

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN STAPHYLOCOCCUS AUREUS
İZOLATLARINDA SCC_{mec} TİPLENDİRİLMESİ VE İNTEGRON
VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

Dr. Aykut GENÇ

**Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Uzmanlık Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Barış OTLU**

MALATYA

2018

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	IV
ABSTRACT.....	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
TABLolar DİZİNİ	XII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Sınıflandırma.....	3
2.2. Morfoloji ve Tür Özellikleri.....	4
2.3. Virulans ve Patojenite	5
2.3.1. Kapsüler Polisakkarit ve Biyofilm Formasyonu	5
2.3.2. Peptidoglikan Tabaka.....	6
2.3.3. Teikoik Asit.....	6
2.3.4. Protein A	7
2.4. Enzimler	7
2.4.1. Katalaz.....	7
2.4.2. Koagülaz	7
2.4.3. Fibrinolizin	8
2.4.4. Hyalüronidaz	8
2.4.5. Lipaz.....	8
2.4.6. Nükleaz	8
2.4.7. Penisilinaz (Beta laktamaz).....	8
2.5. Toksinler	8
2.5.1. Alfa Hemolizin.....	9
2.5.2. Beta Hemolizin.....	9
2.5.3. Gama Hemolizin ve Panton-Valentine Lökosidin	9
2.5.4. Delta Hemolizin	10
2.5.5. Eksfoliyatif Toksinler.....	10
2.5.6. Enterotoksinler	10
2.5.7. TŞST-1	10
2.6. Yaptığı Enfeksiyonlar	11
2.6.1. Folikülit	11
2.6.2. İmpetigo	11

2.6.3. Fronkül ve Karbonkül	12
2.6.4. Mastit.....	12
2.6.5. Yara Yeri Enfeksiyonu.....	12
2.6.6. Selülit ve Yumuşak Doku Enfeksiyonu	12
2.6.7. Kan Dolaşımı Enfeksiyonu	13
2.6.8. Endokardit	13
2.6.9. Menenjit	13
2.6.10. Pulmoner Enfeksiyon	14
2.6.11. Eklem ve Kemik Enfeksiyonları	14
2.6.12. Pyomiyozit	14
2.6.13. Stafilokokkal Besin Zehirlenmesi	14
2.6.14. Stafilokokkal Haşlanmış Deri Sendromu.....	15
2.6.15. Stafilokokkal Toksik Şok Sendromu	15
2.6.16. Bakteriüri ve Üriner Sistem Enfeksiyonları	16
2.7. Koagülaz Negatif Stafilokok Enfeksiyonları	16
2.8. Mikrobiyal Tanımlama.....	16
2.8.1. Gram Boyama	16
2.8.2. Katalaz Testi.....	17
2.8.3. Koagülaz Testi	17
2.8.3.1. Tüp Koagülasyon	17
2.8.3.2. Lamda Koagülasyon.....	18
2.8.4. Mannitol Hidrolizi.....	18
2.8.5. Deoksirübonükleaz Testi.....	18
2.8.6. Termotabil Endonükleaz.....	18
2.8.7. Glikoz Fermentasyonu	19
2.8.8. Lizostafin Duyarlılığı	19
2.8.9. Eritromisin Varlığında Gliserolden Asit Üretimi.....	19
2.8.10. Furazolidon Duyarlılığı	20
2.8.11. Modifiye Oksidaz Testi.....	20
2.8.12. Basitrasin Duyarlılığı	20
2.8.13. Protein A Tespiti	20
2.9. Staphylococcus Tedavisinde Kullanılan Antibiyotikler.....	20
2.10. Staphylococcuslarda Antibiyotik Direnç Mekanizmaları	21
2.10.1. Beta-Laktam Direnci	21
2.10.1.1. Metisilin Direnci	22

2.10.2. Aminoglikozitlere Direnç.....	24
2.10.3. Kloramfenikol direnci	24
2.10.4. Kinolon Direnci.....	24
2.10.5. Makrolid, Linkozamid, Streptogramin (MLS) Direnci	24
2.10.6. Rifampin Direnci.....	25
2.10.7. Trimetoprim-Sulfametoksazol Direnci	25
2.10.8. Linezolid Direnci	25
2.10.9. Glikopeptid Direnci.....	25
2.11. Epidemiyoloji.....	26
2.12. Mobil Genetik Elementler.....	26
2.12.1. İntegronlar	26
2.12.2. İntegronların Farklı Tipleri	28
2.12.3. Mobil İntegronlar (MIs)	28
2.12.4. Kromozomal İntegronlar (CIs).....	29
2.12.5. Stafilokokkal Kaset Kromozomu (SCCmec).....	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM	34
3.1. Hasta grubu	34
3.2. <i>Staphylococcus aureus</i> Suşlarının Tanımlanması	34
3.2.1 Otomatize Bakteriyel Tanımlama Sistemi	34
3.2.3. <i>Staphylococcus aureus</i> İzolatlarında Antibiyotik Dirençlerinin Tespiti	34
3.3. <i>Staphylococcus aureus</i> 'ta Metisilin Direnci Tespitinde Disk Difüzyon Yöntemi.....	34
3.4. Metisilin Direnç Genlerinin Tespit Edilmesi	35
3.4.1. <i>Staphylococcus aureus</i> İzolatlarından DNA Ekstraksiyonu.....	35
3.4.2. <i>MecA</i> gen Bölgelerinin Çoğaltılması	35
3.5. <i>Staphylococcus aureus</i> 'ta Sınıf 1, Sınıf 2 ve Sınıf 3 İntegron Tespiti	38
3.6. Tespit Edilen İntegronların Dizi Analizi ile Doğrulanması	39
3.6.1. Jelden DNA Ekstraksiyonu	39
3.6.2. Dizi Analizi Tepkimesi	39
3.7. Metisiline Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> 'ta SCCmec Tiplendirilmesi.....	41
3.8. Pulse Field Gel Elektroforez (PFGE) İle İzolatlar arası Klonal İlişkinin Araştırılması	42
3.8.1. İzolatların Hazırlanması	42
3.8.2. İzolatların Agaroza Gömülmesi	43
3.8.3. Agaroz İçindeki Hücrelerin Parçalanması ve Yıkanması	43
3.8.4. Agaroz Bloktaki DNA'nın Kesilmesi	43

3.8.5. Elektroforez Jelinin Hazırlanması ve Kalıpların Jele Yüklenmesi	43
3.8.6. Elektroforez.....	44
3.8.7. Jelin Görüntülenmesi	44
4. BULGULAR.....	45
4.1. Hasta grubu	45
4.2. <i>Staphylococcus aureus</i> Suşlarının Tanımlanması	45
4.3. <i>Staphylococcus aureus</i> İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıkları	45
4.4. Metisilin direnç genlerinin tespiti	50
4.4.1. <i>Staphylococcus aureus</i> 'ta <i>mecA</i> Geninin Çoğaltılması.....	50
4.4.2 <i>Staphylococcus aureus</i> 'ta <i>mecC</i> Geninin Çoğaltılması	51
4.5. Metisiline Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> 'ta <i>SCCmec</i> Tiplendirilmesi	52
4.6. <i>Staphylococcus aureus</i> 'ta Sınıf 1, Sınıf 2 ve Sınıf 3 integron Tespiti	55
4.7. Tespit edilen integronların dizi analizi ile doğrulanması	56
4.8. Pulse Field Gel Elektroforez (PFGE) İle İzolatlar arası Klonal İlişkinin Araştırılması	57
5. TARTIŞMA.....	63
KAYNAKLAR	70

ÖZET

Klinik Örneklerden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* İzolatlarında SCCmec Tiplendirilmesi ve İntegron Varlığının Araştırılması

Amaç: *Staphylococcus aureus*, en önemli insan patojenlerinden biridir. Metisilin dirençli *S. aureus* suşları tüm beta-laktam antibiyotiklere dirençli olmakla birlikte diğer antibiyotik sınıflarına karşı da hızla direnç geliştirme potansiyeline sahiptir. Dolayısı ile bu dirence neden olan *mec* genlerinin tiplendirilmesi ve antibiyotik direnç genlerinin aktarıldığı integronların saptanması tedavide yol gösterici olacaktır. Bu çalışmada, hastaların klinik örneklerinden izole edilen *S. aureus* suşlarında *mecA* ve *mecC* genleri araştırılarak SCCmec tiplerinin belirlenmesi ve sınıf 1-3 integron varlığının saptanması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmaya, Mart 2016-Mart 2017 tarihleri arasında Turgut Özal Tıp Merkezi, Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gelen klinik numunelerden izole edilen 138 *S. aureus* suşu dahil edildi. Tanımlanan izolatların metisilin direnci fenotipik olarak disk difüzyon yöntemi ile çalışıldı. Suşların taşıdığı *mecA* ve *mecC* genleri, SCCmec tipleri ve integronların tespiti için Polimerize Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemi kullanıldı. İzolatlar arasındaki klonlanal ilişki Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) ile araştırıldı.

