43,44}. SpA'nın Tümör Nekroz Faktör-α (TNF-α) reseptörleriyle etkileşerek inflamatuvar cevabı engellediği, ostoblastlarda apoptoza neden olarak osteomyelitte yeni kemik oluşumunu engellediği, mukozada mast hücre degranülasyonuna yol açıp histamin, lökotren ve prostoglandin seviyelerinin yükselmesine sebep olduğu da izlenmiştir. SpA'nın antifagositik, kemotaktik ve mitojenik etkilerinin yanı sıra bakterinin koagülaz ve nükleaz aktiviteleri ile korelasyon göstermesi, antibiyotik etkinliğini azaltması gibi özelliklerinin olması bu proteinin en önemli virülans faktörlerinden biri olduğunu düşündürmektedir^{38,40,43}.

SpA son derece stabil bir yapıya sahiptir. Yapısal olarak aspartik ve glutamik asitten zengin, karbonhidrat içermeyen dört veya beş homolog immunglobulin bağlanma (N-terminal uç) bölgesine sahiptir. C-terminal bölgesinden membrana bağlanan SpA'nın yapısı toplam 5 bölgeden oluşur. Bunlar; 1- sinyal peptid, 2- IgG binding domain olarak tanımlanan görevi IgG bağlamak olan 4 veya 5 adet, 56-61 aminoasit uzunluğunda homolog yapıya sahip tekrar dizileri içeren N-terminal uçlar, 3-

görevi tam olarak bilinmeyen, genelde 8 aminoasitlik değişken kısa tekrarlardan oluşan polimorfik X_r bölgesi, 4- SpA'nın bakteri hücre duvarına bağlanmasını sağlayan LysM veya X_c bölgesi (Bu bölgenin hemen arkasında proteini kesip hücre duvarına taşıyacak olan sortaz enziminin hedef bölgesi olan lösin, prolin, X, treonin, glutamat (LPXTG) aminoasitlerden oluşan bir motif yer alır.) ve 5- C terminal uçtur (Şekil 2). Polimorfik X_r bölgesinin işlevi tam olarak kesinleşmese de N-terminal ucun uzunluğunu arttırarak IgG binding domaininin hücre duvarından dışarıya uzanmasına yardımcı olduğu düşünülmektedir. Bu değişken dizileri kodlayan gen bölgesi, kısa tekrar dizilerinin çeşitliliği ve sık rastlanan nokta mutasyonları sebebi ile *Staph. aureus*'un moleküler tiplendirmesinde kullanılmaktadır^{42,44}.



Şekil 2. Protein A'nın yapısı.

Protein A'dan başka birçok yüzey proteini de konak hücreye ve matriksine tutunma, invazyon, konak savunmasından kaçış, biyofilm oluşumu ve demir kazanımında rol alarak virülansta önem taşır. Bu proteinler aktif, pasif immünizasyon ve ilaç çalışmalarında yeni hedefler olarak denenmektedir^{45,46}(Tablo 1).

Tablo 1. *Staph. aureus* hücre yüzey proteinleri, fonksiyonları ve rolleri.

Gen	Protein	Fonksiyon	Enfeksiyondaki rolü
<i>spa</i>	Protein A	Antikorların Fc parçasına bağlanır	Deneysel sepsis
<i>clfA</i>	Kümeleştirici faktör	Fibrinojene bağlanma Kompleman inaktivasyonu	Deneysel osteoartrit
<i>clfB</i>	Kümeleştirici faktör	Fibrinojene bağlanma	Deneysel endokardit
<i>cna</i>	Kollajen bağlayan protein	Kollajene bağlanma	Deneysel osteoartrit
<i>fna</i>	Fibronektin bağlayan protein	Fibronektine bağlanma	Deneysel endokardit
<i>fnb</i>	Fibronektin bağlayan protein	Fibronektine bağlanma	İnvazyon
<i>sdrC</i>	Serin-aspartat tekrar proteini	Fibronektine bağlanma	İnvazyon
<i>sdrD</i>	Serin-aspartat tekrar proteini	Fibrinojene bağlanma	İnvazyon
<i>sdrE</i>	Serin-aspartat tekrar proteini	Fibrinojene bağlanma Komplemanı inaktivasyonu	İnvazyon
<i>pls</i>	Plazmine duyarlı protein	Nazal mukoza hücrelerine bağlanma	Nazal mukozada kolonizasyon
<i>fntB</i>	Metisiline direncini etkileyen protein	Muhtemelen hücre duvarı yapısında rol oynar	Metisilin direnci
<i>sasA</i>	Protein A yüzey proteini	Oral kavitede kolonizasyon	-
<i>sasB</i>	Protein B yüzey proteini	Adezyon	-
<i>sasC</i>	Protein C yüzey proteini	Adezyon	-
<i>sasE</i>	Protein E yüzey proteini	Adezyon	-
<i>sasF</i>	Protein F yüzey proteini	Nazal mukoza hücrelerine bağlanma	İnvaziv hastalıklarla ilişkili
<i>sasG</i>	Protein G yüzey proteini	Adezyon	İnvaziv hastalıklarla ilişkili
<i>sasI</i>	Protein I yüzey proteini	Adezyon	-
<i>sasJ</i>	Protein J yüzey proteini	Adezyon	-
<i>sasK</i>	Protein K yüzey proteini	Adezyon	-

2.5.3. Enzimler

Stafilokoklar çoğu enerji sentezi ile ilişkili ve/veya metabolik aktiviteye sahip, ancak bakterinin virülansını da artıran çok sayıda hücre içi ve hücre dışı ortam da etkili olan enzim üretirler. Bunlardan bazıları *Staph. aureus* için spesifikken bazıları da özellikle insan deri ve müköz membranlarında kolonize olabilen bütün türlerde görülebilir.

2.5.3.1. Katalaz

Stafilokoklar; hem bir konak savunması olarak makrofaj ve nötrofillerden salgılanan hem de oksijenli ortamda bakteri metabolizması sonucu ortaya çıkan toksik oksijen radikallerinden biri olan hidrojen peroksiti su ve oksijene parçalayan katalaz

enzimini üretmektedir. Katalaz testi, katalaz pozitif olan stafilokokları, katalaz negatif olan streptokoklardan ayırmaktadır³⁸⁻⁴⁰.

2.5.3.2. Koagülaz

Staph. aureus için karakteristik belirleyici olan koagülaz enzimi bu türün virülansına önemli katkı sağlar. Koagülaz enziminin serbest koagülaz (stafilokinaz) ve bağlı koagülaz (*Clumping Factor*: CF) olmak üzere iki çeşidi vardır. *Staph. aureus* her ikisine de sahiptir. Trombin benzeri bir etkiye sahip olan serbest koagülaz ekstrasellüler bir proenzimdir. Plazmada bulunan *Coagulase-Reacting Factor* (CRF) ile birleşerek aktif hale gelir ve fibrinojeni fibrine dönüştürür. CF ise stafilokokların hücre yüzeyinde bulunur ve fibrinojenin fibrine dönüşümünü sağlayarak stafilokokların aglütine olmasını sağlar. Bu enzimin patojenitedeki rolü, fagositozu önlemek üzere bakterinin üzerine fibrin örtmesinden ileri gelmektedir. Koagülaz enzimi varlığı lam ve tüp yöntemi ile araştırılır³⁸⁻⁴⁰.

2.5.3.3. Diğer Enzimler

Diğer enzimler genellikle bakterinin dokuya yerleşimi ve yayılması ile ilgilidir. Lipaz enzimi lipidleri hidrolize eder. Stafilokokların yağlı deride yerleşmesini sağlar. Hyaluronidaz (yayılma faktörü) bağ dokusunun asellüler matriksindeki mukopolisakkaritlerden olan hyaluronik asidi hidrolize ederek bakterinin invazyonundan sorumludur. Stafilokinaz ısıya dirençli stafilokokal fibrinolizindir. Plazminojeni plazmine hidrolize eder. *Staph. aureus*'un dokuya yayılımını kolaylaştırır. Endonükleaz ve ekzonükleaz aktivitesi olan deoksiribonükleaz (DNaz), nükleik asitleri 3'fosfomononükleotidlere parçalayan bir fosfodiesterazdır. Bunlardan başka stafilokokal serin proteaz (SspA), sistein proteaz (SspP), metalloproteaz (aureolysin; Aur) ve *staphopain* (Scp) gibi ekstrasellüler proteazlar da sentezlerler. Penisilinaz ise beta-laktam halkasını hidrolize ederek antimikrobiyallere direnç gelişmesine neden olur. Plazmidler tarafından kodlanır ve bu nedenle suşlar arasında direncin hızla yayılmasına neden olur. Koagülaz, hyalüronidaz, fibrinolizin ve DNaz istisnalar haricinde yalnızca *Staph. aureus* tarafından sentezlenir³⁸⁻⁴⁰.

2.5.4. Toksinler

Stafilokokların salgıladığı toksinler temel olarak üç grupta incelenebilir. Bunlar sitolitik toksinler, eksfoliyatif toksinler ve enterotoksinlerdir. Enterotoksin ve TŞST-I süperantijen olarak adlandırılan bir polipeptid sınıfına dahildir. Süperantijenler makrofajlardaki MHC-2 (*Major Histocompatibility Complex-2*) moleküllerine bağlanır. MHC-2 molekülleri spesifik olarak T hücre reseptörlerinin β alt birimine bağlanarak T hücrelerinin proliferasyonuna ve doku hasarını başlatacak olan sitokinlerin ($\text{TNF}\alpha$, IL-1) aşırı salınımına neden olurlar^{24,38}.

2.5.4.1. Sitolitik Toksinler

Enzimatik etkileri ile membrana zarar vererek hücre yıkımına sebep olan sitotoksinler bu grupta yer alır.

2.5.4.1.1. Hemolizinler

Alfa, Beta, Gama ve Delta toksin olmak üzere dört çeşittir. Alfa toksin *Staph. aureus* insan suşlarının ana hemolizindir. Birçok hücre membranına etkisi varsa da (lökosit, hepatosit, trombosit, fibroblast vb) en çok eritrositleri etkiler. Monositler ise bu toksine dirençlidir. Antijeniktir ve damarlardaki düz kas hücrelerini harap ederek deride nekroz oluşturur. *Staph. aureus* suşlarının kanlı agarda yaptığı beta hemolizden sorumludur. Beta toksin (sfingomyelinaz C) antijenik ve ısıya dirençlidir. Diğer bir adı stafilotoksindir. Eritrosit, lökosit ve fibroblastları etkiler. Aktivasyonu için magnezyum ve kobalt iyonlarına gereksinimi vardır. Alfa toksin ile beraber doku hasarı ve apse formasyonunun oluşmasından sorumludurlar. Gama hemolizin eritrositler üzerine toksik etkilidir. Litik kemik enfeksiyonları ile ilişkilidir. Delta hemolizin ise antijenik değildir ve biyolojik membranları deterjan benzeri etkiyle parçalar. Bazı memelilerde cAMP üretimini arttırdığı ve akut diareye neden olduğu gösterilmiştir^{24,26,38,39,47}.

İnsandan enfeksiyon etkeni olarak izole edilmiş *Staph. aureus* suşlarının % 92'sinde alfa ve delta toksinlerden en az biri, % 82'sinde her ikisi birden bulunur^{24,26}.

2.5.4.1.2. Panton Valentine Lökositidin (PVL)

Bakteriyofaj aracılığıyla kazanılan bu toksin eritrositleri etkilemeyip lökosit ve makrofajlara toksiktir. Elektroforetik olarak LukF (hızlı) ve LukS (yavaş) iki

komponente ayrılır ve her iki komponent de antijeniktir. İlk olarak LukS alt birimi spesifik reseptörüne bağlanır. Daha sonra LukF alt birimi de yapıya bağlanır ve heptamer oluşturarak lökosit membranı üzerinde bir por oluşturur. Por oluşumu, konak hücre protein kinazının LukS komponentini fosforile etmesiyle başlar. Bu da kalsiyum iyon kanallarını indükleyerek hücre içi haberleşme mekanizmasını aktive eder ve inflamatuvar medyatörlerin salgılanmasını artırır. Böylece hedef hücrede apoptozise ya da hücre lizisine yol açılır.

Lökosidin özellikle toplum kökenli MRSA enfeksiyonları, deri enfeksiyonlarıyla ve mortal seyredebilen nekrotizan pulmoner enfeksiyonlar ile ilişkili bulunmuştur^{24,37-40,47}.

2.5.4.2. Enterotoksinler

Enterotoksinler ısıya ve mide asidine dirençli polipeptid yapıda toksinlerdir. *Staph. aureus* suşlarının yaklaşık yarısı tarafından üretilirler. Sempatik aktivasyonla intestinal peristaltizmi artırır, protein ve karbonhidrat kaynaklı besin zehirlenmelerine yol açarlar. Süperantijen grubuna dahil olan bu toksinler patojenite adası olarak da adlandırılan kromozomal elementten kodlanırlar. Enterotoksinler A'dan F'ye 5 serolojik tipe ayrılır. Enterotoksin A ve D tipleri besin zehirlenmelerinde, B tipi ise hastane enfeksiyonlarında en sık karşılaşılan tiplerdir. Enterotoksin F ise TŞST-1 ve piyojenik ekzotoksin C olarak da adlandırılır ve tüm toksik şok sendromlarının % 50'sinden, menstürasyon ile ilişkili toksik şok sendromlarının ise % 90'ından sorumludur^{24,39,40}.

2.5.4.3. Eksfoliatif Toksinler

Eksfoliyatif toksin molekül ağırlığı 24,000 dalton olan ekzotoksin niteliğinde süperantijen sınıfına dahil bir proteindir. *Staph. aureus* buyyon kültürlerinden izole edilebilir. Epidermisin stratum granulosum tabakasındaki hücrelerin desmoglein reseptörlerine bağlanarak, desmosom bağlarının kopmasına ve vezikül oluşumuna neden olur. Haşlanmış deri sendromuna, epidermal nekroz ve dermatit oluşumuna neden olur. Eksfoliyatif (epidermolitik) toksin iki çeşittir; eksfoliyatin A kromozomal kaynaklı olup, 100°C'de 20 dakika, eksfoliyatin B ise plazmid kaynaklı olup, 60°C'de 30 dakika ısıtılmaya dirençlidir^{24 38,48}.

2.5.5. Genom

Staph. aureus genomu; profajlar, plazmidler ve 2800 baz çiftli sirküler bir kromozomdan oluşur. Antibiyotik direnci ve bakteri virülansından sorumlu olan genler bu kromozom veya ekstrakromozomal yapılar üzerinde bulunabilir. Guanin+sitozin içeriği % 32 olan genomun 2500'e yakın geni kodladığı düşünülmektedir^{25,40}.

Staph. aureus ile yapılan çok sayıda tüm genom ve parsiyel genom dizi analiz çalışmalarının verilerine göre *Staph. aureus* genomu üç kısımda incelenebilir; temel genler, değişken genler ve mobil genetik elementler (MGE). Temel genler tüm suşlarda % 97 oranında ortak olan genlerdir. Değişken genler ise; genellikle konağa tutunma ve konağı yönetmede sorumlu olan yüzey proteinlerinin ekprese edildiği genler olup tek nükleotid değişikliği ile yeni soyların oluşmasında etkili olan genlerdir. MLST, yedi housekeeping gendeki bu değişken bölgelerde görülen mutasyonların analizine bağlı olarak soy ilişkisini incelemeye kullanılan yöntemdir.

İnsan ve hayvan kaynaklı izolatların housekeeping genleri benzer olmasına rağmen taşıdıkları MGE'ler sayesinde büyük farklılıklar gösterirler. *Staph. aureus* suşları arasında antimikrobiyal direnci kodlayan genler ile çok sayıdaki virülans geni MGE'ler ile taşınmaktadır. Metisilin direncini kodlayan *mecA* genini taşıyan SCC*mec*, PVL toksini taşıyan bakteriyofaj, ilaç direnç genlerini taşıyan plazmid ve transpozanlar bunlar arasında en önemlileridir. Mobil genetik elementlerin horizontal gen transferi daha patojenik, antibiyotik direnci daha yüksek ve konak çeşitliliği daha geniş olan klonların ortaya çıkmasına neden olmuştur⁴⁹ (Tablo 2).

Tablo 2. *Staph. aureus*'da tespit edilen mobil genetik elementler⁴⁹.

MGE	Fonksiyonu
Bakteriyofaj	Enterotoksin A sentezi PVL sentezi Stafilokokal kompleman inhibitörü (SCİN) sentezi Stafilokokal kemotaksis inhibitörü (CHİP) sentezi Stafilokinaz sentezi
Patojenik adalar	Enterotoksin B ve C sentezi TŞST sentezi MDR genleri Fusidik asit direnç genleri
Plazmid ve transpozanlar	Antibiyotik ve ağır metal direnç genleri Toksin sentezi Arjinin metabolizması ile ilgili genler (ACME)
SCC_{mec}	Metisilin direnci
<i>mec</i> dışı SCC	Cıva direnci
Genomik adalar	Phenol soluble modulin (PSM) sentezi Enterotoksin sentezi Bakteriyosin sentezi Proinflamatuvar etki

2.6. Stafilokokların Neden Olduğu Hastalıklar

2.6.1. *Staph. aureus*'a Bağlı Enfeksiyonlar

Staph. aureus kolonizasyon ve invazyonu sonucu gelişen süpüratif karakterli lezyon oluşumu ile seyreden hücre, doku ve organ patolojileridir.

2.6.1.1. Deri ve Yumuşak Doku Enfeksiyonları

Folikülit; kıl follikülü kanallarının tıkanması ile karakterize, kendi kendini sınırlayan iyi huylu enfeksiyon odağıdır. Küçük, kızamık ve ağrılıdır. Sistemik belirti vermez⁴⁰. Fronkül yüz, boyun, koltuk altı, kalçalar gibi kıl folliküllerinin yoğun olduğu

bölgelerde daha sık görülen ağrılı, sert, ortasında nekroz olan kabarık lezyonlardır. İçerisinde pü birikir ve bazen spontan olarak, bazen de cerrahi insizyon ile drene olur⁴⁰. Karbonkül, birçok kıl follikülünü aynı anda tutan, özellikle boyunda deri altı dokulara ilerleyen ve birden fazla sinüsle dışarıya açılan büyük lezyonlardır. İyileştikten sonra sert skar dokusu bırakır. Ateş, titreme ve halsizlik eşlik edebilir ve bakteriyemiye neden olabilir. Karbonkül genellikle sistemik tedavi gerektirir. Bu kişilerin çoğu *Staph. aureus* burun taşıyıcısıdır^{24,40}.

İmpetigo; en sık stafilokoklarla oluşmaktadır ancak % 20'si *Streptococcus pyogenes* tarafından oluşturulur. Genellikle çocuklarda görülen, yüz ve eller gibi vücudun açık bölgelerini tutan, yüzeysel derinin enfeksiyonudur. Hastalık önce bir makül olarak başlar. Zamanla makül üzerinde içi yoğun sıvı ile dolu veziküller oluşur. Veziküller hızla rüptüre olur ve sarı bir kurut tabakası ile kaplanır. Sistemik semptom ve skar görülmez. Herpes simplex virüs ve suçiçeği ile karışabilir. Gram boyama ayırımında yardımcıdır^{24,38}.

Hidradenitis süpurativa; aksilla, perine ve genital bölgelerde görülen, apokrin ter bezlerinin piyogenik enfeksiyonudur. Lezyonlar kendiliğinden birden fazla yerden drene olabilir. İyileştiğinde skar bırakır^{24,40}.

Mastit; genellikle emziren annelerde ve doğumdan sonraki ilk 2-3. haftalarda ortaya çıkar. Görülme sıklığı % 1-3'tür. Meme üzerinde kızarıklık, şişlik, sertlik ve ağrı vardır. Süt kanalliküllerinde apse oluşumları vardır ve yoğun seroanjinöz bir akıntı tabloya eşlik eder. Yüksek ateş ve sistemik semptomlar görülebilir^{24,38-40}.

Erizipel, sınırları belirgin eritemin olduğu ve ateşin eşlik ettiği deri enfeksiyonudur. Etken genellikle *Strep. pyogenes* ve/veya *Staph. aureus*' tur. Sellülit ise deri ve deri altı bağ dokusunun sınırları belirgin olmayan enfeksiyonudur. Sistemik semptomlar mevcuttur. Özellikle immün yetmezliği olan kişilerde G(-) bakteriler de etken olabileceğinden geniş spektrumlu antibiyotiklerle parenteral tedavi edilir^{24,38}.

Cerrahi yara enfeksiyonları, operasyon bölgesinde iki günde veya daha sonra ödem, eritem ve ağrı ile ortaya çıkar. Hafif sistemik semptomlar ve ateş de sıklıkla eşlik eder. Drene olan sıvının Gram boyası ve kültürü ile tanı konur. Derin doku ve yabancı cisim enfeksiyonu söz konusu ise uzun süre tedavi gerektirir²⁴.

2.6.1.2. Derin Doku ve Sistemik Enfeksiyonlar

2.6.1.2.1. Bakteriyemi

Stafilokok bakteriyemileri genel olarak lokal stafilokok enfeksiyonlarına sekonder olarak gelişir ve hastane kökenli ve toplum kökenli olmak üzere iki grupta incelenmektedirler. Hastane kökenli bakteriyemiler genellikle kataterden ve diğer invazif girişimlerden kaynaklanırken toplum kökenli olanlar selülit, osteomyelit, endokardit ve pnömoni gibi bir odakta kaynaklanmaktadır. Hastane kökenli bakteriyemi, hastaneye yatıştan 48-72 saat sonra ya da hastaneden çıkıştan sonraki ilk 10 gün içerisinde başlayan bakteriyemileri ifade eder. Toplum kökenli bakteriyemiler ise hastaneye yatışta var olan ya da ilk 24-72 saat içerisinde başlayan bakteriyemileri ifade eder. Yapılan çalışmalarda *Staph. aureus*'un hastane kökenli bakteriyemilerin % 11-33'ünden, toplum kökenli bakteriyemilerin ise yaklaşık % 50'sinden sorumlu olduğu gösterilmiştir. Genel olarak stafilokok bakteriyemilerinin % 86'sı hastane kökenlidir. *Staph. aureus*'un neden olduğu bakteriyemilerde hemorajik ve nekrotik cilt lezyonları ile karaciğer, dalak ve kas gibi dokularda abselerle karakterize metastatik enfeksiyonlar sık görülür^{24,40,50}.

2.6.1.2.2. Endokardit

Staph. aureus, normal kalp kapağında, protez kapağın erken dönemlerinde ve intravenöz ilaç kullananlarda görülen akut bakteriyel endokarditin en sık nedenidir. Tüm endokardit etkenleri arasında görülme sıklığı % 10-27'dir. En sık mitral kapağı tutar. Hastane ya da toplum kökenli olabilmektedir. Stafilokokal kalp enfeksiyonlarının tanısı için kan kültürü ve ekokardiyografi yardımcıdır⁵¹.

2.6.1.2.3. Perikardit

Genellikle travma veya göğüs cerrahisi sonrası bazen de hematogen yolla gelişir. enfektif endokardite sekonder olarak da görülebilir. Perikardit vakalarının yaklaşık % 22'sine etken *Staph. aureus*'tur^{24,40}.

2.6.1.2.4. Menenjit

Staph. aureus menenjitleri genellikle bakteriyemiye sekonder olarak, travma veya cerrahi sonrası komplikasyon olarak görülür. Tüm menenjitler arasında görülme sıklığı %2-3 olmasına rağmen mortalitesi çok yüksektir^{24,38,40}.

2.6.1.2.5. Pnömoni

Toplumdan kazanılmış *Staph. aureus* pnömonileri genellikle influenza epidemilerinden sonra görülür. Hastane kökenli *Staph. aureus* pnömonileri ise genellikle entübasyon sonrası veya aspirasyona bağlı olarak görülür. Her iki durumda pulmoner enfeksiyon, apse oluşumu ve plevral ampiyem, pnömosel gibi lokal komplikasyonlara yol açabilir. *Staph. aureus*'a bağlı inhalasyon pnömonisi genellikle influenza enfeksiyonundan birkaç gün sonra ortaya çıkar. Yaşlı, diyabetik ve bronşektazisi olanlarda ve nozokomiyal pnömonilerde de önemli etkenlerdendir. Sepsis ve endokardit sonrası metastatik enfeksiyon şeklinde de ortaya çıkabilir. Genellikle çocuklarda görülen ve fatal bir tablo olan toplum kökenli nekrotizan pnömoni ile PVL arasında ilişki olduğu tespit edilmiştir^{24,38-40}.

2.6.1.2.6. Plevral Ampiyem

Plevral ampiyem olgularının yaklaşık 1/3'ünde etken *Staph. aureus*'tur. Başlıca pnömoni ve akciğer apselerinden direk yayılım ile veya göğüs cerrahisi komplikasyonu olarak gelişir. Nadiren hematojen yolla da oluşabilir. Tanı plevral sıvının bakteriyolojik incelemesi ile konur^{24,38}.

2.6.1.2.7. Kemik ve Eklem Enfeksiyonları

Staph. aureus, akut osteomyelitlerin en sık nedenidir ve sıklıkla 12 yaş altındaki çocuklarda görülmektedir. Bakteri uzak bir odaktan hematojen yolla kemiklere ulaşır. Vakaların yarısında kan kültürü pozitifdir. Çocuk yaş grubunda daha çok uzun kemikler tutulurken yetişkinlerde vertebral tutulum daha sıktır. Uzun kemik tutulumlarında metafiz bölgesinde ağrı en sık görülen bulgudur. Radyografi 10-14 günden önce yarar sağlamaz. Vertebral tutulumlarda, tutulan vertebra üzerinde ciddi ağrı görülür. Ateş genelde vardır. Tedavinin geciktiği vakalarda kronikleşme görülür ve uzun yıllar süren

pürülan akıntı tipiktir. Hızlı tanı ve doğru tedavi ile *Staph. aureus* osteomyelitinin prognozu oldukça iyidir²⁴.

Çocuk yaş grubunda septik artritlerin en sık sebebi *Staph. aureus*'tur. Yetişkinlerde ise nongonokoksik artritlerde en sık etkindir. Eklem üzerinde ağrı, ısı artışı ve şişlik tipiktir. Eklem sıvısı çok sayıda lökosit ve etken patojenden dolayı bulanıktır. Bazen pürülan olabilir^{24,40}.

Septik bursitlerde de yaklaşık % 80 etken *Staph. aureus*'tur. Daha çok diz ve dirsek eklemlerinde görülür²⁴.

2.6.1.3. Toksine Bağlı Hastalıklar

Bazı *Staph. aureus* faj tipleri tarafından üretilen ve süperantijen özelliğine sahip toksinlerin yol açtığı hücre ve doku patolojileri bu grupta yer alır.

2.6.1.3.1. Stafilokokal Haşlanmış Deri Sendromu

Stafilokokal haşlanmış deri sendromu genellikle yenidoğan ya da bir yaşın altındaki çocuklarda görülür. Hastalık belirtilerinden ekzfoliyatif toksin A ve B sorumludur. Epidermisin stratum granulosum tabakasındaki hücrelerin desmoglein reseptörlerine bağlanarak desmosom bağlarının kopmasına ve vezikül oluşumuna neden olur. Lezyonlar toksinin etkisi ile oluştuğu için ve toksin sitoliz ya da inflamasyon yapmadığından epidermis tabakalarının Gram boyamasında stafilokoklara ya da lökositlere rastlanılmaz. Bu da tanı koydurucu bir özelliktir. Genellikle nazofarenks, göbek veya üriner sistemin *Staph. aureus* enfeksiyonunun ardından 24-48 saat içerisinde yaygın büller oluşur. Mukozal tutulum yoktur. Sağlam görünen deri hafif bir sürtünme ile sıyrılır. Buna Nikolsky bulgusu denir^{24,38,40}.

2.6.1.3.2. Toksik Şok Sendromu

Toksik şok sendromu; 1980'lerin başlarında menstürasyon sürecinde yüksek emici tamponların kullanımının artması ile birlikte genç kadınlarda çok sayıda olgu olarak bildirilmiştir. Toksik şok sendromu suşları tarafından lokal olarak salgılanan TSST-1 mukozaları geçer ve tüm vücuda yayılır. Menstrüel toksik şok sendromu, bir süperantijen olan TSST-1'in immün sistemi hiperaktif etmesiyle menstürasyonun bitiminden sonraki ilk iki gün içerisinde başlar. Klinik bulgular; ateş, halsizlik, kas

ağrıları, boğaz ağrısı, bulantı ve ishali takiben yüksek ateş, hipotansiyonla birlikte kapiller yetmezlik, hipoalbuminemi, yaygın godesiz ödem, birkaç gün sonra deskuamasyona neden olan eritemli makülopapüler döküntü, bol sulu ishal, konfüzyon ve renal yetmezlikle karakterizedir. Mortalite % 3'tür. Ek olarak hastaların vajinal hiperemileri vardır. Kan kültürlerinde bakteri tespit edilemez. Ancak % 98 olguda stafilokoklar vajinadan izole edilebilmektedir.

Menstrüel olmayan toksik şok sendromu, tampon kullanımıyla ilişkisizdir ve TŞST-1'den başka daha nadir olarak enterotoksin B ve C ile de oluşturulabilir. Etken; cerrahi yaralar, akciğerler, mukoza veya deri ile diyaliz kateterleri gibi vücudun herhangi bir bölümünde kolonize olmuş olan mikroorganizmalar olabilir^{24,48}.

2.6.1.3.3. Besin Zehirlenmesi

Besin zehirlenmesi; genellikle yiyecek hazırlayıcılarının ellerinde kolonize olmuş *Staph. aureus* suşlarının yiyeceklere bulaşması ve bu yiyecekler üzerine salgıladıkları ısıya dirençli enterotoksinlerin yiyeceklerle birlikte tüketilmesi ile ortaya çıkar. Bu toksinler barsaktan direkt sıvı kaybına neden oldukları gibi süperantijen olarak da etkilidirler. Genellikle bol karbonhidratlı ve sütlü tatlılar, patates salataları, tavuk eti ve dondurma gibi yiyeceklerle bulaşmaktadır. Besinler normal görünüşte ve kokudadırlar. Kısa bir inkübasyon sürecinden (2-6 saat) sonra bulantı ve kusma ile başlamaktadır. Daha sonra bulantı kusmanın eşlik ettiği karın ağrısı ve sulu ishal başlar. Ateş ve nörolojik bulgular tipik olarak bulunmaz. Salgınlar halinde görülmektedir. Şüphelenilen besinden Gram boyama, kültür ve toksin araştırılması tanıya yardımcıdır. Hastalık daha çok stafilokokal enterotoksin A, B ve C ile oluşur^{24,40}.

2.6.2. KNS'lerin Neden Olduğu Hastalıklar

KNS'ler normal deri florası üyesidir. Bu sebeple alınan klinik örneklerde sık sık kontaminan olarak karşımıza çıkarlar. Deri ve mukoza florasında en sık görülen stafilokoklar *Staph. epidermidis* ve *Staph. hominis*'dir. İnsanlarda klinik materyallerden etken patojen olarak en sık izole edilenler ise sırası ile; *Staph. epidermidis*, *Staph. saprophyticus*, *Staph. haemolyticus*, *Staph. lugdunensis*'tir.

Vücutta bulunan tanı veya tedavi amaçlı protez, intravenöz katater, kanül ve sondalar gibi invaziv enstrümanlar slime tabakası ile kolay kolonize olan ve

sterilizasyona dirençli hale gelen KNS'ler için taşıyıcı rolü üstlenerek enfeksiyon oluşumuna katkıda bulunur. KNS'lerin oluşturduğu enfeksiyonların çoğu yabancı cisim veya katater ile ilişkilidir. Doğal kapak endokarditi, periton diyaliz katater enfeksiyonu ve *Staph. saprophyticus*'un etken olduğu üriner sistem enfeksiyonu dışında KNS enfeksiyonlarının çoğu hastane kökenlidir ve çoklu antibiyotik direnci izlenir.

KNS'ler damar içi kateter ile ilişkili bakteriyemilerde en sık etkenlerdir. Doğal kapak ve subakut protez kapak endokarditlerinde de etken % 60-80 oranında *Staph. epidermidis*'tir. Şant enfeksiyonlarında 2/3, periton diyaliz hastalarındaki peritonitlerde % 40 oranında etken KNS'lerdir ve genellikle *Staph. epidermidis*'tir.

Staph. epidermidis kardiyotorasik cerrahi sonrası sternal osteomyelitlerde, protez eklem çevresindeki osteomyelitlerde ve hemodiyaliz şanti ile ilişkili hemotojen osteomyelitlerde en sık etkindir. KNS'ler protez sonrası geç dönem enfeksiyonlarında ve göz cerrahisi sonrası gelişen endoftalmitlerde de önemli etkenler arasındadırlar.

Staph. saprophyticus özellikle doğurgan çağıdaki kadınlarda komplike olmayan akut üriner sistem enfeksiyonları arasında ikinci en sık etkindir^{24,40}.

2.7. İmmunopatogenez ve İmmün Sistemden Kaçış

Stafilokoklar hem toplum kökenli hem de hastane kökenli enfeksiyonlarda en önemli etkenlerden birisidir. Yaptığı enfeksiyonlar basit cilt ve yara enfeksiyonlarından ciddi organ tutulumlu sistemik enfeksiyonlara kadar değişmektedir. Ayrıca burun ve cilt taşıyıcılığı da toplumda çok yüksek düzeydedir. Bazen kommensal bazen ciddi patojen olarak bulunması *Accessory gene regülatör* (Agr) adı verilen global bir *quorum sensing* regulatuvar sistemi kontrolündeki ekzotoksinler, enzimler, adezinler gibi sahip olduğu virülans faktörlerinin yanı sıra konağın immün cevabını düzenleyebilme yeteneğine de bağlıdır^{52,53}.

Stafilokokal enfeksiyonlar için konak savunmasının ilk basamağını fiziksel ve aynı zamanda immünolojik bir bariyer görevi yapan dermis ve epidermis oluşturur. Epidermisteki bazal tabakadan farklılaşarak sürekli üst tabakalara göç eden keratinositler organelden fakir ve hücreler arası çapraz bağlardan zengin yapıları sayesinde iyi bir fiziksel bariyer işlevi görürler. Epidermisin altındaki dermiste bulunan kollajen ve elastin fibrillerden oluşan fibröz stroma da bu bariyere katkıda bulunur. Epidermisteki Langerhans hücreleri ve dermiste bulunan makrofajlar, mast hücreler,

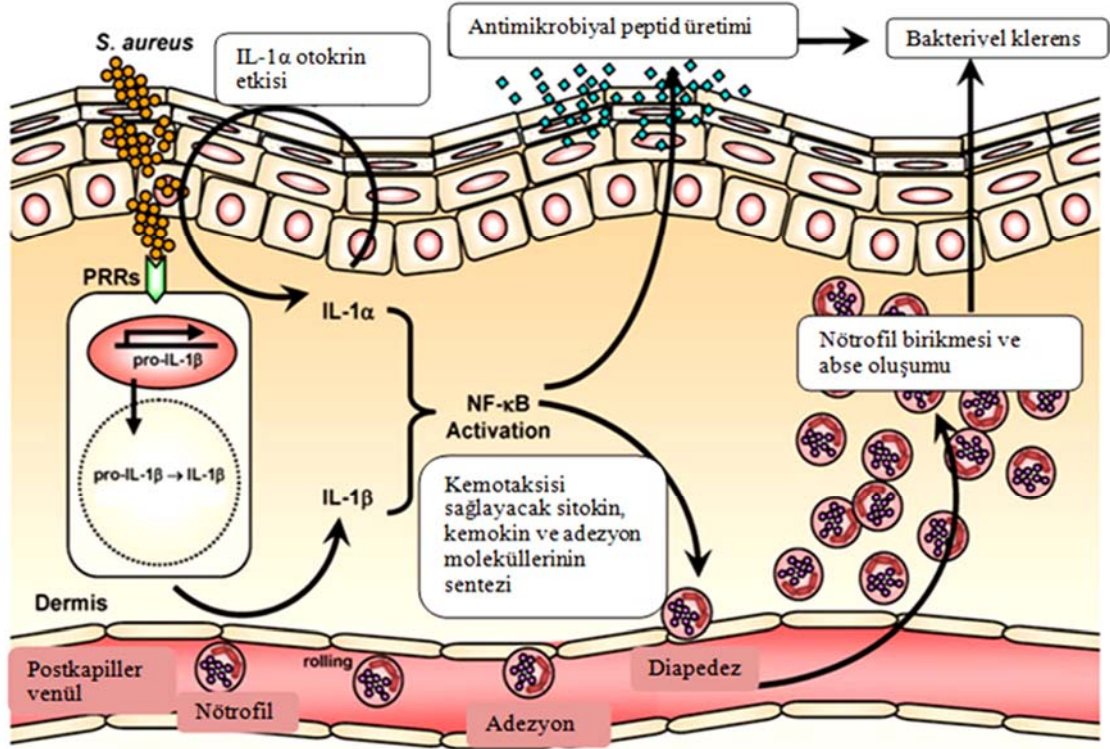
dentritik hücreler, T ve B lenfositler, Natural Killer (NK) hücreler ise derinin bir immün bariyer olmasını sağlarlar⁵⁴⁻⁵⁶.