Bulgular: Toplam 138 *S. aureus* izolatının 38'i metisiline dirençli, 84'ü metisiline duyarlı bulundu. Fenotipik olarak metisilin-dirençli bulunan suşların tümünde PZR ile *mecA* geni saptanırken hiç birinde *mecC* geni tespit edilmedi. İzolatların SCCmec tiplendirmesinde MRSA olarak tespit edilen 38 izolatın 5'inde (%13) SCCmecI, 5'inde SCCmecII (%13), 10'unda (%26) SCCmec III olarak bulundu ve geriye kalan 18 (%47) izolatın SCCmec tipi belirlenemedi ve bunlar gruplandırılmayan olarak sınıflandırıldı. İzolatların PFGE tiplendirilmesi sonucunda 116 farklı genotip tespit edilerek kümeleşme oranı %13 olarak bulundu. Bu 116 *S. aureus* genotipinin 19'unda (%16) sadece Sınıf-I integron tespit edildi ve bunların 4'ü *mecA* geni taşımaktaydı.

Sonuç: Bu çalışmanın sonuçlarına göre, hastanemizde saptanan ve çoğunluğunu farklı genotiplerin oluşturduğu *S. aureus*'ların yaklaşık ¼'ü metisilin dirençli olup bu dirençten de *mecA* geni sorumlu bulunmuştur. Bu çalışma, *S. aureus*'larda farklı integron türlerinin araştırılması yönünden ve ülkemizde izole edilen *S. aureus*

suşlarında ilk kez sınıf 1 integron varlığı gösterilmiş olması nedenleriyle önemlidir. Moleküler çalışmalar, antimikrobiyal direncin yayılım dinamiklerinin anlaşılması bu dirençlerin önlenmesi açısından önemli veriler sağlayacaktır.



ABSTRACT

SCCmec Typing and Integron Investigation of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Clinical Samples

Aim: *Staphylococcus aureus* is one of the leading human pathogens. Methicillin-resistant *S. aureus* strains are resistant to all beta-lactam antibiotics, and also they have potency to rapid development of resistance to other classes of antimicrobials. Therefore, typing of the *mec* genes which are responsible for methicillin resistance and determination of the integrons that carry the antibiotic resistance genes will be valuable for a successful treatment against this bacterium. In this study, typing of SCCmec by studying the *mecA* and *mecC* genes, and determination of the class 1-3 integrons in the *S. aureus* strains which were isolated from the patients' samples were aimed to be investigated.

Material and Method: a total 138 *S. aureus* strains which were isolated from clinical samples of the patients between March 2016 and March 2017, in the central microbiology laboratory of Turgut Ozal Medical Center were included. Methicillin resistance of the identified strains was phenotypically studied with disk diffusion method. Polymerized Chain Reaction (PCR) was used for determination of *mecA* and *mecC* genes, SCCmec types, and for integrons. The clonal relationship of the isolates was studied with Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE).

Results: total 38 out of 138 included strains were found as methicillin-resistant, and remaining 100 were found as methicillin-susceptible. *mecA* gene was found in all methicillin-resistant strains, and no *mecC* gene was determined. Regarding the SCCmec typing of these 38 isolates, 5 (13%) were typed as SCCmecI, 5 (13%) were typed as SCCmecII, and 10 (26%) were typed as SCCmec III; however, the remaining 18 (47%) strains couldn't be typed, and classified as "ungrupp". A total 116 different genotypes were determined in PFGE, and the clusture rate was found as 13%. Among these 116 different groups, class-1 integron was determined in only 19 (16%) genotypes of which 4 were positive for *mecA* gene.

Conclusion: according to the results of this study, almost $\frac{1}{4}$ of the *S. aureus* strains that were isolated from our hospital were methicillin-resistant, all which were due to *mecA* gene. This study is important since the fact that different integron types were investigated in *S. aureus* strains, and first detection of class-1 integron in *S. aureus*

strains in our country. Molecular studies will provide useful data for better understanding the dynamics of the antimicrobial resistance spread, and to prevent this transmission



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

PBP: Penisilin bağlayan protein

SCC: Stafilokokkal kaset kromozomu

MRSA: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*

Nacl: Sodyum klorür

DNA: Deoksiribonükleik asit

RNA: Ribonükleik asit

MSCRAMM: Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecules

Ig G: İmmunoglobülin G

Fc: Fragment crystallizable

TSST: Toksik şok sendromu toksini

CAMP faktör: Christine, Atkins, Munch-Peterson factor

ET A: Eksfoliyatif Toksin A

ET B: Eksfoliyatif Toksin B

DA: Dalton

PVL: Panton-Valentine Lökosidin

IL-1: İnterlökin-1

TNF: Tumor necrosis factor

BOS: Beyin omurilik sıvısı

KNS: Koagülaz negatif stafilokok

TSS: Toksik şok sendromu

CRF: Coagulase reacting factor

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

CAT: Kloramfenikol asetil transferaz

GISA: Glycopeptide intermediate-resistant *Staphylococcus aureus*

MGEs: Mobil Genetik Elementler

ORF: Open reading frame

MI: Mobil integronlar

CI: Kromozomal integronlar

SXT: Trimetoprim-sulfametoksazol

MALDI-TOF: Matrix-assisted laser desorption/ionization

KKA: Koyun kanlı agar

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

CLSI: Clinical & Laboratory Standards Institute

MHA: Mueller Hinton Agar

ATCC: American Type Culture Collection

µl: Mikrolitre

UV: Ultraviole

PCR: Polymerase chain reaction

TBE: Tris-borate-EDTA

TE: Tris-EDTA

RPM: Rotation Per Minute

Tn: Transpozon

EARSS: European Antimicrobial Resistance Surveillance Network

PFGE: Pulsed-field jel elektroforezi

Ccr: Cassette Chromosome Recombinase

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. İntegron aracılı gen kaseti yakalanması ve çıkarılması modeli (113).	27
Şekil 2. Sınıf 1, sınıf 2 ve sınıf 3 integronların yapısı (131).	29
Şekil 3. Farklı tipteki SCCmec tiplerini genetik olarak gösteren şekil (157).....	33
Şekil. 4: <i>Staphylococcus aureus</i> 'ta mecA geninin çoğaltılması.....	50
Şekil. 5: <i>Staphylococcus aureus</i> 'ta mecA geninin çoğaltılması.....	50
Şekil. 6: <i>Staphylococcus aureus</i> 'ta mecA geninin çoğaltılması.....	51
Şekil. 7: <i>Staphylococcus aureus</i> 'ta mecC geninin çoğaltılması.....	51
Şekil. 8: Metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> 'ta SCCmec tiplendirilmesi.....	52
Şekil. 9: Metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> 'ta SCCmec tiplendirilmesi.....	52
Şekil. 10: Metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> 'ta SCCmec tiplendirilmesi.....	53
Şekil. 11: Metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> 'ta SCCmec tiplendirilmesi.....	53
Şekil. 12: Metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> 'ta SCCmec tiplendirilmesi.....	53
Şekil. 13: Metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> 'ta SCCmec tiplendirilmesi.....	54
Şekil. 14: Metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> 'ta SCCmec tiplendirilmesi.....	54
Şekil. 15: Metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> 'ta SCCmec tiplendirilmesi.....	54
Şekil. 16: <i>Staphylococcus aureus</i> 'ta sınıf 1 integron tespiti	55
Şekil. 17: <i>Staphylococcus aureus</i> 'ta sınıf 1 integron tespiti	55
Şekil. 18: <i>Staphylococcus aureus</i> 'ta sınıf 1 integron tespiti	55
Şekil. 19: <i>Staphylococcus aureus</i> 'ta sınıf 1 integron tespiti	56
Şekil. 20: 78 numaralı örneğin electroferogram sonucu.	56
Şekil. 21: Pulse Field Gel Elektroforez (PFGE) ile izolatlar arası klonal ilişkinin tespiti	57
Şekil. 22: Pulse Field Gel Elektroforez (PFGE) ile izolatlar arası klonal ilişkinin tespiti	57
Şekil. 23: Pulse Field Gel Elektroforez (PFGE) ile izolatlar arası klonal ilişkinin tespiti	58
Şekil. 24: Pulse Field Gel Elektroforez (PFGE) ile izolatlar arası klonal ilişkinin tespiti	58
Şekil. 25: Pulse Field Gel Elektroforez (PFGE) ile izolatlar arası klonal ilişkinin tespiti	59
Şekil. 26: Pulse Field Gel Elektroforez (PFGE) ile izolatlar arası klonal ilişkinin tespiti	59

Şekil. 27: Toplam 138 izolatın PFGE ile tiplendirilmesi.	62
--	----



TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 1. <i>Staphylococcaceae</i> ailesinin sınıflandırılması.	4
Tablo 2. Stafilokokların tedavisinde kullanılan antibiyotik sınıfları ve etki mekanizmaları.	21
Tablo 3. Kromozomal integron taşıyan bazı bakteriyel türlerden örnekler ve alakalı gen kasetlerin yapısal özellikleri (149).	31
Tablo 4. <i>MecA</i> gen bölgesini çoğaltan primerler ve çoğaltılan ampliconun büyüklüğü.	35
Tablo 5. <i>MecA</i> tespiti için kullanılan PCR karışımı.	36
Tablo 6. <i>MecC</i> gen bölgesini çoğaltan primerler ve çoğaltılan ampliconun büyüklüğü.	37
Tablo 7. <i>MecC</i> tespiti için kullanılan PCR karışımı.	37
Tablo 8. Sını1,2,3 integronları çoğaltan primerler ve çoğaltılan ampliconların büyüklüğü.	38
Tablo 9. Herbir integronun tespiti için kullanılan PCR karışımı.	38
Tablo 10. Sekans analizi için PCR karışımı.	40
Tablo 11. SCCmec tiplendirilmesi için kullanılan primerler ve çoğaltılan ampliconların büyüklüğü.	41
Tablo 12. SCCmec tiplendirilmesi için kullanılan PCR karışımı.	41
Tablo 13. <i>Staphylococcus aureus</i> izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları	45

1. GİRİŞ

Staphylococcus aureus, insanlarda hem kommensal yaşayabilen hem de patojen olabilen bir bakteridir. Deri lezyonları, derin doku enfeksiyonları, plüropulmoner enfeksiyonlar, osteoartiküler enfeksiyonlar, katater ile ilişkili enfeksiyonlar, üriner sistem enfeksiyonları gibi çok çeşitli hastalıklara sebep olabilir (1-3). İnsan popülasyonunun takriben %30'u bu bakteri ile kolonizedir (4). Koagülaz negatif *Staphylococcus* 'lar ise deri ve müköz membranlardaki floranın doğal üyesidir (5). Fakat yabancı cisimle ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonlarına, endokardit ve prostetik kapak enfeksiyonlarına, cerrahi yara yeri enfeksiyonlarına sebep olabilirler.

Staphylococcus aureus, stafilokoklar arasındaki en önemli insan patojenidir. Normal insan florasında bulunmasına rağmen immün sistem hastalıkları, yabancı cisim invazyonu, lösemi gibi kanserlerde, deri bütünlüğünün bozulması, başka bir ajan (influenza gibi) ile enfeksiyon gibi altta yatan sebeplerin varlığında fırsatçı enfeksiyonlara sebep olur (6). Kolonizasyon, *S. aureus* enfeksiyon riskini arttırır (7,8). Genellikle, *S. aureus* enfeksiyonu, kolonize olan suşlar tarafından oluşturulur (9). Kolonizasyon aynı zamanda bakterinin başka hastalara taşınmasına da sebep olur.

Staphylococcus aureus, hastane kaynaklı ve toplum kökenli enfeksiyonlarda ciddi bir etkindir (10,11). Antibiyotiklere hızlı direnç kazanan bir bakteri olmasının yanında metisiline dirençli hale gelmesi ciddi bir problem teşkil eder. Çünkü metisilin direnci, *mecA* ve daha az sıklıkla *mecC* kontrolünde yeni bir protein bağlayan protein (PBP2A) sentezlenmesiyle gerçekleşir ve bu protein beta laktam halkası taşıyan antibiyotiklerin hedef bölgesidir. Dolayısıyla metisilin direnci, bazı sefalosporinler haricinde bütün beta laktam antibiyotiklerine dirence sebep olur (12). *S. aureus*'ta metisiline direnç ilk defa 1961'de görülmüştür ve günümüze kadar da ciddi bir sağlık sorunu olarak devam etmiştir (13,14).

Metisiline dirençli *S. aureus* ile enfeksiyona yakalanan hasta sayısı ve buna bağlı olarak mortalite ve morbidite, ayrıca sağlık harcamaları artmaktadır. Dünyada *S. aureus* ile bakteriyemi geçiren insan sayısı 100000'de 10-30 kişi/yıldır (15). Danimarka'da, insan sağlığını korumak için yapılan müdahaleler değişmesine rağmen, 1957'de *S. aureus* bakteriyemisi sayısı 100000'de 3 kişi/yıldan 1990'lara gelindiğinde 100000'de 20 kişi/yıla çıkmıştır (16). 1990'lardan bugünlere gelindiğinde oranın yaklaşık 100000'de 21.8 kişi/yıl olduğu tahmin ediliyor (17). *S. aureus* bakteriyemisine

yakalanan insan sayısındaki bu artan seyir Kanada, Amerika, Birleşik Krallık, Fransa, Avustralya'da da görülmektedir (17-22). Ayrıca Avrupa'da test edilen invaziv *S. aureus* izolatlarında metisiline direnç oranı, her ülkede yıllara göre farklılık göstermekle birlikte, ortalama %16.8'dir (23).

Bakteriler arasında direncin yayılması, günümüzde en önemli halk sağlığı problemlerinden biridir. *Staphylococcus aureus*'ta metisilin direncinin tespit edilebilmesi için fenotipik yöntemlerin yanın da, dirence neden olan *mecA* geninin varlığının gösterilmesi de altın standart kabul edilmektedir. Bununla birlikte moleküler yöntemler ile toplumdan kazanılmış ve nozokomiyal suşların arasında farklı olan SCCmec gen kasetinin ayırt edilebilmesini de sağlayabilir. Bu şekilde dirençli bakterilerin tespit edilmesinin yanında bulaş yollarının ve kaynaklarının saptamasını sağlanarak, etkenin moleküler epidemiyolojik verilerine katkıda bulunabilir.

Direncin bu denli hızlı yayılmasının en önemli nedenlerinden biri de, mobil genetik elemanlar sayesinde direnç genlerinin horizontal olarak aktarılmasıdır. Özellikle gram negatif bakteriler arasında sıkça görülen bu mekanizmalardan birisi de integronlardır. Dolayısıyla integron ile ilaç dirençlerinin bakteriler arasında hızla yayılması ve tedavi seçeneklerinin kısıtlanması hastalığın morbidite ve mortalite, ayrıca sağlık harcamaları açısından büyük önem arz etmektedir. İntegronların gram negatif bakteriler arasındaki prevalansı ve dağılımı iyi çalışılmış bir konu iken gram pozitif bakterilerdeki integron varlığı ilk defa 1988 yılında tespit edilmiştir. Bununla birlikte bu konuyla ilgili araştırma oldukça sınırlı sayıdadır.

Çalışmamızda, Turgut Özal Tıp Merkezi'nde yatan ve polikliniğe başvuran hastaların klinik örneklerinden izole edilen ve enfeksiyon etkeni olan *S. aureus*'larda *mecA*, *mecC* genlerinin varlığı araştırılarak SCCmec tipleri belirlenecektir. Bununla birlikte izolatlarda direncin yayılımında sorumlu olan sınıf-1, sınıf-2, sınıf-3 integronların varlığı da araştırılacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

Stafilokoklar ilk defa 1878 yılında Robert Koch tarafından tanımlanmıştır. Pasteur 1880’de stafilokokları sıvı besiyerinde üretmiştir. Aynı yılda İskoçyalı cerrah Alexander Ogston, ilk defa bir enfeksiyon etkeni olarak bir abse materyalinde tanımlamış ve ‘üzüm salkımına benzediğini’ söylemiştir. Stafilokok kelimesi, yunanca üzüm salkımı demek olan ‘staphle’ ve yaban mersini demek olan ‘kokkos’ kelimelerinden türetilmiştir. Daha sonra 1884’te alman doktor Friedrich Julius Rosenbach, koloni morfolojilerine bakarak stafilokokları birbirinden ayırmaya başlamıştır. Altın anlamına gelen ‘aurum’ kelimesiyle *S. aureus*’u, beyaz anlamına gelen ‘albus’ ile *S. albus*’u isimlendirmiştir. *S. albus*, daha sonra *S. epidermidis* olarak yeniden isimlendirilmiştir (24).

Antibiyotik öncesi devirlerde *S. aureus* bakteriyemisi geçiren hastalarda mortalite oranı %80’ler civarındaydı (25). Bin dokuz yüz kırk yılından itibaren penisilinin *S. aureus* enfeksiyonu geçiren hastaların tedavisinde kullanılmaya başlanmasıyla prognozda ciddi bir düzelme görüldü. Fakat 1942’de, ilk defa penisiline dirençli *S. aureus*’lar bildirilmeye başlandı (26). Kirby ilk defa *S. aureus*’un penisilini inaktive ettiğini gösterdi (27). Penisilinin tedavide ilk kez kullanılmasından yaklaşık 20 yıl sonra *S. aureus* izolatlarının %80’den fazlasının penisiline dirençli hale geldiği tespit edildi. Bu direnç paterni önceleri hastanelerde, daha sonra toplum içinde yayılmaya başladı. Şimdi ise bu seyir, her antibiyotik direncinin izlediği bir yol olmuştur (28).

1960 yıllarında klinik kullanıma giren, ilk semisentetik penisilinaze dirençli penisilin olan metisiline direnç, tedavide kullanılmasını izleyen birkaç yıl içinde rapor edilmeye başlandı (29). Bunu takip eden yıllarda klinik olarak kullanılan birçok antibiyotiğe direnç gelişmesi izlemiştir (30). Penisilinaze dirençli izolatlarda olduğu gibi metisiline dirençli izolatlarda da diğer birçok antimikrobiyal ajana direnç genlerinin birlikte taşındığı gösterilmiştir (31). Çoklu antibiyotik direncine sahip olan MRSA izolatları 1990’lı yıllardan itibaren bütün dünyaya yayılmış ve sıklıkla sağlık bakımı ile ilişkili enfeksiyonlara sebep olan patojenler arasındaki yerini almıştır (32).