Staph. aureus enfeksiyonlarına karşı savunmada hem doğal hem de kazanılmış immünite görev alır. Doğal immünite uyarılınca nötrofil ve makrofaj fagositozu, kompleman aktivasyonu gibi nonspesifik proinflatuvar cevap oluşur. T ve B lenfositlerin antijeni fark etmesiyle başlayan kazanılmış immün cevap ise antikor aracılı immün cevap ile hücresel immün cevaptan oluşur ve oldukça spesifiktir⁵⁴. Günümüzde doğal immünitenin de aslında *Pathogen Associated Molecular Patterns* (PAMPs) denilen mikroorganizmanın iyi korunmuş moleküler yapılarına karşı kısmen spesifik olduğu bilinmektedir. Konak hücredeki PAMPs tanıma reseptörlerine *Pattern Recognition Receptors* (PRRs) denilmektedir. Hem nötrofil, makrofaj, Langerhans hücresi, dentritik hücre gibi immün sistem hücrelerinde hem de epitel hücresi, keratinosit, fibroblast, endotel hücresi, adiposit gibi nonimmün hücrelerde bulunan PRRs uyarılınca nötrofil göçü başta olmak üzere erken immün cevaptan sorumlu çeşitli sitokin, kemokin ve antimikrobiyal peptidlerin sentezi başlatılır^{54,57,58}.

Keratinositler çeşitli yollardan erken immün cevaba katkı sağlarlar. İlki; keratinositler *Human β -Defensin* (hBD2 ve hBD3), katelisidin (LL-37) ve RNaz-7 gibi çeşitli bakterisidal ve bakteriyostatik peptidler salgılarlar. Bu peptidler antimikrobiyal etkilerinin yanında aynı zamanda doğal ve kazanılmış bağışıklıkta görev alan çeşitli immün sistem hücrelerinin de kemotaksisine katkı sağlar. İkincisi; keratinositler, PRRs'den *Staph. aureus*'a ait lipopeptidleri, lipoteikoik asidi ve peptidoglikanı tanıyan *Toll-like Receptors* (TLRs) 1, 2, 6 ve peptidoglikan yıkım ürünü olan muramil dipeptidi tanıyan sitoplazmik (Nucleotide-binding oligomerization domain-2 (NOD2) reseptörlerini taşırlar ve uyarılmaları sonucu IL-1 α salgılayarak Nükleer Faktör $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$), *Mitogen Activated Protein Kinase* (MAPK) yolları üzerinden sitokin, kemokin ve antimikrobiyal peptid sentezini başlatırlar^{54,59,60} (Şekil 3).

Nötrofiller stafilokok enfeksiyonlarında killit hücrelerdir ve tipik piyojenik lezyonlardan sorumludurlar. Mikroorganizma ile karşılaşan ilk fagositer hücrelerdir ve etkenin ortadan kaldırılmasındaki en etkin lökositlerdir. PRRs tarafından patojenin tanınmasına cevaben sentezlenen IL-1 α , IL-1 β , TNF- α ve IL-6 başta olmak üzere proinflatuvar sitokinler ve kemokinler sayesinde enfeksiyon bölgesine göç ederler ve çeşitli yollardan mikroorganizmayı öldürürler^{102,103} (Şekil 3). Nötrofiller yüzeylerindeki

Fc ve kompleman reseptörleri sayesinde antikor ve kompleman aracılı fagositozla mikroorganizmayı hücre içine alıp oksijen radikalleri (O_2^- , H_2O_2 , $HOCl$), antimikrobiyal peptidler (katelisin, lizozim, azurosidin, α -defensin) ve enzimler (katepsin G, elastaz, jelatinaz, kollajenaz, proteinaz) aracılığı ile öldürürler^{61,62}.



Şekil 3. *Staph. aureus*'a karşı oluşan erken immün yanıt⁵⁴.

Ayrıca nötrofiller önemli besinler olan demiri bağlayan laktoferrin, B12'yi bağlayan transkobalamin-II ve bakteriyel siderofajları bağlayan *Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin* (NGAL) faktörlerini ve bakterinin sitoplazmaya kaçması durumunda sitoplazmada çoğalmasını önlemek için Mg^{2+} ve Zn^{2+} şelasyonu yapan kalprotektin (S100A8/S100A9) isimli protein kompleksini de içerir. Son olarak nötrofiller hücre dışına salgıladıkları *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs) olarak adlandırılan antimikrobiyal peptidler [*Human Neutrophil Peptides* (HNPs), β -defensinler, katelisin, RNaz-7, dermisidin], proteazlar ve kromatin sayesinde mikroorganizmaları ekstrasellüler olarak tuzağa düşürürler^{54,63}.

Staph. aureus nötrofil cevabından korumak için çeşitli mekanizmalara sahiptir. Sentezlediği *Chemotaxis Inhibitory Proteins of Staphylococci* (CHIPS) ile kemotaktik olan C5a reseptörlerini bloke ederek ve *Extracellular Adherence Protein* (Eap) ile epitelyal adezyon molekülleri ile etkileşerek nötrofil kemotaksisini bozarlar⁶⁴. Protein A sayesinde IgG'nin Fc koluna bağlanarak antikor aracılı fagositozdan kaçarlar. FnBP ve CF sayesinde kümeleşerek fagositozdan korunurlar^{65,66}. Salgıladıkları PVL gibi sitolitik toksinler sayesinde nötrofilleri ve diğer immün sistem hücrelerini lizise uğrattırır^{65,66}. Yine nötrofil lizisinden sorumlu olan α -tip fenol modulinler TK-MRSA'lar ile yakından ilişkili bulunmuştur⁶⁷. Koloniye altın sarısı rengini veren karoten pigmenti ve süperoksit dismutaz enzimi sayesinde oksijen radikallerinden korunmaya çalışırlar^{68,69}. Stafilokinaz ile α -defensini, IsdA (*Iron-regulated surface determinant A*) ise Hbd2 ve LL-37'yi nötralize ederler. Çeşitli protezlarla antimikrobiyal peptidleri yıkarlar ve yüzeylerindeki *Multiple Peptide Resistance Factor* (MprF)'' sayesinde kendi hücre membranlarının anyonik yükünü azaltarak katyonik antimikrobiyal peptidlere dayanıklı hale gelirler^{54,70}.

TLRs ve NOD reseptörlerinin haricinde *Peptidoglycan Recognition Receptor Proteins* (PGRPs)' ve *Tumor Necrosis Factor- α Receptor 1* (TNFR 1)'de stafilokokal enfeksiyonlarda etkili bulunmuşlardır. Protein A ile TNFR 1 arasındaki etkileşimin konak defansında majör rol oynadığı düşünülmektedir^{54,70}.

Konak savunmasında ilk hat olan doğal immüniteden bir süre sonra etkene spesifik olan ve immünolojik hafızayı oluşturan kazanılmış bağışıklık devreye girer. Kazanılmış bağışıklığın B lenfositler tarafından düzenlenen humoral (antikor aracılı) ve T lenfositler tarafından düzenlenen hücresel iki kolu bulunmaktadır^{54,71}. Th1 hücrelerden Interferon gama (IFN γ) salgılanması hücresel immüniteyi uyarırken aynı zamanda nötrofil kemotaksisini ve maturasyonunu da arttırmaktadır. Th2' den IL-4 ve IL-13 salgılanması antikor aracılı immun cevabı indükler. Bu antikorlar fagositozda rol alırlar^{54,71}. Ancak hem atopik dermatitli bireylerde Th2 cevabının artmış olması hem de *Staph. aureus*'un süperantijenleri ile oluşturduğu etkinin Th2 cevabı yönünde olması nedeni ile Th2 cevabının artmış kolonizasyon ve daha kötü klinik tablo ile ilişkili olduğu Th1 cevabının ise etkenin ortadan kaldırıldığı tablolarla ilişkili olduğu düşünülmektedir^{54,72,73}. *Staph. aureus* enfeksiyonlarında bakterinin çeşitli toksinlerine (α -toksin, β ve γ hemolizin, PVL ve enterotoksinler), virülans faktörlerine (aerolizin,

IsdA ve süperantijenler), hücre duvar proteinlerine (CF, FnBP) ve protein olmayan antijenlerine (kapsüler polisakkaritler, lipoteikoik asit ve peptidoglikan) karşı kanda yüksek oranda antikor tespit edilir. Buna rağmen tekrarlayan enfeksiyonların sık olması ve antikor temelli aşılarda immünizasyonun zayıf olması nedeni ile bu antikorların koruyuculuğunun düşük olduğu düşünülmektedir^{54,70}.

Staph. aureus, T ve B lenfositler üzerinde etkili süperantijenlere de sahiptir. Enteretoksinler gibi süperantijenler, antijen sunan hücrelerdeki MHC class II moleküllerine bağlanarak T hücre reseptörlerinin uyarılmasına neden olurken SpA ise özellikle dalakta ve kemik iliğindeki immatür B hücreleri olmak üzere B lenfositleri etkileyerek proliferasyonuna ve apoptoza gitmesine neden olurlar. Böylece etkin bir koruyucu immünite gelişmesine engel olurlar^{54,70}. Farelerle yapılan çalışmalarda SpA mutant suşlarla enfekte edilen hayvanın vahşi tip *Staph. aureus*'a karşı da etkin koruyucu immünite geliştirebildiği izlenmiş ve SpA'nın aşı çalışmaları için hedef oluşturabileceği düşünülmüştür^{54,74}. SpA'nın aynı zamanda IgG'nin Fcγ domainine ve platelet agregasyonundan sorumlu vWF'e bağlanarak yüzey antijenlerini maskelediği böylece opsonizasyondan ve fagositozdan kaçışı sağladığı da iyi bilinmektedir. SpA ile ortak yapılara sahip olan *Staphylococcal Binding of Immunoglobulin* (Sbi) de SpA gibi IgG'nin Fc kolunu bağlamasının yanı sıra C3d ve faktör H ile trimer oluşturarak B hücrelerinden spesifik immünglobulin sentezini engeller⁷⁰.

Bir stafilokokal yüzey proteini olan *Adenozin sentaz A* (AdsA), 5' nükleotidaz aktivitesi ile konakta ekstraselüler adenozin miktarını arttırmakta bu da G protein ailesinden reseptörlerle etkileşerek hem doğal hem de kazanılmış immünite ile ilgili antiinflamatuvar yolların aktiflenmesine neden olmaktadır. AdsA'nın virülansta ve bakteriyemi oluşumunda majör bir role sahip olduğu düşünülmektedir⁷⁰.

T ve B lenfositlerden başka NK hücrelerin bir kolu olan Th17 hücrelerinin de stafilokokal enfeksiyonların kontrolünde çok önemli rolü olduğu tespit edilmiştir. Th17 tarafından üretilen IL-17 hem nötrofil kemotaksisini hem de keratinositlerden antimikrobiyal peptit sentezini arttırmaktadır^{54,72}.

2.8. Tanı

2.8.1. Boyama

Serebrospinal ve eklem sıvısı gibi normalde steril olan vücut sıvılarının direk mikroskopik incelemesi kullanılabilir. Direk mikroskopik inceleme tek başına patojenik stafilokoklar ile patojenik olmayanları veya stafilokok dışı G(+) kokları birbirinden ayırmada yeterli değildir²⁵.

2.8.2. Kültür

Staph. aureus'ların tanımlanmasında birçok seçici ve zenginleştirici besiyerleri kullanılabilir. Klinikte en sık kullanılan besiyeri koyun kanlı agardır. *Staph. aureus* bu besiyerinde 37°C'de 18-24 saatte genellikle beta-hemolitik, S tipi koloniler oluşturur. *Staph. aureus* ayırıcı tanısı için sık kullanılan besiyerlerinden biri de *Mannitol salt* agar (*Chapman* besiyeri) olup % 1 mannitol, % 7,5 NaCl, fenol kırmızısı ve pepton içerir. *Staph. aureus*'lar KNS'lerden, bu besiyerindeki mannitolü fermente etmeleri ile açığa çıkan asitlik nedeniyle kolonilerinin etrafında sarı halka oluşmasıyla ayrılırlar. Stafilokokların selektif tanımlanmasında kullanılan besiyerlerinden olan *Baird-Parker* agar, yumurta sarısı emülsiyonu ve potasyum tellurit içeren bir besiyeridir. Yumurta sarısı lesitinaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla, potasyum tellurit ise stafilokokların telluriti telluryuma indirgemesiyle oluşan siyah kolonilerin izlenmesi ve potasyum tellurit G(-) mikroorganizmalar üzerinde inhibisyon etkisine sahip olması nedeniyle kullanılmaktadır. Besiyerinde koloni etrafında yumurta sarısının parçalanmasına neden olan lesitinaz enzim aktivitesi ile berrak bir zon oluşur. *Baird-Parker* agar besiyerinde mikroboklar ve diğer stafilokoklar da hafif siyah renkli koloniler oluşturarak gelişirler ancak, bu kolonilerin lesitinaz aktivitesi olmadığı için *Staph. aureus*'dan ayrımı kolaydır. Bunun dışında *Staph. aureus*'un spesifik olarak tanımlanmasını sağlayan kromojenik identifikasyon besiyerleri de mevcuttur. *Staph. aureus* klinik materyallerin ekiminin yapıldığı nonspesifik besiyerlerinin çoğunda ürer. Rutin laboratuvar tanısında koyun kanlı agardaki sarı, genellikle hemolizli koloniler seçilerek koloni tipi, Gram boyama ve biyokimyasal özelliklerine göre *Staph. aureus*'lar tanımlanır⁴⁰.

2.8.3. Katalaz

Katalaz testi stafilokokları streptokoklardan ayırmada kullanılan temel testlerden biridir. Katalaz, bakteriyi toksik oksijen radikallerinden koruyan bir sitokrom oksidaz enzimidir. Test % 3'lük hidrojen peroksit ile bakterinin lam üzerinde karşılaştırılması prensibine dayanır. Stafilokoklardaki katalaz hidrojen peroksidi suya ve oksijene parçalar. Açığa çıkan oksijenden ötürü hızlı bir gaz çıkışı gözlenir. Bütün stafilokoklar katalaz pozitifdir^{25,40}.

2.8.4. Lizostafin

Stafilokokların hücre duvarındaki peptidoglikan tabakadaki glisinden zengin pentapeptid köprülerini yıkan bir tür endopeptidazdır. Lizostafin duyarlılığı disk difüzyon veya tüp dilüsyon testi ile tespit edilebilir. Stafilokoklar lizostafine duyarlıdır, mikrokoklar ise dirençlidir^{25,40}.

2.8.5. Furozolidon

Mikrokoklarla stafilokokları ayırt etmede kullanılan bir duyarlılık testi olup genellikle disk difüzyon yöntemi ile tespit edilir. Stafilokoklar furozolidona duyarlı sonuç verir. Mikrokoklar ise dirençlidir^{25,40}.

2.8.6. Koagülaz

Koagülaz enzimi plazmadaki fibrinojenin fibrine dönüşümünü katalizleyerek bakteriyi konağın savunma sisteminden korur. Koagülaz tayini *Staph. aureus* ile diğer KNS'lerin ayırımında kullanılan temel testlerdendir. Koagülaz tayininde EDTA'lı tavşan plazması kullanılır. Bağlı ve serbest koagülaz olmak üzere iki tipi vardır:

Lam koagülaz (Bağlı koagülaz/CF): Temiz bir lamın uca yakın kısımlarına birer damla saf su damlatılır. Kuşku stafilokok kolonilerinden öze ile alınarak bu iki damlayla karıştırılıp homojen süspansiyonlar elde edilir. Bu süspansiyonlardan birinin üzerine plazma, diğerinin üzerine negatif kontrol olarak fizyolojik tuzlu su damlatılır ve elde çevirme hareketleri yaparak karıştırılır. Pozitif sonuçlarda 10-30 saniye sonra plazma eklenen damlada stafilokokların birbirine yapışması nedeniyle gözle görülür bir kümeleşme oluşur. Bunun sebebi hücre duvarının yüzeyinde bulunan CF'dir. Yüksek tuz oranı otoaglutinasyona yol açabileceğinden mannitol salt agar gibi besiyerlerindeki

kolonilerden çalışılmamalıdır. Lam koagülaz negatif olan suşlar tüp koagülazla doğrulanmalıdır. *Staph. lugdunensis* ve *Staph. schleiferi sp. schleiferi* lam koagülaz pozitif olabilir.

Tüp koagülaz (Serbest koagülaz): Test çalışılırken bir koloniden öze ile alınan örnek plazma içinde ezilerek emülsiyon haline getirilir. 37°C’de inkübe edilip, 1. ve 4. saatlerde pıhtı oluşumuna bakılır. Eğer pıhtı oluşmazsa bir gece oda ısısında bekletilir. Fakat bazı suşlar fibrinolizin oluşturabileceğinden fazla beklemesi yalancı negatif sonuç verebilir. Pıhtılaşmanın nedeni ekstrasellüler olarak sekrete edilen ve plazmadaki CRF ile birleşerek fibrinojeni fibrine çeviren koagülaz enzimidir. Bazı koagülaz negatif stafilokoklar (*Staph. intermedius*, *Staph. hyicus*, *Staph. delphini*, *Staph. schleiferi sp. schleiferi*) da pozitif reaksiyon verebilir^{25,40}.

2.8.7. DNaz

Tüp koagülaz ve katalaz testleri zayıf ya da belirsiz sonuçlandığı durumlarda *Staph. aureus*’u KNS’den ayırmak için DNaz testi kullanılır. DNA içeren DNaz agara *Staph. aureus* olduğu düşünülen koloni ekilir. 35°C’de 24 saat inkübasyon sonunda DNaz enzimini içeren *Staph. aureus* besiyerindeki DNA’yı parçalayacaktır. Besiyerine oluşan kolonilerin üzeri 1N HCl ile kaplandığında asit DNA’yı çökelteceğinden *Staph. aureus* kolonisinin etrafındaki bölge şeffaf kalırken, diğer bölgelerde hala DNA mevcut olduğundan bulanık görülür. Pozitifliği daha iyi görmek için besiyerine toluidin mavisi eklendiğinde DNaz pozitif kolonilerin etrafında pembe bir hale görülür^{25,40}.

2.8.8. Termostabil Nükleaz (Termonükleaz)

Staph. aureus’un ısıya dayanıklı deoksiribonükleaz oluşturması temeline dayanır. Testin uygulanışında standart bir mikroskop lamı üzerine toluidin mavisi DNA agar ilave edilir. Agar katılaştıktan sonra 2 mm çapında kuyucuklar açılır. Açılan kuyucuğa örnekler ilave edilip nemli ortamda 35°C’de 4 saat inkübe edilir. Bu sürenin sonunda toluidin mavisi içeren agarda DNA’nın parçalanmasıyla açığa çıkan oligonükleotidler nedeniyle parlak pembe-kırmızı ya da mor renkli hale oluşması pozitif olarak değerlendirilir^{25,40}.

2.8.9. Novobiosin direnci

Staph. saprophyticus’u diğer klinik önemi olan türlerden ayırmak için yapılan disk difüzyon duyarlılık testidir^{25,40}.

2.8.10. Ticari Biyokimyasal Test Yöntemleri

Ticari kit tanımlama ve otomatize sistemler stafilocok türlerini % 70 ile > % 90 doğrulukla nispeten hızlı ve kolay şekilde bir çok türü tanımlayabilir. Mevcut tanımlama sistemleri arasında Vitek, Vitek 2, API STAPH, MicroScan Pos ID panel, MicroScan Rapid Pos ID panel, BBL Crystal Gram pozitif tanımlama sistemi, Pasco MIC/ID Gram pozitif panel ve BD Phoenix otomatize tanımlama sistemi, GP MicroPlate test paneli, MIDI Sherlock tanımlama sistemi ve RiboPrinter gibi sistemler bulunmaktadır. Vitek 2 sisteminde stafilocokların tanısı için Gram pozitif idendifikasyon ve duyarlılık kartları kullanılmaktadır. Kartlar üzerinde karbon kaynağı kullanımını, enzimatik aktiviteyi ve direnci ölçen biyokimyasal testlerin olduğu mikrokuyucuklar bulunmaktadır.

Staph. aureus tanısında latex aglütinasyonla protein A aranması, fibrinojenle duyarlılaştırılmış koyun eritrositlerinin kullanıldığı pasif hemaglütinasyonla CF tayini ve sadece *Staph. aureus*’ta bulunan asetilglukozaminidaz enzimini tespit eden ELISA yöntemleri gibi farklı yöntemler de kullanılabilir^{25,40}.

2.9. Duyarlılık Testleri

Klinik olarak önemli enfeksiyonlardan izole edilen stafilocoklar için konvansiyonel duyarlılık testlerinin rutin olarak yapılması önerilmektedir. Bununla beraber laboratuvarlar için en önemli nokta MRSA’nın tanımlanmasıdır. Metisilin direnci β -laktam antibiyotiklere afinitesi olmayan PBP2a’yı kodlayan *mec* geni ile ilişkilidir. Bu gen Polymerase Chain Reaction (PCR) kullanılarak tespit edilebilir. Çoğu laboratuvar direncin göstergesi olarak rutinde bir fenotipik yöntem olan oksasilin testini kullanmaktadır. 6 μ g/mL oksasilin ve %4 NaCl içeren *Müller-Hinton* agarda üreyen stafilocoklar *mecA* pozitif ve metisiline dirençlidir. Fakat sefoksitin disk difüzyon testi *mecA* bağımlı direnci göstermekte oksasilinden daha iyi bir belirteçtir. Alternatif olarak *mecA* geninin ürünü PBP2a için geliştirilmiş lateks aglütinasyon ve hibridizasyon gibi

yöntemlere dayalı ticari testler bulunmaktadır ve bu testler PCR veya oksasilin diski direnç testlerinden daha hızlıdır^{25,40}.

2.10. Moleküler Tiplendirme Testleri

Hem toplumda hem de hastanelerde görülen MRSA nedenli enfeksiyonların risk yönetiminde etkenin kaynağının ve bulaş yollarının moleküler yöntemlerle hızlı tespiti MRSA kontrolünde anahtar veriler sağlamaktadır. Fakat hiçbir moleküler yöntem özellikle toplum kökenli suşlardaki çeşitlilik nedeni ile yeterli ayırım gücüne sahip bulunmamakta ve kombine şekilde kullanılmaktadırlar. Günümüzde kullanılan en popüler MRSA tiplendirme yöntemleri PFGE, MLST, SCC_{mec} tiplendirme ve *spa* tiplendirme yöntemleridir. Bunların dışında *Multilocus Tandem Repeat Analysis* (MLVA) ve piyasada kit şeklinde bulunan rep-PCR da yapılan çalışmalarda denenmiştir. MLVA; laboratuvarlar arasında diskriminatif gücü ve tekrarlanabilirliği çok değişken olduğu için, rep-PCR ise tekrarlanabilirliği çok yüksek olduğu halde diskriminatif gücü düşük olduğu ve standart bir isimlendirmesi olmadığı için yaygın olarak kullanılmamaktadır (Tablo 3). Son zamanlarda majör klonal komplekslere ve subklonlara spesifik olan tek nükleotid polimorfizmlerinin tespitine dayalı PCR ve mikroarray bazlı yöntemler de geliştirilmiş ve *SNP typing systems* olarak adlandırılmıştır⁷⁵.

Tablo 3. Metisilin dirençli *Staph. aureus* tiplendirmesinde kullanılan moleküler yöntemlerin karşılaştırılması⁷⁵.

Yöntem	Prensip	Avantaj	Dezavantaj
<i>spa</i> sekans tiplendirmesi	<i>spa</i> geninin <i>Xr</i> bölgesinin polimorfizminin sekans analizi	Hızlı; ayırım gücü yüksek; taşınabilir, kıyaslanabilir, güncellenebilir veri; standart isimlendirme, BURP	Bazı soyların birbirinden ayrılamaması
MLST	Yedi housekeeping genin sekans polimorfizmi	Taşınabilir, kıyaslanabilir veri; standart isimlendirme, eBURST	Düşük ayırım gücü, yüksek maliyet
PFGE	Tüm genomun restriksiyon enzimleriyle polimorfik kesimi	Yüksek ayırım gücü	Teknik alt yapı gereği, standart isimlendirmenin olmaması, laboratuvarlar arası kıyaslamamanın güçlüğü, bazı soyların yanlış sınıflandırılması
SCC <i>mec</i> tiplendirmesi	Mobil genetik elementin analizi	Standart isimlendirme	Düşük ayırım gücü, standart protokolün olmaması, isimlendirmenin gelişimi
Multilokus VNTR (MLVA)	Kromozomal VNTR bölgelerinin polimorfizmi	Yüksek ayırım gücü	Standart isimlendirmenin olmaması, standart protokolün olmaması, bazı soyların yanlış sınıflandırılması

2.10.1. Pulsed Field Jel Elektroforezi

PFGE tüm genomunun bir bütün halinde agoroz jel içerisinde restriksiyon enzimleri ile kesime uğratıldıktan sonra oluşan 10 kbp'den 10 Mbp'e kadar değişen büyüklükteki DNA fragmentlerinin ayırımına dayalı elektroforetik bir yöntemdir. Konvansiyonel agoroz jel elektroforez yöntemleri ile ayrıştırılması mümkün olmayan

büyüklerdeki DNA molekülleri, PFGE yönteminin açısı belirli aralıklarla değişen elektrik alanı sayesinde birbirinden ayrılır.

Yüksek ayırım gücüne sahip olan PFGE birçok mikroorganizmanın tiplendirilmesinde altın standart olarak kabul edilmektedir^{8, 76-78}. En yaygın kullanılan PFGE uygulaması, *Contour–Clamped Homogeneous Electric Field* (CHEF) elektroforez ve *Field inversion* jel elektroforezdir. *Field inversion* sisteminde elektrik alan periyodik olarak 180° dönen akım sayesinde ters yöne çevrilir. CHEF elektroforezde ise akımın 120° derece değişmesine olanak veren daha kompleks multiple elektrot sistemi mevcuttur ve mikrobiyoloji çalışmalarında tercih edilen sistemdir⁸.

Sonuçların doğru yorumlanması ve epidemiyolojik veriye çevrilebilmesi için araştırmacının band paternlerini nasıl kıyaslayacağını bilmesi ve salgın süresince meydana gelebilecek random genetik değişikliklerin oluşturabileceği farklılıkları gerçek ilişkisizlik tanımından ayırabilmesi gerekmektedir^{8,10,75,79}. PFGE yöntemi, MRSA için günümüzde hala hem lokal salgın araştırmalarında hem de uzun dönem filogenetik çalışmalarda kullanılan altın standart yöntemdir. Çok değerli ve ana yöntem olmasına rağmen pahalı teknik ekipman gerektirmesi, zaman alıcı olması, uzun dönemli ve çok merkezli araştırmalarda sonuçların yorumlanmasının zor olması ve çiftlik hayvanı kaynaklı salgınlara neden olabilen ST398 gibi tiplendirilemeyen izolatların ortaya çıkması nedeni ile MRSA tiplendirmesinde tek başına kullanımı azalmaktadır^{11,75,78}. Laboratuvarlar arası kıyaslanabilirliği düşük olsa da Avrupa, Amerika ve Kanada’da yapılan çalışmaların harmonize edilmesi sayesinde protokollerin standardizasyonu ve sonuçların çok merkezli kıyaslanması daha mümkün hale gelmiştir. Böylece ulusal veya coğrafik olarak sık görülen klonların isimlendirilmesi başarılmıştır. Örneğin ABD’de bu klonlar “USA100, USA200, USA300 ” gibi isimlendirilirken Birleşik Krallık’ta EMRSA, batı Avusturalya’da WA, Kanada’da CMRSA olarak adlandırılıp numaralandırılmıştır⁴⁹.

2.10.2. Multilokus Dizi Tiplendirme

Moleküler tiplendirmede altın standart olarak kullanılan PFGE yönteminin günümüzdeki en önemli problemleri, farklı laboratuvarlar tarafından elde edilen sonuçların karşılaştırılmasındaki zorluklardır. Bu nedenle geliştirilen tekrarlanabilirliği

ve kıyaslanabilirliği daha yüksek olan sekans bazlı yöntemlerden biri olan MLST, moleküler biyolojide kullanımı giderek artan ve mikroorganizmaya ait birden çok lokusun tiplendirilmesinde kullanılan bir tekniktir. Yöntem ilk olarak 1990 yılında meningokoksik menenjit ve sepsisemiye neden olan, *Neisseria meningitidis* üzerinde çalışılmıştır. Daha sonra bu teknik, *Strep. pneumoniae*, *Staph. aureus* ve diğer major patojenler için adapte edilmiştir. Bu yöntemle virülan veya antibiyotiklere dirençli klonların tiplendirilmesi yanında, klonların evrimsel gelişimi de izlenebilmektedir^{79,80}.

MLST, temel metabolik fonksiyonu kodlayan ve aynı türün tüm izolatlarında bulunan *housekeeping* genlerdeki değişikliğin DNA dizi analizi ile gösterilmesidir. Yedi *housekeeping* genin yaklaşık 450-500 baz çiftlik fragmentlerinin dizi analizi çıkarılmaktadır. *Staph. aureus* için MLST’de kullanılan genler ve kodladığı proteinler; *arcC*, karbamat kinaz; *aroE*, shikimate dehidrogenaz; *glp*, gliserol kinaz; *gmk*, guanilat kinaz; *pta*, fosfat asetiltransferaz; *tpi*, triosefosfat izomeraz; ve *yqiL*, asetil koenzim A asetiltransferazdır. Hedef gene ait her bir lokus için, her farklı dizilim farklı bir allel numarası ile gösterilmekte ve bu allel numaralarının kombinasyonu sekans tipini (*sequence type*=ST) belirlemektedir. Belirlenen allel profilleri, MLST veri bankasındaki (<http://www.mlst.net>) bilinen allellerle kıyaslanarak, tespit edilen profilin diğer ülkelerdeki yaygınlık derecesi hakkında bilgi edinmek mümkün olabilmektedir,^{75,79,80,81}. MLST’de incelenen genler mutasyonların nadir izlendiği genler olduğundan kısa zaman aralıklarındaki salgın incelemelerinde ayırım gücü yeterli olmayıp daha çok filogenetik çalışmalarda kıymetli bir yöntemdir. Kısa zaman aralıklarındaki salgın izolatları ile yapılan araştırmalarda MLST’nin ayırım gücü PFGE’den ve *spa* tiplendirmeden daha düşük bulunmuştur^{58,82}. MLST veri programındaki eBURST uygulaması yardımı ile belirlenen ve kıyaslanan alleller, klonal komplekslere (CC: *Clonal Complex*) gruplanarak soy ilişkileri de incelenebilir^{78,79,80}.

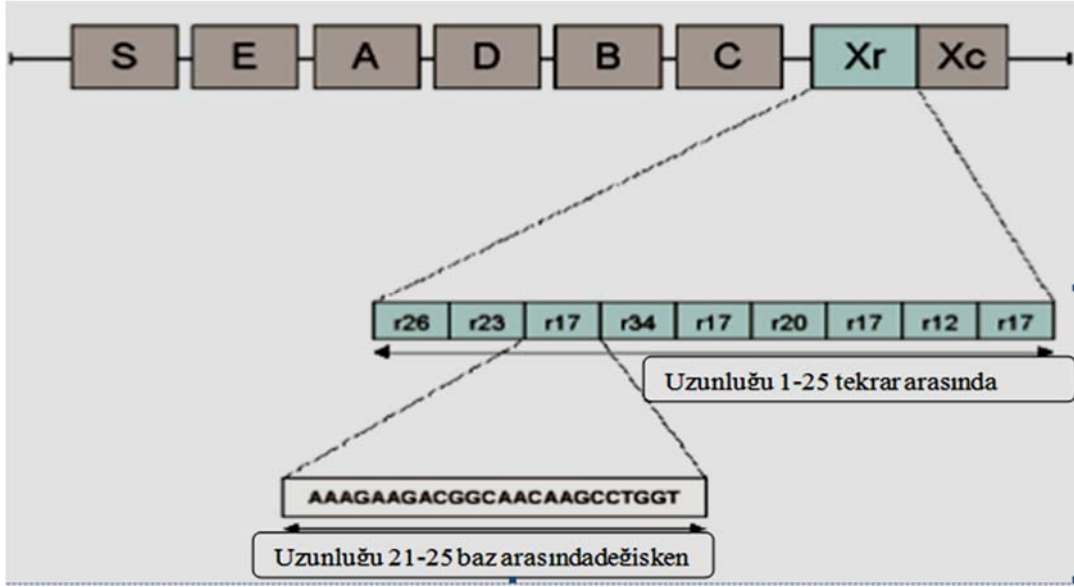
MLST yönteminde isimlendirmenin standart olması, verilerin elektronik ortamda saklanabilir ve kıyaslanabilir olması en önemli avantajlardır. Ancak yedi adet gen bölgesine PCR ve yüksek doğrulukta sekans analizi gerektirmesi nedeni ile pahalı ve zaman alıcı bir yöntemdir^{75,79,82}. Ayrıca MLST eBURST uygulaması ile elde edilen CC’ler ile *spa* tiplendirme programının BURP algoritması ile elde edilen CC’ler yapılan birçok çalışmada çok uyumlu bulunması ile de MLST birçok laboratuvarı yerini *spa* tiplendirmeye bırakmıştır⁷⁵.

2.10.3. *spa* Tiplendirme

MLST yönteminin yedi gen bölgesinin analizini gerektirmesinin neden olduğu güçlükler sebebi ile *single locus sequence typing* (SLST)' diye adlandırılan ve genomda değişkenliği yüksek olan tek bölgeyi hedef alan yöntemler geliştirilmiştir. Yöntemin ayırıştırma gücünü artırmak için seçilen gen bölgelerinin çok değişken olması tercih edilmiştir. Böylece SLST yöntemler hem kısa hem de uzun periyotlarda yapılan incelemelerde kullanılabilecek, kısa sürede genomda ortaya çıkabilecek olan değişiklikleri bile tespit etmeye olanak sağlayan yöntemler olmuşlardır⁸³. SLST yöntemlerinden biri olan *spa* tiplendirme MRSA tiplendirilmesinde kullanılan güvenilir ve popüler bir yöntem haline gelmiştir⁷⁵.

Bu yöntemin temeli, tüm *Staph. aureus* izolatlarında bulunan *spa* geninin iyi korunmuş polimorfik X (Xr) bölgesinin sekansına dayanmaktadır. Xr bölgesi tipik olarak 24 bp uzunluğunda değişken sayı ve sıradaki ardışık tekrar bölgelerinden oluşur [*Variable Number of Tandem Repeats* (VNTR)]^{84,85}. Her tekrar, yazılımlar aracılığıyla tespit edilir ve baz dizilimine göre standart bir numara ile adlandırılır (r1, r2 vb). İçerdiği tekrarların sırasına ve sayısına göre her izolat için bir tekrar paterni oluşturulur ve bu paterne göre bir tip numarası ile tanımlanır⁸⁴ (Şekil 4).

Polimorfik X bölgesinin VNTR yapısı “kayan iplik yanlış baz eşleşmesi modeli” ile açıklanmaktadır. Bu modele göre DNA replikasyonu sırasında birbirine benzeyen kısa tekrar bölgeleri arasında gelişen yanlış baz eşleşmeleri DNA’da loop oluşumuna ve gerilmelere neden olmakta ve DNA polimeraz bu durumu onarmak için genoma tekrar birimi eklemekte veya çıkarmaktadır. Bu tekrar birimi delesyon ve duplikasyonlarına ek olarak nokta mutasyonları da çeşitliliğe katkı sağlamaktadır⁸⁶.



Şekil 4. *spa* gen şeması. S, sinyal sekans; A-C, IgG-binding domain; E, A-D'ye homolog bölge; X, C-terminal parça, iki bölümden oluşur: VNTR bölgesi (Xr) ve hücre duvarına bağlanmayı sağlayan aminoasitleri kodlayan sabit bölge [constant region (Xc)]. (b) Xr bölgesinin tekrar yapısı (t067). (c) repeat 17'nin DNA sekansı.

Spa tiplendirmenin kolay kullanılabilir ve ayırım gücü yüksek bir yöntem olduğunu, elde edilen verilerin tekrarlanabilirliğinin, kıyaslanabilirliğinin ve taşınabilirliğinin yüksek olduğunu destekleyen bir çok çalışma mevcuttur^{18,22}. Xr gen bölgesi, tekrar yapısından dolayı makro ve mikrovaryasyonlarla karakterize olduğu için hem uzun dönem hem de kısa dönem epidemiyolojik çalışmalara uygun olduğu da yapılan çalışmalarda izlenmiştir^{18,83,87}. Fakat Xr gen bölgesinde mutasyonların çok sık görülmesine bağlı olarak bazen aynı izolattan gelişen bir salgının kaynağı yanlışlıkla birden fazla olarak yorumlanabilmektedir⁸². Bu nedenle *spa* tiplendirme programlarına eklenen BURP algoritmi uygulaması yardımı ile ilişkili *spa* tipleri tekrar duplikasyon ve delesyonlarına göre kümelenerek klonal komplekslere (*spa* CC) ayrılıp yakın izolatlar arasındaki ilişkiler tespit edilebilmektedir. *spa* tiplendirmenin diğer bir problemi de ST1, ST8 ve ST80 gibi bazı MLST tiplerini birbirinden ayıramamasıdır⁸⁸.

spa tiplendirme için kullanılan iki software ve ek olarak veri paylaşımını ve yeni bulunan tiplerle güncellemeleri sağlayan bir internet veri tabanı (*SpaServer*) ile yöntemin kullanımı kolaylaştırılmış, tüm dünyada ortak bir isimlendirme sağlanmış ve en popüler yöntem haline gelmiştir^{13,75,87}.

2.10.4. SCCmec Tiplendirme

Staph. aureus izolatlarında metisilin direncinden sorumlu olan mekanizma, 78 kDa ağırlığındaki alternatif bir penisilin bağlayıcı protein olan PBP2a'yı kodlayan *mecA* geninin varlığıdır. Diğer PBP'e kıyasla PBP2a'nın β -laktam antibiyotiklere afinitesi daha düşüktür. Bunun sonucu olarak β -laktam antibiyotik varlığında peptidoglikan sentezi devam edebilir ve bakteri canlılığını sürdürebilir⁸⁸. *mecA* geni regülatuar genleri olan *mecI* (inhibitör) ve *mecRI*(regulatör) genleri ile beraber *mec* operonunda bulunur ve SCCmec denilen mobil genetik element üzerinde taşınır^{89,90}. SCCmec elementinin kaynağının *Staph. scuris* olduğu ve diğer KNS'lerin özellikle *Staph. epidermidis*'in önemli bir rezervuar olduğu düşünülmektedir⁹¹.

Günümüzde SCCmec elementinin bilinen 11 tipi ve çok sayıda subtipi bulunmaktadır. SCCmec tip I ilk olarak 1960'da Birleşik Krallıkta tespit edilmiştir ve *Archaic* klon olarak adlandırılmıştır. SCCmec I,II ve III HK-MRSA'da en sık görülen tiplerken; IV, V ve VII TK-MRSA'da en sık görülen tiplerdir. SCCmec gen yapısının farklılıklarına dayalı tiplendirme yöntemleri, sekans bazlı tiplendirme (MLST, *spa* tiplendirme) yöntemleri ile kombine edilerek MRSA izolatlarının tanımlanmasında ve birbirinden ayrılmasında kullanılmaktadır^{90,91}.

SCCmec elementi, *Staph. aureus* genomunda hem MRSA hem de MSSA'larda iyi korunan ve replikasyon orjininin yakınında bulunan open reading frame X (orfX) geninin 3' ucundaki attBsc (bacterial chromosomal attachment site) denilen bölgeye integre olur^{30,93}. attBsc bölgesinde integration site sequence (ISS) denilen ve rekombinasyon için gerekli olan 15 bp'lik bir bölge bulunur. İntegrasyondan sonra bu bölge, elementi sağdan ve soldan çevreleyen *direkt repeat* (DR) sekanslarını oluşturur⁹⁴.

Tüm SCCmec elementlerinde benzer bir yapı mevcuttur ve bu yapı 3 temel bileşenden oluşur; *mec* gen kompleksi, *ccr* gen kompleksi ve bu kompleksleri birbirine bağlayan bağlama bölgeleri [*join-ing* (*J*) *region*]. Tip VII ve IX SCCmec haricinde diğer SCCmec tiplerinde bu bileşenlerin sırası: '*orfX-J3-mec-J2-ccr-J1*' şeklindedir. tipVII ve IX'da ise *mec* kompleksi ve *ccr* kompleksi yer değiştirmiştir^{95,96,97}.

mecA geni, 2,1 kb uzunluğunda olup içerisinde bulunduğu mobil genomik adanın (SCCmec) büyüklüğü içerdiği transpozon, plazmid ve insersiyon sekanslarından dolayı 20,9 kb ile 66,9 kb arasında değişkenlik gösterir. SCCmec tip I (34,3 kb), IV

(20,9–24,3 kb), V (28 kb), VI (20,9 kb), and VII (35,9 kb) sadece β -laktam antibiyotiklere direnç gösterirken SCCmec tip II (53,0 kb) and III (66,9 kb) içerdği farklı mobil direnç genlerinden dolayı diğer antibiyotik sınıflarına da direnç gösterir. Örneğin *pUB110* plazmidi kanamisin, tobramisin ve bleomisin gibi aminoglikozidlere direnç sağlayan *ant(4')* genini içerir. *pI258* plazmidi penisilinlere ve cıva gibi ağır metallerle direnç sağlarken, *pT181* tetrasiklin direncini kodlamaktadır. Transpozon *Tn554* makrolid, linkozamid ve streptograminB (MLSb) direncini kodlayan *ermA* genini içerirken *ΨTn554* kadmiyum direncini kodlar. Ayrıca SCCmec, *IS431* ve *IS1272* gibi *mecA* geninin transkripsiyonunu düzenleyen insersiyon sekansları da içerebilir. Her iki IS elementi de *mecI* ve *mecR1* genlerini etkileyerek *mecA* geninin baskılanmasına neden olurlar⁹⁰.

ccr genleri; SCCmec elementinin stafilokokal genomdaki spesifik bölgeye integrasyonundan ve aynı zamanda genomdan ayrılabilmesinden yani bu gen kasetinin hareketliliğinden sorumlu, invertaz-resolvaz ailesinden olan DNA rekombinaz enzimini kodlar⁹⁴. *ccr* geni içeriğine göre iki grup *ccr* gen kompleksi mevcuttur. Birincisi *ccrA*, *ccrB* genini içeren gruptur. *ccrA* geninin dört, *ccrB* geninin beş allotipi bulunmaktadır. Tip 1 (*ccrA1B1*), tip 2 (*ccrA2B2*), tip 3 (*ccrA3B3*), tip 4 (*ccrA4B4*), tip 6 (*ccrA5,B3*), tip 7 (*ccrA1B6*) ve tip 8 (*ccrA1B3*) olmak üzere yedi *ccr* gen kompleksi tipi bu gruptadır. İkincisi ise *ccrC*'yi içeren gruptur ve bu grupta sadece tip 5 (*ccrC1*) bulunur^{92,96,98} (Tablo 4).

Tablo 4. *ccr* gen kompleksi tipleri ve ilişkili olduğu SCCmec tipleri⁹⁸.

<i>ccr</i> gen kompleksi	<i>ccr</i> genleri	Taşıyan SCCmec tipleri
Tip 1	<i>A1B2</i>	I, IX
Tip 2	<i>A2B2</i>	II, IV
Tip 3	<i>A3B3</i>	III
Tip 4	<i>A4B4</i>	VI, VIII
Tip 5	<i>C1</i>	V, VII
Tip 6	<i>A5B3</i>	
Tip 7	<i>A1B6</i>	X
Tip 8	<i>A1B3</i>	XI

mec gen kompleksinin prototipi olan sınıf A *mec* gen kompleksi, bütün bir *mec* operonu ile *hyper variable region* (HVR) ve *IS431* içerir. *mec* operonu, *mecA* geninden ve upstreaminde bulunan düzenleyici genleri olan *mecR1* (aktivatör) ve *mecI* (inhibitör) genlerinden oluşur⁹³⁻⁹⁸. Diğer sınıflarla sınıf A arasındaki farklılıklar ise sıklıkla düzenleyici genler arasına giren ve *mecI* geninin tamamının delesyonuna, *mecR1* geninin ise kısmi delesyonuna neden olan *IS1272* veya *IS431* elementlerinden kaynaklanmaktadır. Bu farklılıklara göre beş majör sınıf (sınıf A,B,C,D,E) *mec* gen kompleksi ve alttipleri tanımlanmıştır^{92,98,99}(Tablo5).

Tablo 5. *mec* gen kompleksi sınıfları ve ilişkili olduğu SCC*mec* tipleri⁹⁸.

<i>mec</i> gen kompleksi	İçeriği	Taşıyan SCC <i>mec</i> tipi
Sınıf A	<i>IS431-mecA-mecR1-mecI</i>	II, III, VIII
Sınıf B	<i>IS431-mecA-ΔmecR1-IS1272</i>	I, IV, VI
Sınıf C1	<i>IS431-mecA-ΔmecR1-IS431</i>	VII, X
Sınıf C2	<i>IS431-mecA-ΔmecR1-IS431</i>	V, IX
Sınıf D	<i>IS431-mecA-ΔmecR1</i>	
Sınıf E	<i>blaZ-mecALGA251-mecR1LGA251-mecILGA251</i>	XI

mec gen kompleksi ve *ccr* gen kompleksi üç adet bağlama bölgesi ile birbirine ve genoma bağlanır [*Joining regions* (J1-J3)]. J1, SCC*mec* elementinin sağ ucunda; J2, *ccr* ve *mec* kompleksi arasında; J3 ise sol uçta bulunur^{92,99, 100}. Bu bölgeler transpozon ve plazmidlerin girişi için sıcak bölgelerdir ve çeşitli direnç genlerini içerirler^{79,95,96}. J bölgesi varyasyonlarının aynı *ccr* gen kompleksleri ile kombinasyonları sonucu SCC*mec* elementinin subtipleri oluşmaktadır^{79,93,94,95,96}.

SCC*mec* tiplendirme hem diğer genotiplendirme metodları ile kombine edilerek hem salgın analizlerinde hem de evrim incelemelerinde kullanılmaktadır^{59,97}(Tablo6). SCC*mec* tipleri, spesifik genler ve alelleri multipleks PCR ve sekans ile tespit edilerek tanımlanır^{90,100-102}.

Tablo 6. SCCmec tipleri ve içerdği genler⁹⁸.

SCCmec tipi	mec gen kompleksi	ccr gen kompleksi
I	1 (A1B1)	B
II	2 (A2B2)	A
III	3 (A3B3)	A
IV	2 (A2B2)	B
V	5 (C1)	C2
VI	4 (A4B4)	B
VII	5 (C1)	C1
VIII	4 (A4B4)	A
IX	1 (A1B1)	C2
X	7(A1B6)	C1
XI	8(A1B3)	E

2.11. MRSA Epidemiyolojisi:

İlk olarak İngiltere’de ortaya çıkan MRSA enfeksiyonu önce diğer Avrupa ülkeleri ve ABD olmak üzere bütün dünyada giderek artan oranda hastane ve toplum kökenli enfeksiyonlardan izole edilmeye başlanmıştır. Normal sağlıklı yani asemptomatik bireylerin burun ve deri floralarından da izole edilen MRSA suşları glikopeptit grubu antibiyotiklere de azalmış duyarlılık göstererek halk sağlığı açısından önemli bir tehdit oluşturduklarını ispatlamışlardır.

2.11.1. MRSA ile Kolonizasyon

Staph. aureus’un doğal kaynağı insandır. Yenidoğan döneminde *Staph. aureus*; göbek çevresi, perianal bölge, deri ve bazen de gastrointestinal sistemde kolonize olurlar. Bundan sonraki dönemde ise daha çok burunda kolonize olurlar. Toksik şok sendromu için risk altında olan doğurganlık çağındaki kadınların % 10’nunun vajeninde *Staph. aureus* taşıyıcılığı bildirilmiştir, ayrıca rektal, faringeal, aksillar ve perineal taşıyıcılıktan da söz edilmiştir. Sağlıklı erişkinlerde kolonizasyon oranı % 10-20’si kalıcı olmak üzere % 30-50 arasında değişmektedir^{24,38}.

Sağlık çalışanları, HIV enfeksiyonu olanlar, atopik dermatitliler, cerrahi operasyon geçirmiş hastalar, hemodiyaliz hastaları, intravenöz uyuşturucu kullananlar ve Tip I diyabetlilerde genel popülasyona göre taşıyıcılık oranı yüksektir. Taşıyıcı olan kişilerde özellikle burun taşıyıcılarında, taşıyıcı olmayan hastalara göre, cerrahi bir operasyondan sonra stafilokokal yara enfeksiyonu geçirme riskinin yükseldiği gösterilmiştir. Nazal *Staph. aureus* tedavi edildiğinde mikroorganizma vücudun diğer bölgelerinden de kaybolmaktadır^{24,38,103,104}.

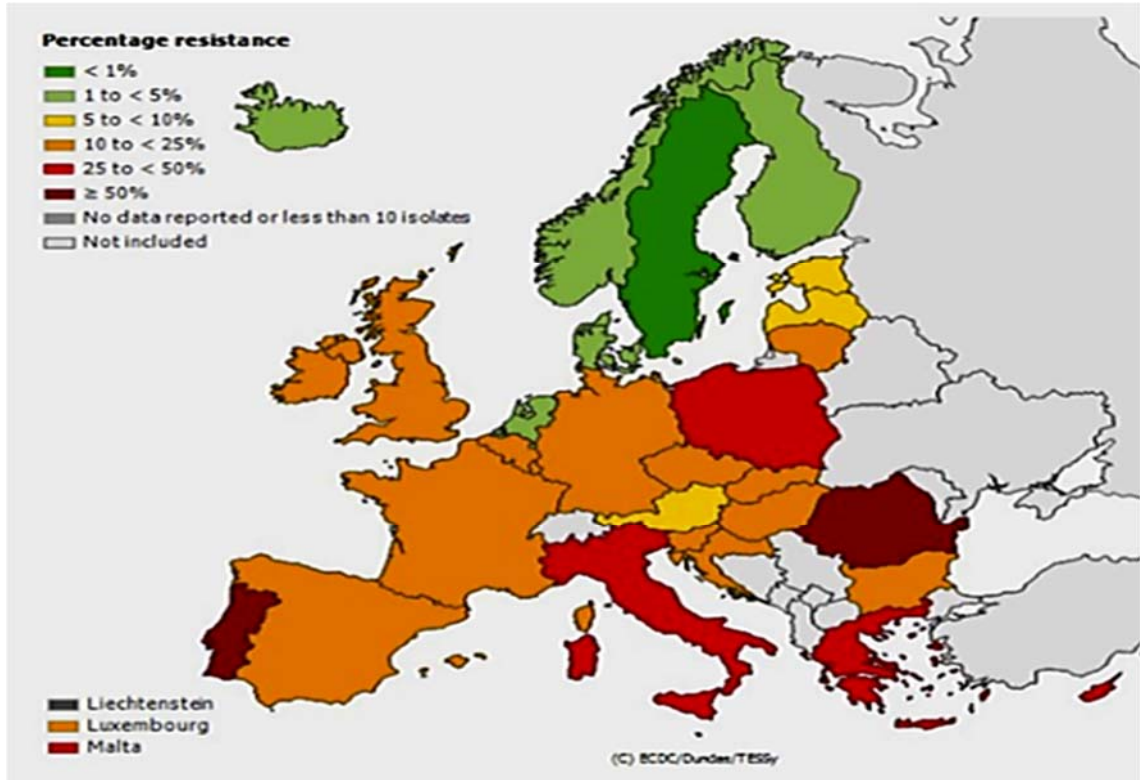
Özellikle nozokomiyal bir etken olarak izole edilen MRSA'ların kolonizasyonu ayrı bir önem taşımaktadır. MRSA enfeksiyonlarının epidemiyolojisi ve patogeneğinde özellikle nazal taşıyıcılığın çok önemli olduğu bilinmektedir. MRSA kökenlerinin hastanelerde, kolonize hastalar ve hastane çalışanları tarafından taşındığı çalışmalarla ortaya konulmuştur. MRSA kolonizasyonu olan kişilerde stafilokokal enfeksiyon görülme riski hassas suşlarla kolonize olanlardan daha yüksek bulunmuştur. Genellikle taşıyıcıları tespit etmek ve tedavilerini yapmak, genel hijyen şartlarını iyileştirmek nozokomiyal MRSA'larla mücadelede etkili olmaktadır^{37,38,104}.

2.11.2. MRSA Enfeksiyonlarının Moleküler Epidemiyolojik Sürveyansı

Penisilinin 1940'da kullanımına başlanmasından önce *Staph. aureus*'a bağlı enfeksiyonların mortalitesi % 80'e yakındı. Penisilinin kullanımından iki yıl sonra ilk penisilin dirençli *Staph. aureus* bir hastanede bildirilmiştir. Daha sonra toplumda da direnç görülmeye başlanmış ve hızla yayılarak 1960'lara gelindiğinde direnç oranı % 80'e yaklaşmıştır. 1961'de metisilinin kullanıma girmesinden iki yıl sonra *mecA* geni kazanımına bağlı ilk MRSA bildirilmiştir. Bundan sonra 45 yıl boyunca MRSA hastanelerin problemi olarak kalmış ve çeşitli HK-MRSA klonları dünya çapında hastanelerde yayılmıştır. PVL ve tip IV veya tip V SCC*mec* taşıması ile karakterize TK-MRSA klonları 1990 yıllarından bu yana görülmeye başlanmış ve önce toplumda daha sonrada hastanelerde giderek yaygınlaşarak Avrupa ve ABD'de baskın klonlar haline gelmişlerdir. Bu nedenle günümüzde tek başına hastane enfeksiyonu önleme ve kontrol parametreleri ile MRSA'nın kontrol altına alınamayacağı anlaşılmıştır ve hastane kökenli MRSA'larla beraber toplum kökenli ve hatta çiftlik hayvanları kökenli MRSA'lar ciddi sağlık tehditleri olarak ele alınmaktadır^{49,90}. Antibiyotik direnci açısından HK-MRSA'a göre daha ılımlı olmasına rağmen sahip oldukları toksinler

sayesinde güçlü virülen olan bu klonlar en sık ağır seyreden yumuşak doku enfeksiyonlarında ve pnömonilerde izlenmektedir⁹⁰.

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)' nin 2012 verilerine göre Avrupa ülkelerinde MRSA oranları güneye doğru daha yüksek olmakla beraber % 15 - 50 arasında değişmektedir¹⁰⁵ (Şekil 5).



Şekil 5. ECDC verilerine göre 2012 yılı katılımcı ülkelerin MRSA oranları¹⁰⁵.

Ülkemizde ise yapılan 2008-2012 yılları arasında dört yıl süren bir çalışmada toplum kökenli suşların % 12,5'i, hastane kökenli suşların % 43'ü metisiline dirençli olarak bulunmuştur¹⁰⁶. İlk olarak 2006 yılında aktif sürveyans sistemi ile tüm ülkede yoğun bakımlardan hastane enfeksiyonlarının verilerinin toplandığı Ulusal Hastane Enfeksiyonları Sürveyans Ağı (UHESA) verilerine göre 2008-2013 yılları arasında Türkiye genelinde MRSA oranı sırasıyla % 56,1; 68,4; 53,4; 55,33; 53,88; 49,37'dir¹⁰⁷.

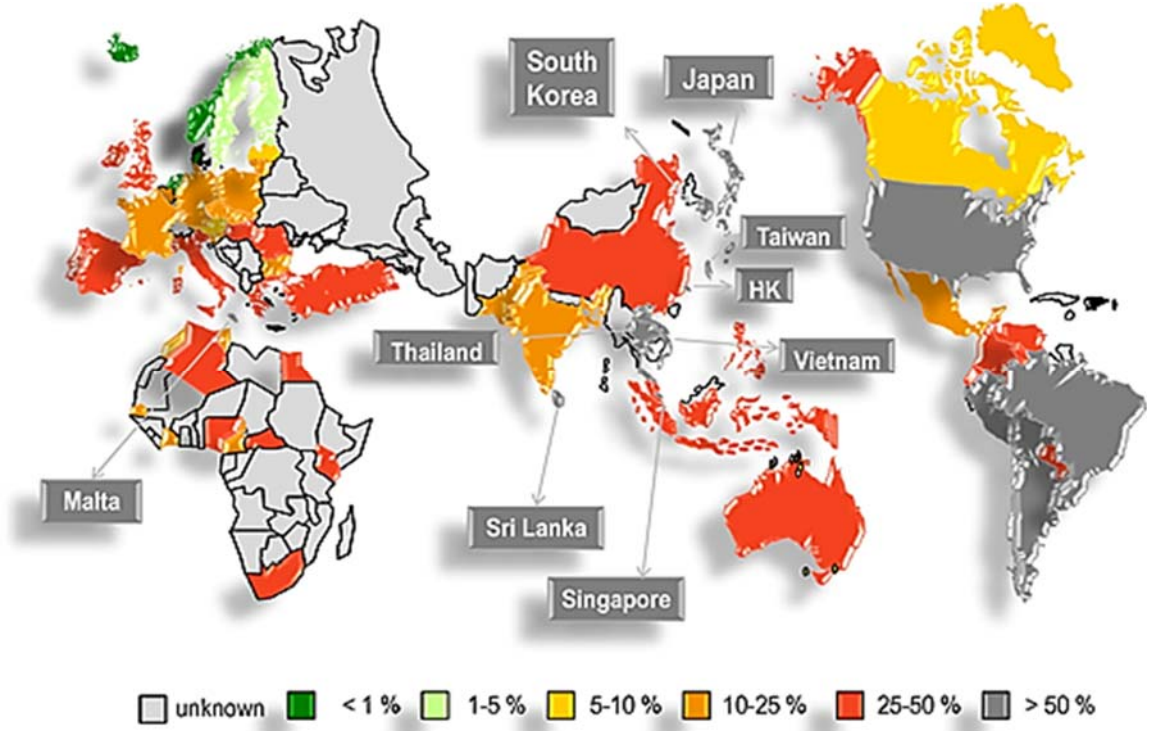
İlk tanımlandığı günden itibaren MRSA dünya çapında hızla yayılmıştır. İlk yıllarda ilaç direnci için yeni gen kazanmış olan bu suşların tek bir başarılı klondan

köken aldığı düşünülse de 2002’de 20 ülkeden toplanan suşlarla yapılan geniş çaplı bir çalışmada MLST ile tüm MRSA izolatlarının beş MLST klonol kompleksi içerisinde bulunan 11 major klondan oluştuğu ve ilk MRSA’nın ise ST250’den geliştiği fikri ortaya konulmuştur ve çeşitli çalışmalarla desteklenmiştir. Günümüzde de ST250’nin bir minör varyantı olan ve Iberian klonu olarak da adlandırılan ST247 klonu dünyada dolaşan majör klonlardan birisidir¹⁰⁸.

2.11.2.1. HK-MRSA Enfeksiyonları

MRSA, tüm dünyada hastanelerde yüksek prevelansa sahip bir bakteridir. Çalışmalardan elde edilen verileri kıyaslamak çalışma planlarının ve çalışmaya dahil edilen örneklerin seçiminin farklı olması nedeniyle mümkün olmasa da en yüksek oranlar % 50’nin üstünde olup, Kuzey ve Güney Amerika’dan, Asya ve Malta’dan bildirilmiştir. Çin, Avusturalya, Afrika ve Avrupa’da bazı ülkelerde (Portekiz % 49, Yunanistan % 40, italya % 37, Romanya % 34) orta derecede yüksek prevelanslar (%25-50) bildirilmiştir. İskandinavya ve Hollanda’da ise MRSA prevelansı çok düşük olarak bildirilmektedir^{105,109-111}.

Avusturya, Fransa, İrlanda ve Yunanistan’ da MRSA prevelansı düşmekle beraber diğer Avrupa ülkelerinde stabil olduğu bildirilmektedir¹⁰⁵. Doğu Asya’da hastane kökenli *Staph. aureus* enfeksiyonları içinde MRSA oranı özellikle Sri Lanka’da (% 86,5), Güney Kore’de (% 70,6), Vietnam’da (% 65), Tayvan’da (% 65), Hong Kong’da (% 56,8) olmak üzere çok yüksek; Hindistan (% 22,6) ve Filipinlerde (% 38) ise daha düşük olarak tespit edilmiştir^{10,110} (Şekil 6). Ülkemizde ise bu oran UHESA verilerine göre son 5 yılda yaklaşık % 49-68 seviyelerinde değişmektedir¹⁰⁷.



Şekil 6: HK-MRSA'nın dünya çapında prevalansı¹¹⁰.

Çeşitli ülkelerden 1961-2008 yılları arasında en sık bildirilen MRSA klonlarının MLST ile analiz edildiği çalışmada hemen hemen tüm klonların CC5, CC8, CC22; CC30 ve CC45 klonal kompleksleri içerisinde yer aldığı ve bu komplekslerin içerisinde birbirinden nokta mutasyonu farklılıkları ile ayrılan sekans tipleri (ST) bulunduğu gösterilmiştir. CC5 ve CC8 tüm dünyada en prevalan CC olarak tespit edilmiştir¹⁰⁸. CC22 de global olarak yayılmış diğer bir klonal komplekstir. CC36-ST36, ABD ve Birleşik Krallık'ta; CC45 ise ABD ve tüm Avrupa'da yaygındır^{90,112}. En sık görülen Asya klonları CC8-ST239, CC5-ST5 ve CC22-ST22'dir^{142,144}. Ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalarda baskın klonun yaklaşık % 80 oranında CC8-ST239-III-t030 olduğu gösterilmiştir¹¹³. Son zamanlarda Asya'da yapılan çalışmalar CC8-ST239-III-t037 klonunun Güney Kore, Vietnam, Hong Kong, Tayvan'da; CC5-ST5-II-t002 klonunun Güney Kore ve Sri Lanka'da hastanelerden topluma yayıldığı ve artık epidemiyolojik olarak TK-MRSA olarak düşünüldüğünü göstermiştir¹¹⁰. CC5-ST5, CC8-ST239, CC30 Latin Amerika'da da baskın klonlardır^{111,114}. Afrika'dan bildirilen kısıtlı verilere göre buradaki baskın klonlar CC8-ST239 ve daha az sıklıkla CC8-ST612 (sadece Güney Afrika ve Avusturalya'dan bildirilmiştir), CC5-ST5 ve CC30'dur^{115,116}(Tablo7).

Filogenetik çalışmalar, tüm dünyada yaygın olarak bulunan bazı HK-MRSA klonlarının farklı ülkelerde değişik zamanlarda MSSA'lerden *mec* geni kazanımı ile evrimleştiğini yani ülkeler arası yayılmadığını bazı klonların ise ülkeler arası geçişlerle yayıldığını göstermiştir. Örneğin CC5 MRSA farklı ülkelerde CC5 MSSA'dan farklılaşmıştır ve ülkeler arasında geçişi yoktur. CC8-ST239 MRSA'nın ise Güney Amerika'dan Avrupa'ya; Tayland'dan Çin'e geçtiği izlenmiştir¹¹⁷⁻¹¹⁹.

Tablo 7. HK-MRSA klonlarının genotip özellikleri ve coğrafi dağılımı⁹⁰.

HK-MRSA klonu	ST	CC	SCCmec	spa	Coğrafi bölge
Archaic	250	8	I	t008, t009, t194	Alm, Ast, Dan, İsp, Kan, Uga, UK, USA
Berlin(USA600)	45	45	IV	t004, t015, t026, t031, t038, t050, t065, t204, t0230, t390	Alm, Ast, Aus, Bel, Çin, Dan, Erm, Fin, Mac, Hol, İsr, İsp, İsv, İsç, Nor, USA.
Brazilian/ Hungarian	239	8	III	t030, t037, t234, t387, t388	Alm, Arj, Ast, Aus, Bre, Czy, Çin, Çek, Dan, End, Fin, Hin, Hol, İsp, İsv, Kan, Kore, Moğ, Mac, Nor, Por, Pol, Rus, SA, Sin, Slo, Sri, Şili, Tür, Tyl, Tyv, UK, Uru, USA, Vie, Yun.
Iberian	247	8	I	T008, t051, t052, t054, t200	Alm, Aus, Bel, Hir, Çek, Dan, Fin, Fra, Hir, Hol, İsç, İsp, İsr, İsv, İta, Mac, Nor, Pol, Por, UK, USA.
Irish-1	8	8	II	t008, t024, t064, t190, t206, t211	Ast, İrl, Kan, UK, USA.
NewYork/ Japan (USA100)	5	5	II	t001, t002, t003, t010, t045, t053, t062, t105, t178, t179, t187, t214, t311, t319, t389, t443	Alm, Ast, Bel, Çin, Dan, Fin, Fra, İrl, İsç, İsr, İsv, Jap, Kor, Mek, Nor, Por, SA, Tyv, Uru, UK, USA.
Pediatric (USA800)	5	5	IV	t001, t002, t003, t010, t045, t053, t062, t105, t178, t179, t187, t214, t311, t319, t389, t443	Alm, Arj, Ast, Aus, Bre, Czy, Dan, Fin, Fra, İsp, İsç, İsv, Kol, Kor, Nor, Por, Tür, Uru, UK, USA.
Southern Germany	228	5	I	t001, t023, t041, t188, t201	Alm, Aus, Bel, Fin, İsç, İsp, İta, Mac, Pol, Slo.
UKEMRSA-2/-6 (USA500)	8	8	IV	t008, t024, t064, t190, t206, t211	Alm, Ast, Aus, Bel, Dan, Fin, Fra, Hol, İrl, İsç, İsr, Jap, Kan, Mac, Nor, Tyv, UK, USA.
UKEMRSA-3	5	5	I	t001, t002, t003, t010, t045, t053, t062, t105, t178, t179, t187, t214, t311, t319, t389, t443	Alm, Arj, Dan, Jap, Nor, Par, Pol, Por, Slo, Tyv, UK.
UKEMRSA-15	22	22	IV	t005, t022, t032, t223, t309, t310, t417, t420	Alm, Ast, Aus, Bel, Çin, Çek, Dan, Fin, İrl, İsp, İsv, Kan, Küv, Mal, Mac, Nor, Por, Sin, UK, YZ.
UKEMRSA-16 (USA200)	36	36	II	t008, t253, t418, t419	Alm, Ast, Aus, Bel, Dan, Fin, İrl, İsç, İsp, İsv, Kan, Mek, Nor, Por, UK, USA.

Alm: Almanya, Arj: Arjantin, Ast: Avusturalya, Aus: Avusturya, Bel: Belçika, Bre: Brezilya, Czy: Cezayir, Çek: Çek Cumhuriyeti, Dan: Danimarka, End: Endonezya, Erm: Ermenistan, Fin: Finlandiya, Fra: Fransa, Hir: Hırvatistan, Hin: Hindistan, Hol: Hollanda, İsç: İsviçre, İsp: İspanya, İsr: İsrail, İsv: İsveç, İrl: İrlanda, İta: İtalya, Jap: Japonya, Kan: Kanada, Kol: Kolombiya, Kor: Kore, Küv: Küveyt, Mac: Macaristan, Mal: Malta, Mek: Meksika, Moğ: Moğolistan, Nor: Norveç, Pol: Polonya, Por: Portekiz, Rus: Rusya, SA: Suudi Arabistan, Sin: Singapur, Slo: Slovakya, Sri: Sri Lanka, Tür: Türkiye, Tyl: Tayland, Tyv: Tayvan, Uru: Uruguay, Uga: Uganda, UK: United Kingdom, USA: United States of America, Vie: Viyetnam, Yun: Yunanistan, YZ: Yeni Zelanda.

2.11.2.2. TK-MRSA Enfeksiyonları

Toplum kökenli MSSA'nın SCCmec geni kazanımı ile ortaya çıktığı kabul edilen TK-MRSA, ilk kez 1990'lı yılların başında batı Avustralya ve Yeni Zelanda'da, 2000'li yılların başında ABD'de ortaya çıkmıştır ve hızla yayılmıştır. Daha çok yaşlı, cerrahi ve antimikrobiyal kullanım öyküsü gibi risk faktörleri olan hastaları etkileyen HK-MRSA'nın tersine TK-MRSA genç ve sağlıklı bireyleri etkilemektedir. Yine HK-MRSA'dan farklı olarak TK-MRSA taşıdığı daha küçük boyuttaki SCCmec geni (genellikle tip IV veya V) ile non- β -laktam antibiyotiklere karşı nadiren direnç gösterir ve birçoğu PVL üretir^{49,120}.

CDC kriterlerine göre:

1. Ayaktan muayenesinde MRSA tanısı almış ya da hastaneye yatışının ilk 48 saati içinde alınan kültürlerinde MRSA izole edilmiş ise,
2. Daha önceden MRSA enfeksiyonu ya da kolonizasyonu hikayesi yoksa,
3. Hastanın son bir yıl içinde hastaneye yatış, dializ merkezinde tedavi ya da bakım evinde kalma hikayesi yoksa,
4. Hastanın derisini delerek vücuduna giren (perkutanöz) herhangi bir kateter, şant ya da protezi yoksa bu hastalardan izole edilen MRSA suşu TK-MRSA olarak nitelendirilebilir¹²¹. CDC'nin tanımı yol gösterici olsa da *Staph. aureus*'un toplum kökenli olup olmadığı kesin olarak ancak moleküler yöntemlerle tespit edilebilmektedir.

ABD'de yapılan bir çalışmada TK-MRSA izolatlarının % 97'sinin USA300 (CC8-ST8); SCCmec tip IV; PVL(+); rifampisin, trimetoprim sülfametoksazol, klindamisin ve tetrasikline hassas klonu olduğu gösterilmiştir^{49,120,122}. Ayrıca bu klon *Arginin Catabolic Mobile Genetic Element* (ACME) taşıması ile diğer TK-MRSA'lardan ayrılmaktadır. Bu gen kümesi bakterinin spermin ve spermidin gibi poliaminlere karşı dirençli olmasını sağlamaktadır. Bunun da USA300'ün başarılı bir klon olmasının önemli bir nedeni olduğu düşünülmektedir¹²³. Sıklıkla yumuşak doku enfeksiyonlarından sorumlu olmakla birlikte nekrotizan pnömoni gibi ciddi enfeksiyonlara da neden olan bu klon daha sonra hastanelere girerek hastane enfeksiyonlarında majör etken haline gelmiştir^{49,120,122}. San Fransisko'da yapılan bir

çalışmada TK-MRSA prevelansının (316/100000) HK-MRSA'dan (31/100000) yaklaşık on kat daha yüksek olduğu ve her ikisinde de baskın klonun USA300 olduğu gösterilmiştir (TK-MRSA, % 78,5 USA300; HK-MRSA, % 43,4 USA300)¹²⁴. Başka bir çalışmada TK-MRSA enfeksiyonlarına paralel olarak Amerika'da nazal MRSA taşıyıcılığının 2001-2002'de % 8 iken 2003-2004'de % 17,2'ye yükseldiği bildirilmiştir¹²⁵.

Amerika'ya kıyasla batı Avrupa'da TK-MRSA daha az sıklıkla görülür. USA300 klonunun Amerika'dan Avrupa'ya yayılıp az sayıda vakaya neden olduğu bildirilse de CC80-ST80 (SCCmec tip IV, PVL pozitif) Avrupa'da en sık görülen TK-MRSA klonudur^{126,127}. Doğu Asya'da ise TK-MRSA oranları tüm MRSA enfeksiyonları içinde % 5 (Tayland ve Hindistan) ile % 30 (Vietnam, Filipinler, Tayvan, ve Sri Lanka) arasında değişmekte ve en sık görülen klonlar ST259, ST30, ST239 ve ST72'dir¹¹⁰(Tablo 8).

Tablo 8. TK-MRSA klonlarının genotipik özellikleri ve coğrafik dağılımı⁹⁰.