2.1. Sınıflandırma

Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology’nin eski baskısında *Planococcus*, *Micrococcus*, *Stomatococcus*, *Staphylococcus* cinsleri “*Micrococcaceae*” ailesinin üyeleridir (33). Moleküler ve kemotaksonomik tekniklerdeki gelişmeler ve

modifikasyonlar ile *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Macrococcus* ve *Rothia* cinslerinin aralarındaki farklılıklar tespit edildi. Planokoklar ve stafilokokların *Bacillus/Lactobacillus/Streptococcus* grubu üyeleri ile mikrokok ve stomatokokların ise *Amycelial aktinomycetes*'ler ile yakın filogenetik ilişki içinde oldukları saptandığı için sınıflama yeniden düzenlendi. Yeni sınıflandırmada *Staphylococcus*, *Firmicutes* şubesinde, *Bacilli* sınıfında, *Bacillales* takımındaki *Staphylococcaceae* ailesi içinde *Genus I* olarak sınıflandırılmıştır (34).

Tablo 1. *Staphylococcaceae* ailesinin sınıflandırılması.

Class	Order	Suborder	Family	Genera
"Bacilli"	<i>Bacillales</i>		<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Gemella</i> , <i>Jeotgalicoccus</i> , <i>Macrococcus</i> , <i>Nosocomi-</i> <i>icoccus</i> , <i>Salinicoccus</i> , <i>Staphylococcus</i>
Actinobacteria	<i>Actinomycetales</i>	<i>Micrococcineae</i>	<i>Dermacoccaceae</i>	<i>Demetria</i> , <i>Dermacoccus</i> , <i>Kytococcus</i> , <i>Yamilla</i>
			<i>Micrococcaceae</i>	<i>Arthrobacter</i> , <i>Kocuria</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Nesterenkonia</i> , <i>Renibacterium</i> , <i>Rothia</i> (includes former <i>Stomatococcus</i> species)

Staphylococcus cinsi içinde 35 tür, 17 alt tür bulunmaktadır (35). Bu cins içinde yaptığı enfeksiyonların çeşitliliği ve sıklığı sebebiyle en önemli insan patojeni *S. aureus*'tur (36). *S. aureus*'tan sonra, enfeksiyon yapma açısından, insan deri florasında bulunmasına rağmen fırsatçı enfeksiyonlara sebep olabilen iki önemli stafilokok vardır. Bunlar; *S. apidermidis* ve *S. haemolyticu*'tur. Diğer birçok Stafilokok türü ise esas olarak hayvan patojenidir. Ancak bu türler de, hayvanlarla yakın temasta bulunan insanlarda enfeksiyona neden olabilmektedirler (37).

2.2. Morfoloji ve Tür Özellikleri

Staphylococcus aureus birden çok düzlemde bölünüp birbirinden ayrılamadığı için üzüm salkımı şeklinde görülen, daha az sıklıkla tek, çift, tetratlar ve kısa zincirler oluşturan, 0,5-1,5 µm çapında koklardır (38,39). Seçici olmayan kanlı agar, nutrient agar, triptik soya agar veya beyin-kalp infüzyon agar gibi besiyerlerinde 24 saat içinde 34-37 C sıcaklıkta 3-8 mm çapında koloniler oluşturlar (40). Tipik *S. aureus* kolonileri 24 saatte, ürettiği karotenoid sebebiyle sarı renkte veya krem renginde, düzgün kenarlı, hafif kabarık olarak görünür ve rutin kanlı agarda beta hemoliz yapar (40,41).

Uzun süre antibiyotik tedavisi gören veya kistik fibrozis gibi altta yatan kalıcı bir sebep olan hastalardan izole edilen *S. aureus*'lar içerisinde kanlı besiyeri gibi rutin

besiyerlerinde küçük, pigmentsiz, hemoliz yapmayan ve CO² varlığında daha iyi üreyen atipik varyantlar vardır (42). Bu kolonilerin görülebilmesi için inkübasyon süresinin uzun olması gereklidir. Küçük koloni varyantları (KKV) sıklıkla menadion ve hemin için oksotrofiktir ve azalmış karbonhidrat kullanımı ve gentamisin direncine sahiptir (43).

Staphylococcus aureus glikoz başta olmak üzere fruktoz, maltoz, mannoz, trehaloz gibi birçok karbonhidratı laktik asit oluşturmak üzere fermente eder. Ayrıca koagülaz negatif stafilocokların aksine mannitolü de fermente eder ve bu, *S. aureus* için önemli ve ayırt edici bir özelliktir. Ayrıca nitritleri nitratlara indirger. %7.5- 10 NaCl varlığında üreyebilir (44).

Staphylococcus aureus hareketsiz, sporsuz, fakültatif anaerob olup katalaz pozitifdir. Furazolidona ve lizostafine duyarlıdır fakat basitrasine ve lizozime dirençlidirler. Modifiye oksidaz testi negatiftir (45). *Staphylococcus aureus*'un ayırt edici bir özelliği de koagülaz pozitif olmasıdır. Hem lam koagülaz testi hem de tüp koagülaz testi pozitifdir. *S. intermedius*, *S. hyicus* ve *S. schleferi subsps coagulans*'ta sadece tüp koagülaz testi, *S. lugdunensis* ve *S. schleferi subsp schleferi*'nde ise sadece lam koagülaz testi pozitifdir, geri kalan stafilocok türleri koagülaz negatiftirler (47). *Staphylococcus aureus*'un DNAaz ve termotabil endonükleaz üretiyor olması *S. epidermidis* ile ayırımında koagülaz testine yardımcı olarak kullanılabilir (48).

2.3. Virulans ve Patojenite

Staphylococcus aureus enfeksiyon oluşturmak ve yayılmak için birçok yapısal elemanından, enzimlerinden ve toksinlerinden faydalanır. Ancak bu şekilde konağın savunma sisteminden kaçabilir, konak içinde yayılabilir ve farklı klinik tablolara sebep olabilir.

2.3.1. Kapsüler Polisakkarit ve Biyofilm Formasyonu

Staphylococcus aureus'ların %90'dan fazlası, bakterinin konak hücrelerine ve prostetik aletlere tutunmasını sağlayan ve bakteriyi polimorfonükleer hücrelerin fagositozundan koruyan bir ekzopolisakkarit sentez ederler. Kapsüler polisakkarit aynı zamanda bakterinin tutunma ve fonksiyonel elemanlarını değiştirebilir. *S. aureus* ile enfekte yabancı cisimlerde elektron mikroskobu ile görülen kapsüler polisakkarit, serolojik olarak 13 tipten oluşur. Klinikten izole edilen suşların %70-80'inde serotip 5 ve serotip 8 görülmüştür. Diğer tipler klinik izolatlarda çok nadirdir (49).

Kapsüler polisakkarit, konağa tutunmuş bakterilerin eksatraselüler protein matriks ile üzerlerini örten biyofilmin en önemli elemanıdır. Biyofilm vasıtası ile matrikse gömülmüş bakteriler antimikrobiyal ajanların penetrasyonuna ve dolayısıyla aktivitelerine karşı dirençli hale gelirler (49).

2.3.2. Peptidoglikan Tabaka

Hücre duvarı bakteriye şeklini veren, yapısal sertlik sağlayan ve bakterinin çevre şartlarına karşı dirençli olmasına sebep olan bir yapıdır. Bakteri ağırlığının büyük kısmı peptidoglikan tabakasına aittir. Bu tabaka beta 1-4 glukoz bağları ile N-asetilglukozamin ve N-asetilmuramikasit'in birbirlerine bağlanması suretiyle oluşur. N-asetil muramikasit'e ait rezidülerin C3 karbonuna bağlı, L-alanin, D-glutamin, L-lizin ve D-alanin aminoasitlerinden oluşan bir zincir bulunur. Bu zincirdeki D-alanin, diğer zincirdeki N-asetil muramik asit'e bağlı kısa zincirin L-lizin'ine pentaglisin köprüleri ile bağlanır. Peptidoglikan tabaka, teikoik asitle beraber kopleman aktivasyonuna, polimorfonükleer hücrelerin kemotaksisinin artırılmasına, monositler tarafından interlökin-1 üretilmesine ve opsonik antikorların sentezinin uyarılmasına sebep olur. Ayrıca sitokinlerin salgılanmasını artırır ve trombositlerin kümelenmesine yol açar (50,51).

2.3.3. Teikoik Asit

Teikoik asitler, ya beş karbonlu ribitollerin ya da üç karbonlu gliserollerin fosfodiester bağlarıyla birleşmiş bir polimerdir. Ribitol teikoik asit bakteri hücre duvarıyla, gliserol teikoik asit ise hücre membranıyla ilişkilidir. Ribitol teikoik asit, N-asetil muramik asit'in C6 hidroksil grubu sayesinde peptidoglikana kovalent olarak bağlanır. Gliserol teikoik asit, hücre membranının dışı bakan yüzeyindeki glikolipidlere bağlanır ve buna lipoteikoik asit denir. Bu yapı hücre duvarı içinde ilerleyerek hücrenin dışına kadar uzanır (52).

Teikoik asit bakteri için birden çok vazife görür. Hücre duvarının stabilizasyonunu sağlar, hücre duvarı ile hücre membranının bağlantısını sağlar, hücre duvarının sağlamlığı ve fonksiyonları için gerekli küçük iyonlarla şelat oluşturur, bakteriler arası etkileşimde ve bakterinin konak hücrelerde bulunan yüzeylere tutunmasında rol alır. Ayrıca bakterinin çoğalma ve büyüme zamanlarında peptidoglikan sentezi ve septum oluşumunda rol oynayabilir. Teikoik asitler antijenik olduğu için bakteri grupları bu antijenik yapı esas alınarak tanımlanır (52).