TK-MRSA klonu	ST	CC	Spa	SCCmec	Coğrafik bölge
Avrupa	80	80	t044, t131, t376, t416, t455, t109,	IV	Alm, Ast, ,Aus, Bel, Bul, Czy, Dan,Fin, Fra, Hır, Hol, İsp, İrl, İsç, İsv, Lib,Nor, Rom, Sin, Slo, Tun, UK, Yug, Yun
Güneybatı Pasifik (USA100)	30	30	t012, t018, t019, t021, t038, t268, t276, t318, t338, t391	IV	Alm, Ast, Aus, Bel, Bre, Çin, Dan, Fin, Hol, Mıs, İrl, İsç, İsp, İsv, Jap, Let, Nor, Rus, Sin, Spa, Swe, Swi, UK, Uru, YZ, USA
USA400	1		t127, t128, t174, t176, t386, t558	IV	Alm, Ast, Fin, Fra, İsç, Kan, Sin, Uru, USA
USA300	8	8	t008, t024, t064, t190, t206, t211	IV	Alm, Ast, Aus, Bel, Bul, Çin, Dan, Fra, Hol, İrl, İsç, İsp,İsv, Kan, Kor, Nor, UK, USA, Yun.
USA1000	59	59	t199, t216, t444	IV, VII	Alm, Ast, Çin, Fra, Hol, İsv, Nor, Sin, Tyv, USA

Alm: Almanya, Ast: Avusturalya, Aus: Avusturya, Bel: Belçika, Bre: Brezilya, Czy: Cezayir, Dan: Danimarka, Fin: Finlandiya, Fra: Fransa, Hır: Hırvatistan, Hol: Hollanda, İsç: İsviçre, İsp: İspanya, İsv: İsveç, İrl: İrlanda, Jap: Japonya, Kan: Kanada, Kor: Kore, Nor: Norveç, Rus: Rusya, Sin: Singapur, Slo: Slovakya, Tyv: Tayvan, Uru: Uruguay, UK: United Kingdom, USA: United States of America, Vie: Viyetnam, Yun: Yunanistan, YZ: Yeni Zellanda.

2.12. Tedavide Kullanılan Antibiyotikler ve Direnç Mekanizmaları

Stafilokoklara bağı enfeksiyon hastalıkları yüzyıllardır insanlığın önemli sağlık sorunlarından biri olmuştur. Özellikle hastane kökenli enfeksiyonların önde gelen sebeplerinden biri olan MRSA, hayatı tehdit eden ciddi enfeksiyonlara neden olmaktadır. Çoklu antibiyotik direncine sahip bu suşlar hastanede kalış süresinin uzamasına neden olmakta ve sağlık sistemine ciddi bir mali yük getirmektedir.

Staph. aureus, klinik kullanımda olan antibiyotiklerin çoğuna direnç geliştirme yeteneğinde olup tüm dünyada çeşitli antibiyotiklere karşı değişik direnç oranları rapor edilmiştir. Direnç gelişiminde pek çok mekanizma rol oynamaktadır. Bunlardan en önemlileri patojenite adaları ve hareketli genetik elementlerdir. SCCmec, MRSA'lar tarafından taşınmakta ve metisilin direncinden sorumlu *mecA* gen dizisini içermektedir. Ayrıca bu genomik adada, *mecA* geninden başka, diğer antibiyotiklere dirençten sorumlu genler, insersiyon gen dizileri ve fonksiyonları henüz tanımlanmamış genler yer alır. Fakat virülansla ilgili genler bulunmamaktadır^{90,91}.

2.12.1. β -Laktamlar

B-laktam antibiyotikler, G(+) ve G(-) bakterilerde bulunan peptidoglikan sentezindeki transpeptidasyon ve transglikozilasyon basamaklarından sorumlu enzimler olan *Penicillin Binding Proteins* (PBPs)'i hedef alarak aktif bölgelerindeki serin rezidülerini kalıcı olarak açillerler. Stafilokoklarda dört adet PBP (I-IV) bulunmaktadır. *Staph. aureus*, % 95 oranında sahip olduğu β -laktamaz (penisilinaz) enzimi ile β -laktam halkasındaki amid bağı hidroliz etmektedir. Bu yüzden benzilpenisilin yapısındaki fenoksi grubunun yerine metoksi grubunun eklenmesi ile elde edilen metisilin (2,6-dimetoksifenilpenisilin) ve diğer β -laktamaz enzimine dirençli antibiyotikler (metisilin, oksasilin, nafsilin, kloksasilin, dikloksasilin) tedavide kullanılmaya başlanmıştır. Ancak bu antibiyotiklere de farklı bir mekanizma ile kısa sürede direnç gelişmiştir¹²⁸.

Stafilokoklardaki metisilin direnci üç farklı mekanizma ile gerçekleşmektedir.

2.12.1.1. Yeni Bir Penisilin Bağlayıcı Protein (PBP2a) Sentezi

En sık karşımıza çıkan mekanizma *mecA* genini taşıyan SCCmec'in bakteri kromozomuna integre olması ile ortaya çıkar. Kaynağının normal florada da bulunan

Staph. sciuri olduğu düşünölen bu gen, genetik alt yapısı uygun olan başarılı *Staph. aureus* suşları tarafından alınarak ve eksprese edilerek tüm dünyaya yayılmıştır^{128,129}.

mecA geninin etkisi ile MRSA suşlarında PBP2' ya da PBP2a denilen ve aktif bölgesi β -laktam antibiyotiklere karşı PBP'den daha düşük afinite gösteren bir protein üretilir. Böylece bakteri hücre duvarı için gerekli olan peptidoglikan sentezi metisilin varlığında da devam etmektedir^{128,129}.

Stafilokoklarda PBP2a sentezinin düzenlenmesinde *mecR1* (regülatör) ve *mecI* (inhibitör) adı verilen iki düzenleyici gen önemli rol oynar. Bu genler *mecA* geninin transkripsiyonunu düzenlemektedirler. *mecR1* membrana bağlı bir sinyal taşıyıcı protein olan MecR1'i kodlarken *mecI* transkripsiyonel inhibitör bir protein olan MecI'yı kodlar. *mecA* genini taşıyan suşların metisilin dirençli fenotipe sahip olmaları için *mecI* geninde fonksiyonunu bozan mutasyonlar olması veya hedef bölgesinde afiniteyi bozan mutasyonlar olması gereklidir^{128,130}. Bu genlerin ürünleri olan *MecR1* ve *MecI* proteinleri, β -laktamaz üretimini sağlayan plazmid ilişkili indüklenebilir *blaZ* gen sisteminin düzenleyici proteinleri olan BlaR1 ve BlaI proteinleri ile büyük oranda benzerlik gösterirler. Bu durum *mecA* sisteminin düzenleyici genlerinin *blaZ* gen sisteminden geliştiğini düşündürmektedir. Bu nedenle *blaZ* geni, BlaR1 ve BlaI proteinleri kontrolünde PBP2a üretimini indükleyebilmektedir^{128,131,132}.

BlaI, ortamda antibiyotik baskısı olmadığında operatör bölgeye bağlanarak *blaZ* ve *blaR1* ekspresyonunu baskılamaktadır. β -laktam antibiyotik varlığında ise membranda bulunan BlaR1 proteinini; ekstrasellüler penisilin bağlayan domaini ile penisilini algılar ve bir çinko metalloproteinaz olan sitoplazmik domaini otokatalitik aktivite ile membrandan ayırarak BlaI'i inaktive eder. BlaI'nin baskılayıcı etkisi kalkınca fazla miktarda beta laktamaz sentezlenmeye başlar. *mecA* geni indüklenebilir bir gen olmamasına rağmen çapraz etki ile BlaR tarafından indüklenebilir^{128,131}.

Tek başına PBP2a eksprese etmesi bir popülasyondaki tüm bakterileri tek tip olarak yüksek dirençli hale (homolog direnç) getirmemektedir. Bunun yerine daha sık olarak; kolonideki bütün bakterilerin *mecA* genini taşıdığı ancak yaklaşık 10^{-6} bakteride yüksek düzey direncin görüldüğü ve farklı düzeylerde dirençli subpopülasyonların olduğu heterojen tip direnç karşımıza çıkmaktadır. Bunun nedeni *mecI* baskılayıcı geninin mutasyonlar sebebiyle farklı subpopülasyonlarda farklı düzeyde aktif olmasıdır^{128,133,134}.

mecA genini taşıdığı halde *mecI* geninin baskılayıcı etkisinden dolayı metisilin duyarlı fenotip gösteren suşlara pre-MRSA denmektedir. Deneysel olarak bu suşlara düşük doz metisilin uygulandığında *mecR* uyarılıp MecI proteininin etkisi azaltılarak heterotip dirençli bir popülasyon elde edilmektedir. Heterotip dirençli popülasyona yüksek doz metisilin uygulandığında ise düşük direnç gösteren subpopülasyonlar seleksiyona uğrayarak homolog yüksek dirençli bir popülasyon elde edilmektedir^{166,167}. Bu nedenle antibiyogram sırasında MecR'yi daha iyi uyaran sefoksitin kullanımı direnç tespit ihtimalini arttırdığı için önerilmektedir.

Üçüncü direnç fenotipi ise karşıt olarak düşük düzey metisiline hassasken yüksek düzeylerde direnç sergileyen *eagle* tip dirençtir. Burada *mecI* genindeki mutasyonlara ek olarak *mec* geni dışındaki kromozomal mutasyonların da *mecA* geninin süpresyonuna katkıda bulunduğu düşünülmektedir (örneğin *hrmA* ve *B, llm, lyt, rpoB* genleri). Pre-MRSA popülasyonlarına yüksek doz metisilin uygulanması *eagle* tip dirençli subpopülasyonun hakim olmasına neden olur. *Eagle* tip dirençli popülasyona düşük doz metisilin uygulandığında ise homojen dirençli popülasyon elde edilir^{128,133,134}.

Bu mekanizmadan başka *factors essential for the expression of methicillin resistance (fem)* veya *auxiliary (aux)* olarak da adlandırılan, *mecA* gen bölgesinden farklı bir bölgede yer alan bir grup gen sistemi (*femA, femB* ve *femX*) de β -laktam direncini etkilemektedir. Bu sistem yirmi kadar proteini ifade eder. Bu proteinler PBP2a'yı etkilememektedirler ancak çoğu peptidoglikan yapımında görev alır. Peptidoglikan zincirleri arasına glisin rezidüleri ekleyerek pentaglisin yapıyı oluştururlar. *fem* faktörlerinin enzimatik aktiviteleri de vardır. Doğrudan ya da direkt olarak metisilin direncine de etki ederler¹²⁸.

mecA genini taşıyan plazmid ve transpozonlar, β -laktam antibiyotiklerden başka, kinolonlar, makrolidler, kloramfenikol, klindamisin tetrasiklinler, aminoglikozidler, sülfametoksazol/trimetoprim, rifampin direncinden sorumlu genleri de taşımaktadırlar⁹⁰.

2.12.1.2. Aşırı Miktarda β -laktamaz Salgılanması

Aşırı miktarda β -laktamaz, sınırda (borderline) metisilin direncine neden olmaktadır. Metisilin β -laktamaz enzimine dayanıklıdır. Ancak, metisiline direnç

gelişimine aşırı miktarda β -laktamaz üretiminin de neden olabileceği gösterilmiştir. Bu suşlar BORSA (*Borderline resistant Staph. aureus*) olarak adlandırılırlar¹³⁵.

2.12.1.3. PBP'lerdeki Yapısal Değişiklikler

Bazı MRSA suşları β -laktamaz üretemezler ve *mecA* geni taşımazlar. Ancak metisiline orta düzeyde dirençlidirler. Bu direnç türünün mekanizmasının, PBP'lerin yapısındaki diğer mutasyonel değişikliklerle ilgili olduğu düşünülmektedir. Bu tip dirençli suşlara MODSA (*Modified resistant Staph. aureus*) adı verilmektedir¹³⁶.

Yeni geliştirilen V. Kuşak sefalosporinler olan seftarolin ve seftabiprol, PBP2a'ya karşı yüksek afinite göstermekte ve böylece bakteri duvar sentezini inhibe edebilmektedir. MRSA tedavisinde özellikle yumuşak doku enfeksiyonlarında klinik başarı sağladığı kanıtlanıp kullanımı onay almıştır¹³⁷.

2.12.2. Aminoglikozidler

Aminoglikozidler tek başlarına kullanımda yüksek direnç geliştirme riskinden dolayı ÇİD *Staph. aureus* tedavisinde sinerjistik etkisinden faydalanılarak glikopeptidlerle kombine kullanılırlar. Gentamisin, netilmisin ve tobramisin stafilokoklara karşı en aktif aminoglikozidlerdir. Aminoglikozid direnci 1960'larda tüm aminoglikozitlere direnç gösteren vakaların bildiriminden bu yana bilinmektedir. Aminoglikozid direnci üç mekanizma ile gerçekleşebilir. İlk mekanizma aminoglikozit modifiye edici enzimler (AME) tarafından ilacın inaktive edilmesidir. Bu enzimler ilaç molekülündeki amino grubunu asetilleyen asetiltransferazlar, hidroksil grubunu fosforile eden fosfotransferazlar veya hidroksil grubunu adenile eden nükleotidiltransferazlardır. *Staph. aureus*'da aminoglikozid direnci genellikle AME ilişkilidir ve en sık görülen AME tipleri; düşük düzey dirençten sorumlu olan aminoglikozitd-3''-O-fosfotransferaz III [aph(3')-III], aminoglikozid-4'-O-fosfotransferaz I [ant(4')-I] ile gentamisin ve streptomisine yüksek direnç tobramisine düşük düzey dirençten sorumlu ve en sık görülen AME olan bifonksiyonel aminoglikozit-6'-N-asetiltransferaz/2''-O-fosfotransferaz [aacc(6')-aph(2'')]'dir. AME bağlı olmayan ikinci yol ilacın hedefi olan ribozomal proteinleri kodlayan genlerde mutasyon meydana gelmesi, üçüncü yol ise spesifik olmayan membran transport

defekti, hücre duvar geçirgenliğinin azalması gibi ilacın hücre içine alınmasını engelleyen mekanizmalardır ve daha az görülürler^{138,139}.

2.12.3. Kloramfenikol

Kloramfenikol direncinde sorumlu mekanizma genellikle *Chloramphenicol acetyltransferase* (CAT) enzimi ile ilacın inaktive edilmesidir. G(-) bakterilerde A ve B olmak üzere iki tip CAT geni olsa da stafilokok türlerinde sadece tip A CAT plazmid üzerinde veya kromozomda kodlanabilir. Eflüks sistemleri, fosfotransferazlarla inaktivasyon, hedef bölgede mutasyon ve geçirgenlik azalması da diğer nadir görülen kloramfenikol direnç mekanizmalarıdır. Kemik iliği süpresyonu yaptığı için ilk seçenek olarak kullanılmamaktadır^{140,141}.

2.12.4. Makrolid, Linkozamid ve Streptogramin B (MLSB)

Makrolid, linkozamid ve streptogramin G(+) etkenlerle gelişen enfeksiyonların tedavisinde önemli antibiyotiklerdir. Klindamisin iyi oral biyoyararlanımı, penisilin alerjisi olan hastalarda alternatif ilaç olması, dokuya iyi geçişi, abse içinde birikebilmesi, renal doz ayarı gerektirmemesi nedeni ile ayaktan tedavi gören hastalarda sık tercih edilen bir ilaçtır. Streptograminler ise MRSA'da etkili ilaçlardır. Tek başlarına sınırlı etkileri varken sabit konsantrasyonda % 30 kinopristin, % 70 dalfopristin olarak kullanıldıklarında sinerjistik etki gösteren antibiyotiklerdir¹⁴²⁻¹⁴⁴.

Erm (*Eritromycin ribosome methylation*) geni tarafından kodlanan metilaz enzimleriyle üç ilacın ortak hedefi olan 23S RNA'nın değişikliğe uğratılarak MLSB grubu ilaçların ribozomlara bağlanmasının engellenmesi bu ilaçlara karşı gelişen direncin en önemli mekanizmasıdır. Enzim plazmid (*ermB*, *ermC*) ya da transpozonlarda (*ermA*) kodlanmaktadır. Enzimin sentezi yapısal ya da indüklenebilen türdedir. MLSb direnci dalfopristin (streptograminA) duyarlılığını etkilemez. Kinopristin/dalfopristin kombinasyonuna duyarlılık devam eder ancak bakterisidal aktivite bakteriyostatik hale gelir^{142,144}.

Diğer direnç mekanizmaları ise ilaçları inaktive eden plazmid kaynaklı çeşitli enzimler ve eflüks pompa sistemleridir. Bu sistemler metilaz enziminden farklı olarak karışık olarak sentezlendikleri ilaçlara daha spesifiktirler^{142,144}.

2.12.5. Tetrasiklin

Tetrasiklin 1950 ve 1960 yıllarında sık kullanılan bir antibiyotikken birçok patojen mikroorganizmada artan direnç nedeni ile kullanımı azalmıştır. HK-MRSA'da kullanılmamakla beraber *invitro* duyarlı olduğunda indüklenebilen dirence rağmen TK-MRSA enfeksiyonlarında nadiren kullanılabilir. Tetrasiklin direnci üç mekanizmayla gerçekleşmektedir. İlk mekanizma *tetA, B, C, D, F, G, J, M* genlerinin kontrolünde sentezlenen eflüks sistemidir. İkinci mekanizma *tetK, L, M, O, S, Q, B, D, H, C* genlerinin kontrolündeki ribozomda hedef bölge değişikliği ve bazen beraberinde eflüks mekanizmasıdır. Üçüncü mekanizma ise *tetX* geni kontrolünde antibiyotiğin enzimatik değişikliğe uğratılmasıdır. *Staph. aureus*'da en sık eflüks sistemini kodlayan *tetK* ve ribozomal değişikliklerden sorumlu *tetM* geni bulunmaktadır. *tetM* geni kromozomal veya plazmid kaynaklı olup tetrasiklin ve minosiklin direcinden sorumludur. *tetK* ise indüklenebilir tipte kromozomal dirençtir ve minosiklini etkilemez¹⁴⁵⁻¹⁴⁷.

2.12.6. Kinolonlar

Başlangıçta özellikle 2. kuşak ajanlardan siprofloksasilin ve ofloksasilinin *Staph. aureus*'a karşı etkinliklerinin yüksek olsa da kısa sürede yaygınlaşan direnç nedeniyle artık kinolonlar primer anti-stafilokoksik ajanlar arasında yer almamaktadır. Kinolonlara direnç üç mekanizma ile gerçekleşmektedir. İlk mekanizma ilacın hedefi olan DNA giraz ve topoizomera IV enzimlerini kodlayan *gyrA, C* ve *parC, E* genlerinde mutasyon meydana gelmesidir. İkinci mekanizma ilacın aktif olarak dışarı atılmasını sağlayan ve *mdfA, tolC* ve *ydhE* gibi genlerce kodlanan eflüks sistemidir. İlk iki mekanizma kromozomal olup üçüncüsü ise plazmidlerle taşınan ve topoizomeraza ilaca duyarlılığını azaltan *qnrA, B, S* ve *aac(6')-Ib-cr* gibi genlerdir^{148,149}.

2.12.7. Trimetoprim-Sülfametoksazol

Sinerjistik etkilerinden dolayı kombine preparatları tercih edilen antimikrobiyallerdir. Birçok G(+), G(-) kok ve basillere etkili olsalarda günümüzde yaygın kullanımları sonucu direnç görülme sıklığı artmıştır. *Staph. aureus*'ta trimetoprim direncinin ilaç hedefinde değişikliğe neden olan iki genetik mekanizması gösterilmiştir. Kromozomda dihidrofolat redüktaz enzimini (DHFR) kodlayan gende (*dfrB*) meydana

gelen mutasyonlar düşük düzeyde dirence neden olurken genellikle mobil genetik elementlerle kazanılmış olan genlerle [*dfrA* (*dfrS1*), *dfrG* ve *dfrK*] kazanılan varyant DHFR' lerde ki direnç ise daha yüksek düzeydedir. Sülfonamide karşı oluşan direnç ise kromozomal olarak dihidropteroat sentetaz (DHPS) enzimini kodlayan *folP* genindeki mutasyonlar sonucu veya varyant DHPS sentezleyen genlerin kazanımı (*sul1*, *sul2*) sonucu gerçekleşir. *Staph. aureus*'da en sık görülen direnç mekanizması *dfrG* geni kontrolünde ilaca afinitesi düşük olan yeni bir DHFR enziminin kazanılmasıdır^{150,151}.

2.12.8. Fusidik Asit

Fusidik asit MRSA'ya bağlı lokal ve sistemik hastalıkların tedavisinde kullanılan oral formu olan nadir antibiyotiklerdendir. Peptidil-tRNA' nın A bölgesinden P bölgesine taşınmasını katalize eden Elongasyon Faktör G (EF-G)'yi inhibe ederek protein sentezini durdurur. Klinik kullanımının sıklığına bağlı olarak son yıllarda fusidik asit direnci giderek artmaktadır. Direncin en sık nedeni EF-G' ye bağlanarak fusidik asidin etkisini engelleyen FusB tip direnç proteinlerinin (FusB ve FusC) sentezlenmesidir¹⁵².

2.12.9. Mupirosin

Yüzeyel stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde ve taşıyıcıların dekolonizasyonunda lokal olarak kullanılan bu ilaca karşı hem *Staph. aureus* hem de KNS'de giderek artan direnç bildirilmektedir. En sık neden yeni bir izölösil tRNA sentezi sağlayan plazmid kaynaklı *mupA* geni ve son yıllarda keşfedilen bir mobil direnç geni olan *mupB* geni olup yüksek düzeyde direnci sağlamaktadır. Kromozomal *ileS* genindeki nokta mutasyonları ise düşük düzeyde dirençten sorumludur¹⁵².

2.12.10. Rifampin

Rifampin, oldukça potent bakterisidal bir anti-stafilokokal olmasına ve doku ve abselere iyi dağılım göstermesine rağmen tek başına kullanıldığında RNA polimerazın β altgrubunu kodlayan *rpoB* geninde noktasal mutasyonlar sonucu yüksek seviyede direnç gelişimi görülebilmektedir. Bu nedenle stafilokok enfeksiyonlarında rifampinin tek başına kullanımı önerilmemektedir¹³⁷. Protez enfeksiyonlarında kombine tedavide yeri

olsa da ciddi *Staph. aureus* enfeksiyonlarında bakteriyeminin temizlenmesini geciktirmesi ve yüksek hepatotoksite riski nedeni ile önerilmemektedir¹⁴⁷.

2.12.11. Glikopeptidler

Glikopeptidler 1956'da kullanıma girmiştir ancak, önemi ve kullanımı MRSA'ların hızla yayılmasıyla günümüzde tekrar artmıştır. Kullanımda olan üyeleri vankomisin ve teikoplanin olup, etki bakımından birbirine benzer özellikler gösterirler ve birbirlerinin alternatifi olarak kullanılırlar. Glikopeptidler, G(+) hücre duvarını oluşturan peptidlerin terminal D-ala-D-ala dizisine bağlanarak transglikolizasyon reaksiyonunu ve peptidoglikan oluşumunu inhibe ederler. Uzun yıllardır kullanımda olmalarına rağmen halen yaygın bir *Staph. aureus* direnci görülmemiştir. Fakat son yıllarda kullanımları yaygınlaştığından azalmış duyarlılık gösteren suşlar bildirilmektedir¹⁵³.

İlk kez Japonya'dan Hiramatsu ve arkadaşları tarafından vankomisine orta düzeyde duyarlı [Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MİK): 8 µg/ml] *Staph. aureus* suşunun bildirilmesiyle, literatüre VISA ve Mu50 kavramı girmiştir¹⁵⁴. Japonya'da izole edilen Mu50 suşu (8 µg/mL) İngiliz standartlarına göre dirençli, NCCLS standartlarına göre ise orta duyarlı (*intermediate*) olarak değerlendirilmektedir¹⁵⁵. Mu50 gibi *intermediate* suşlar oldukça nadirdir. Daha sık görülen diğer bir vankomisin *intermediate* direnç tipi yine Japonya'da aynı araştırma grubu tarafından tespit edilmiştir. Vankomisin MİK değeri 2 µg/ml olan bu suş Mu3 olarak adlandırılmıştır¹⁹⁸. Bu direnç tipindeki suşlar vankomisinin duyarlılık sınırı (< 4 µg/mL) altında MİK değeri göstermektedirler, ancak 1/10⁻⁶ hücre > 4 µg/mL MIC değerine sahiptirler ve hetero-VISA (hVISA) olarak tanımlanırlar. Vankomisin MİK değeri 1-4 µg/mL olan stafilokok izolatları hVISA olabilir. Bu bakteriler aynı zamanda teikoplanine de dirençli olduğundan *Hetero-Glycopeptide Intermediate Staph. aureus* (hGISA) olarak da tanımlanmaktadırlar¹⁵⁵.

Stafilokoklarda, vankomisine orta düzeyde direncin nedeni, peptidoglikan biyosentezindeki değişikliğe bağlı olarak hücre duvarının kalınlaşması ve çapraz bağların zayıflamasıyla membran periferinde açıl-D-alanil-D-alanin hedeflerinin birikerek ilacın hücre içine geçişinin azaltılmasıdır¹⁵³. Bu VISA/hVISA suşlarının, laboratuvarlarda uygulanan rutin duyarlılık testleriyle saptanması güçtür. Bu izolatların

tespiti için vankomisin içeren (4-6 mg/l) beyin kalp infüzyon agar (BKİA) ile tarama, E-test, makro E-test ve PAP-AUC (*Population Analysis Profile Area Under the Curven*) olmak üzere farklı yöntemler kullanılmaktadır¹⁵⁵.

İlk VRSA ise 2002’de ABD’de tanımlanmıştır¹³⁶. Günümüze kadar ABD, Avrupa ve Hindistan’ da sayılı vakada tespit edilen VRSA izolatlarındaki direnç mekanizması, enterokoklarda vankomisin direncine neden olan ve bir transpozon (*Tn1546n*) tarafından taşınan *vanA* genine bağlı olan dirençtir¹⁵³.

VRSA’ların yaygınlaşmasından tüm dünyada korkulmaktadır. Bu yüzden özellikle hastane kökenli ciddi *Staph. aureus* enfeksiyonlarında kullanılmaları önerilmekte, diğer antimikrobiyallere duyarlı olan *Staph. aureus* suşlarının neden olduğu enfeksiyonlarda glikopeptidlerin son seçenek olarak kullanılması tavsiye edilmektedir^{153,155}.

2.12.12. Oksazolidinon

Linezolid; *Food and Drug Administration* (FDA) tarafından MRSA, VISA ve Vankomisin Rezistan Enterokok (VRE) gibi dirençli G(+) patojenlerle oluşan enfeksiyonların tedavisinde kullanım onayı alan tek oksazolidinon grubu antibiyotiktir. Ayrıca eperozolit, ranbezolit, AZD 2563, tedizolit gibi yeni oksazolidinon grubu antibiyotikler üzerinde de çalışmalar devam etmektedir. Oksazolidinonlar, ribozomun 23S subunitinde bulunan peptidil transferaza bağlanarak 70S oluşumunu engeller ve protein sentezinin başlamasını inhibe ederek bakteriyostatik etki gösterirler. İlk linezolid dirençli bakteri linezolidin kullanıma girişinden bir yıl sonra 2001’de bildirilmiştir ve günümüzde *Staph. aureus*’da direnç oranının % 1 olduğu belirtilmektedir. Linezolide en önemli direnç mekanizmaları; 23S rRNA geninin V domaninde mutasyonlar, ribozomal L3, L4 ve L22 proteinlerinde mutasyonlar ve *cfr* (*chloramphenicol florfenicol resistance*) geninin kodladığı metil transferaz enzimi varlığında 23S rRNA’nın A2503 bazının C-8 pozisyonundan metillenmesidir¹⁵⁷.

2.12.13. Daptomisin

Daptomisin, G(+) ve anarob bakterilere etkili kalsiyum bağımlı siklik lipopeptid bir antibiyotiktir. Dünyada 2003, ülkemizde 2009 yılından itibaren MRSA, VISA, VRSA dahil stafilokoklarla oluşan komplike deri ve yumuşak doku enfeksiyonları,

bakteriyemi ve endokarditte kullanılmaktadır. Etkisini göstermek için önce kalsiyum molekülüne bağlanan daptomisin, lipofilik kuyruğu ile lipoteikoik asite irreversible olarak bağlanır. Oligomerizasyon sonucu transmembran kanallar oluşturur. Bu kanallar hücre içi iyonların (K^+ , Mg^+) ve ATP'nin dışarı sızmasına, ayrıca makromoleküllerin sentezinin engellenmesine neden olur. Böylece hücre membran bütünlüğü bozulmadan ve bakteriyel toksin ve bileşikler ortama salınmadan bakteri ölümü gerçekleşir. Son yıllarda daptomisine artan oranlarda direnç bildirilmektedir. Direncin en önemli iki mekanizması bakteri membranındaki fosfotidilgliserolün lizinlenmesini kontrol eden *mprF* operonundaki tek nükleotid polimorfizmleri ve teikoik asit moleküllerinin D-alanillenmesini kontrol eden *dlt* operonunun aşırı ekspresyonudur. Böylece hücre membranının yükü, kalınlığı ve rijiditesi değiştirilerek antibiyotiğin afinitesi ve etkisi azaltılır^{158,159}.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Örnek Toplanması

Çalışmada, 2013-2014 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Balcalı Hastanesi Merkez Laboratuvarına gönderilen klinik örneklerden izole edilen 75 metisilin dirençli *Staph. aureus* suşu incelendi. Suşların identifikasyonu ve duyarlılık testleri laboratuvarında rutin olarak kullanılan Vitek 2 otomatize sisteminde yapıldı.

3.2. Klinik Örneklerden İzolasyon

Kliniklerden gelen kan kültürü şişeleri, rutin olarak BACTEC 9240 otomatize kan kültürü cihazına (Becton-Dickinson) konuldu ve cihaz pozitif uyarı verene kadar en fazla yedi gün inkübe edildi. Pozitif kan kültürleri Gram boyama ile değerlendirildi. Bronko-alveolar lavaj (BAL), trakeal aspirat örnekleri, beyin omurilik sıvısı (BOS), asit mayi, plevral mayi örnekleri, yara, apse, idrar örnekleri ve diğer klinik örnekler % 5 koyun kanlı agar (COS; bioMerieux), MacConkey agar (MCK; bioMerieux) ve çikolata besiyerine (PVX; bioMerieux) ekildi ve 35-37°C'de, 18-24 saat inkübe edildi. Bakteri üremesi tespit edilen besiyerlerindeki kolonilerden Gram boyası yapılarak G(+) kok olanlara katalaz ve plazma koagülaz testi uygulandı.

3.2.1. Katalaz Testi

Kanlı agardan lam üzerine alınan koloniye % 3'lük hidrojen peroksitten (H₂O₂) birkaç damla damlatıldı ve O₂ çıkışının izlenmesi pozitif test olarak kabul edildi.

3.2.2. Plazma Koagülaz Testi

Boyamasında G(+) kok görülen ve katalaz testi pozitif olan tüm izolatlarla koagülaz testi uygulandı. Çalışmada, tüp koagülaz testi yapıldı ve insan plazması kullanıldı. Besiyerinden öze ile alınan birkaç koloni, 1 ml insan plazması içinde ezildi ve emülsiyon haline getirildi. Tüpler 37°C'ye kaldırıldı. 2., 4. ve 24. saatlerde pıhtı oluşup oluşmadığı kontrol edildi. Bu süre içinde pıhtı oluşturmeyen suşlar koagülaz negatif kabul edildi.

3.2.3. Vitek 2 Otomatize Sistem:

Katalaz ve plazma koagülaz işlemlerinden sonra, suşlar identifikasyon ve duyarlılık için rutin olarak kullanılan Vitek 2 otomatize sisteme verildi. G(+) identifikasyon kartı GP (bioMerieux) ve G(+) duyarlılık kartı AST-P536 (bioMerieux) kullanıldı. Referans suş olarak *Staph. aureus* ATCC-29213 kullanıldı. Steril salinden (% 0,45 NaCl, pH 4,5-7.0) sistem için özel kullanılan şeffaf plastik deney tüpüne (12x75 mm) 3 ml konuldu. Tüpe öze ile saf koloniler aktarıldı ve McFarland 0,5-0,6'a eş değer yoğunlukta homojen bir süspansiyon hazırlandı. Süspansiyon tüpü, GP kartı ve AST-P536 kartı kasete yerleştirildi. Veri girişi ve kasetin cihaza yüklenmesi Vitek 2 otomatize sistem kullanım talimatına uygun şekilde yapıldı.

Çalışmada incelenen toplam 86 suş gliserollü % 10 gliserol ve % 10 kan içeren triptik soy agar saklama besiyerine alınarak -20°C'de saklandı. Moleküler çalışma yapılacağı zaman kontaminasyonu elimine etmek için % 5 koyun kanlı agarda ve Endo agarda aerob şartlarda 37°C'de 1 gün süre ile inkübe edilerek üretildi ve Gram boyama, katalaz, koagülaz ve Chapman besiyerinde mannitol kullanımı testleri yapıldı. G(+) üzüm salkımı şeklinde kümeler oluşturan, katalaz (+), koagülaz (+), mannitol hidrolizi (+) bakteriler *Staph. aureus* olarak kabul edildi.

3.2.4. Kullanılan Besiyerleri

Bu çalışmada saklama besiyerlerindeki bakterilerin çoğaltılması ve doğrulanması amacı ile rutin olarak; kanlı agar ve Endo agar besiyeri kullanılmıştır. Daha ileri identifikasyon için Mannitollü tuz agar (Chapman besiyeri) kullanılmıştır ve suşlar kullanılabildiği kadar saklama besiyerinde bekletilmiştir.

3.2.4.1. Koyun Kanlı Agar

Çeşitli klinik ve polikliniklerden gelen örneklerden *Staph. aureus*'un izolasyonu amacı ile koyun kanlı agar kullanılmıştır.

Pepton (DIFCO 63928JB)	5 g
Et ekstresi (MERCK 1.03979)	5 g
NaCl (MERCK 1.06400)	5 g
Agar (LAB M MC2)	12 g

Distile Su	1000 ml
pH : 7,3 ± 0,2	

37 g toz besiyeri 1000 ml distile suda çözülerek 121°C’de 15 dakikada otoklavda steril edildi. Daha sonra üzerine 50 ml defibrine koyun kanı eklendi.

3.2.4.2. Endo Agar

Staph. aureus’un G(-) mikroorganizmalardan ayrımı için kullanılmıştır.

Et ekstresi (MERCK 1.03979)	3 g
Pepton (DIFCO 63928JB)	1 g
NaCl (MERCK 1.06400)	5 g
Agar (LAB M MC2)	20 g
Distile Su	1000 ml
pH: 7,3 ± 0,2	

Karışım 121°C’de 15 dakikada otoklavda steril edildi. Soğuduktan sonra üzerine, % 20’lik laktozdan (EGAŞ DMV) 50 ml, % 10 Na₂SO₃ (SIGMA 239321)’den 24 ml ve % 10 fuksin (SIGMA B0904)’den 4 ml eklendi.

3.2.4.3. Mannitollü Tuzlu Agar (Chapman besiyeri)

Mannitollü tuzlu agar ayırt edici ve seçici bir besiyeridir. *Staph. aureus*’un saf olarak elde edilmesi ve laboratuvarında tanımlanabilmesi açısından önemli olan mannitol fermentasyonunun gözlenebilmesi için mannitollü tuzlu agar kullanıldı.

Et ekstresi	10 g
Pepton	10 g
NaCl	75 g
Mannit	75 g
Agar (LAB M MC2)	15 g
Phenol kırmızısı, % 0,5	5 ml
Distile su	1000 ml

Agar, 500ml suda 121°C’de 15 dakika otoklavlandı. Et özütü 500 ml suda eritildi. pH 8,4 olacak şekilde ayarlandı, kaynar hale getirildi ve süzgeç kağıdı ile süzüldü. 500 ml’ye tamamlandı ve pepton, tuz ve mannit eritildi. Solüsyon sıcak iken erimiş olan agar ile birleştirildi. Fenol kırmızısı eklenerek karıştırıldı ve 121°C’de 15 dakika otoklavda bekletildi. Yaklaşık 60°C’ye gelince petrilere döküldü.

3.3. Moleküler Yöntemler

3.3.1.PFGE

3.3.1.1- PFGE’de Kullanılan Solüsyonlar ve Kimyasal Madeler

Hücre Süspansiyon Tamponu [HST (pH 7,2)]

Tris-HCl (SIGMA T-3253)	1,576g
EDTA (AMRESCO 0105-500)	18,61g
NaCl	1,17g

Ultrapür su ile 100ml’ye tamamlandı ve pH: 7,2’ye ayarlandı.

Lizis I Solüsyonu (pH:8,0)

Tris-HCl (SIGMA T-3253)	0,788g
EDTA (AMRESCO 0105-500)	9,306g
NaCl	1,461g
N-lauryl Sarcosine (AMRESCO 0719-500)	2,5g
Deoxicolot	1g

Ultrapür su ile 100ml’ye tamamlandı ve pH ayarlandı.

Lizis II Solüsyonu

250 mM EDTA (AMRESCO 0105-500)	18,612g
N-lauryl Sarcosine (AMRESCO 0719-500)	5g

Ultrapür su ile 100 ml’ye tamamlandı. 0,5 M EDTA pH: 9,0’a ulaşana kadar tam olarak çözünmedi. Bu nedenle NaOH pelletleri kullanıldı. Her örnek solüsyonuna Proteinaz K (50 µg/ml) eklendi.

10X TE Solüsyonu (pH 7,6)

Tris-HCl (SIGMA T-3253)	1,576g
EDTA (AMRESCO 0105-500)	0,372g

Ultrapür su ile 100ml'ye tamamlandı.

10X TBE Solüsyonu (pH 8,4)

Tris-base (SIGMA T-1503) 108g

Borik Asit (MERCK 1.00165.0500) 55g

EDTA (AMRESCO 0105-500) 7,44g

Ultrapür su ile 1000ml'ye tamamlandı.

3.3.1.2. PFGE Yönteminin Uygulanması

3.3.1.2.1. İzolatların Hazırlanması

1. *Staph. aureus* suşlarını canlandırmak amacı ile ilk olarak % 5 koyun kanlı agara pasajlandı.
2. Saf kültür halinde üreyen koloniler plastik öze ile 1 ml HST içinde süspanse edildi.
3. Hücre süspansiyonu, 13.000xg'de 4°C'de 3 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant atıldı (HERAEUS Biofuge Primo R).
4. Pelletin üzerine tekrar 1 ml soğuk HST eklendi, pipetajla pellet homojen bir şekilde dağıtıldı ve yaklaşık McFarland 4 bulanıklığı olacak şekilde ayarlandı.

3.3.1.2.2. İzolatların Agaroza Gömülmesi

1. Kalıpların hazırlandığı agaroz kalıp aparatı buzdolabına konuldu.
2. HST'den alınan 9 ml içerisinde 0,2g low melting agar (BIO-RAD 161-3113EDU) eklendi ve mikrodalga fırında eritildi (BEKO MD1505).
3. Agarozdan 150µl ependorf tüplere dağıtılarak ve 50°C'deki kuru ısı bloğunda beklemeye alındı.
4. HST içinde hazırlanmış bakteri süspansiyonundan 150µl alınarak, 50°C'de bekleyen ve içinde 150µl agaroz bulunan tüpe eklendi.
5. Üzerine 2µl lizostafin eklenerek karışımın homojen olabilmesi için birkaç defa pipetaj işlemi yapıldı.
6. Bekletilmeden, hücre-agaroz karışımından agaroz kalıp aparatına dağıtıldı. Kalıplar, agaroz katılaşmaya kadar +4°C'de bekletildi.

3.3.1.2.3. Agaroz İçindeki Hücrelerin Parçalanması

1. Her agaroz kalıp için 5 ml’lik steril kapaklı tüplere, 0,5ml lizis I solüsyonu konuldu.
2. İçerisinde bakteri bulunan agaroz, kalıptan çıkarılarak lizis I solüsyonuna yerleştirildi.
3. Lizis I solüsyonuna alınan kalıplar 37°C’de 1 saat çalkalamalı su banyosunda bekletildi (MEMMERT WNE-14 WATERBATH).
4. Bu işlemin sonunda Lizis I solüsyonu dökülerek, yerine 0.5 ml hücre lizis solüsyon II eklendi ve 50°C’de yarım saat çalkalamalı su banyosunda bekletildi.

3.3.1.2.4. Hücre Lizizinden Sonra Agaroz Kalıplarının Yıkaması

1. Lizis aşamasından sonra yumuşayan agaroz kalıplarının katılaşması için tüpler buz içerisinde en az 15 dakika bekletildi ve lizis solüsyonu döküldü.
2. Daha sonra agaroz kalıpları 50°C’de 4 ml TE tamponuyla her yıkama 30 dakika olmak üzere 3 kez yıkandı. Son olarak rnekler TE içerisine konularak 4°C’de saklandı.

3.3.1.2.5. Agaroz Kalıpları İçindeki DNA’nın Enzimle Kesilmesi

1. Agaroz kalıbı bir lam üzerine alınarak bir bistr yardımıyla 1/3 oranında kesildi.
2. Parçalardan biri, 100 l 1X SmaI tamponu içine alınarak oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi ve daha sonra bu tampon boşaltıldı.
3. Her agaroz kalıbı için aşağıdaki enzim karışımı hazırlandı.
10 l 10X SmaI tamponu,
2,5l SmaI enzimi (10 U /l) (Fermentas)
1l BSA (10 mg /ml)
86,5l steril ultra saf su
4. Agaroz kalıbına bu karışım eklenerek çalkalamalı su banyosunda 30°C’de 2 saat inkübe edildi.
5. İnkübasyon sonunda tüpler buzdolabında 15 dakika bekletildi.

3.3.1.2.6. Elektroforez Jelinin Hazırlanması ve Kalıpların Jele Yüklenmesi

1. 2 litre 0,5X TBE buffer hazırlandı ve içerisinde 100 ml ayrılarak kalan tampon elektroforez tankına döküldü.
2. Ayrılan 100 ml tampon içerisine 1,1 g Pulsed-Field Certified (BIO-RAD) agaroz eklenerek % 1,1'lik agaroz hazırlandı ve mikrodalga fırında eritildi.
3. Agaroz dökülecek kaset hazırlandı, SmaI ile kesilmiş olan agaroz kalıpların her biri tarak dişlerinin uç kısmına yerleştirildi.
4. Tarağın kenar ve ortasındaki dişlerine marker kalıplar yüklendi ve kurutma kâğıdı ile agaroz kalıplarının kenarındaki sıvının fazlası alındı.
5. Tarak kalıplarla birlikte agaroz dökülecek kaset içine yerleştirildi.
6. Agaroz dikkatli bir şekilde hava kabarcığı oluşturulmadan kaset içine döküldü.
7. Oda ısısında 20 dakika katılaşmaya bırakıldı, dikkatlice tarak çekildi ve elektroforez tankına yerleştirildi.
8. Agaroz kasetinin çerçeveleri çıkarıldı ve tabla ile agaroz alındı. Daha sonra içerisinde 1900 ml 0.5X TBE tamponu bulunan PFGE tankına yerleştirildi.

3.3.1.2.7. Elektroforez

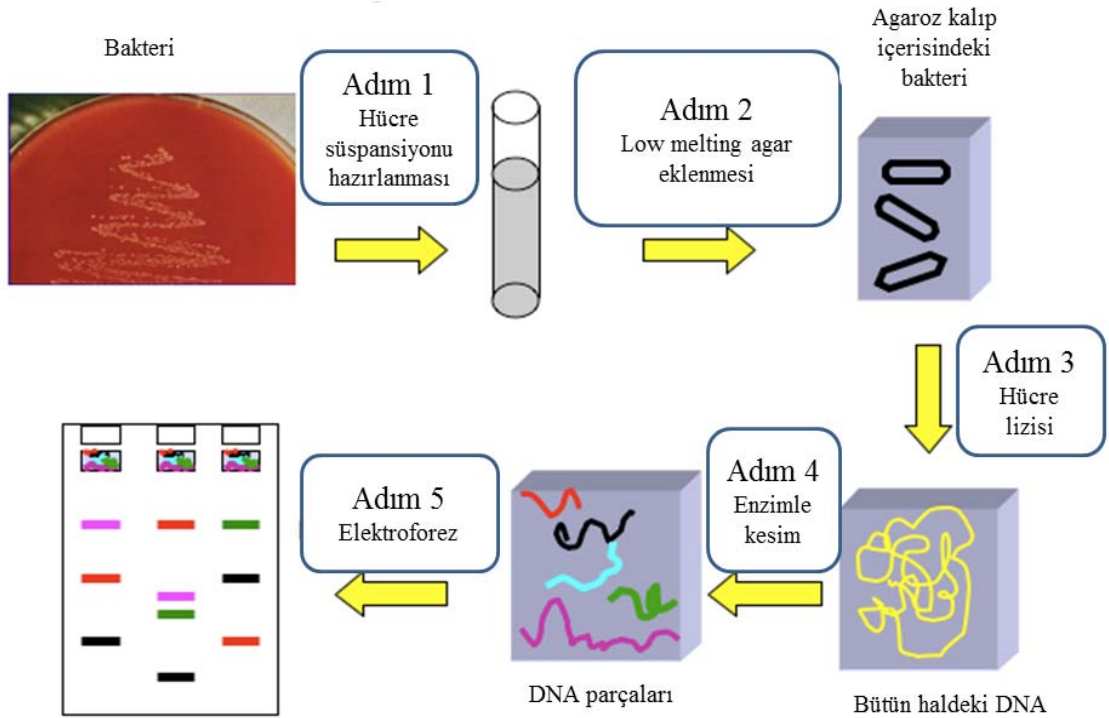
CHEF-DR II sisteminde (Bio-Rad Laboratories, Nazareth, Belgium) elektroforez koşulları ayarlandı.

Başlangıç vuruş süresi	5,3 sn
Bitiş vuruş süresi	34,9 sn
Vuruş açısı	120°
Akım	6 V/cm ²
Sıcaklık	14°C
Süre	20 saat

3.3.1.2.8. Sonucun Gözlenmesi ve Analiz

1. Elektroforezden sonra jel, 5 µg/ml etidyum bromür içeren 500 ml ultra saf su içine alındı ve 20 dakika boyandı.

2. UV ışığa altında görüntülendi. Gel Logic 1500 Imaging System (ayrım gücü: 1708x1280 pixel, Kodak Company, NY, USA) kullanılarak DNA bant görüntülerinin fotoğrafı çekildi.
3. Resimler TIFF formatında kaydedildi. GelCompar II yazılım sistemi (version 4.0; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) kullanılarak bant profilleri analiz edildi. Her resimde bulunan iki adet marker yardımı ile resimler arası normalizasyon yapıldı. UPGMA kullanılarak PFGE profillerinin dendogramı oluşturuldu, kümeleşme analizi yapıldı. Bantlara bağlı “Dice” benzerlik katsayısına göre suşlar arasındaki ilişki belirlendi. Benzerlik katsayısının hesaplanmasında bant ve profil toleransı, % 1,5 olarak alındı. Bant profilleri % 85 benzerlik gösteren izolatlar aynı küme içinde değerlendirildi ve büyük harfle isimlendirildi. Aynı küme içerisindeki subtipler ise rakamlar ile gösterildi.



Şekil 7. PFGE tekniğini aşamaları.

3.3.2. *spa* Tiplendirme Yöntemi

3.3.2.1. İzolatların Hazırlanması ve DNA Ekstraksiyonu

1. *Staph. aureus* suşları canlandırmak amacı ile % 5 Koyun kanlı agara pasajlandı.
2. Steril cam tüplere yaklaşık 2 ml distile su eklendi.
3. Bakteriler steril öze yardımı ile toplanarak distile su içinde homojen dağılması sağlandı ve McFarland cihazı ile bakteri süspansiyonları McFarland 5 olacak şekilde ayarlandı.
4. Hazırlanan hücre süspansiyonlarından 500 µl ependorf tüplerine alındı.
5. Sonra 8000xg'de 3 dakika santrifüj edilerek süpernatant atıldı.
6. Altta kalan pellet üzerine 500 µl 1X TE tamponu eklendi.
7. Daha sonra ependorf tüpleri 100° C'de 10 dakika ısı bloğunda tutuldu.
8. 500 µl bakteri süspansiyonu olan bu ependorflara yaklaşık 150 µl boncuk (Sigma) konuldu.
9. Maksimum hızda 7 dakika Mickle (Mickle Tissue Disintegrator, Mickle Laboratory Engineering Co. Ltd.) cihazında mekanik lizise uğratıldı.
10. Daha sonra 12000 xg'de 10 dakika santrifüj edildi.
11. Son olarak 200 µl süpernatant alınıp yeni ependorfa aktarıldı ve çalışma yapılana kadar -20°C'de saklandı.

3.3.2.2. PCR Yönteminin Uygulanması

Çalışmaya dahil edilen 86 örneğe *spa* gen bölgesinin amplifikasyonu için *spa*-1113f (5'TAA AGA CGA TCC TTC GGT GAG C3') ve *spa*-1514r (5'CAG CAG TAG TGC CGT TTG CTT3') primerleri kullanılarak PCR uygulandı. Her bir örnek için aşağıdaki PCR karışımı hazırlandı.

PCR master mix (Thermo Scientific) 2X	12,5 µl
Saf su	10,4 µl
<i>spa</i> -1113f primeri (Microsynth) 100pmol/µl	0,05 µl
<i>spa</i> -1514r primeri (Microsynth)	0,05 µl
Genomik DNA	2 µl
Toplam hacim	25 µl

Hazırlanan karışım PCR döngülerini gerçekleştirmek amacıyla termal döngü cihazına (APPLIED BIOSYSTEMS 2720 Thermal Cycler) alındı ve ısı döngüleri aşağıdaki şekilde ayarlandı.

Ön denatürasyon	80° C 5 dk	1 Döngü
Denatürasyon	94° C 45 sn	} 38 Döngü
Bağlanma	53° C 60 sn	
Uzama	72° C 90 sn	
Son uzama	72° C 7 dk	1 Döngü
+4°C	∞	

3.3.2.3. Agaroz Jel Elektrofozi

Ekstraksiyon ve amplifikasyonun doğru bir şekilde gerçekleştiğini test etmek amacı ile agaroz jel elektroforezi kullanıldı. 100 ml 1X TBE ve 2 g agaroz ile kaynatılarak % 2'lik agaroz jel hazırlandı. Oda şartlarında yaklaşık 50-60° C'ye kadar soğuyan agaraz jel üzerine 10 µg/ml konsantrasyonda etidyum bromürden 5 µl eklendi. Agaroz jel içerisinde etidyum bromür iyice karıştırıldıktan sonra taraklar yerleştirilerek jel kasetine döküldü. Oda ısısında katılaştıran jelden tarak dikkatli bir şekilde çıkarıldı ve içerisinde 1X TBE tamponu olan tank içerisine yerleştirildi. Jel üzerindeki kuyulara 16 µl örnek ile 4 µl loading buffer karıştırılarak yükleme yapıldı. İlk ve son kuyuya marker yüklendi (GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus). Tank güç kaynağına (Bio-rad) bağlandı. 120 volt akımda 1 saat yürütme işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra DNA bantları jel görüntüleme sistemi (Gel Logic 1500 Imaging System ayırım gücü: 1708X1280 pixel, Kodak Company, NY, USA) ile incelendi. Yaklaşık 300-400 bp aralığındaki bantlar pozitif olarak kabul edildi ve dizi analizi işlemine alındı.

3.3.2.4. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

Dizi analizinden önce ortamdan reaksiyonu etkileyecek olan nükleotid, primer ve diğer kimyasalların uzaklaştırılması amacı ile PCR ürünleri saflaştırıldı. Saflaştırma işlemi “SentroPure® PCR ürünü saflaştırma ve jelden DNA ekstraksiyon kiti (SENTROMER®)” saflaştırma sistemi ile protokolde önerildiği şekilde gerçekleştirildi.

1. Steril 1,5 ml tüp içerisine, her 1 µl PCR ürünü için 4 µl SG solüsyonu (DNA immobilizasyonunu sağlar, pH 6,6) eklendi ve 15 saniye vortekslendi.
2. Karışım SentroSpin kolonuna aktarıldı, 13000rpm’ de 1 dakika santrifüj edildi ve toplama tüpünde toplanan sıvı döküldü.
3. SentroSpin kolonuna 500 µl solüsyon SW (DNA’nın arınmasını sağlar, pH 7,5) eklendi, 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi ve toplama tüpünde toplanan sıvı döküldü. İşlem bir kez daha tekrarlandı.
4. SentroSpin kolon 1 dakika boş olarak santrifüj edildi ve kalan etanol uzaklaştırıldı.
5. SentroSpin kolonu 1,5 ml’lik temiz mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilerek başlangıç PCR ürünü miktarı kadar solüsyon SE (DNA’nın toplanmasını sağlar, pH 8,5) kolonun tam ortasına gelecek şekilde eklendi. Oda sıcaklığında 3 dakika bekletildi ve 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilerek saf DNA toplandı.

Bu saflaştırılmış DNA örnekleri dizi analizi için kullanılabilecek kadar -20°C’de saklandı.

3.3.2.5. Dizi Analizi Çalışmaları

spa geninin DNA dizi analizi otomatik DNA dizi analiz cihazı “ABI Prism 310 DNA sequencer (Applied Biosystems)” kullanılarak yapıldı. Bu cihaz, F. Sanger tarafından geliştirilen “dideoksi zincir sonlandırma yöntemi” prensibine dayanmaktadır ve gelişmiş bir kapiller sisteme uyarlanmıştır. Bu yöntemin temeli DNA polimerazın dNTP’lerin (deoksiribonükleozit trifosfat) yanısıra deoksiribozun 3’ pozisyonunda OH grubu yerine H atomu taşıyan ddNTP’leri (dideoksiribonükleozit trifosfat) de substrat olarak kullanmasına bağlıdır. Floresan boyalı olan ddNTP’ler zincir uzamasının durmasına ve son nükleotidi işaretli olan her uzunlukta DNA parçalarının oluşmasına neden olurlar. Oluşan ürünler kapiller elektroforezde yürütülürken sonlanan her dizide bulunan ddNTP’ler bir lazer sistemi ile uyarılarak yaydığı farklı dalga boyundaki floresanlar CCD kamera ile kaydedilir. Veriler bilgisayar ortamında DNA dizilerine çevrilir.

İlk olarak saf haldeki PCR ürünlerine Cycle sequencing uygulaması yapıldı. Bu aşamada forward primerler kullanılarak hem dNTP hem de ddNTP içeren reaksiyon

karışımı ile tek zincirli amplifikasyon işlemi gerçekleştirildi. İşlem BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) kullanılarak gerçekleştirildi. Kontrol olarak da Pgem DNA ve M13 primerleri kullanıldı. Her örnek için aşağıdaki karışım hazırlandı.

Ready reaxion mix (RR-100) 5X	4 µl
Squencing Buffer 5X	4 µl
<i>spa</i> -1113f	4 µl
Saf su	4 µl
Saf PCR ürünü	4 µl
Toplam hacim	20 µl

Cycle sekans için hazırlanan örnekler için termal cycle cihazında aşağıdaki ısı döngüleri ayarlandı.

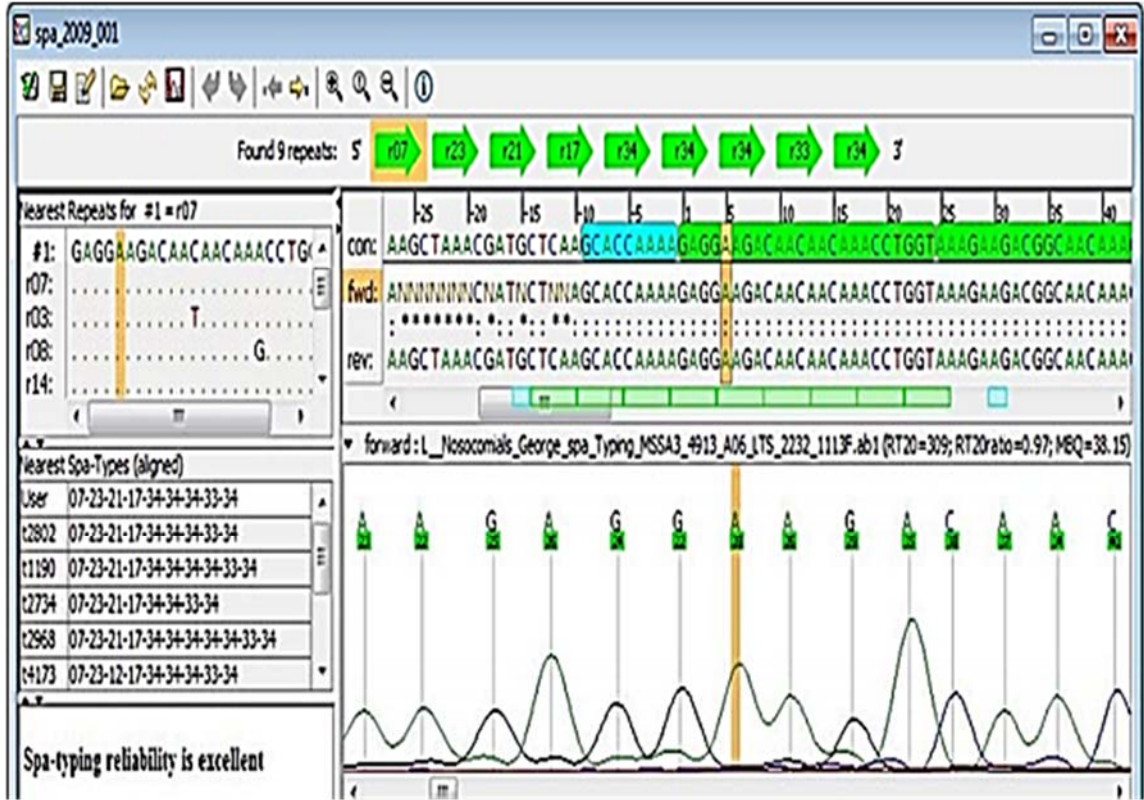
96° C de 10 sn	} 25 döngü
50° C de 5 sn	
60° C de 4 dk	

Cycle sekans ürünleri, sekans cihazına yüklenmeden önce tekrar saflaştırıldı. Saflaştırma işlemi için ZR DNA Sequencing Clean-up Kit™ (Zymo Research) protokolünde önerildiği şekilde kullanıldı.

1. 5-20 µl cycle sekans ürününe 240 µl “Sequencing Binding Buffer” eklendi.
2. Karışım Zymo-Spin™ IB kolona aktarıldı.
3. 13000 rpm (15000 - 16000 xg) de 30 saniye santrifüj edildi.
4. Spin kolona 300 µl “Sequencing Wash Buffer” eklendi ve 13000 rpm (15000 - 16000 x g) de 30 saniye santrifüj edildi.
5. DNA’ yı toplamak için kolona, 20 µl % 20’lik formamid eklendi ve kolon 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilerek 13000 rpm (15000 - 16000 xg) de 15 saniye santrifüj edildi. Elde edilen ultrapür DNA sekans cihazına (ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer) yüklendi.

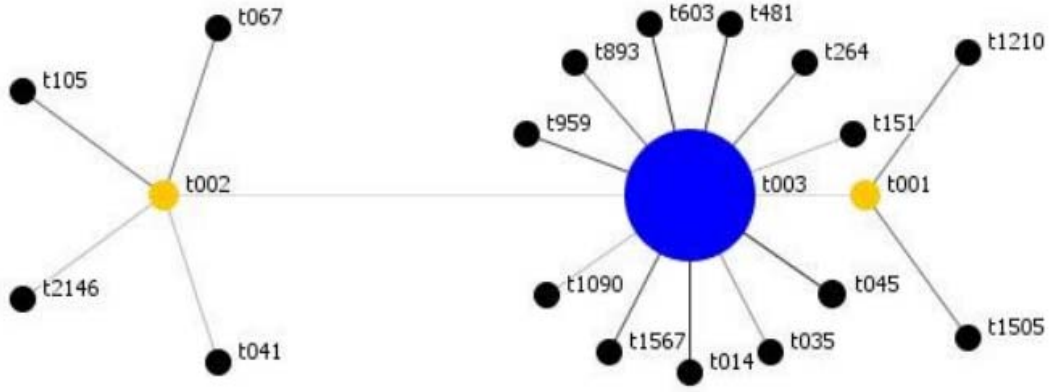
3.3.2.6. Dizi Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve *spa* Tiplerinin Tespiti

Sekans cihazından elde edilen ham veriler Sequencing Analysis 5.1 programıyla işlendi. Elde edilen DNA dizileri StaphType yazılım programının (Ridom) yardımı ile *spa* tiplerinin belirlenmesi için kullanıldı. Program baz dizisi içerisinde 5' ucunu, 5' ucundan belli bir uzaklıkta başlayan genellikle 24 bp uzunluktaki birbirine bitişik tekrar dizilerini ve 3' ucunu otomatik olarak tespit edebilmektedir. Her tekrar, baz dizisine göre standart bir numara ile isimlendirilir ve elde edilen tekrar profiline göre suş standart bir tip numarası ile adlandırılır (Şekil 8).



Şekil 8. StaphType yazılımında *spa* tiplerinin tespiti.

StaphType yazılımında yer alan BURP algoritması ile birbirinden 6 veya daha az tekrar farkı olan *spa* tipleri aynı grupta olacak şekilde kümelendi. Böylece *spa* CC tipleri ve kümelerin kaynakları tespit edildi (Şekil 9).



Şekil 9: BURP algoritması ile *spa* CC'lerin tespiti.

4. BULGULAR

Bu çalışmada Ç.Ü Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi poliklinik ve kliniklerine Kasım 2012-Aralık 2013 tarihleri arasında çeşitli yakınmalar ile başvuran hastalardan tanı amacı ile alınan örneklerden izole edilen ve Vitek 2 sistemi aracılığıyla MRSA oldukları tespit edilen *Staph. aureus* suşları, bölgemizde hastanede veya toplumda kazanılmış MRSA enfeksiyonlarının epidemiyolojik özelliklerini tespit amacı ile genotipik özellikleri yönünden değerlendirilmiştir. Bir hastanın aynı bölgesinden üretilen izolatlardan sadece birisinin dahil edildiği çalışmada toplam 75 suş PFGE ve *spa* tiplendirme yöntemi ile tiplendirildi.

Çalışmaya dahil edilen suşlar % 13'lük oran ile en çok Çocuk Yoğun Bakım ünitesinden alınan örneklerden izole edildi (Tablo 9).

Tablo 9. Suşların kliniklere ve polikliniklere göre dağılımı.

Klinik/poliklinik adı	Suş Yüzdesi (sayısı)	Klinik/poliklinik adı	Suş Yüzdesi (sayısı)
Çocuk Yoğun Bakım	13 (n:10)	Çocuk Yenidoğan Yoğun Bakım	1,3 (n:1)
Reanimasyon	13 (n:10)	Çocuk Alerji ve İmmünoloji Polikliniği	1,3 (n:1)
Dahili Yoğun Bakım	6,7 (n:5)	Beyin Cerrahi Yoğun Bakım	1,3 (n:1)
Göğüs Hastalıkları Servisi	5,3 (n:4)	Ortopedi ve Travmatoloji Servisi	1,3 (n:1)
Klinik Bakteriyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Servisi	5,3 (n:4)	Kadın Hastalıkları ve Doğum Obstetrik Servisi	1,3 (n:1)
Dermatoloji Poliklinik	5,3 (n:4)	Genel Cerrahi Servisi 1	1,3 (n:1)
Yanık Ünitesi	4 (n:3)	Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları Poliklinik	1,3 (n:1)
Çocuk Onkoloji Servisi	2,7 (n:2)	Dahiliye Onkoloji Polikliniği	1,3 (n:1)
Çocuk Hematoloji Servisi	2,7 (n:2)	Göz Hastalıkları Servisi	1,3 (n:1)
Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları Servisi	2,7 (n:2)	Çocuk Gastroloji ve Hepatoloji Servisi	1,3 (n:1)
Çocuk Sağlığı 2 servisi	2,7 (n:2)	Çocuk Cerrahi Poliklinik	1,3 (n:1)
Dahiliye Nefroloji Polikliniği	2,7 (n:2)	Nöroloji Servisi	1,3 (n:1)
Üroloji Servisi	2,7 (n:2)	Üroloji Polikliniği	1,3 (n:1)
Nöroloji Yoğun Bakım	2,7 (n:2)	Beyin Cerrahi Servisi	1,3 (n:1)
Dahiliye Endokrinoloji Servisi	2,7 (n:2)	Çocuk Kalp Damar Cerrahi Servisi	1,3 (n:1)
Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Servisi	2,7 (n:2)		
Dahiliye Hematoloji Servisi	2,7 (n:2)	Toplam	75

Suşıların izole edildiği hastaların yaş ortalamasının 34, 9 olmasına karşılık test suşlarının % 61'inin yetişkin hastalara ait örneklerden izole edildiği tespit edildi. Test suşlarının izole edildiği hastaların 52'si erkek 23'ü kadın olmak üzere 0-85 yaş aralığında dağıldığı görüldü (Tablo 10).

Tablo 10. Çalışmaya dahil edilen suşların izole edildiği hastaların yaş ve cinsiyet gruplarına göre dağılımı.

Cinsiyet		Yaş					
		0-5	6-17	18-35	36-65	≥66	Toplam
Kadın	Sayı	4	7	2	7	3	23
	Yüzde	% 5,3	% 9,3	% 2,7	% 9,3	% 4	% 30,6
Erkek	Sayı	6	10	12	17	7	52
	Yüzde	% 8	% 13,4	% 16	% 22,7	% 9,3	% 69,4
Toplam	Sayı	10	17	14	24	10	75
	Yüzde	% 13,3	% 22,7	% 18,7	% 32	% 13,3	% 100

MRSA suşlarının en fazla yara sürüntüsü örneklerinden izole edildiği (n: 28, % 31,8) bunu 20 (% 26,7) örnekle trakeal aspirat kültürü (TAK) izolatlarının izlediği sadece bir suşun BAL'dan izole edildiği görüldü (Tablo 11).

Tablo 11. Çalışmaya dahil edilen suşların izole edildikleri örneklere göre dağılımı.

Örnek	Sayısı	Yüzdesi	Örnek	Sayısı	Yüzdesi
Yara kültürü	28	% 37,3	İdrar	3	% 4
TAK	20	% 26,7	Dren ucu	3	% 4
Kan kültürü	11	% 14,7	Boğaz kültürü	2	% 2,7
Balgam	7	% 9,3	BAL	1	% 1,3
Toplam	75	% 100			

TAK: Trakeal aspirat kültürü, BAL: Bronkoalveolar lavaj

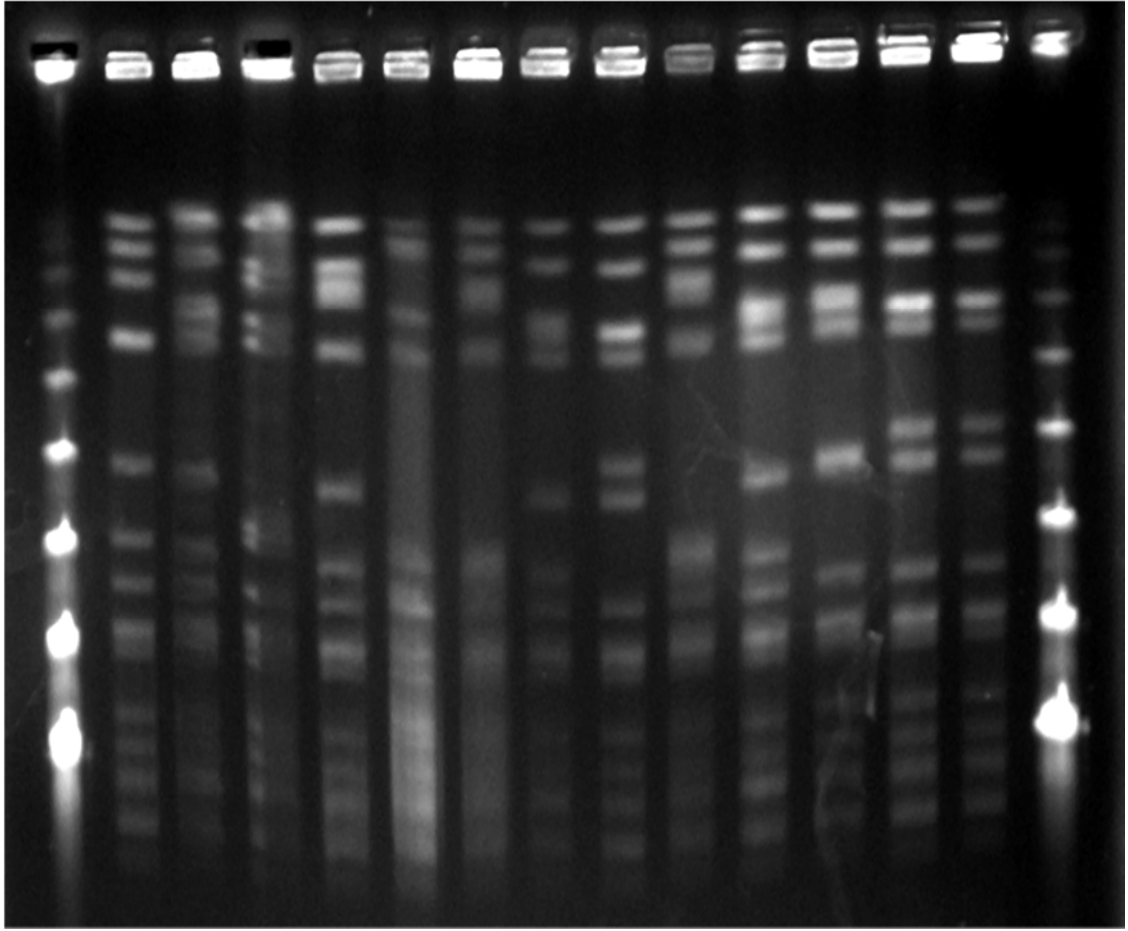
Vitek 2 sistemi ile yapılan antibiyotik duyarlılık test sonuçlarına göre 75 test suşunun 23 paterne ayrıldığı ve suşların % 63,1'inin tetrasikline karşı dirençli olduğu linezolid karşı direncin ise % 4 olduğu tespit edildi. Test suşlarının tamamı vankomisin, teikoplanin ve tigesikline duyarlı bulundu (Tablo 12).