2.3.4. Protein A

Adezif matriks moleküllerini tanıyan mikrobiyal yüzey elemanları (“Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecules”, MSCRAMM), *S. aureus*’un hücre duvarına bağlanan ve sayısı 20’yi geçen küçük proteinlerden oluşmuş bir ailedir. Bakteri bu proteinler ile fibronektin, fibrinojen, elastin, diğer lipidler gibi birçok konak matriks proteinlerine bağlanabilir. Ayrıca bazı adezinler stafilokokların tabiatında ve bazı hastalıklardaki spesifik virulansında rol oynar. Örneğin; *S. aureus*’un nazal taşıyıcılığında clumping factor B, yabancı cisimle ilişkili ventiküler enfeksiyonda fibronektin bağlayan protein A ve B, osteomiyelitte kollojen bağlayan protein gibi (53,54).

Protein A, 42000 kDa ağırlığında ve MSCRAMM’ e ailesine ait bir adezindir. Hücre duvarının dış yüzeyinde bulunur. IgG3 haricindeki bütün insan IgG’lerin Fc bölgelerine bağlanır. Bu sayede antikomplementer ve antifagositer etki gösterir (4955). Protein A ayrıca opsonizasyona ve bakterinin polimorfonükleer hücreler tarafından fagositozuna, kompleman aktivasyonuna ve aşırı duyarlılık reaksiyonlarına sebep olur. Aynı zamanda B hücre süperantijenidir. Çünkü B hücre reseptörüne doğrudan bağlanıp spesifik antikor sentezlemesini engeller. Ayrıca organizmanın tiplendirilmesinde ve vücut sıvılarında antijen taranmasında kullanılan koagülasyon test metodu Protein A’nın varlığına ve özelliğine dayanır (56).

2.4. Enzimler

2.4.1. Katalaz

Bakteriyi fagosit eden hücrelerdeki myeloperoksidaz enzim sistemi tarafından oluşturulan hidrojen peroksiti (H_2O_2), suya (H_2O) ve oksijene (O_2) parçalayan enzimdir. *S. saccharolyticus* ve *S. aureus subsp. anaerobius* haricindeki bütün stafilokoklar tarafından üretildiği için katalaz negatif olan streptokoklardan ayrımında kullanılır (58).

2.4.2. Koagülaz

Staphylococcus aureus’un pıhtılaşmaya sebep olan koagülaz aktivitesi iki tiptir. Bağlı koagülaz hücre duvarına (Clumping faktör) bağlı olarak bulunur ve fibrinojene doğrudan bağlanarak fibrin oluşmasına sebep olur. Ayrıca *S. aureus*’ların kümelenmesini sağlar. Serbest koagülaz ise hücreden dışarı salınır ve plazmada bulunan koagülaz reaktif faktör (CRF) ile birleşerek fibrinojeni fibrine dönüştüren

stafilotrombini meydana getirir. Bakterinin fibrinle kaplanması onu fagosit ve antimikrobiyal ajanlara dirençli hale getirir (56,59).

2.4.3. Fibrinolizin

Bu enzim plazminojeni plazmine dönüştürür ve oluşan plazmin fibrin pıhtılarını yıkarak bakterinin dokularda yayılmasına sebep olur (60).

2.4.4. Hyalüronidaz

Fibrinolizine benzer şekilde, hücreler arasındaki matriksi hidrolize ederek bakterinin yayılmasını sebep olur (56).

2.4.5. Lipaz

Yağları hidrolize ederek bakterinin kutanöz ve subkutanöz dokulara yayılmasına yol açar. Bu enzim fronkül ve karbonkül oluşmasında rol oynar. Fosfatidilinozitol-spesifik fosfolipaz C enziminin, yetişkin *respiratuar distres sendrom* ve diseminan intravasküler koagülasyon geçiren hastalardan izole edilen suşlarla ilişkisi tanımlanmıştır (56).

2.4.6. Nükleaz

DNA ve RNA'yı 3'-fosfomononükleotidlere parçalayan, ekzo ve endonükleaz aktivitesi bulunan ısıya dirençli fosfodiesterazdır (61).

2.4.7. Penisilinaz (Beta laktamaz)

İmmunolojik ve substrata spesifik çalışmalar *S. aureus*'un birden çok tipte B laktamaz enzimi ürettiğini göstermiştir. Bu enzimler indüklenebilir yahut devamlı bir şekilde sentezlenebilir. Beta laktamazı kodlayan genler, eritromisin ve tetrasiklin gibi birçok antibiyotiğe direnç genleri taşıyabilen plazmidler üzerinde bulunur ve transformasyon, transdüksiyon ile başka bakterilere nakledilebilir (56).

2.5. Toksinler

Staphylococcus aureus enfekte ettiği konağın hücre yapısını ve fonksiyonunu bozacak birden çok toksin üretir. Bunlar; beş tane sitotoksin (alfa, beta, delta, gama ve Panton-Valentine lökositidin), iki tane eksfoliyatif toksin (A ve B), sekiz tane enterotoksin ve toksik şok sendromu toksini (TSST-1)'dir (62,63).

2.5.1. Alfa Hemolizin

Birçok farklı hücrede litik etkiler gösterir. İnsan eritrositlerinin, makrofajlarının, monositlerinin ve lenfositlerinin yıkılmasına sebep olur. 33000 dalton ağırlığında olan bu protein, geç logaritmik üreme periyodunda besiyerine salgılanır. Bu proteinin monomerleri hedef hücrenin duvarında birleşip kümeleşirken merkezde bir por meydana gelir. Pordan potasyum iyonları ve küçük moleküller dışarı çıkar, sodyum ve kalsiyum iyonları hücre içine girer. Bu durum hücrenin osmotik dengesini bozarak hücrenin parçalanmasına yol açar. Alfa hemolizin subkutanöz dokular için dermonekrotiktir. *S. aureus*'un kanlı agarda yaptığı beta hemolizden bu toksin sorumludur (56).

2.5.2. Beta Hemolizin

Çeşitli tipteki hücrelere etki eden bir nötral sfingomyelinidaz olup 35000 dalton ağırlığındadır ve logaritmik üreme fazının sonunda ortama salınır. Hemolitik aktivitesinin gerçekleşebilmesi için magnezyum gerekir. Sfingomyelini seramid ve fosforil koline hidrolize eder. Monositlere karşı toksik olmasına rağmen lenfositlere, granüositlere ve fibroblastlara etkisizdir. Düşük sıcaklıkta eritrositlere olan hemolitik etkisi arttığı için 'sıcak-soğuk' hemolizin olarak da bilinir. Bu hemolizin *S. aureus* haricinde B grubu streptokoklar ve *L. monocytogenes* tarafından da üretilir ve CAMP faktörle etkileştiğinde bakterinin hemolitik etkisinin artmasını sağlar(56).

2.5.3. Gama Hemolizin ve Panton-Valentine Lökosidin

İki hemolizin de konak hücrelerinde porlar açan polipeptitlerden oluşmuştur. Bu polipeptitler jel elektroforezindeki hareketlerine göre yavaş (S) ve hızlı (F) olarak ikiye ayrılırlar. Gama hemolizin HIgA ve HIgC'den (yavaş kısım) biri ve HIgB'nin (hızlı kısım) birleşmesinden meydana gelir (56).

Panton-Valentine Lökosidin, stafilokok suşları arasında lizojenik fajlar ile nakledilir ve *LukF* ve *LukS* parçalarından oluşur. 4 tane S ve 4 tane F monomeri birleştikten sonra hedef hücrenin membranına bağlanır ve hücrede porlar meydana gelir. Etkilenen hücre şişer ve patlar. PVL insan nötrofili, fare alveolar makrofajı, tavşan nötrofili gibi çok çeşitli hücre tiplerine toksik etkide bulunur. Fakat insanların yakalandığı enfeksiyonlardaki rolü hala aydınlatılamamıştır (56).

2.5.4. Delta Hemolizin

Bu hemolizin *S. aureus*'ların %97'sinde, koagülaz negatif stafilocokların ise %50-%70'inde bulunur. 3000 da ağırlığında küçük ve eksponansiyal büyüme fazının sonunda salgılanan amfipatik bir peptittir. Yüzeye etkin deterjan özelliği sayesinde hücre membranında porlar açarak hücre içeriğinin yavaş yavaş dışarı sızmasına sebep olur (56).

2.5.5. Eksfoliyatif Toksinler

Staphylococcus aureus suşlarının %1-2' si tarafından salgılanan ve 24000 daltonluk *ET-A* ve *ET-B* proteinlerinden oluşan bir toksindir ve süperantijendir. Bunlardan *ET-A* ısıya duyarlıdır ve kromozoma entegre olmuş bir bakteriyofaj üzerinde kodlanmıştır. Diğer protein *ET-B* ise ısıya dirençlidir ve plazmidler ile taşınır. Bu iki peptid biyokimyasal ve immunolojik olarak farklı olsalar da biyolojik ve süperantijen aktiviteleri birbirlerine benzerdir. Serin proteaz aktivitesi göstererek epidermise ait desmozomlardaki adezyon glikoproteinlerini hedef alır. Böylece stratum granulozum tabakasını oluşturan hücreler arasındaki bağlar kopmaya başlar ve stratum granulozum tabakası ayrılır. Stafilocokkal haşlanmış deri sendromuna sebep olur (56,64).