Tablo 12. Test suşlarının Vitek 2 otomatize sistemi sonuçlarına göre antibiyotik direnç profilleri.

	n	CIP	DA	E	FOS	FA	CN	LZD	MOX	RA	TEi	TE	TiG	SXT	VA
X1	19	D	D	D	D	H	D	H	D	D	H	D	H	H	H
X2	5	D	D	D	H	H	D	H	D	D	H	D	H	H	H
X3	3	D	D	D	D	H	D	H	H	D	H	D	H	H	H
X4	1	D	H	D	D	H	D	H	D	D	H	D	H	H	H
X5	2	H	D	D	H	D	D	H	H	D	H	D	H	D	H
X6	1	D	D	D	H	D	D	H	H	H	H	D	H	D	H
X7	8	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
X8	8	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	D	H
X9	1	H	H	H	H	H	H	D	H	H	H	H	H	D	H
X10	1	H	H	H	H	H	H	D	H	H	H	H	H	H	H
X11	2	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	D	H	H	H
X12	1	H	H	H	H	H	H	H	H	D	H	H	H	H	H
X13	1	D	H	H	H	H	H	H	D	D	H	D	H	H	H
X14	2	D	H	H	H	H	D	H	D	D	H	D	H	H	H
X15	2	D	H	H	D	H	D	H	D	D	H	D	H	H	H
X16	1	D	H	H	D	H	H	H	D	D	H	D	H	H	H
X17	1	D	H	H	H	H	D	H	H	D	H	D	H	H	H
X18	7	H	D	D	H	H	H	H	H	H	H	D	H	H	H
X19	4	H	D	D	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
X20	1	H	D	D	H	D	H	H	H	H	H	H	H	H	H
X21	1	H	D	D	H	D	H	H	H	D	H	H	H	H	H
X22	2	D	H	D	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
X23	1	D	H	H	H	H	H	D	D	H	H	D	H	D	H
Direnç yüzdesi		52	57,3	61,3	34,6	6,7	48	4	42,7	52	0	63,1	0	17,3	0

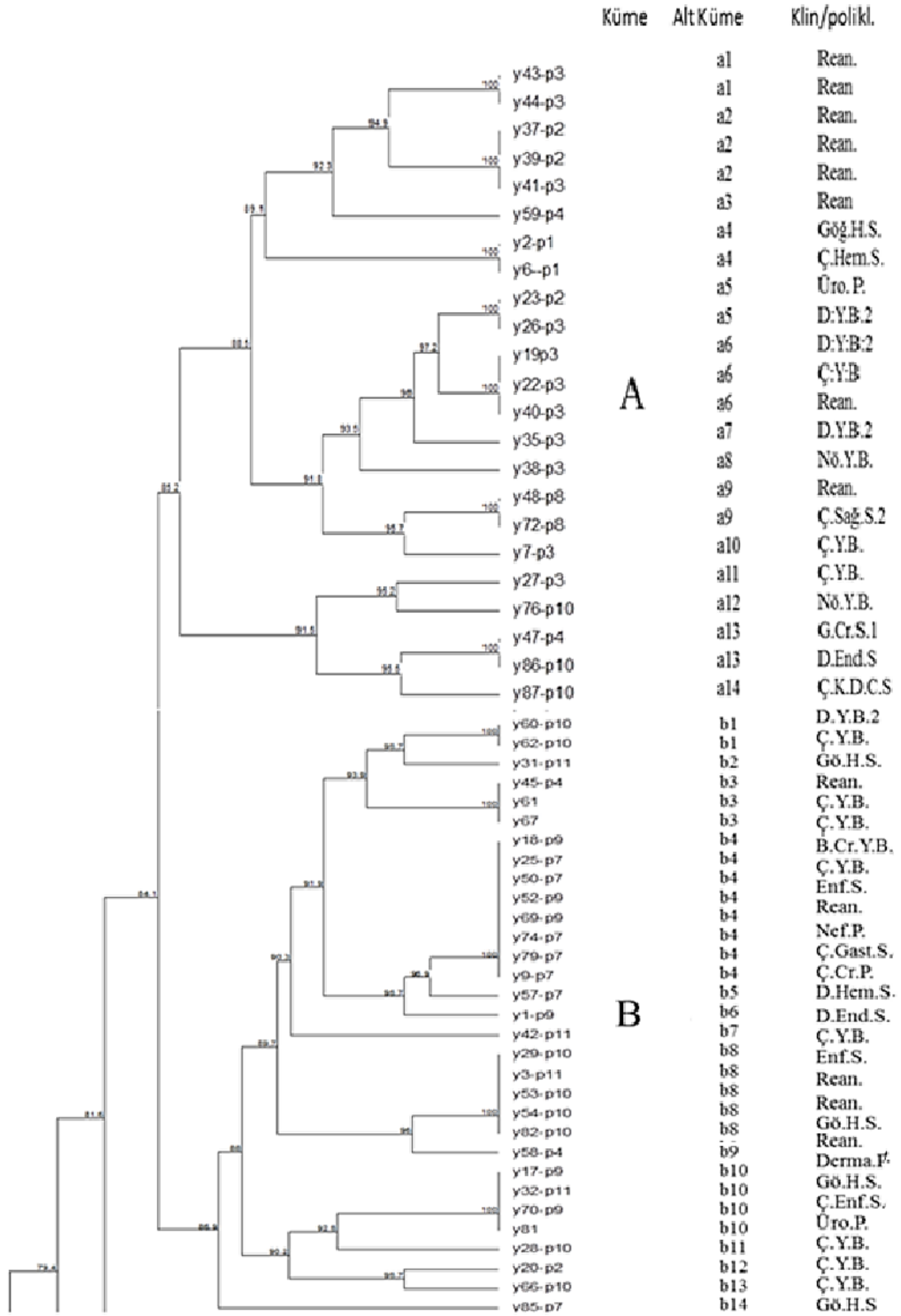
H: Hassas, D: Dirençli, CIP: Siprofloksasin, DA: Klindamisin, E: Eritromisin, FD: Fusidik Asit, FOS: Fosfomisin, CN: Gentamisin, IPM: İmipenem, OX: Oksasilin, LZD: Linezolid, RA: Rifampin, TEi: Teikoplanin TE: Tetrasiklin, TiG: Tigesiklin, SXT: Trimetoprim-sulfametaksazol, VA: Vankomisin

MRSA test suşlarının genotipik düzeyde izlemi ve bölgede muhtemel hakim klonların tespiti amacı ile yapılan Sma-PFGE testi sonucunda en az % 85 benzerlik ilişkisi kriteri olarak kabul edildiğinde suşların 11 büyük küme içerisinde toplandıkları, en büyük kümeyi 27 üye ile B kümesinin oluşturduğu bunu 19 üye ile A kümesinin izlediği görüldü. J, K, L, N kümeleri ise tek suş içermekte idi.

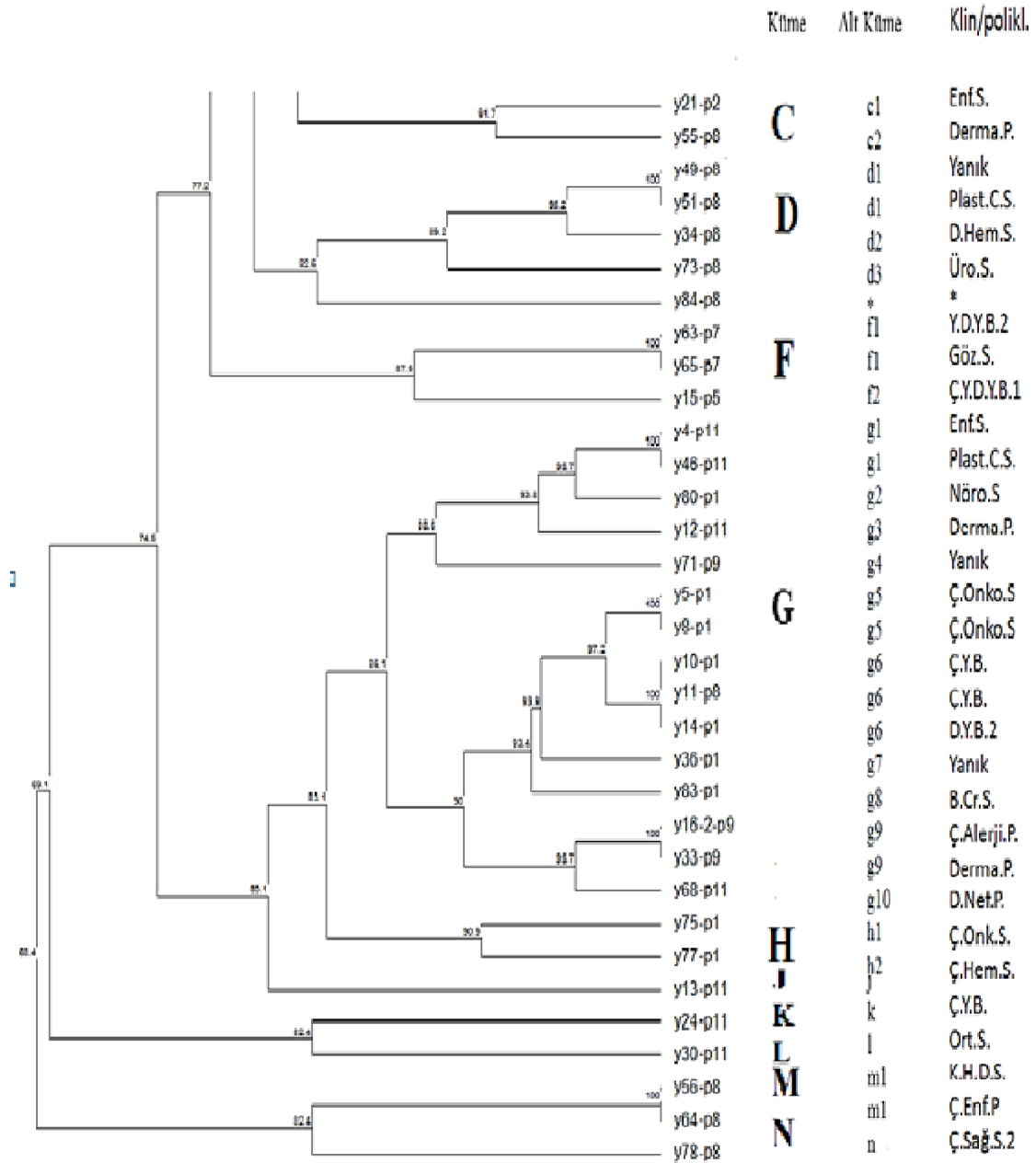


Şekil 10. Agaroz jelde *Staph. aureus* suşlarının Sma-PFGE ile elde edilen DNA bant paternleri.

Bu iki major küme arasındaki benzerliğin % 84,1 olduğu ve bu iki küme suşlarının toplamının test suşların % 61,3'ünü oluşturduğu tespit edildi. Bir başka ifade ile ilişkinin tespitinde bir çok çalışmada olduğu gibi baz olarak % 83 benzerliğin alınması halinde suşların en az % 61,3'ünün bir küme içerisinde toplandığı yani yakın ilişkili suşlar oldukları tespit edilecekti (Şekil 11).



Şekil 11. Suşların Sma-PFGE kümelerine ve kaynağa göre dağılımları.



Şekil 11 (devamı). Suşların Sma-PFGE kümelerine ve kaynağa göre dağılımları. Rean: reanimasyon, Göğ.H.S: Göğüs Hastalıkları Servisi, Ç.Hem.S: Çocuk Hematoloji Servisi, Üro.P.: Üroloji Polikliniği, D:Y:B 2: Dahili Yoğun Bakım 2, Ç.Y.B: Çocuk Yoğun Bakım, Nö.Y.B: Nöroloji Yoğun Bakım, G.Cr.S.1: Genel Cerrahi Servisi 1, D.End.S: Dahili Endokrin Servisi, Ç.K.D.C.S: Çocuk Kalp Damar Cerrahisi Servisi, B.Cr.Y.B: Beyin Cerrahi Yoğun Bakım, Enf.S: Enfeksiyon Hastalıkları Servisi, Nef.P: Nefroloji Poliklinik, Ç.Gas.S: Çocuk Gastroloji Servisi, Ç.Cr.P: Çocuk Cerrahisi Poliklinik, D.Hem.S: Dahili Hematoloji Servisi, Derma.P: Dermatoloji Poliklinik, Ç.Enf.S: Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları Servisi, Plast.C.S: Plastik Cerrahi Servisi, Y.D.Y.B: Yenidoğan Yoğun Bakım, Ç.Onk.S: Çocuk Onkoloji Servisi, Ç.Alerji.P: Çocuk Alerji Polikliniği, Ort.S: Ortopedi servisi, K.H.D.S: Kadın Hastalıkları ve Doğum Servisi.

Tüm izolatlar *Stap. aureus* protein A gen polimorfizminin tespiti yönünden *spa* tiplendirme ile değerlendirildiğinde suşların 18 *spa* tipine dağıldığı tespit edildi. En büyük *spa* kümesi 31 izolat (% 41,3) ile t030 iken bunu 9 izolat ile t223 (% 12) tipinin izlediği görüldü. İzolatlardan 8'inin tek üyeli özgün suşlar olduğu belirlendi (Tablo 13).

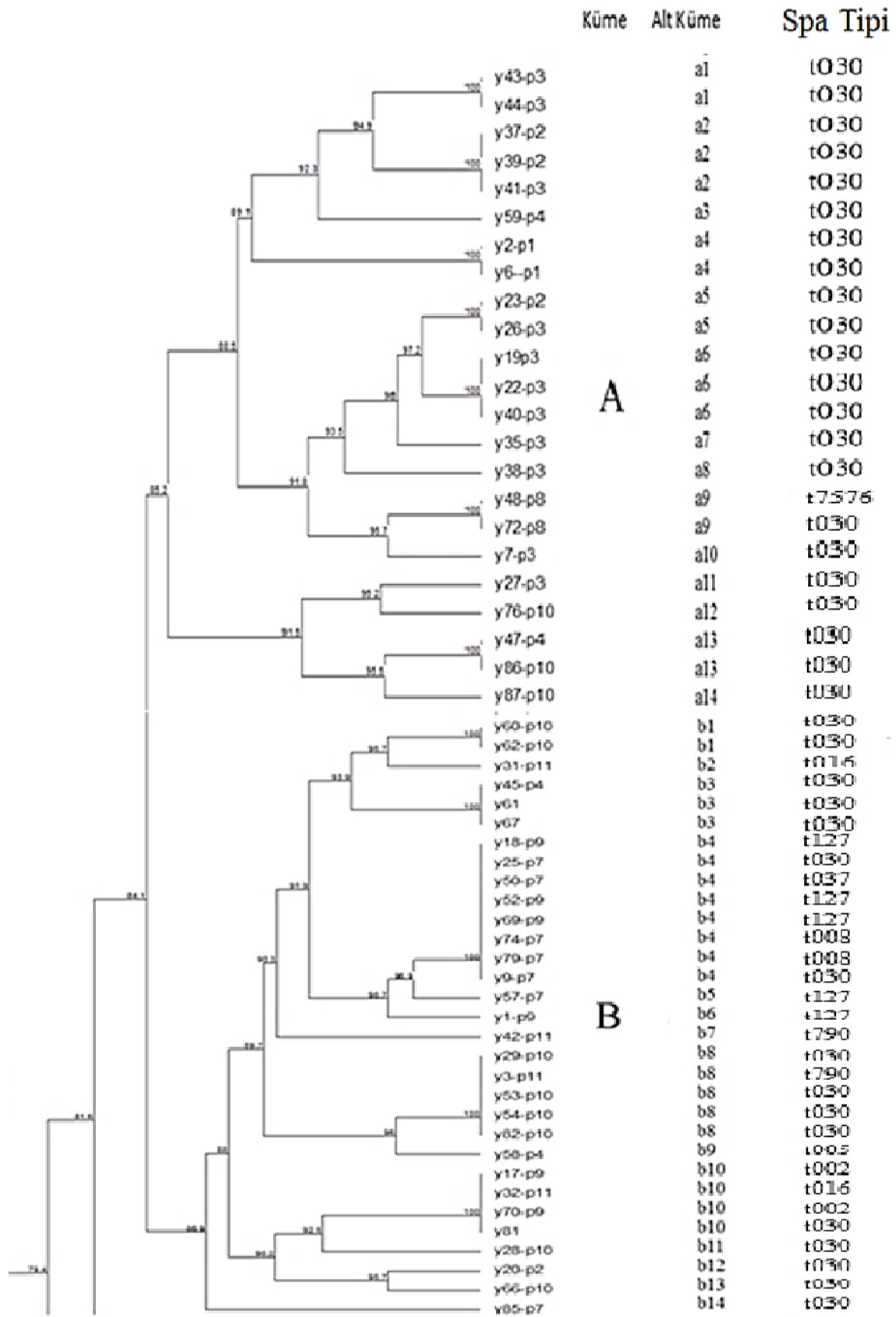
Tablo 13. Test izolatlarının *spa* tip dağılımları.

<i>spa</i> tipi	Örnek sayısı	Yüzdesi
t030	31	% 41,3
t223	9	% 12
t127	7	% 9,3
t037	6	% 8
t005	4	% 5,3
t002	2	% 2,7
t267	2	% 2,7
t008	2	% 2,7
t016	2	% 2,7
t790	2	% 2,7
t304	1	% 1,3
t459	1	% 1,3
t359	1	% 1,3
t311	1	% 1,3
t091	1	% 1,3
t7576	1	% 1,3
t2816	1	% 1,3
t4565	1	% 1,3
Toplam	75	% 100

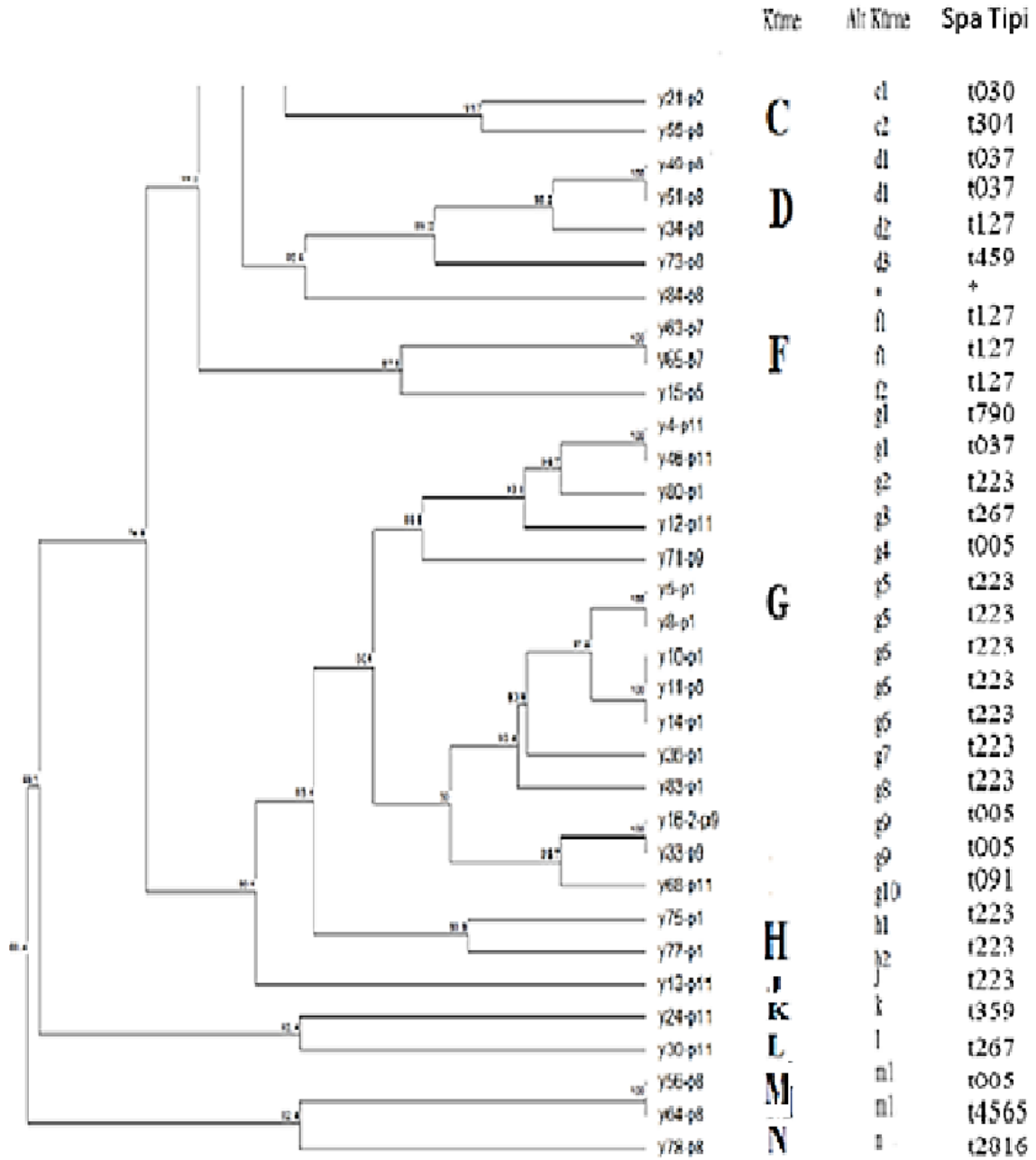
Sma-PFGE küme dağılımı ile *spa* tip dağılımının kıyaslanması sonucu t030'un, C kümesinde yer alan 1 izolat hariç tamamının Sma-PFGE yöntemi ile oluşan A ve B kümeleri içerisinde yer aldıkları görüldü ki bu iki kümenin benzerlik oranının % 84,1

olduğu belirlenmişti (şekil 11/ Tablo 17). Sma-PFGE ile ortaya çıkan A ve B major kümelerinde t030 dışında 9 farklı *spa* tipi daha bulunmaktaydı. Diğer taraftan Sma-PFGE yöntemi ile oluşan 3. büyük küme olan G kümesindeki suşların da 5 farklı *spa* tipine dağıldıkları görüldü (şekil 11).

İkinci sıklıkta tespit edilen t223' n G, H ve J kümelerine dağıldığı, bu kümelerin Sma-PFGE ile % 80,1 oranında benzerlik gösteren ilişkisiz kümeler oldukları görüldü. t127'nin; B ve F kümelerine, t037'nin; B, D ve G kümelerine, t005'in ise G ve M kümelerine dağıldığı tespit edildi (şekil 12/ Tablo 14).



Şekil 12. Sma-PFGE ve *spa* tiplerinin korelasyonu.



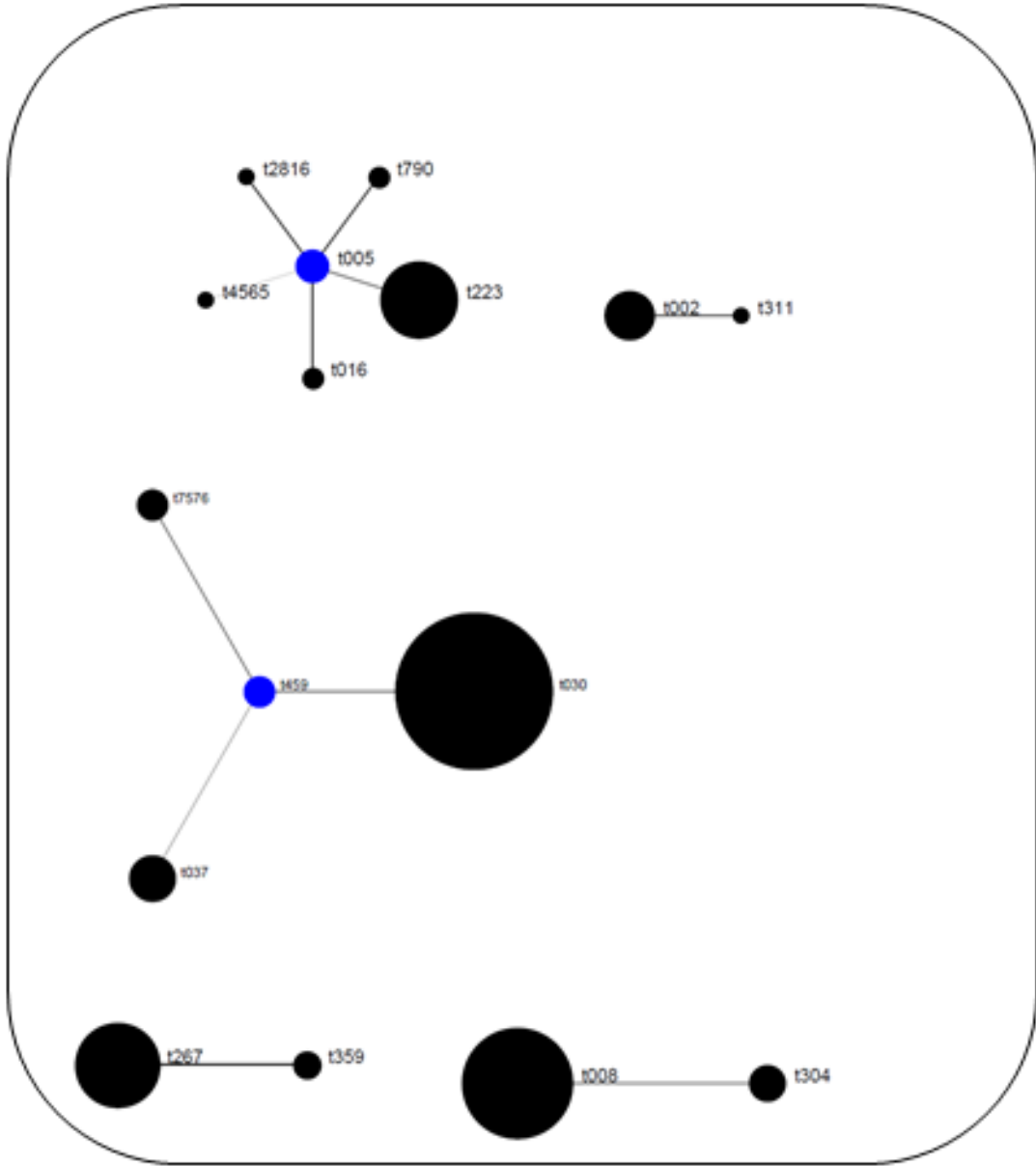
Şekil 12 (devamı). Sma-PFGE ve *spa* tiplerinin korelasyonu.

A kümesinin 2 izolat hariç tamamı t030'dan oluşmaktaydı. İki izolattan bir tanesi t7576 olup BURP analizinde t030 ile aynı klonal kompleks içerisindeydi. Diğer izolat ise t311 olup, t030 ile ilişkisizdi. B kümesi en büyük küme olup içerisinde farklı *spa* tipleri içermektedir. B, C ve G kümeleri haricindeki diğer kümeler tek *spa* tipi veya aynı klonal kompleks içerisindeki *spa* tiplerini içermektedir.

Tablo 14. *Staph. aureus* suşlarının PFGE ve *spa* tiplendirmeye göre kıyaslanması.

PFGE		<i>spa</i> tipi	Suş No
Küme	Alt Küme		
A KÜMESİ	A1	t030	44
	A2		37
	A3		59
	A4		2, 6
	A5		23, 26
	A6		19, 22, 40
	A7		35
	A8		38
	A9		72
	A10		7
	A11		27
	A12		76
	A13		47, 86
	A9	t7576	48
	A14	t311	87
B KÜMESİ	B1	t030	60
	B3		45, 61, 67
	B4		25, 9
	B8		53, 54, 82
	B9		81
	B11		28
	B12		20
	B13		66
	B14		85
	B4	t127	18, 52, 69
	B5		57
	B6		1
	B2	t016	31
	B10		32
	B4	t008	74, 79
	B4	t037	50
	B7	t790	42
	B8		3
	B10	t002	17, 70
PFGE		<i>spa</i> tipi	Suş No
Küme	Alt Küme		
C KÜMESİ	C1	t30	21
	C2	t304	55
D KÜMESİ	D1	t37	49, 51
	D2		34
	D3	t459	73
F KÜMESİ	F1	t127	65
	F2		15
G KÜMESİ	G1	t037	4,46
	G2	t223	80
	G5		5
	G6		11, 14
	G7		36
	G8		83
	G4	t005	71
	G9		16, 33
	G3	t267	12
	G10	t091	68
H KÜMESİ	H1	t223	75
	H2		77
J KÜMESİ	J	t223	13
K KÜMESİ	K	t359	24
L KÜMESİ	L	t267	30
M KÜMESİ	M	t005	56
	M	t4565	64
N KÜMESİ	N	t2816	78

StaphType yazılımında yer alan BURP algoritması sayesinde türler birbirinden 5 tekrardan daha az farklı olan komplekslere ayrıldı. Buna göre 5 tane *spa* CC tespit edildi. Küme 1’de (CC005); t005’den köken alan t790, t223, t4565, t2816, t016 bulunmaktaydı. Küme 2 (CC459); t459’ dan köken alan t37, t30, t7576’yı içermekteydi. Küme 3’de t002 ve t311, küme 4’ de t267 ve t359, küme 5’ de t008 ve t304 bulunmaktaydı. t091 ve t127 ise küme oluşturmamaktaydı (Şekil 13).



Şekil 13. *spa* klonal komplekslerinin dağılımı (BURP grafikleri).

İzole edildiği materyal ile *spa* tip dağılımı incelendiğinde en fazla çeşitlilik yara sürüntü örneklerinde tespit edildi. Bu izolatlarda 16 çeşit *spa* tipi görüldü. TAK izolatlarının ise % 70'i t030'dan oluşmaktaydı. Kan kültürlerinin % 45,4'ü t030, % 27,3'ü t223, % 27,3'ü t030 ile aynı klonal komplekste bulunan t037 idi. Diğer izolatlar da çeşitli *spa* tiplerini içermektedir (Tablo 15).

Tablo 15. İzole edilen materyallere göre *spa* tipi dağılımı.

<i>spa</i>	Yara	TAK	Kan	Balgam	Dren ucu	İdrar	Boğaz kültürü	BAL	Toplam
t030	6	14	5	3	1	2	-	-	31
t223	3	2	3	-	-	1	-	-	9
t127	1	3	-	2	1	-	-	-	7
t037	3	-	3	-	-	-	-	-	6
t005	2	-	-	-	-	-	2	-	4
t016	-	-	-	1	-	-	-	1	2
t008	2	-	-	-	-	-	-	-	2
t790	1	-	-	1	-	-	-	-	2
t267	2	-	-	-	-	-	-	-	2
t002	2	-	-	-	-	-	-	-	2
t359	1	-	-	-	-	-	-	-	1
t459	-	-	-	-	1	-	-	-	1
t304	1	-	-	-	-	-	-	-	1
t7576	-	1	-	-	-	-	-	-	1
t311	1	-	-	-	-	-	-	-	1
t2816	1	-	-	-	-	-	-	-	1
t4565	1	-	-	-	-	-	-	-	1
t91	1	-	-	-	-	-	-	-	1
Toplam	28	20	11	7	3	3	2	1	75

TAK: Trakeal aspirat kültürü, BAL: Bronkoalveolar lavaj

Çalışmaya dahil edilen 75 izolatın 11'i polikliniklere ayaktan başvuran hastalardan, 64'ü ise kliniklerde yatan hastalardan elde edildi. Poliklinikten elde edilen 11 izolat 8 *spa* tipi, kliniklerden elde edilen 64 izolat ise 16 *spa* tipi içermekteydi (Tablo 16).

Tablo 16. *spa* tiplerinin poliklinik ve kliniklere dağılımı.

<i>spa</i> tipi	Poliklinik	Klinik	Toplam
t030	1	30	31
t223	-	9	9
t127	2	5	7
t037	-	6	6
t005	3	1	4
t002	1	1	2
t267	1	1	2
t008	1	1	2
t016	-	2	2
t790	-	2	2
t304	1	-	1
t459	-	1	1
t359	-	1	1
t311	-	1	1
t091	1	-	1
t7576	-	1	1
t2816	-	1	1
t4565	-	1	1
Toplam	11	64	75

Sonuçların antibiyotikleme sonuçları ile korelasyonu sonunda t030 izolatlarının 24'ü nün (% 77,4); siprofloksasin, fusidik asit, gentamisin, tetrasiklin, eritromisin ve rifampisine % 100 oranında direnç gösteren ancak trimethoprim-sülfametoksazol (TMP-SMX) duyarlı suşların yer aldığı X1, X2, X3 ve X4 direnç grupları içerisinde toplandıkları görüldü. Siprofloksasine duyarlı olan bir t030 izolatı ise X19 direnç paterni içerisindeydi. t030 ile aynı CC içerisinde yer alan t7576, X2 içerisinde; t037 de benzer şekilde β -laktam dışı direncin fazla görüldüğü X1, X2, X5 ve X6 grupları içerisindeydi.

spa tipi t223 olan 9 izolattan 6'sı β -laktam haricinde sadece TMP-SMX'e dirençli olan X8 grubunda yer alırken, ikisi X8'e benzeyen X9 ve X12 grubunda, birisi ise farklı olarak bir çok antibiyotiğe dirençli olan X2 grubunda yer aldı. t127'nin 6 tanesi X18 (eritromisin, klindamisin, tetrasiklin dirençli) paterni gösterirken bir tanesi tetrasikline duyarlı olup X19 grubundaydı (Tablo 17).

Tablo 17. *spa* tiplerinin antibiyotip dağılımı.

Antibiyotip	Spa tipleri																		Toplam
	t030	t223	t127	t037	t005	t016	t008	t790	t267	t002	t359	t459	t304	t7576	t301	t2816	t4565	t091	
X1	16	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18
X2	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	6
X3	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
X4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
X5	-	-	-	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
X6	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
X7	-	-	-	-	2	-	-	2	1	-	1	-	1	-	-	1	-	-	8
X8	-	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	7
X9	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
X10	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
X11	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
X12	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
X13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
X14	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
X15	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
X16	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
X17	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
X18	-	-	5	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6
X19	1	-	2	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	5
X20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
X21	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
X22	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
X23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
Toplam	31	9	7	6	4	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	7

Dört hastanın ikişer örneği farklı numunelerden izole edildikleri için çalışmaya dahil edildiler. 3 ve 42 numaralı örnekler aynı hastanın sırasıyla kan ve yara (diabetik ayak) örnekleriydi. Yaklaşık 5 ay ara ile alınmışlardı. Her ikisi de t790'dı. Örnek 3 B8, örnek 42 B7 grubundaydı ve benzerlikleri % 89,7'di. 5 ve 11 numaralı örnekler aynı hastanın sırasıyla kan ve yara örnekleriydi. İkisi de t223'dü. Örnek 5 PFGE ile G5 kümesinde; örnek 11 ise G6 kümesinde gruplandı. Birbirlerine % 97,2 oranında

benzemektelerdi. 46 ve 51 numaralı örnekler aynı hastanın sırasıyla yara ve kan örnekleriydi. Her ikisi de t037 olup örnek 51 D1 kümesinde, 46 ise G1 kümesinde gruplandı ve birbirlerine % 74,5 oranında benzemektelerdi. 66 ve 67 nolu örnekler aynı hastanın sırasıyla TAK ve yara kültürleriydi. Her ikisi de t030 idi. Örnek 66 B13, 67 ise B3 grubundaydı ve benzerlikleri % 88'di.

Tablo 18. Test suşlarının özellikleri ve sürveyans yöntemleri ile korelasyonları.

	Yaş	Cinsiyet	Klinik	Örnek	PFGE	spa	Antibiyogram
1	56	E	Onk. P	Balgam	B	t127	X19
2	77	K	Göğüs H.S	Balgam	A	t030	X1
3	71	E	Enf. S	Balgam	B	t790	X8
4	54	E	Enf. S	Kan	G	t037	X1
5	11	E	Ç.Onk. S	Kan	G	t223	X8
6	8	K	Ç. Hem. S	Kan	A	t030	X19
7	6	E	Ç. Yoğ. B	TAK	A	t030	X1
9	30	K	D. Hem.	Balgam	B	t030	X2
11	11	E	Ç. Yoğ. B.	Yara S.	G	t223	X8
12	7	E	Derma. P.	Yara S.	G	t267	X21
13	5	E	Ç. Yoğ. B.	TAK	J	t223	X2
14	53	E	D. Yoğ. B.2	TAK	G	t223	X8
15	0	E	Ç. Yoğ. B..	TAK	F	t127	X18
16	8	K	Ç. Alerji P.	Boğaz	G	t005	X7
17	29	E	Derma. P.	Yara S.	B	t002	X19
18	1	E	BeyinC.Y.B	Balgam	B	t127	X19
19	50	E	D. Yoğ. B.2	TAK	A	t030	X1
20	9	E	Ç. Yoğ. B.	TAK	B	t030	X17
21	33	E	Enf. S.	Yara S.	C	t030	X16
22	9	K	Ç. Yoğ. B.	TAK	A	t030	X3
23	38	E	Üroloji	İdrar	A	t030	X1
23	15	E	Ortopedi	Yara S.	K	t359	X7
25	6	K	Ç. Yoğ. B.	TAK	B	t030	X14
26	75	E	D. Yoğ. B.2	TAK	A	t030	X4
27	7	E	Ç. Yoğ. B.	Yara S.	A	t030	X3
30	35	K	Kadın H.S	Yara S.	N	t267	X7
31	64	E	Göğüs H.S.	BAL	B	t016	X11
32	64	E	Göğüs H. S.	Balgam	B	t016	X11
33	16	E	Derma. P	Yara S.	G	t005	X7
34	50	E	D. Hem. S	Kan	D	t037	X18
35	50	K	D. Yoğ. B.2	Kan	A	t030	X15
36	58	E	Yanık Ü.	Yara S.	G	t223	X12
37	59	E	Rean.	Balgam	A	t030	X2

Tablo 18. Devamı

38	37	E	Nöroloji Y.B	Kan	A	t030	X1
40	81	E	Reanim.	TAK	A	t030	X1
42	55	E	Reanim.	Yara S.	B	t790	X7
44	19	E	Reanim.	TAK	A	t030	X1
45	43	E	Reanim.	Dren	B	t030	X1
46	18	E	Plast. C.S.	Yara S.	G	t037	X5
47	59	K	G. C. S. 1	Yara S.	A	t030	X2
48	60	E	Reanim.	TAK	A	t7576	X2
49	31	K	Yanık Ü.	Yara S.	D	t037	X6
50	85	E	Enf. S.	Yara S.	B	t037	X1
51	19	E	Plast. C. S.	Kan	D	t037	X5
52	22	E	Reanim.	TAK	B	t127	X18
53	62	K	Reanim.	TAK	B	t030	X1
54	58	E	Reanim.	TAK	B	t030	X2
55	41	E	Derma. P.	Yara S.	C	t304	X7
56	4	E	Ç. Enf. P.	Boğaz	M	t005	X10
57	22	E	Reanim.	TAK	B	t127	X18
59	64	K	Reanim.	TAK	A	t030	X1
60	75	K	D. Yoğ. B.2	TAK	B	t030	X4
61	4	K	Ç. Yoğ. B..	TAK	B	t030	X1
64	13	E	Ç. Sağ.2 S.	Yara S.	M	t4565	X8
65	44	E	Göz H. S.	Dren	F	t127	X18
66	3	K	Ç. Yoğ. B.	TAK	B	t030	X1
67	3	K	Ç. Yoğ. B.	Yara S.	B	t030	X3
68	34	E	Nefro. P.	Yara S.	G	t091	X23
69	43	E	Nefro. P	Yara S.	B	t127	X18
70	1	E	Ç. Enf. S.	Yara S.	B	t002	X19
71	45	K	Yanık Ü.	Yara S.	G	t005	X7
72	1	E	Ç. Sağ.2 S.	Kan	A	t030	X15
73	46	K	Üroloji S.	Dren	D	t459	X13
74	17	K	Ç.Gas-HepS.	Yara S.	B	t008	X22
75	14	K	Ç.Onk S.	Kan	H	t223	X8
76	77	K	Nöro. Y. B.	Kan	A	t030	X1
77	14	E	Ç. Hem. S.	Kan	H	t223	X8
78	5	K	Ç. Enf. P.	Yara S.	N	t2816	X7
79	17	K	Ç. Cer. P.	Yara S.	B	t008	X22
80	70	E	Nöro. S.	İdrar	G	t223	X8
81	73	E	Üroloji P.	İdrar	B	t030	X1
83	47	K	Beyin C. S.	Yara S.	G	t223	X9
85	30	E	Göğüs H. S.	Balgam	B	t030	X1
86	30	E	D. Endok. S.	Yara S.	A	t030	X1
87	311	E	Ç. K.D.C.S.	Yara S.	A	t301	X20

Çalışmanın yapıldığı süre içerisinde hastanemizde uygulanan aktif sürveyans sistemi tarafından toplam 12 suş hastane enfeksiyonu olarak değerlendirildi. Bu suşlardan 5 tanesi t030, 3 tanesi t127, 3 tanesi t037, 1 tanesi ise t223 olarak tiplendirildi ve PFGE paternine göre de A, B, D, F ve G gruplarına dağıldı (Tablo 19).