2.5.6. Enterotoksinler

Isıya dirençli ve gastrik, jejunal enzimlere dayanıklı toksinlerdir. *A-E*, *G*, *H*, *I* isimleriyle serolojik olarak sekiz tipe ayrılır. Bu toksinler ısıya dirençli oldukları için ısıtılıp bakteriler öldürülse dahi etkilerini kaybetmezler. *S. aureus*'ların %30-50'si bu toksini üretmektedir(65). Tüm enterotoksinler süperantijendir. Besin zehirlenmesine en sık sebep olan enterotoksin *A*'dır. Enterotoksin *B* ise genellikle hastane kaynaklı enfeksiyonlarda görülür ve psödomembranoz enterokolite sebep olur(66).

2.5.7. TŞST-1

Toksik şok sendrom toksin-1 22000 dalton ağırlığında küçük bir proteindir. Bakteriden salındıktan sonra mukozal membranları geçerek dolaşım sistemine katılır. Süperantijen özelliği olduğu için T hücrelerinin değişken bölgelerine doğrudan bağlanarak kontrolsüz miktarlarda IL-1, TNF ve interferon- γ üretilmesine sebep olur ve ciddi, multisistemik bir hastalık tablosuna yol açar. Hastalarda ateş, hipotansiyon, eritrodermi, mental konfüzyon, çoklu organ yetmezliği görülür. Bu tabloya Toksik Şok Sendromu adı verilir. (67)

2.6. Yaptığı Enfeksiyonlar

Staphylococcus aureus, stafilokoklar içindeki en önemli insan patojenidir. Yetişkinlerin burnunda %20-40 oranında ve çevrede bulunur. Hatta aksilla, cilt, perineum, vajinada da bulunabilir. İnsanların normal mikrofloralarında bulunmasına rağmen fırsatçı enfeksiyonlar yapabilir. Enfeksiyona zemin hazırlayan konağa ait predispozan faktörler şunlardır:

- Lökosit kemotaksisinde defekt
- Antikorlar tarafından opsonizasyonda defekt
- Bakterinin intraselüler alanda öldürülmesinde defekt
- Deri yaralanmaları
- Yabancı cisim
- Başka ajanlarla enfeksiyon
- Malinite, diyabet gibi kronik hastalıklar
- Terapotik veya profilaktik antibiyotik kullanımı

Staphylococcus aureus, basit deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarından hayatı tehdit eden sepsislere, menenjitlere kadar geniş bir hastalık yapma yelpazesine sahiptir. Aynı zamanda toplum kaynaklı sepsislerin en önemli nedenidir ve en önemli nozokomial patojendir (68-70).

2.6.1. Folikülit

Yüzeyel dermisin iyi seyirli enfeksiyonudur. Kıl foliküllerini tutar ve küçük, kırmızı, ağrılı lezyonlar oluşturur. Sistemik semptomlar görülmez (71).

2.6.2. İmpetigo

Genellikle çocuklarda, bilhassa yüz gibi vücudun açık bölgelerinde görülen dermisin tutulduğu bir stafilokokkal enfeksiyondur. Büllöz ve nonbüllöz olmak üzere iki formu vardır. Nonbüllöz formda kırmızı tek bir makül yahut papül hızlıca veziküle döner. Daha sonra lezyon rüptüre olur ve eritamatöz kenarlı, karakteristik altın renginde kabuğa sahip bir yara halini alır. Otoinokülasyonla vücudun başka bölgelerine yayılabilir. Büllöz impetigo, büyük çocuklarda ve yetişkinlerde görülse de en çok yeni doğanlarda görülen stafilokokkal haşlanmış deri sendromunun bir parçası olan formdur. Yüzeyel vezikül, etrafında eriteme olmayan, keskin sınırlı büle kadar ilerler ve daha sonra bül rüptüre olur. Genellikle vücudun nemli bölgelerini tutam impetigoda ateş ve gastroenterit gibi sistemik semptomlar da görülebilir. Birçok vaka skar bırakmadan

kendi kendini sınırlar. İmpetigo vakalarının %80-90'ının etkeni *S. aureus*'tur. Geri kalan vakalara ise A grubu beta hemolitik streptokoklar sebep olur (71).

2.6.3. Fronkül ve Karbonkül

Fronkül'de mikroorganizma derin yerleşimli kıl foliküllerine tutulur. Süpürasyon subkutanöz dokuda, dermise doğru uzanır. Lezyonlar deriden kabarık, ağrılı ve içi pürülan materyalle doludur. Sistemik semptom genellikle yoktur. Karbonkül de subkutanöz dokuya, kıl foliküllerinin yakınına doğru uzanır. Birçok lezyon birleşerek subkutanöz bölgede sinusler meydana getirir. Genellikle sistemik semptomlar vardır. Tedavisi cerrahi drenaj ve parenteral antibiyoterapidir (71).

2.6.4. Mastit

Yeni doğum yapmış veya laktasyondaki kadınların meme dokusunu tutar. Meme dokusunda sertlik, ödem, kızarıklık yapar. Yüzeysel abseler aspirasyonla tedavi edilirken derin abseler insizyon ile drene edilir (71).

2.6.5. Yara Yeri Enfeksiyonu

Ekseri stafilokokkal yara yeri enfeksiyonu cerrahi müdahale sonrasında gelişir. Yara bölgesi kırmızı, kabarık, ağrılıdır ve seröanjinoz akıntı gelir. Tedavi yaklaşımını enfeksiyonun derinliği, hastanın durumu, sistemik semptomların varlığı/yokluğu, yabancı cisim varlığı/yokluğu belirler. Bu enfeksiyon sıklıkla hastanın burnunda kolonize olan *S. aureus*'lar tarafından meydana gelir (71).

2.6.6. Selülit ve Yumuşak Doku Enfeksiyonu

Selülit, enfeksiyonun yumuşak dokudan süperfisyal fasyaya doğru hızlıca yayılmasıdır. En sık sebebi A grubu beta hemolitik streptokok olsa da kutanöz ülser veya abse varlığında ara sıra *S. aureus* da etken olabilir. *S. aureus* gibi, diğer gram pozitif ve gram negatif bakteriler de selülit yapabilir. Selülit olan bölgeden numune alınmalı, kan kültürleri toplanmalı ve geniş spektrumlu antibiyotikler ampirik başlanmalıdır. Erizipel, A grubu beta hemolitik streptokokların ve daha az sıklıkla *S. aureus*'un sebep olduğu bir selülit tipidir ve ağrılıdır. Nekrotizan fasit, lokalize stafilokokkal enfeksiyonun hızlıca yayılmasıyla meydana gelebilir. Bu enfeksiyon tipinde erken ve hızlı teşhisle birlikte iyi cerrahi debridman yapılmalıdır (71).

2.6.7. Kan Dolaşımı Enfeksiyonu

Staphylococcus aureus'un yaptığı kan dolaşımı enfeksiyonu yılda 10.0000'de 20-30 kişidir ve mortalite oranı %20-%30 civarındadır. Hastaneye yatışı ilk iki gününde geçirilen enfeksiyon toplum kaynaklı, üçüncü günden itibaren geçirilen enfeksiyon hastane kaynaklıdır. Toplum kaynaklanan enfeksiyonun kaynağı genelde selülit, endokardit, pnemoni kaynaklı, hastane kaynaklı enfeksiyonların kaynağı ise genelde kataterler, invaziv girişimler olmaktadır. Hastane kaynaklı enfeksiyonlara sebep olan *S. aureus* suşları daha dirençlidir. *S. aureus* bakteriyemisi geçiren hastaların %10'unda, bakteriyemiye takiben endokardit görülür. Bakteriyemi durdurulamazsa trombositopeni, yaygın damar içi pıhtılaşma, çoklu organ yetmezliği gibi ciddi, mortal hastalıklar görülebilir. Bakteriyeminin sebebi yabancı cisim ise hemen vücuttan uzaklaştırılmalıdır. 8-10 güne kadar hastaya parenteral tedavi verilmesi tavsiye edilir (71).

2.6.8. Endokardit

Staphylococcus aureus hem doğal kapak hem de prostetik kapak endokarditine yol açabilir. Ateşin görüldüğü akut septik sendrom ve artralji, miyalji, göğüs ağrısı gibi nonspesifik semptomlar ve yeni kalp üfürümleri ile karakterizedir. Peteşiyal deri lezyonları ve Janeway lezyonları septik embolinin vücutta dağıldığını gösterir. Kapakçıkların üzerindeki vejetasyonlar koparsa küçük arterlerden beyin, kalp, böbrek gibi önemli organlara kadar bir çok dokuya emboli atabilir ve ciddi hastalıklara sebep olabilir. İntravenöz ilaç kullananlarda primer olarak sağ kapak endokarditi görülür. Doğal kapakları tutan metisiline duyarlı *S. aureus* endokarditinde tedavisinde 4-6 hafta süre ile penisilinaza dirençli bir penisilin ya da birinci kuşak sefolosporin kullanılır. Beta laktam grubuna alerji görülürse veya etken metisiline dirençli ise tedavi vankomisin ile yapılır. Metisiline duyarlı *S. aureus* prostetik kapağı tutarsa tedaviye aminoglikozit eklenir (71).

2.6.9. Menenjit

Staphylococcus aureus'un etken olduğu menenjit bakteriyeminin, travmanın, cerrahi girişimin, şant tedavisinin bir komplikasyonu olarak görülebilir. Menenjite sebep olan bakteriyeminin kaynağı sıklıkla abse, pnömoni gibi herhangi başka bir yerdeki enfeksiyondur. *Staphylococcus aureus*'un etken olduğu menenjitler tüm menenjitlerin içinde %2-8 gibi nadir bir oranda olmasına rağmen enfeksiyonların mortalitesi yüksektir.(72)

2.6.10. Pulmoner Enfeksiyon

Staphylococcus aureus pnömonileri, aspirasyonla veya başka bölgedeki enfeksiyonun hematojen yolla yayılması ile meydana gelir. Toplumdan kazanılmış aspirasyon pnömonileri sıklıkla yaşlı insanlarda influenza pnömonilerinin bir komplikasyonu olarak görülür. Hastaneden kazanılan pnömoni ise genellikle entübasyon veya ventilasyon desteğine sekonder olarak görülür. Yarisından fazlasının metisiline direnç gösterdiği *S. aureus* pnömonileri, nozokomiyal pnömonilerin en sık görülen etkenidir. Enfeksiyon akciğerlere hızlıca yayılır, nekroz, kavitasyon, abse ve ampiyem bırakarak vücuda yayılır. *Staphylococcus aureus* pnömonilerinin komplikasyonları ampiyem ve bronkoplevral fistüldür (72).

2.6.11. Eklem ve Kemik Enfeksiyonları

Staphylococcus aureus osteomyelitleri sıklıkla lokal enfeksiyonun ilerlemesi veya hematojen yolla enfeksiyonun yerleşmesi ile oluşur. Hematojen yolla enfeksiyonun yayılımı genellikle çocuklarda görülür ve karakteristik olarak uzun kemikler tutulur. Abse ve litik kemik lezyonundan numune alınıp ekimi yapılmalıdır. Hastalar sıklıkla ateş, kilo kaybı ve kemik ağrısı gibi nonspesifik semptomlara sahiptir. *S. aureus*'un sebep olduğu osteomyelit'in radyolojik bulguları osteosarkom gibi maligniteleri taklit edebilir, birbirlerinden ayırmak için biyopsi alınmalıdır. *Staphylococcus aureus*'a bağlı septik artrit genellikle prepubertal çocuklarda görülür ve yetişkinlerde de bakteriyeminin bir komplikasyonu olarak görülür (72).

2.6.12. Pyomiyozit

Sıklıkla travmaya sekonder gelişen, daha az sıklıkla fronkül gibi yakın enfeksiyon odağından yayılan bir kas enfeksiyonudur. Hastalarda ateş ve kas ağrısı vardır. Tedavisi insizyon ve drenaja ek olarak destekleyici antibiyotik kullanılmasıdır (72).

2.6.13. Stafilokokkal Besin Zehirlenmesi

Bakteri ile kontamine olan besinlerin içinde bulunan ve *S. aureus*'un ürettiği ısıya dayanıklı toksinin sebep olduğu hastalık tablosudur. Hastalarda mide bulantısı, kusma, karın ağrısı ve diyare görülür. Semptomlar besin alımından 2-6 saat sonra

başlar, 8-10 saat sonra hafifler. Karakteristik olarak ateş ve nörolojik bulgu yoktur. Semptomlara yönelik destek tedavisi yeterlidir (72).

2.6.14. Stafilokokkal Haşlanmış Deri Sendromu

Eksfoliyatif toksin üreten *S. aureus* suşları tarafından oluşturulan bu hastalık genellikle yenidoğanlarda ve beş yaşın altındaki çocuklarda görülür. Enfeksiyon konjunktivada, burunda, umblikusta ve perineumda gelişebilir. Aynı zamanda pnömoni, üriner sistem enfeksiyonu, endokardit, septik artrit gibi enfeksiyonların bir sonucu olarak görülebilir. Lokalize enfeksiyon büllöz lezyon olarak görülebilir fakat toksin dolaşım sistemine girip vücuda dağılırsa büyük eritemler ve daha büyük bölgelere yerleşen büyük büllöz lezyonlara ve yüzeysel derinin soyulmasına sebep olur. Birçok vakada deri pul pul soyulur ve semptomlar 5-7 gün sonra azalır. Toksinler antijenik olduğu için antijene karşı oluşan antikorlar koruyucudur. Salgınlar yenidoğan yoğun bakımlarında ve hemşirelerde görülür. Lezyondan alınan numunenin kültürü enfeksiyon odağı burun, pnömoni gibi başka bir bölge olabileceği için tanı değeri sınırlıdır. (72)

2.6.15. Stafilokokkal Toksik Şok Sendromu

Toksik şok sendromu ateş, hipotansiyon, eritroderma, bulanı, kusma, diyare, renal disfonksiyon, baş ve boğaz ağrısı, konjunktivit ile karakterize bir hastalıktır. Sıklıkla menstrüasyon gören ve yüksek absorbansa sahip tampon kullanan kadınlarda görülür. Tamponlarda kullanan fiber toksin üretimi için ideal çevre oluşturur. Yüksek oksijen seviyesi, absorbant malzemedeki protein, yüksek pH ve kan ile çevrelenmiş nötral çevre bakterinin TSST-1 toksini üretmesini stimule eder. Menstruasyonla alakasız TSS ise hem kadınlarda hem de erkeklerde stafilokokkal absenin, osteomyelitin, influenza sonrası pnömoninin, cerrahi yara yeri enfeksiyonunun bir komplikasyonu olarak görülebilir. Taşıyıcılarda ve klinik olarak enfeksiyon etkeni olan *S. aureus*'ların %20'si bu toksini üretir. Bu toksin ile vasküler kapiller geçirgenlikte artışa bağlı olarak intravasküler sıvı intersitisyel alana kaçır ve hipotansiyon, doku hipoksisi görülür. İntravasküler sıvı kaybını diyare şiddetlendirir. Akut respiratuvar distress sendromu ve yaygın damar içi pıhtılaşması TSS'nin hayatı tehdit eden ciddi komplikasyonlarıdır. Ayrıca TSST-1 direkt olarak myokardium, iskelet kası, böbrek ve karaciğere toksik etkileri vardır. TSS üreten bakteri ile enfekte veya TSST-1'e karşı düşük antikör seviyesine sahip hastalar TSS geçirmelerine rağmen hastaların yarısından

fazlasında TSST-1'e karşı antikor üretimi olmaz. Antibiyotik tedavisi ve semptomlara yönelik destekleyici tedavi verilir. Stafilokokkal TSS'na bağlı ölüm %3'tür (72).

2.6.16. Bakteriüri ve Üriner Sistem Enfeksiyonları

Üriner sistemden izole edilen *S. aureus*'lar, bakteriyemi veya üriner sisteme yönelik invaziv girişim sonrası görülebilir. Başka bir odaktan böbreğe yayılan bakteriler üriner sisteme yerleşebilir. *Staphylococcus aureus* üriner sisteme yerleşse de hastaların ekserisi asemptomatiktir. İleri yaş, kataterizasyon, üriner sisteme cerrahi müdahale, obstruksiyon, malignite *S. aureus* bakteriürisi için risk faktörleridir (72).

2.7. Koagülaz Negatif Stafilokok Enfeksiyonları

KNS'lere bağlı doğal kapak endokarditleri nadir olsa da protez kapakları tutan endokarditlerde en sık etkindir. Cerrahi sonrası 2-12 ay içerisinde görülen protez kapak endokarditlerinin %60-%80 etkeni *S. epidermis*'tir. Diğer KNS'ler de endokardit etkeni olabilir (73).

KNS'ler katater ve şant enfeksiyonlarının en sık sebebidir, en sık etkeni ise *S. epidermidis*'tir. Bilhassa katater, şant gibi yabancı cisimlerin etrafına bakteri tarafından fibrinojen, fibrin yığınları oluşturulur ve bakteri buraya yerleşerek bir biyofilm tabaka meydana getirir. Glikokalik yapısındaki bu biyofilm tabakası içindeyken bakteri antimikrobiyallere ve konak savunma sistemine dirençli hale gelir (74). Ayrıca *S. saprophyticus* sağlıklı kadınlarda nonkomplike üriner sistem enfeksiyonlarına sıklıkla sebep olur.

2.8. Mikrobiyal Tanımlama

2.8.1. Gram Boyama

Staphylococcus aureus birden çok düzlemde bölünüp birbirinden ayıramadığı için mikroskop altında üzüm salkımı şeklinde görülen, daha az sıklıkla tek, çift, tetratlar ve kısa zincirler oluşturan, 0,5-1,5 µm çapında Gr(+) koklardır(38,39). Ancak eski kültürlerin boya tutması zorlaştığı için gram negatif görülebileceği akılda tutulmalıdır (75).

2.8.2. Katalaz Testi

Bu test ile *Staphylococcus* ve *Micrococcus* cinsleri, *streptococci*, *enterococci* ve *streptococcus*-benzeri bakterilerden ayırt edilir. Katalaz testi aslında sitokrom oksidaz enziminin varlığını tespit eder. Bir cam üzerinde %3'lük hydrogen peroxide (H_2O_2) ile çalışılır. Bakteri cam üzerindeki solüsyona bırakıldığında hemen belirgin kabarcıklar görülüyorsa, H_2O_2 , suya ve oksijene parçalanmış ve testi pozitif hale getirmiş demektir. Kırmızı kan hücreleri katalaz enzimi içerdiklerinden testi zayıf pozitif hale getirebileceği için ideal olanı katalaz testinin eritrosit içermeyen besiyerinde üreyen bakterilere uygulanmasıdır. Bu tehlike sebebiyle testi çalışan kişinin eritrosit içeren besiyerinden mümkün mertebe sadece bakteriyi almaya dikkat etmesi gerekir. Çok nadir stafilokok suşları katalaz negatif olabilir. Bazı enterokoklar 'pseudocatalase' üreterek testi zayıf pozitif hale getirebilir (76).