Tablo 19. Hastane enfeksiyonu etkeni olan suşların özellikleri.

Numarası	Örnek	Enfeksiyon	<i>spa</i> tipi	PFGE tipi
7	TAK	VİP	t030	A
14	TAK	VİP	t223	G
15	TAK	VİP	t127	F
18	Balgam	Pnömoni	t127	B
34	Kan	Bakteriyemi	t037	D
49	Yara sürüntü	Yanık enfeksiyonu	t037	D
51	Kan	Bakteriyemi	t037	D
52	TAK	VİP	t127	B
54	TAK	VİP	t030	B
59	TAK	VİP	t030	A
61	TAK	VİP	t030	B
76	Kan	Bakteriyemi	t030	A

TAK: Trakeal aspirat kültürü, BAL: Bronkoalveolar lavaj, VİP: Ventilator ilişkili pnömoni.

5. TARTIŞMA

Staph. aureus asemptomatik nazal taşıyıcılıktan komplike olmayan cilt enfeksiyonlarına, yüksek mortalite ile seyreden bakteriyemiden, endokardit ve osteomyelit gibi ciddi enfeksiyonlara kadar değişen geniş bir spektrumda klinik tablolara yol açabilen eski ve önemli bir patojendir. Metisilinin klinik kullanımından kısa bir süre sonra 1961’de başlayan MRSA sorunu giderek artarak önce hastanelerin sonra herhangi bir tıbbi müdahale öyküsü olmayan toplum bireylerinin problemi haline gelmiştir. HK-MRSA’ya göre daha küçük bir *SCCmec* elementi taşıyan TK-MRSA suşları, HK-MRSA suşlarına göre daha hızlı çoğalarak geniş kitlelere yayılma şansı bulmuş ve bazı coğrafi bölgelerde toplum kökenli enfeksiyonların yanı sıra hastane kökenli enfeksiyonlar için de major patojen haline gelmiştir¹⁶⁰.

Toplum sağlığını tehdit eden diğer enfeksiyon ajanlarında olduğu gibi, yataklı tedavi kurumlarında ve toplumda, tedavi başarısızlıklarının yaşandığı ciddi sağlık problemlerine yol açan MRSA suşlarının; hareketinin takibi, salgınlarda kaynak ve yayılım yollarının tespiti ve daha da önemlisi epidemik klonların evrimleri ve yayılışının incelenmesi ile zaman içerisindeki değişikliklerin takibi için duyarlı, uygulanabilir ve tekrarlanabilirliği olan yeterli diskriminatif güce sahip moleküler metodların kullanılmasına ihtiyaç vardır. Bu amaçla süveyans amaçlı her laboratuvar kendi bölgesinde izole edilen MRSA suşlarını tiplendirmek için imkan ve kabiliyetleri içerisinde yer alan en uygun metod veya metodların kombinasyonunu tercih etmelidir.

MRSA süveyansı için bugüne kadar kullanılan metod veya kombinasyonlardan hiç birisi tam olarak istenilen ayırım gücüne sahip bulunmasada PFGE, MLST, *SCCmec* tiplendirme ve *spa* tiplendirme, çalışmalarda en çok refere edilen yöntemler olmuştur. Uzun bir süre PFGE yöntemi *Staph. aureus* suşlarının tiplendirilmesinde altın standart olarak kabul edilmiştir. Bir çok ülke kendi lokal klonlarını PFGE verilerine göre özel olarak isimlendirmiştir. Ancak elde edilen bu verilerin yeteri kadar ayırım gücüne sahip olmadığı düşünülerek, bu klonlar içerisinde yer alan suşların daha ayrıntılı klonal ilişkilerini tespit için ilave farklı yöntemler kullanılmıştır. Buna karşılık, MLST ve *spa* tiplendirme metodlarının yardımı ile elde edilen sonuçların laboratuvarlar arasında yüksek tekrarlanabilir oluşu, standardizasyonunun kolaylığı ve bütün dünyada ortak bir isimlendirmenin olması bu yöntemleri PFGE yöntemine göre daha avantajlı hale

getirmiştir. MLST, *spa* tiplendirmeye göre daha düşük ayırım gücüne sahip olmasına rağmen, klonal evrimleşmenin takibinde daha üstün bir yöntemdir. Buna karşılık *spa* tiplendirme yöntemi kabul edilebilir bir ayırım gücüne sağlamasının yanı sıra tek bölgeyi hedef aldığı için daha düşük maliyete sahip olma üstünlüğü getirmektedir. Ayrıca son sürümlerde StaphType yazılımına eklenen BURP algoritması sayesinde elde edilen veriler evrimin izlenmesinde MLST ile de yüksek derecede uyumlu bulunmuştur^{15,16,18,19,20,21}.

Bu yöntemler ile her biyocoğrafik bölgenin hastane ve toplum kökenli suşları arasında çok sayıda tip ve küme elde edilse de, genellikle bölgesel farklılıklar göstermek üzere belirli klonların dominant oldukları tespit edilmiştir. Mesela ABD’de ST8-t008 (USA300) ve ST5-t002 klonları hakimken^{49,120,122}, Avrupa’da ST22-t032’nin daha yaygın klon olduğu, Fransa ve Belçika’da Amerika’ya benzer şekilde ST8-t008^{109,161} sıkken doğuya doğru gidildikçe Bulgaristan ve Romanya gibi Balkan ülkeleri ve ülkemizde de en baskın *spa* tipinin t030, MLST tip ST239 ve SCCmec tip III’olduğu tespit edilmiştir¹⁰⁹. Çin’de en yaygın klonun ST239-t030 ve BURP analizine göre t030 ile aynı CC içerisinde olan ST239-T037¹⁶², Kore’de¹¹⁰ en yaygın klonun ST239-t037, Tayvan’da¹⁶³ en yaygın klonun ST5-t002 ve ST239-t037 olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.

Biz bu çalışmada 2012-2013 yılları arasında kalan 12 aylık süre içerisinde hastanemiz kliniklerinde takip edilen hastalara ait örneklerden izole edilen 75 MRSA suşunu moleküler sürveyans için altın standart yöntem olarak kabul edilen PFGE yöntemi ve yine son yıllarda bu amaç ile kullanılan en popüler yöntemlerden biri olan *spa* tiplendirme yöntemleriyle inceledik. Test izolatlarının PFGE ile 11 küme, *spa* tiplendirme ile 18 tipe dağıldığını tespit ettik. *spa* tiplendirme ile 31 izolatın (% 41,3) t030 tipine ait olduklarını gördük. Bunu 9 izolat ile t223 (% 12), 7 izolat ile t127 (% 9,3), 6 izolat ile (% 8) t037 ve 4 izolat ile t005 (% 5,3) izliyordu. PFGE kümeleri arasında birbirine % 84,1 oranında benzeyen A ve B kümeleri tüm izolatların % 61’ini oluşturmaktaydı ve bu kümelerde t030 dominant *spa* tipiydi. Ancak t030’dan başka A kümesi 2, B kümesi 6 *spa* tipini daha içermekteydi. Üçüncü en sık *spa* tipi olan ve BURP analizi ile t030 ile aynı klonal kompleks içerisinde bulunmayan t127 de B kümesi içerisindeydi. İkinci en sık *spa* tipi olan t223 de birbirine % 80,1 oranında benzeyen G, H ve J kümesi içerisinde bulunmaktaydı. En sık görülen bu *spa* tipleri

dışındaki diğer daha az ya da sporadik görülen *spa* tipleri, çeşitli PFGE kümelerine dağılmıştı. Sonuç olarak dominant *spa* tipleri PFGE ile de yakın ilişkilendirilirken sporadik tiplerde homojen olmayan bir dağılım söz konusuydu.

Kullandığımız iki süveyans yöntemi doğaları gereği genetik varyasyonun tespitinde iki farklı hedefi kullanmaktadır. PFGE kontrollü ortamda total genomun enzimatik hidrolize cevabını incelerken *spa* tiplendirme analizi sadece *spa* geninin tekrar bölgesindeki polimorfizmi hedef almaktadır. Bakteri klonunun mutasyon hızı ki yaklaşık olarak bir aylık period içerisinde en az bir major fragmentte kırılma beklenmektedir, PFGE fragment paternini değiştireceğinden test suşlarının izolasyon tarihleri ile çalışma tarihleri arasındaki süre farklarının minor düzeyde de olsa PFGE sonuçlarını etkilemesi beklenir. Oysa *spa* bölgesinin mutasyon hızının tüm genoma göre daha az olduğu ve çok daha uzun zaman aralığında test sonuçlarını etkilemeyecek kadar önemsiz olacağını düşündürmektedir. Ancak çok sayıdaki çalışmada *spa* tiplendirmenin daha diskriminatif bulunması bazı *Staph. aureus* klonlarında *spa* genindeki mutasyon hızının daha yüksek olması varsayımı ile açıklanmıştır.

Vainio ve ark. (2010) 589 kan kültürü izolatıyla yaptıkları çalışmada 38 *spa* tipi ve 25 PFGE tipi belirlemiştir. Bu çalışmada Finlandiya’da TK-MRSA’da en sık görülen PFGE paterni olan FIN-4 (n;220) ve HK-MRSA’da en sık görülen FIN-16’nın (n;196) % 90 oranında sırasıyla t172 ve t067 *spa* tipi içerdiği tespit edilmiştir. Bu dominant PFGE tipleri içerisindeki tüm *spa* tiplerinin yine aynı *spa* klonal kompleksi içerisinde yer aldığı gösterilmiştir. Dominant bir *spa* tipi içeren FIN-5 haricinde diğer sporadik PFGE kümelerinin ise belirgin dominantlığı olmayan farklı *spa* tiplerini içerdiği bildirilmiştir. Farklı bir bakış açısı ile çalışmada elde edilen *spa* tiplerinin % 48’inin birden fazla PFGE kümesiyle ilişkili olduğu belirtilmiştir⁸⁷. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde dominant *spa* tipleri PFGE ile de yakın ilişkilendirilirken, sporadik tiplerde homojen olmayan bir dağılım belirlendi.

Çalışmamızda *spa* tiplendirmeyi tercih etmemizin amacı çeşitli çalışmalarda *spa* BURP analizi ile elde edilen sonuçların MLST ile yüksek korelasyon gösterdiğinin belirlenmesiydi. Strommenger ve ark. (2006) Almanya’da yaptıkları bir çalışmada 6 ay boyunca Ulusal Stafilocok Referans Laboratuvarına gönderilen ve 1176’sı (% 81) MRSA; 283’ü (% 19) MSSA olarak tanımlanmış toplam 1459 izolati incelemişlerdir. Bütün izolatları *spa* tiplendirme yöntemi ile tiplendiren bu çalışmada, suşların 283 *spa*

tipi içerisinde yer aldıklarını tespit edilmiş ve çok daha az sayıda olmasına rağmen MSSA izolatlarındaki çeşitliliğin MRSA izolatlarından daha fazla olduğunu ve çoğu tiplerin sadece bir suşu temsil ettiğini bildirmişlerdir. MSSA izolatları arasında tek predominant tipin t008 olduğunu buna karşılık MRSA’da suşların % 50’sinin t032 ve t003 *spa* tipi kümesinde toplandığını tespit etmişlerdir. Bu iki major tipi t008 ve t002 *spa* tiplerinin izlediğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar daha sonra MRSA ve MSSA suşları arasından seçtikleri 73 izolatı PFGE ve MLST ile tekrar değerlendirmişlerdir. Çalışma sonucunda; *spa* tiplendirme BURP analizi ile MLST eBURST analizi arasında 0,983; MLST ile *spa* tiplendirme arasında 0,963; PFGE küme analizi ile *spa* tiplendirme BURP analizi arasında 0,915 uyum izlenmiştir. Ek olarak Almanya’da sık izlenen klonlardan biri olan CC22’ye ait olan 442 izolatın *spa* tiplendirme ile 37 tipe PFGE ile sadece 2 kümeye ayrıldığını görmüşler, *spa* tiplendirmeyi daha diskriminatif bulmuşlardır¹⁶.

Berit Schulte ve ark. da (2012) Almanya’da 1996’dan beri en sık görülen klon olan “*Rhine-Hesse*” klonuna ait 79 izolatı PFGE, *spa* ve MLST yöntemleri ile genotiplendirmişlerdir. Bu çalışmada PFGE ile diğer klonlardan kolayca ayrılan tek bir küme olan *Rhine-Hesse* klonu içerisinde, MLST ile 2 (ikisi de CC5’de yer alan ST5 ve ST225), *spa* tiplendirme ile de 7 tip tespit etmişlerdir. Bu yedi *spa* tipinin t003, t045, t264, t1486 dan oluşan CC003/045 ve t002, t105, t1305 den oluşan CC105 olmak üzere 2 BURP kümesinde yer aldıklarını bildirmişlerdir. t045 *spa* tipi haricinde *spa* CC ile MLST tipleri arasında %100 uyum izlenmiş ve CC105 izolatları ST5, CC003 izolatları ST225 olarak tanımlanmıştır¹⁶⁴.

Biz çalışmamızda bir PFGE kümesi içerisinde aynı klonal kompleks içerisinde bulunmayan *spa* tiplerinin olabileceğini gördük. Örneğin t030 ile t127 aynı klonal komplekste bulunmamalarına rağmen, her ikisi de PFGE B kümesinde yer almaktaydı. David ve ark. (2011) random olarak seçtikleri 149 örneği inceledikleri çalışmalarında benzer bir sonucu gözlemlemişlerdir. Çalışmalarında USA100, USA300, USA500, USA800, USA900 ve daha önceden bilinen bir PFGE kalıbına benzemeyen non-typable (NT) olmak üzere toplam 6 PFGE tipi ve 17 *spa* tipi belirlemişlerdir. USA100 kümesinde baskın *spa* tipi t002 olmakla beraber BURP analizi ve MLST ile ilişkisiz olduğu gösterilen 3 *spa* tipinin daha bulunduğunu tespit etmişlerdir. Aynı şekilde USA500 kümesi içerisindeki birbiriyle ilişkisiz 3 *spa* tipi de PFGE ile birbirinden

ayırtdilememiştir. Ayrıca en sık tespit ettikleri pulsotip olan USA300 kümesi içerisinde, t008 *spa* tipi dominant olmak üzere, toplam 8 *spa* tipinin yer aldığını belirlemişlerdir¹⁶⁵.

Kanada Hastane Enfeksiyonları Surveyans Programı (CNISP) çalışma grubu 13 yıllık bir surveyans sonrası 10 epidemik Kanada MRSA (CMRSA1-10) pulsotipini belirlemiştir. Golding ve ark. (2008), CNISP'e ait 14000 izolattan her CMRSA tipini temsil edecek şekilde seçtikleri 1488 suşu *spa* yöntemi ile tiplendirmişlerdir. Bu çalışmada araştırmacılar % 100 benzeyen 805 PFGE paterni, 114 *spa* tipi tespit ettiklerini bildirmişlerdir. *spa* tiplerinin BURP ile analizini yapan araştırmacılar suşların 6 klonal komplekse ayrıldığını görmüşlerdir. Klonal komplekslerle PFGE tipinin ilişkisini inceleyen araştırmacılar CC1'in sadece CMRSA 1'i, CC2'nin CMRSA 2'yi, CC3'ün CMRSA 7'i, CC4'ün CMRSA 8'i içerdiğini belirlemiştir. CC6'nın, MLST ve PFGE ile de yakın ilişkili bulunan CMRSA 5, 9 ve 10'u kapsarken; CC5'in yakın ilişkili olan CMRSA 3 ve 6 ile bunlarla uzak ilişkili olan CMRSA 4'ü içerdiğini görmüştür. Yani *spa* BURP analizinin CMRSA 4'ü ilişkisiz olduğu CMRSA 3 ve 6'dan ayıramadığını tespit etmişlerdir. CMRSA 3 ve 4, MLST CC8; CMRSA 6 ise MLST CC30 kümelerinde olup bu iki kümenin *spa* ile ayıramadığı başka çalışmalarda da bildirilmiştir¹⁶⁶. Bizim çalışmamızda da bazı *spa* tiplerinin birden fazla PFGE kümesine dağıldığını gözlemledik. Örneğin; t127; B ve F kümelerine, t037; B, D ve G kümelerine dağılmıştı.

Çalışmamızda dominant *spa* tipleri olarak bulunan t030 ve t223 suşlarının, bir t030 izolatu hariç, tamamının PFGE analizine göre de ilişkili ($\geq$ %80 eşik değeri ile) kümeler içerisinde yer aldıklarını gördük. Hudson ve ark. 2008-2010 yılları arasında yaptıkları bir çok merkezli çalışmada 31 merkezden izole ettikleri 2246 suşu değerlendirmişler, çalışma sonucunda test suşlarının 134 *spa* tipine dağıldığını, ancak % 83'ünün t008 (% 46), t242 (% 21,3) ve t002 (% 15,4) *spa* tipinde toplandığını bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar *spa* tiplerinin BURP analizine göre; % 78'inin iki büyük küme olan *spa* CC008 ve *spa* CC242'de yer almak üzere toplam 8 klonal komplekse ayrıldıklarını belirtmişlerdir. Daha sonra test suşları içerisinde seçtikleri 284 izolatu MLST ile tiplendiren araştırmacılar t008 *spa* tipinin ST8, t242 ve t002 *spa* tipinin ise ST5 olduğunu, bunların PFGE ile sırasıyla USA300 (dominant TKMRSA klonu) ve USA100 suşları olduklarını tespit etmişlerdir¹⁶⁰.

Bizim çalışmamızda en sık görülen *spa* tipi t030 olup, Türkiye’de yapılan çeşitli çalışmalarda da yaygın klon olarak gösterilmiştir. MLST tipi ST239 olan bu klonun ilk olarak Brezilya’da çok sayıdaki hastanede geniş yayılım gösterdiği tespit edilmiş ve bu sebeple bu klon Brezilya klonu olarak adlandırılmıştır. Daha sonra Arjantin, Şili, Uruguay gibi komşu Güney Amerika ülkelerine ve Portekiz, Çek Cumhuriyeti, Yunanistan gibi Avrupa ülkelerine yayılan bu klon günümüzde çoğu Asya ülkesinde epidemik olarak görülmektedir¹⁶².

Hongbin Chen ve ark. Çin’de 1994-2008 yılları arasında hastanelerinde izole ettikleri 302 MRSA suşu ile yaptıkları çalışmada 1994-2000 yılları arasında baskın klonun % 92,6 oranında ST239-MRSA-III-*spa* t037 olduğunu, fakat 2000 yılında sonra bu klonun hızla azalarak 2002-2008 yılları arasında görülme sıklığının % 9,1’e kadar düştüğünü tespit ettiklerini belirtmişlerdir. Ancak bu klonun yerini 2000 yılından önce hiç rastlanmayan ST239-MRSA-III-*spa* t030 almaya başladığını ve 2008 yılında bu yeni klonun insidansının % 89,6’ya ulaştığını bildirmişlerdir. Random seçilen 15 t030 izolatına yapılan PFGE ile t037 ve t030 *spa* tiplerinin birbirinden farklı ilişkisiz kümeler içerisinde yer aldıklarını tespit etmişlerdir. Diğer taraftan ABD’de yaygın görülen ST5-MRSA-II-*spa* t002’ de % 2 oranında tespit ettiklerini bildirmişlerdir¹⁶². Yong Chen ve ark. da 2011-2012 yılları arasında izole edilen 151 MRSA izolatı ile yaptıkları bir başka çok merkezli çalışmada ST239-MRSA-t030 klonunun en sık görülen klon olduğunu (% 80,1) tespit etmişlerdir¹⁶⁷.

Türkiye’de yapılan sınırlı sayıdaki çalışmada tespit edilen baskın tipin bizim çalışmamızla uyumlu şekilde t030 olduğu görülsede, bildirilen oranlar bizim t030 oranımızdan çok daha yüksektir. Biz bu farkın örnek seçiminden kaynaklanabileceğini düşündük. Bizim çalışmamızda değerlendirdiğimiz test suşları sayı azlığı sebebi ile toplum veya hastane kökenli olarak ayırt edilememiştir. Bu da toplum ve hastane kökenli klonların farklılığının gerçekçi değerlendirilmesinin yapılamamasına yol açmış olabilir. Ancak elde edilen sonuç bölge genelinin profilini vermesi açısından önemlidir. Bu giderek artan sıklıkta bazı toplum kökenli izolatlarının bilinen HK-MRSA izolatlarının yerini almaya başladığı gerçeğinden hareketle daha sonra yapılacak çalışmalar için bulgularımız yol gösterici olacaktır.

Ergon ve ark. 2003-2004 yıllarında Dokuz Eylül Üniversitesi hastanesinde yatan farklı hastalardan gönderilen kan kültürlerinden izole edilen *Staph. aureus* izolatları

arasında en sık görülen antibiyogram profilini taşıyan, dokuz MRSA suşunu incelemişler ve sonuç olarak bir PFGE paterninin hakim olduğunu ve dominant klonun MLST-239, SCCmecIII, *spa* t030 olduğunu belirtmişlerdir¹¹³.

Alp ve ark. da 2005-2006 yılları arasında Türkiye'nin altı bölgesindeki 8 üniversite hastanesinden invaziv enfeksiyonlardan izole edilen 54 suşla yaptıkları çalışmada 22'si birbiriyle yakın ilişkili bir tanesi ilişkisiz olmak üzere toplam 23 PFGE paterni tespit etmiştir. Örneklerin tamamına *spa* tiplendirme de yapan araştırmacılar suşların % 89'unun t030 olduğunu belirlemişlerdir. İki örnek t459, birer örnek ise t1459 ve t189 olarak gösterilmiştir. Aynı kümede olduğunu düşündükleri 22 PFGE tipindeki örneklerin tamamı t030 ve t030'dan derive olduğu düşünülen t459 ve t1459 iken, ilişkisiz olan bir PFGE tipindeki tek izolat ise t189 olarak tespit edilmiştir¹⁶⁸.

Yılmaz ve ark. ise Giresun Üniversitesi'nde üç aylık bir zaman diliminde çeşitli klinik örneklerden izole edilen ve Enfeksiyon Kontrol Komitesi tarafından 18'i kolonizasyon, 30'u hastane enfeksiyonu etkeni olarak kabul edilen 48 MRSA suşu ile hastane enfeksiyonu etkeni olarak kabul edilen 7 MSSA suşunu incelemişlerdir. Bu çalışmada PFGE ile MRSA izolatlarında 14, MSSA izolatlarında ise 7 farklı pulsotip belirlenmiştir. İki izolat dışında (t459, t632) MRSA izolatlarının hepsinde *spa* tipi t030 olarak gösterilmiştir. Farklı 3 *spa* tipinden birer temsilci seçilerek MLST yöntemi uygulandığında, tek MLST klonal kompleks tipi (CC8) ve tek MLST dizi tipi (ST239) tespit edilmiştir. İncelenen 7 MSSA izolatının ise her birisinin *spa* tipi, MLST dizi tipi ve MLST klonal kompleks tipinin farklı olduğu izlenmiştir¹⁶⁹.

Bozdoğan ve ark. 2008-2009 yıllarında 12 farklı ilden toplanan 397 izolatın; SCCmec, PFGE, MLST ve *spa* tiplendirmelerini yaparak klonal ilişkilerini araştırmıştır. Bu çalışmada 2011 yılı içinde 12 merkezin 4'ünden izole edilmiş olan toplam 91 MRSA izolatının da *spa* tipleri incelenmiştir. PFGE'de pulsotip A'nın Türkiye'deki MRSA izolatları arasında en yaygın pulsotip olduğu görülmüş (% 91,4), 18 suşun (% 4,5) pulsotip B ve 11 suşun (% 2,8) pulsotip C olduğu tespit edilmiştir. Bulunan 7 *spa* tipi içerisinde 338 (% 85,1) suş ile en sık görülen *spa* tipinin t030 olduğu belirlenmiştir. Bunu % 2,5 ile t005, % 2 ile t632 izlemiştir. t030, 2011 yılında da en yaygın olan tip olarak belirlenmiş ama % 70,3'e gerilemiş ve bu merkezlerde sporadik *spa* tipleri tespit edilmiştir. En fazla azalma, 2006-2008 örneklerinde % 94,5 iken 2011 örneklerinde % 55,5'e düşen İstanbul örneklerinde görülmüştür. Bizim çalışmamızda t030 oranı % 41,3

olarak belirlendi. Ama t030 ile aynı klonal kompleks içerisindeki t037 de % 8 oranında tespit edildi. Bundan başka t459 ve t7576 da birer izolatla t030 ile aynı klonal kompleks içerisindeydi. Bozdoğan ve ark.'nın çalışmasında Türkiye'deki en yaygın MRSA klonu olan ST239-SCC*mec* tip III, t030 "Türkiye klonu-TR09" olarak ve ST737-SCC*mec* tip IV, t005 en yaygın olarak görülen toplum kökenli klon olup TR10 olarak adlandırılmıştır. Bizim çalışmamızda da t005 % 5,3 oranında tespit edildi ama ikinci en sık görülen *spa* tipi olan t223 (% 12) ve t790 (n:2), t4565 (n:1), t2816 (n:1), t016 (n:2) de BURP analizi ile t005 ile aynı klonal kompleks içerisinde yer almaktaydı¹⁷⁰.

Biz çalışmamızda daha önce ülkemizde hiç belirlenmeyen t127'yi en sık tanımlanan üçüncü *spa* tipi olarak belirledik. Metisiline duyarlı ve dirençli t127 klonları çeşitli çalışmalarda insan, gıda ve hayvanlardan izole edilmiş ve toplum kökenli olarak kabul edilmiştir. Metisiline duyarlı *spa* t127, Almanya'da 2014 yılında dondurma kaynaklı bir besin zehirlenmesi salgınında insan ve gıda örneklerinden izole edilmiştir¹⁷¹. Yine 2014 yılında Çin'de yapılan bir çalışmada yemekhane çalışanlarının nazal kültürlerinde en sık izole edilen tiplerden birisi MSSA t127 olarak belirlenmiştir¹⁷². Metisiline dirençli t127' nin, 2004 yılında Birmingham'da bir yenidoğan ünitesi salgını sırasında bir hastane çalışanı ve 4 bebekte kolonize olduğu tespit edilmiştir. Yayınladıkları makalelerinde epidemik TK-MRSA klonlarından olmayan ve SCC*mec* tip IV taşıyan bu klonun bir TK-MRSA olduğunu ve epidemiyolojik takibin önemini vurgulamışlardır.¹⁷³ Londra'da yapılan bir çalışmada da 2000-2006 yılları arasında TK-MRSA'lar içerisinde en sık t127 tespit edilmiştir¹⁷⁴. İtalya'da 2011 yılında domuz yetiştiricilerinin ve domuzların nazal kavitesi ile çiftlikten alınan çevresel örneklerden MRSA t127 izole edilmiştir¹⁷⁵. Bu klon bizim hastanemizde de TK-MRSA içerisinde en sık görülen ikinci tip olarak tespit edilmiştir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Ç.Ü. Balcalı Hastanesi poliklinik ve kliniklerde takip edilmekte olup, enfeksiyon ön tanısı ile alınan klinik materyalleri Merkez Laboratuvarına gönderilen hasta örneklerinden izole edilerek Vitek 2 sistemi ile identifikasyonu ve antibiyotik duyarlılığı belirlenen 75 MRSA izolatının, muhtemel bir salgına ışık tutmak amacı ile klonal ilişkilerinin PFGE ve *spa* dizi tiplendirme metodları kullanılarak değerlendirildiği çalışmamızda;

1. Değerlendirilen MRSA suşlarının ilişki oranı $\geq$ % 85 olarak kabul edildiğinde, PFGE yöntemi ile 11 major küme içerisinde toplandıkları ve % 84,1 benzerlik oranı ile ilişkisiz kabul edilerek A ve B kümesine dağılan izolatların tüm izolatların % 61,3'ünü oluşturduğu,
2. MRSA izolatların *spa* dizi tiplendirme yöntemi ile 18 tip içerisinde dağıldıkları ve bu tiplerin BURP algoritması ile incelendiğinde 5 CC ve 2 tek üyeli tip oluşturdukları,
3. *spa* tipi t030'un % 41,3'lük insidans ile dominant genotip olduğu ve bu genotipte yer alan suşların antibiyotik direnç profili ve Hastane Enfeksiyonları Kontrol Komitesi tarafından tanımlanmış “hastane enfeksiyonu” olgularından en sık izole edilen izolatlar oluşu nedeni ile hastane klonu olduğu,
4. *spa* tipi t030'un, bir suş haricinde, PFGE ile A ve B kümesi içerisinde yer aldığı,
5. Toplum kökenli olduğu düşünülen *spa* tiplerinin aynı CC içerisinde bulunmayan t223 ve t127 olup, bu genotiplerin dağılımının sırasıyla % 12 ve % 9,3 oranlarında olduğu,
6. Birbirinden farklı zamanlarda ve farklı yerlerden alınan birden fazla izolatu bulunan hastaların sonuçları incelendiğinde 3 hastada izolatların aynı PFGE ve *spa* tipinde olduğu, bir hastadan izole edilen suşların ise *spa* tipinin değişmemesine rağmen PFGE tipinin farklı olduğu tespit edildi.

Hastane ve toplum kökenli MRSA suşlarının long-term ve short-term sürveyansında yüksek tekrarlanabilirlik ve ayırım gücüne sahip olan PFGE birçok araştırmacı tarafından altın standart olarak kabul edilmiştir. Ancak bazı klonlar için daha yüksek ayırım gücüne sahip olan *spa* dizi tiplendirme metodu özellikle sporadik suşların tanımlanmasında ek bir ayırım ve isimlendirme sağlamaktadır. Ayrıca *spa* dizi tiplendirme BURP algoritması sayesinde izolatların evrimsel ilişkilerinin analizine de imkan sağlayacaktır. En az PFGE kadar iyi standardize edilmiş olan *spa* tiplendirmenin ortak dil oluşturulması ve verilerin tüm dünya ile kolay karşılaştırılabilmesini sağlaması nedeniyle tek başına veya PFGE yöntemi ile birlikte kullanılması MRSA klonlarının hastane ve toplumda yerel, ülkesel ve evrensel anlamda takibi için son derece faydalı olacaktır. Kanaatimizce kısa dönemli salgın incelemelerinde ve uzun dönemli soy ilişkisi araştırmalarında *spa* dizi tiplendirme yönteminin PFGE ile birlikte kullanımı ve bu çalışmanın daha uzun süre ve daha fazla örnek kullanılarak tekrarlanması faydalı olacaktır.

KAYNAKLAR

1. **Lowy FD.** *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* **1998**; 339:520–532.
2. **Aires de Sausa M, De Lencastre H.** Bridges from hospitals to the laboratory: genetic portraits of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* clones. *FEMS Immunol Med Microbiol* **2004**; 40: 101–111.
3. **Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE.** The molecular evolution of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* **2007**;13: 222-235.
4. **WitteW.** International dissemination of antibiotic resistant strains of bacterial pathogens. *Infect Genet Evol* **2004**; 4: 187-191.
5. **Kluytmans-Vandenbergh MF, Kluytmans JA.** Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: current perspectives. *Clin Microbiol Infect* **2006**; 12: 915.
6. **Salgado CD, Farr BM, Calfee DP.** Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a meta-analysis of prevalence and risk factors. *Clin Infect Dis* **2003**; 36:131–139.
7. **Seybold U, Kourbatova EV, Johnson JG, Halvosa SJ, Wang YF, King MD, Ray SM, Blumberg HM.** Emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 geno-type as a major cause of healthcare-associated bloodstream infections. *Clin Infect Dis* **2006**; 42: 647–656.
8. **Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ.** Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clin Microbiol Rev* **2006**; 19: 512–530.
9. **Struelens MJ.** Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *Clin Microbiol Infect* **1996**; 2: 2–11.
10. **Murchan S, Kaufmann ME, Deplano A, de Ryck R, Struelens M, Zinn CE, Fussing V, Salmenlinna S, Vuopio-Varkila J, El Solh N, Cuny C, WitteW, Tassios PT, Legakis N, Van Leeuwen W, Van Belkum A, Vindel A, Laconcha I, Garaizar J, Haeggman S, Olsson-Liljequist N, Ransjo U, Coombes G, Cookson B.** Harmonization of pulsed-field gel electro-phoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains. *J Clin Microbiol* **2003**; 41: 1574–1585.

11. **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* **1995**; 33: 2233–2239. Harbarth S.
12. **Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG.** Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* **2000**; 38: 1008–1015
13. **Harmsen D, Claus H, Witte W, Rothganger J, Claus H, Turnwald D, Vogel U.** Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for *spa* repeat determination and database management. *J Clin Microbiol* **2003**; 41: 5442–5448.
14. **Aires de Sousa M, Boye K, de Lencastre H, Deplano A, Enright MC, Etienne J, Friedrich A, Harmsen D, Holmes A, Huijsdens XW, Kearns AM, Mellmann A, Meugnier H, Rasheed JK, Spalburg E, Strommenger B, Struelens MJ, Tenover FJ, Thomas J, Vogel U, Westh H, Xu J, Witte W.** High interlaboratory reproducibility of DNA sequence-based typing of bacteria in a multicenter study. *J Clin Microbiol* **2006**; 44: 619–621.
15. **Strommenger B, Kettlitz K, Weniger T, Harmsen D, Friedrich AW, Witte.** Assignment of *Staphylococcus* Isolates to Groups by *spa* Typing, SmaI Macrorestriction Analysis, and Multilocus Sequence Typing. *J Clin Microbiol* **2006**; 44(7): 2533–2540.
16. **Strommenger B, Braulke C, Heuck D, Schmidt C, Pasemann B, Nubel U, Witte W.** *spa* Typing of *Staphylococcus aureus* as a Frontline Tool in Epidemiological Typing. *J Clin Microbiol* **2008**; 46: 574–581.
17. **Cookson BD, Robinson DA, Monk AB, Murchan S, Deplano A, de Ryck R, Struelens MJ, Scheel C, Fussing V, Salmenlinna S, Vuopio-Varkila J, Cuny C, Witte W, Tassios PT, Legakis NJ, van Leeuwen W, van Belkum A, Vindel A, Garaizar J, Haeggman S, Olsson-Liljequist B, Ransjo U, Muller-Premru M, Hryniewicz W, Rossney A, O’Connell B, Short BD, Thomas J, O’Hanlon S, Enright MC.** Evaluation of molecular typing methods in characterizing a European collection of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains: the HARMONY collection. *J Clin Microbiol* **2007**; 45: 1830–1837.
18. **Koreen L, Ramaswamy SV, Graviss EA, Naidich S, Musser JM, Kreiswirth BN.** *spa* typing method for discriminating among *Staphylococcus aureus* isolates: implications for use of a single marker to detect genetic micro- and macrovariation. *J Clin Microbiol* **2004**; 42: 792–799.

19. **Montesinos I, Salido E, Delgado T, Cuervo M, Sierra A.** Epidemiologic genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis at a university hospital and comparison with antibiotyping and protein A and coagulase gene polymorphisms. *J Clin Microbiol* **2002**; 40: 2119–2125.
20. **Shopsin B, Gomez M, Montgomery SO, Smith DH, Waddington M, Dodge DE, Bost DA, Riehman M, Naidich S Kreiswirth BN.** Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol* **1999**; 37: 3556-3563
21. **Tang YW, Waddington MG, Smith DH, Manahan JM, Kohner PC, Highsmith LM, Li H, Cockerill 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* **2000**; 38: 1347–1351.
22. **Hallin M, Deplano A, Denis O, De Mendonca R, de Ryck R, Struelens MJ.** Validation of pulsed-field gel electrophoresis and *spa* typing for long term, nationwide epidemiological surveillance studies of *Staphylococcus aureus* infections. *J Clin Microbiol* **2007**; 45: 127–133.
23. **Ruppitsch W, Indra A, Stoger A, Mayer B, Stadlbauer S, Wewalka G, Allerberger F.** Classifying *spa* types in complexes improves interpretation of typing results for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* **2006**; 44: 2442–2448.
24. **Dündar V, Dündar DÖ.** Stafilokok Enfeksiyonları. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, Ed. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. 3. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, **2008**; 2065-2077.
25. **Bannerman TL.** Staphylococcus, Micrococcus and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover MC, Eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 8th Ed., Washington: DC Publishing Company, **2003**: 384-404.
26. **Peacock SJ.** Staphylococcus. In Borriello SP, Murray PR, Funke G, Eds. *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. 10th Ed., London: Hodder Arnold Publishing Company, **2005**: 771-832.
27. **Bulger RJ, Sherris JC.** Decreased incidence of antibiotic resistance among *Staphylococcus aureus*. *Ann Intern Med* **1968**; 69:1099–1108.
28. **Ayliffe GAJ.** The progressive intercontinental spread of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* **1997**; 24: 74–79.

29. **Duckworth GJ, Lothian JL, Willams JD.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: report of an outbreak in a London teaching hospital. *J Hosp Infect* **1988**; 11: 1-15.
30. **Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T.** The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends In Microbiology* **2001**; 9: 486–493.
31. **Ploy M, Grelaud C, Martin C. de Lumley L, Deniset F.** First clinical isolate of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a French hospital. *Lancet* **1998**; 351:1212.
32. **Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S, Fukuchi Y, Kobayashi I.** Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* **1997**; 350:1670-1673.
33. **Centers for Disease Control and Prevention.** Staphylococcus aureus with reduced susceptibility to vancomycin-United States 1997. *MMWR* **1997**; 46: 765-766.
34. **McManus J.** Vancomycin resistant staphylococcus reported in Hong Kong. *BMJ* **1999**; 318:626.
35. **Kim MN, Pai CH, Woo JH, Ryu JS, Hiramatsuet K.** Vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* in Korea. *J Clin Microbiol* **2000**; 38: 3879-3881.
36. **Centers for Disease Control and Prevention.** Staphylococcus resistant to vancomycin-United States, 2002. *MMWR* **2002**; 51: 565-7.
37. **Peacock S.** *Staphylococcus aureus*. In: Gillespie SH, Hawkey PM, Eds. *Principles and Practice of Clinical Bacteriology*. 2nd Ed., England: John Wiley & Sons Ltd **2005**; 73-98
38. **Que YA, Moreillon P.** *Staphylococcus aureus* (including staphylococcal toxic shock). In: Mandel GL, Bennet JE, Dolin R, Eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 7th Ed., Philadelphia: Churchill Livingstone, **2010**; 2543–2579
39. **Cengiz A.T.** Staphylococcus. In: Ustaçelebi Ş. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Ankara: Güneş Kitabevi, **1999**:339-346.
40. **Koneman EW, Allen SD, William MJ, Schreckenberger PC, Winn WC.** Gram-positive cocci, Part I: Staphylococci and related gram-positive cocci. In: Winn W, Allen S, Janda W, Kneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G., Eds. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 6th Ed., Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, **2006**: 623–671.

41. **Havaei SA, Moghim S, Bardebari AM, Narimani T, Azimian A, Akbari1 M.** The comparison of *Staphylococcus aureus* types 5 and 8 with respect to methicillin resistance in patients admitted to Al-Zahra Hospital by PCR. *Adv Biomed Re.* **2013**; 2: 13.
42. **Graille M, Stura EA, Corper AL, Sutton BJ, Taussig MJ, Charbonnier JB, Silverman GJ.** Crystal structure of a *Staphylococcus aureus* protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: Structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity. *PNAS* **2000**; 97: 5399–5404
43. **Atkins KL, Burman JD, Chamberlain ES, Cooper JE, Poutrel B, Bagby S, Jenkins ATA, Feil EJ, van den Elsen JMH.** *S.aureus* IgG-binding proteins SpA and Sbi: Host specificity and mechanisms of immune complex formation. *Molecular Immunology* **2008**; 45:1600-1611
44. **Khrustalev VV, Ghaznavi-Rad E, Neela V, Shamsudin MN, Amouzandeh-Nobaveh A, Barkovsky EV.** Short repeats in the *spa* gene of *Staphylococcus aureus* are prone to nonsense mutations: stop codons can be found in strains isolated from patients with generalized infection. *Res Microbiol* **2013**; 164:913-922.
45. **Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, Höök M.** Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Microbiology* **2014**; 12: 49–62.
46. **Schaffer AC, Lee JC.** Vaccination and passive immunisation against *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents* **2008**; 32: 71–78
47. **Tomita T, Kamio Y.** Molecular biology of the pore-forming cytolysins from *Staphylococcus aureus*, alpha, gamma hemolysins and leukocidin. *Biosci Biotech Biochem* **1997**; 61: 565-572.
48. **Lindsay JA, Ruzin A, Ross HF, Kurepina N, Novick RP.** The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **1998**; 29: 527-43.
49. **Stefani S, Chung DR, Lindsay JA, Friedrich AW, Kearns AM, Westh H, Mackenzie FM.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): Global epidemiology and harmonisation of typing methods. *Int J Antimicrob Agents* **2012**; 39:273-82.
50. **Tibavizco D, Rodríguez JY, Silva E, Cuervo SI, Cortés JA.** Therapeutic approach to *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Biomedica.* **2007**; 27: 294-307.
51. **Akova M, Çetinkaya-Şardan Y.** Enfektif endokardit, perikardit, myokardit. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, Ed. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 3. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 2008; 1003-1016.

52. **Xue T1, You Y, Hong D, Sun H, Sun B.** The *Staphylococcus aureus* KdpDE two-component system couples extracellular K⁺ sensing and Agr signaling to infection programming. *Infect Immun* **2011**; 79: 2154-2167.
53. **Fournier B, Philpott DJ.** Recognition of *Staphylococcus aureus* by the Innate Immune System. *Clin Microbiol Rev* **2005**; 18: 521-540.
54. **Krishna S, Miller LS.** Innate and adaptive immune responses against *Staphylococcus aureus* skin infections. *Semin Immunopathol* **2012**; 34: 261-280.
55. **Kupper TS, Fuhlbrigge RC.** Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. *Nat Rev Immunol* **2004**; 4: 211-222.
56. **Nestle FO, Di MP, Qin JZ, Nickoloff BJ.** Skin immune sentinels in health and disease. *Nat Rev Immunol* **2009**; 9: 679-691.
57. **Takeuchi O, Akira S.** Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **2010**; 140: 805-820.
58. **Girardi M.** Cutaneous perspectives on adaptive immunity. *Clin Rev Allergy Immunol* **2007**; 33: 4-14.
59. **Miller LS.** Toll-like receptors in skin. *Adv Dermatol* **2008**; 24: 71-87.
60. **Lai Y, Cogen AL, Radek KA, Park HJ, Macleod DT, Leichtle A, Ryan AF, Di NA, Gallo RL.** Activation of TLR2 by a small molecule produced by *Staphylococcus epidermidis* increases antimicrobial defense against bacterial skin infections. *J Invest Dermatol* **2010**; 130: 2211-2221.
61. **Segal AW.** How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol* **2005**; 23: 197-223.
62. **Pilschek FH, Salina D, Poon KK, Fahey C, Yipp BG, Sibley CD, Robbins SM, Green FH, Surette MG, Sugai M, Bowden MG, Hussain M, Zhang K, Kubes P.** A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol* **2010**; 185:7413-7425.
63. **Corbin BD, Seeley EH, Raab A, Feldmann J, Miller MR, Torres VJ, Anderson KL, Dattilo BM, Dunman PM, Gerads R, Caprioli RM, Nacken W, Chazin WJ, Skaar EP.** Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses. *Science* **2008**; 319: 962-965.
64. **Athanasopoulos AN, Economopoulou M, Orlova VV, Sobke A, Schneider D, Weber H, Augustin HG, Eming SA, Schubert U, Linn T, Nawroth PP, Hussain M, Hammes HP, Herrmann M, Preissner KT, Chavakis T.** The extracellular adherence protein (Eap) of *Staphylococcus aureus* inhibits wound healing by interfering with host defense and repair mechanisms. *Blood* **2006**; 107: 2720-2727.

65. **Foster TJ.** Immune evasion by staphylococci. *Nat Rev Microbiol* **2005**; 3: 948–958 53.
66. **Rooijackers SH, van Kessel KP, van Strijp JA.** Staphylococcal innate immune evasion. *Trends Microbiol* **2005**; 13: 596-601.
67. **Otto M.** Basis of virulence in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Microbiol* **2010**; 64: 143-162.
68. **Liu GY, Essex A, Buchanan JT, Datta V, Hoffman HM, Bastian JF, Fierer J, Nizet V.** *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. *J Exp Med* **2005**; 202: 209-215.
69. **Karavolos MH, Horsburgh MJ, Ingham E, Foster SJ.** Role and regulation of the superoxide dismutases of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* **2003**; 149: 2749-2758.
70. **Kim HK, Thammavongsa V, Schneewind O, Missiakas D.** Recurrent infections and immune evasion strategies of *Staphylococcus aureus*. *Current Opinion on Microbiology* **2012**; 15: 92-99.
71. **O'Shea JJ, Paul WE.** Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science* **2010**; 327:1098-1102.
72. **Mathews WC, Caperna JC, Barber RE, Torriani FJ, Miller LG, May S, McCutchan JA.** Incidence of and risk factors for clinically significant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in a cohort of HIV-infected adults. *J Acquir Immune Defic Syndr* **2005**; 40: 155-160.
73. **Skiest D, Brown K, Hester J, Moore T, Crosby C, Mussa HR, Hoffman-Roberts H, Cooper T.** Community-onset methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an urban HIV clinic. *HIV Med* **2006**; 7: 361-368.
74. **Kim HK, Kim HY, Schneewind O, Missiakas D.** Identifying protective antigens of *Staphylococcus aureus*, a pathogen that suppresses host immune responses, *FASEB J* **2011**; 25: 3605-3612.
75. **Struelens MJ, Hawkey PM, French GL, Witte W, Tacconelli E.** Laboratory tools and strategies for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* screening, surveillance and typing: state of the art and unmet needs. *Clin Microbiol Infect* **2009**; 15: 112-119.
76. **Herschleb J, Ananiev G, Schwartz DC.** Pulsed-field gel electrophoresis. *Nat Protoc* **2007**; 2: 677-684.
77. **Li W, Raoult D, Fournier PE.** Bacterial strain typing in the genomic era. *FEMS Microbiol Rev* **2009**; 33: 892-916.

78. **Chung M, de Lencastre H, Matthews P, Tomasz A, Adamsson I, Aires de Sousa M, Camou T, Cocuzza C, Corso A, Couto I, Dominguez A, Gniadkowski M, Goering R, Gomes A, Kikuchi K, Marchese A, Mato R, Melter O, Oliveira D, Palacio R, Sa-Leao R, Sanches IS, Song JH, Tassios PT, Villari P.** Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. *Microb Drug Resist* **2000**; 6:189-198.
79. **Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG.** Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci* **1998**; 95: 3140-3145.
80. **Aanensen DM, Spratt BG.** The multilocus sequence typing network: mlst.net. *Nucleic Acids Res* **2005**; 33: 728-733.
81. **Enright MC, Spratt BG.** Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol* **1999**; 7: 482-7.
82. **Emori TG, Gaynes RP.** An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev* **1993**; 6: 428-442.
83. **van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, Fussing V, Green J, Fei El, Gerner-Smidt P, Brisse S, Struelens M.** Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect* **2007**; 3: 1-46.
84. **Frenay HM, Bunschoten AE, Schouls LM, van Leeuwen WJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Verhoef J, Mooi FR.** Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **1996**; 15:60-4.
85. **Frenay HM, Theelen JP, Schouls LM, Vandenbroucke-Grauls CM, Verhoef J, van Leeuwen WJ, Mooi FR.** Discrimination of epidemic and nonepidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains on the basis of protein A gene polymorphism. *J Clin Microbiol* **1994**; 32(3): 846-7.
86. **van Belkum A.** The role of short sequence repeats in epidemiologic typing. *Curr Opin Microbiol* **1999**; 2(3): 306-11.
87. **Hallin M, Friedrich AW, Struelens MJ.** *spa* Typing for Epidemiological Surveillance of *Staphylococcus aureus*. *Methods in Molecular Biology* **2009**; 551: 189-202.

88. **Mellmann A, Weniger T, Berssenbrugge C, Rothganger J, Sammeth M, Stoye J, Harmsen D.** Based Upon Repeat Pattern (BURP): an algorithm to characterize the long-term evolution of *Staphylococcus aureus* populations based on *spa* polymorphisms. *BMC Microbiol* **2007**; 7: 98.
89. **Berger-Bachi B, Rohrer S.** Factors influencing methicillin resistance in staphylococci. *Arch Microbiol* **2002**; 178:165-171.
90. **Deurenberg RH, Stobberingh EE.** The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol* **2008**; 8: 747-763.
91. **Mongkolrattanothai K, Boyle S, Murphy TV, Daum RS.** Novel non-mecA-containing staphylococcal chromosomal cassette composite island containing *pbp4* and *tagF* genes in a commensal staphylococcal species: a possible reservoir for antibiotic resistance islands in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **2004**; 48: 1823-1836.
92. **Turlej A, Hryniewicz W, Empel J.** Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec) Classification and Typing Methods. *Polish Journal of Microbiology* **2011**; 60(2): 95-103.
93. **Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C, Hiramatsu K.** Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **2001**; 45: 1323-1336.
94. **Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K.** 2000. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **2000**; 44: 1549-1555.
95. **Berglund C, Ito T, Ikeda M, Ma XX, Soderquist B, Hiramatsu K.** Novel type of staphylococcal cassette chromosome mec in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain isolated in Sweden. *Antimicrob Agents Chemother* **2008**; 52: 3512-3516.
96. **Chongtrakool P, Ito T, Ma XX, Kondo Y, Trakulsomboon S, Tiensasitorn C, Jamklang M, Chavalit T, Song JH, Hiramatsu K.** Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in 11 Asian countries: a proposal for a new nomenclature for SCCmec elements. *Antimicrob Agents Chemother* **2006**; 50: 1001-1012.
97. **Li S, Skov RL, Han X, Larsen AR, Larsen J, Sørup M, Wulf M, Voss A, Hiramatsu K, Ito T.** Novel types of staphylococcal cassette chromosome mec elements identified in CC398 methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother* **2011**; 55(6): 3046-3050

98. **International Working Group on the Staphylococcal Cassette Chromosome elements.** [SCC_{mec} up to date](http://www.sccmec.org/). Erişim: (<http://www.sccmec.org/>). Erişim Tarihi: 2015.
99. **International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC).** Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCC_{mec}): guidelines for reporting novel SCC_{mec} elements. *Antimicrob Agents Chemother* **2009**; 53: 4961-4967
100. **Hiramatsu K, Katayama Y, Yuzawa H, Ito T.** Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol.* **2002**; 292: 67-74.
101. **Ito T, Okuma K, Ma XX, Yuzawa H, Hiramatsu K.** Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resist Updat* **2003**; 6: 41-52.
102. **Malachowa N, DeLeo FR.** Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. *Cell Mol Life Sci.* **2010**; 67: 3057-3071.
103. **Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H.** Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clinical Microbiology Reviews* **1997**; 10: 505-520.
104. **Parras F1, Guerrero MC, Bouza E, Blazquez MJ, Moreno S, Menarguez MC, Cercenado E.** Comparative study of mupirocin and oral co-trimoxazole plus topical fusidic acid in eradication of nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **1995**; 39: 175-179
105. European Centre for Disease Prevention and Control (EDCC). Erişim: (http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/database/Pages/map_reports.aspx). Erişim tarihi: 2015
106. **Duman Y, Tekerekoğlu MS, Otlı B.** Toplum ve hastane kökenli *Staphylococcus aureus* klinik izolatlarında Panton-Valentine Lökosidin varlığının ve klonal ilişkinin araştırılması. *Mikrobiyol Bul* **2013**; 47(3): 389-400.
107. **Ulusal Hastane Enfeksiyonlari Sürveyans Aği (Uhesa) Raporu zet Veri, 2013** Erişim: (<http://www.sb.gov.tr/DH/dosya/1-88693/h/uhesa-analiz-2013>). Erişim tarihi: 2015.
108. **Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG.** The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci USA* **2002**; 99: 7687-7692.

109. **Grundmann H, Aanensen DM, van den Wijngaard CC, Spratt BG, Harmsen D, Friedrich AW.** Geographic distribution of *Staphylococcus aureus* causing invasive infection in Europe: a molecular-epidemiological analysis. *PLoS Med* **2010**; 12; 7(1): e1000215.
110. **Song JH, Hsueh PR, Chung DR, Ko KS, Kang CI, Peck KR, Yeom JS, Kim SW, Chang HH, Kim YS, Jung SI, Son JS, So TM, Lalitha MK, Yang Y, Huang SG, Wang H, Lu Q, Carlos CC, Perera JA, Chiu CH, Liu JW, Chongthaleong A, Thamlikitkul V, Van PH.** Spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between the community and the hospitals in Asian countries: an ANSORP study. *J Antimicrob Chemother* **2011**; 66: 1061-1069.
111. **Mejia C, Zurita J, Guzman-Blanco M.** Epidemiology and surveillance methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Latin America. *Braz J Infect Dis* **2010**; 14(1.2): 79-86
112. **Campanile F, Bongiorno D, Borbone S, Stefani S.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* evolution: the multiple facets of an old pathogen. *Eur Infect Dis* **2010**; 4(1): 70-76
113. **Ergon MC, Biçmen M, Gülay Z.** Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi'ndeki dominant metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşunun moleküler yöntemlerle tiplendirilmesi. *ANKEM Derg* **2010**; 24(2): 65-70.
114. **Rodriguez-Noriega E, Seas C, Guzman-Blanco M, Mejia C, Alvarez C, Bavestrello L, Zurita J, Labarca J, Luna CM, Salles MJ, Gotuzzo E.** Evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America. *Int J Infect Dis* **2010**; 14(7): 560-566.
115. **Moodley A, Oosthuysen WF, Duse AG, Marais E.** Molecular characterization of clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in South Africa. *J Clin Microbiol* **2010**; 48(12): 4608-4611.
116. **D'Souza N, Rodrigues C, Mehta A.** Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with emergence of epidemic clones of sequence type (ST) 22 and ST 772 in Mumbai, India. *J Clin Microbiol* **2010**; 48(5): 1806-1811.
117. **Nübel U, Roumagnac P, Feldkamp M, Song JH, Ko KS, Huang YC, Coombs G, Ip M, Westh H, Skov R, Struelens MJ, Goering RV, Strommenger B, Weller A, Witte W, Achtman M.** Frequent emergence and limited geographic dispersal of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci USA* **2008**; 105(37): 14130-14135.
118. **Harris SR, Feil EJ, Holden MT, Quail MA, Nickerson EK, Chantratita N, Gardete S, Tavares A, Day N, Lindsay JA, Edgeworth JD, de Lencastre H, Parkhill J, Peacock SJ, Bentley SD.** Evolution of MRSA during hospital transmission and intercontinental spread. *Science* **2010**; 327(5964): 469-474.

119. **Gray RR, Tatem AJ, Johnson JA, Alekseyenko AV, Pybus OG, Suchard MA, Salemi M.** Testing spatiotemporal hypothesis of bacterial evolution using methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST239 genome-wide data within a bayesian framework. *Mol Biol Evol* **2011**; 28(5): 1593-1603.
120. **Otter JA1, French GL.** Community-associated meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains as a cause of healthcare associated infection. *J Hosp Infect* **2011**; 79(3): 189-193.
121. CDC: Community-associated MRSA information for clinicians. Erişim: http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/ar_mrsa_ca_clinicians.html. Erişim tarihi: 2015.
122. **Pallin DJ, Egan DJ, Pelletier AJ, Espinola JA, Hooper DC, Camargo Jr CA.** Increased US emergency department visits for skin and soft tissue infections, and changes in antibiotic choices, during the emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Ann Emerg Med* **2008**; 51: 291-298.
123. **Planet PJ, LaRussa SJ, Dana A, Smith H, Xu A, Ryan C, Uhlemann AC, Boundy S, Goldberg J, Narechania A, Kulkarni R, Ratner AJ, Geoghegan JA, Kolokotronis SO, Princea A.** Emergence of the epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300 coincides with horizontal transfer of the arginine catabolic mobile element and speG-mediated adaptations for survival on skin. *mBio* **2013**; 17(6): 00889-13.
124. **Liu C, Graber CJ, Karr M, Diep BA, Basuino L, Schwartz BS, Enright MC, O'Hanlon SJ, Thomas JC, Perdreau-Remington F, Gordon S, Gunthorpe H, Jacobs R, Jensen P, Leoung G, Rumack JS, Chambers HF.** A population-based study of the incidence and molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in San Francisco 2004-2005. *Clin Infect Dis* **2008**; 46(11): 1637-1646.
125. **Tenover FC, McAllister S, Fosheim G, McDougal LK, Carey RB, Limbago B, Lonsway D, Patel JB, Kuehnert MJ, Gorwitz R.** Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from nasal cultures collected from individuals in the United States in 2001 to 2004. *J Clin Microbiol* **2008**; 46: 2837-2841.
126. **Ellington MJ, Perry C, Ganner M, Warner M, McCormick Smith I, Hill RL, Shallcross L, Sabersheikh S, Holmes A, Cookson BD, Kearns AM.** Clinical and molecular epidemiology of ciprofloxacin-susceptible MRSA encoding PVL in England and Wales. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **2009**; 28: 1113-1121.
127. **Tietz A, Frei R, Widmer AF.** Transatlantic spread of the USA300 clone of MRSA. *N Engl J Med* **2005**; 353:532-533.
128. **Stapleton PD, Taylor PW.** Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. *Sci Prog* **2002**; 85: 57-72.

129. **De Lencastre H, Oliveira D, Tomasz A.** Antibiotic resistant *Staphylococcus aureus*: a paradigm of adaptive power. *Curr Opin Microbiol* **2007**;10(5): 428-35.
130. **Weller TM.** The distribution of *mecA*, *mecR1* and *mecI* and sequence analysis of *mecI* and the *mec* promoter region in staphylococci expressing resistance to methicillin. *J Antimicrob Chemother* **1999**; 43: 15-22.
131. **Oliveira DC, de Lencastre H.** Methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus* is not affected by the overexpression in trans of the *mecA* gene repressor: a surprising observation. *PLoS ONE* **2011**; 6(8): 23287.
132. **Garcia-Castellanos R, Mallorqui-Fernandez G, Marrero A, Potempa J, Coll M, Gomis-Rüth FX.** On the transcriptional regulation of methicillin resistance: MecI repressor in complex with its operator. *J Biol Chem* **2004**; 279(17): 17888-17896.
133. **Aiba Y, Katayama Y, Hishinuma T, Murakami-Kuroda H, Cui L, Hiramatsu K.** Mutation of RNA Polymerase-Subunit Gene Promotes Heterogeneous-to-Homogeneous Conversion of β -Lactam Resistance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **2013**; 57(10): 4861-4871.
134. **Kondo N, Kuwahara-Arai K, Kuroda-Murakami H, Tateda-Suzuki E, Hiramatsu K.** Eagle-type methicillin resistance: new phenotype of high methicillin resistance under *mec* regulator gene control. *Antimicrob Agents Chemother* **2001**; 45(3): 815-824.
135. **McDougal L, Thornsberry C.** The role of β -lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase resistant penicillins and cephalosporins. *J Clin Microbiol* **1986**; 23: 832-839.
136. **Tomasz A, Drugeon HB, De Lencastre HM, Jabes D, McDougal L, Bille J.** New mechanism for methicillin resistance in *S. aureus*: clinical isolates that lack the PBP 2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding proteins with modified penicillin binding capacity. *Antimicrob Agents Chemother* **1989**; 33: 1867-1869.
137. **Yılmaz S, Diktaş H.** New antibiotics in development against multidrug-resistant bacteria. *J Clin Anal Med* **2013**; 4(3): 249-252.
138. **Emaneini M, Taherikalani M, Eslampour MA, Sedaghat H, Aligholi M, Jabalameli F, Shahsavan S, Sotoudeh N.** Phenotypic and genotypic evaluation of aminoglycoside resistance in clinical isolates of staphylococci in Tehran, Iran. *Microb Drug Resist* **2009**; 5(2): 129-32.
139. **Chandrakanth RK, Raju S, Patil SA.** Aminoglycoside resistance mechanisms in multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Curr Microbiol* **2008**; 56: 558–562.

140. **Kim TJ, Na YR, Lee JI.** Investigations into the basis of chloramphenicol and tetracycline resistance in *Staphylococcus intermedius* isolates from cases of pyoderma in dogs. *Vet Med B* **2005**; 52: 119-124.
141. **Parent R, Roy PH.** The chloramphenicol acetyltransferase gene of Tn2424: a new breed of cat. *J Bacteriol* **1992**; 174(9): 2891-2897.
142. **Uyanık MH, Yazgı H, Bilici D, Özden K, Karakoç E.** Hastane kökenli *Staphylococcus aureus* Türlerinde Makrolid-Linkozamid-Streptogramin B direncinin araştırılması. *Ankem Derg* **2009**; 23(2):66-70.
143. **Ulusoy S.** Streptograminler (kinopristin/dalfopristin). *Ankem Derg* **2004**; 18(2): 174-177.
144. **Saderi H, Emadi B, Owlia P.** Phenotypic and genotypic study of macrolide, lincosamide and streptogramin B (MLSB) resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in Tehran, Iran. *Med Sci Monit* **2011**; 17(2): 48-53.
145. **Warsa UC, Nonoyama M, Ida T, Okamoto R, Okubo T, Shimauchi C, Kuga A, Inoue M.** Detection of tet(K) and tet(M) in *Staphylococcus aureus* of Asian countries by the polymerase chain reaction. *J Antibiot* **1996**; 49(11): 1127-1132.
146. **Ng LK, Martin I, Alfa M, Mulvey M.** Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Mol Cell Probes* **2001**; 15(4): 209-215.
147. **Goulda IM, Cauda R, Espositoc S, Gudiol S, Mazzei T, Garauf J.** Management of serious methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infections: what are the limits?. *Int J Antimicrob Agents* **2011**; 37: 202-209.
148. **Shigemuraa K, Tanakaa K, Yamamichia F, Shirakawaa T, Miyakea H, Fujisawaa M.** Does mutation in gyrA and/or parC or efflux pump expression play the main role in fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* urinary tract infections ? : A statistical analysis study. *Int J Antimicrob Agents* **2012**; 40: 516-520.
149. **Kim JY, Jeon SM, Kim H, Lim N, Park MS, Kim SH.** Resistance to fluoroquinolone by a combination of efflux and target site mutations in Enterococci *Escherichia coli* isolated in Korea. *Osong Public Health Res Perspect* **2012**; 3(4): 239-244.
150. **Nurjadi D, Olalekan AO, Layer F, Shittu AO, Alabi A, Ghebremedhin B, Schaumburg F, Hofmann-Eifler J, Van Genderen PJ, Caumes E, Fleck R, Mockenhaupt FP, Herrmann M, Kern WV, Abdulla S, Grobusch MP, Kremsner PG, Wolz C, Zanger P.** Emergence of trimethoprim resistance gene dfrG in *Staphylococcus aureus* causing human infection and colonization in sub-Saharan Africa and its import to Europe. *J Antimicrob Chemother* **2014**; 69(9): 2361-2368.

151. **Mohd-Zain Z, Kamsani NH, Ahmad N.** Molecular insights of co-trimoxazole resistance genes in *Haemophilus influenzae* isolated in Malaysia. *Tropical Biomedicine* **2013**; 30(4): 584-590.
152. **Desroches M, Potier J, Laurent F, Bourrel AS, Doucet-Populaire F, Decusser JW.** Prevalence of mupirocin resistance among invasive coagulase-negative staphylococci and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in France: emergence of a mupirocin-resistant MRSA clone harbouring mupA. *J Antimicrob Chemother* **2013**; 68: 1714–1717.
153. **Perichon B, Courvalin P.** VanA-type vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **2009**; 53(11): 4580-4587.
154. **Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemoter* **1997**; 40(1): 135-136.
155. **Wootton M, Howe RA, Hillman R, Walsh TR, Bennett PM, MacGowan AP.** A modified population analysis profile (PAP) method to detect hetero-resistance to vancomycin in *Staphylococcus aureus* in a UK hospital. *J Antimicrob Chemother* **2001**; 47(4): 399-403.
156. **Hiramatsu K.** Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. *Lancet Infect Dis* **2001**; 1(3): 147-55.
157. **Rajan V, Kumar VG, Gopal S.** A cfr-positive clinical staphylococcal isolate from India with multiple mechanisms of linezolid-resistance. *Indian J Med Res* **2014**; 139(3): 463-467.
158. **Mishra NN, Bayer AS, Weidenmaier C, Grau T, Wanner S, Stefani S, Cafiso V, Bertuccio T, Yeaman MR, Nast CC, Yang SJ.** Phenotypic and genotypic characterization of daptomycin-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains: relative roles of *mprF* and *dlt* operons. *PLoS ONE* **2014**; 9(9): e107426.
159. **Sümer Ş.** Daptomisin; siklik lipopeptid antibiyotiklerin ilk ve tek üyesi. *Selçuk Tıp Derg* **2012**; 28(3): 205-208.
160. **Hudson LO, Murphy CR, Spratt BG, Enright MC, Elkins K, Nguyen C, Terpstra L, Gombosev A, Kim D, Hannah P, Mikhail L, Alexander R, Moore DF, Huang SS.** Diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from inpatients of 30 hospitals in orange county, California. *PLoS ONE* **2013**; 8(4): e62117.
161. **Johnson AP.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the European landscape. *J Antimicrob Chemother* **2011**; 66(4): 43-48.

162. **Chen H, Liu Y, Jiang X, Chen M, Wang H.** Rapid change of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in a Chinese tertiary care hospital over a 15-year period. *Antimicrob Agents Chemother* **2010**; 54(5): 1842-1847.
163. **Ho CM, Ho MW, Lee CY, Tien N, Lu JJ.** Clonal spreading of methicillin-resistant SCCmec *Staphylococcus aureus* with specific *spa* and *dru* types in central Taiwan. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **2012**; 31(4): 499-504.
164. **Schulte B, Bierbaum G, Pohl K, Goerke C, Wolza C.** Diversification of clonal complex 5 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains (Rhine-Hesse clone) within Germany. *J Clin Microbiol* **2013**; 51(1): 212-216.
165. **David MZ, Taylor A, Lynfield R, Boxrud DJ, Short G, Zychowski D, Boyle-Vavra S, Daum RS.** Comparing pulsed-field gel electrophoresis with multilocus sequence typing, *spa* typing, staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) typing, and PCR for panton-valentine leukocidin, *arcA*, and *opp3* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates at a U.S. Medical Center. *J Clin Microbiol* **2013**; 51(3): 814-819.
166. **Golding GR, Campbell JL, Spreitzer DJ, Veyhl J, Suryniec K, Simor A, Mulvey MR.** A preliminary guideline for the assignment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to a Canadian pulsed-field gel electrophoresis epidemic type using *spa* typing. *Can J Infect Dis Med Microbiol* **2008**; 19(4): 273-281.
167. **Chen Y, Liu Z, Duo L, Xiong J, Gong Y, Yang J, Wang Z, Wu X, Lu Z, Meng X, Zhao J, Zhang C, Wang F, Zhang Y, Zhang M, Han L.** Characterization of *Staphylococcus aureus* from distinct geographic locations in China: an increasing prevalence of *spa*-t030 and SCCmec type III. *PLoS ONE* **2014**; 9(4):e96255.
168. **Alp E, Klaassen CHW, Doğanay M, Altoparlak Ü, Aydın K, Engin A, Kuzucu Ç, Özakin C, Özinel MA, Turhan Ö, Voss A.** MRSA genotypes in Turkey: persistence over 10 years of a single clone of ST239. *J Infect* **2009**;58: 433-438.
169. **Yılmaz ŞK, Acuner İÇ, Strommenger B, Bek Y, Witte W.** Türkiye'nin Orta Karadeniz bölgesinde metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* kökenlerinin enfeksiyözite-rezistotip-genotip kümelenmesi. *Mikrobiyol Bül* **2014**; 48(1): 14-27.
170. **Bozdoğan B, Yıldız Ö, Oryaşın E, Kırdar S, Gülcü B, Aktepe O, Arslan U, Bayramoğlu G, Çoban AY, Coşkuner SA, Güdücüoğlu H, Karabiber N, Öncü S, Tatman M, Özkütük N, Özyurt M, Şener AG.** t030, Türkiye'deki hastanelerden izole edilen metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* izolatları arasında en yaygın *spa* tipidir. *Mikrobiyol Bül* **2013**; 47(4): 571-581.

171. **Fetscha A, Contzenb M, Harteltc K, Kleiserd A, Maassene S, Raub J, Kraushaara B, Layerg F, Strommenger B.** *Staphylococcus aureus* food-poisoning outbreak associated with the consumption of ice-cream. *Int J Food Microbiol* **2014**; 187: 1-6.
172. **Ho J, O'Donoghue MM, Boost MV3.** Occupational exposure to raw meat: a newly-recognized risk factor for *Staphylococcus aureus* nasal colonization amongst food handlers. *Int J Hyg Environ Healt* **2014**; 217(2-3): 347-353.
173. David MD, Kearns AM, Gossain S, Ganner M, Holmes A. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: nosocomial transmission in a neonatal unit. *J Hosp Infect* **2006**; 64: 244-250.
174. **Otter JA, French GL.** The emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a London teaching hospital, 2000–2006. *Clin Microbiol Infect* **2008**; 14: 670-676.
175. **Franco A, Hasman H, Iurescia M, Lorenzetti R, Stegger M, Pantosti A, Feltrin F, Ianzano A, Porrero MC, Liapi M, Battisti A.** Molecular characterization of *spa* type t127, sequence type 1 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from pigs. *J Antimicrob Chemother* **2011**; 66(6): 1231-1235.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Yıldız Kalaycı
Doğum Tarih ve Yeri : 16.03.1984 Gaziantep
Medeni Durumu : Evli
Telefon : 05056102705
E.posta : yldzozdmr@hotmail.com
Mezun Olduğu Tıp Fakültesi : Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi
Varsa Mezuniyet Derecesi : Birincilik
Görev Yerleri : Kilis Verem Savaş Dispanseri
Yabancı Dil(ler) : İngilizce