2.8.3. Koagülaz Testi

Bu test yardımıyla *S. aureus* diğer stafilokok türlerinden ayırt edilir. *Enterococcus*, *P. aeruginosa*, *S. marcescens* gibi bakteriler sitratı parçalayıp pıhtılaşmaya sebep olabildikleri için EDTA'lı plazmalar kullanılmalıdır. İnsan plazması farklı miktarlarda CRF ve bakteriye karşı oluşmuş antikor bulundurabileceğinden bu test insan plazması ile çalışılmamalıdır. Koagülaz testi iki şekilde yapılır.

2.8.3.1. Tüp Koagülasyon

Tüp koagülaz testi bağlı ve serbest koagülazı tespit eder. Koagülaz enzimi ekstraselüler alana salgılanır ve fibrinojeni fibrine dönüştüren koagülaz-reakting-faktor (CRF) ile etkileşime girer. Steril tüpe 0.5 ml tavşan plazması dağıtılır ve bir öze dolusu bakteri tüpe aktarılır ve 35 C°'de 4 saat sonra pıhtılaşma kontrol edilir. Eğer pıhtılaşma yoksa oda sıcaklığında inkübe edilerek 18-24 saat sonra tekrar kontrol edilir. Pıhtılaşma varsa test pozitifdir. Eğer inkübasyon 18-24 saate kadar 35 C°'de gerçekleşirse bakteri fibrinolizin üreterek pıhtıyı çözebilir. Çok nadir *S. aureus* suşları koagülaz negatif olabilir bazı hayvanlardan izole edilen *Staphylococcus* (*S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. delphini*, ve *S. schleiferi subsp. coagulans*) ise tüp koagülaz pozitif olabilir. *S. schleiferi subsp. schleiferi* hem lamda koagülaz hem de tüpte koagülaz testi pozitif olduğundan ve ısıya dirençli endonükleaz üretebildikleri için klinikte yanlışlıkla *S. aureus* olarak isimlendirilebilir (77,78).

2.8.3.2. Lamda Koagülasyon

Bu test bağı koagülazı tespit eder. Bağı koagülaz kümeleşme faktörü (clumping factor) olarak bilinir ve bakterinin hücre duvarında bulunur. Fibrin lifleri bakterilerin hücre duvarları arasında oluşur ve gözle görülebilir bir kümeleşmeye yol açar. Küçük bir damla su bulunan bir lam üzerinde yoğun bir bakteri süspansiyonu hazırlanır ve üzerine bir damla tavşan plazması damlatılır. Devamlı dairesel hareketlerle karıştırılır. Beyaz kümelenme görülmesi testin pozitif olduğunu gösterir. Otoaglutinasyona dikkat edilmelidir. Test negatif çıkarsa yahut geç pozitiflik görülürse (20-60) tüpte koagülaz testi ile doğrulanmalıdır (77,78).

2.8.4. Mannitol Hidrolizi

Staphylococcus aureus, *S. epidermidis* ve diğer stafilokok türlerinin aksine mannitolden asit üretir. Bu özellik sayesinde *S. aureus* toprakta, feçeste ve nazal taşıyıcılıkta taranabilir. Mannitol agarın içinde enterokokların üremesini inhibe eden yüksek tuz konsantrasyonu (%7.5), %1 mannitol, fenil kırmızısı ve pepton bulunur. *S. aureus*'ların etrafında sarı bir zon oluşur. Nadiren başka stafilokok türleri de bu görüntüyü verebilir, bu nedenle *S. aureus* tiplendirmesine başka testler de eklenmelidir (79).

2.8.5. Deoksirübonükleaz Testi

Bazı *S. aureus* suşları tüpte koagülasyon testinde zayıf veya belirsiz sonuç verebilir, hatta bazıları koagülaz negatif olabilir. Neyse ki diğer testler koagülaz üretimi ile yüksek korelasyon gösterir. *Staphylococcus aureus*, deoksirübonükleaz (DNAaz), endo ve ekzonükleaz aktiviteye sahip termostabil nükleaz üretir. Metakromatik bir boya olan toludin mavisi içeren besiyerine bakteri inokule edilerek DNAaz tespit edilebilir. 35 C°'de 24 saat inkübasyondan sonra bakteri kolonisinin çevresi ve altı DNA hidrolizine bağı olarak maviden pembeye döner. Toludin mavisi DNAaz aktivitesini maskelememesi için konsantrasyonu %0.005'i geçmemelidir. Bu test *S. aureus* tiplendirilmesinde destekleyici bir rol alır (77).

2.8.6. Termostabil Endonükleaz

Bu test için DNAaz besiyeri kullanılır. Besiyerinde kuyucuklar açılır ve içine 24 saat sıvı besiyerinde inkübe edildikten sonra 15 dakika sıcak su banyosunda bekletilen bakteriler konulur. 35 C°'de bir gece inkübe edilir. *Staphylococcus aureus* kuyucukların etrafında pembe bir zon oluşturur. Bazı hayvan izolatları (*S. caprae*, *S.*

schleiferi, *S. intermedius*, *S. hyicus*) ısıya dayanıklı termonükleaz üretebilir, bazı koagülaz negatif stafilocoklar (*S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. capitis*, *S. carnosus*) da zayıf pozitif reaksiyon verebilir. Testi spesifikleştirmek ve doğrulamak için *S. aureus* termonükleaz enzimine karşı oluşturulmuş poliklonal veya monoklonal antikorlar ile sero-inhibisyon yapılabilir (80).

2.8.7. Glikoz Fermentasyonu

Bu test nonfermentatif gram negatif basiller için kullanılan oksidasyon-fermantasyon (OF) testine benzer. OF besiyerine stafilocokların üremesini arttırmak için maya ekstraktı gibi büyümeyi arttıran maddeler eklenir. *Staphylococcus* cinsini *Micrococcaceae* cinsinden ayıran güvenilir ve referans testtir. Yöntemin dezavantajı, uzun inkübasyonlara ihtiyaç olması ve laboratuvarların rutinine uyumlu olmamasıdır (76).

2.8.8. Lizostafin Duyarlılığı

Lizostafin, stafilocokkal hücre duvarının peptidoglikan tabakasındaki glisinden zengin çapraz köprüleri birbirinden ayıran bir endopeptidazdır ve etki ettiği bakteriler osmatik parçalanmaya duyarlı hale gelir. Bazı stafilocoklar (*S. aureus*, *S. simulans*, *S. cohnii*, *S. xylosus* gibi) diğer bazı stafilocoklara (*S. hominis*, *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus* gibi) göre lizostafine daha duyarlı oldukları için testin yorumlanması ve standardizasyonu güçleşmektedir. Bir tüpe 0.2 ml salin ile yoğun bir bakteri süspansiyonu hazırlanır ve üzerine 0.2 ml Remel lizostafin solüsyonu eklenir. 35 C’de 2 saat inkübe edilir. Bu sürenin sonunda süspansiyondaki bulanıklık kaybolursa test pozitifdir. Aynı test Bakteri inoküle edilmiş Mueller Hinton Agar plağına lizostafin emdirilmiş disk ile de yapılabilir. Stafilocoklarda 10-16 mm inhibisyon zonu oluşurken mikrokoklarda inhibisyon zonu oluşmaz. Mikrokoklar lizostafine dirençlidir (76).

2.8.9. Eritromisin Varlığında Gliserolden Asit Üretimi

Bu test için bromkrezol moru ile zenginleştirilmiş ve %1 gliserol ve erythromycin (0.4 µg/mL) içeren besiyeri hazırlanır. Birkaç koloni besiyerine bir çizgi şeklinde sürülür ve 35C’de 3 gün inkübe edilir. Stafilocoklar besiyerinde asit oluştururken mikrokoklar oluşturmaz (76).

2.8.10. Furazolidon Duyarlılığı

Testin çalışılabilmesi için hazırlanmış ticari diskler mevcuttur. Stafilokokların büyümesi furazolidon tarafından inhibe edilir ve 15 mm veya daha fazla inhibisyon zonu oluşur. Mikrokok ve ilişkili bakterilerde inhibisyon zonu 9 mm'ye kadar görülebilir yahut hiç görülmez. Fakat KNS sık olmasa da furazolidona dirençli görülebilir (76).

2.8.11. Modifiye Oksidaz Testi

Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (oxidase ayırıcı) ve dimethyl sulfoxide (DMSO) emdirilmiş filtre kağıtları ile çalışılan ve ticari olarak hazır satılan bir testtir. DMSO bakteri hücre duvarının ayıraca geçirgen olmasını sağlar. Besiyerinden alınan koloniler filtre kağıdına inoküle edilir ve 30 saniye içinde mavi-mor renk görülürse testin pozitif olduğu kabul edilir. Bu süre zarfında renk değişikliği olmazsa test negatiftir. Mikrokoklarda modifiye oksidaz testi negatifken, *S. sciuri*, *S. lentus*, ve *S. vitulinus* haricindeki bütün stafilokoklar pozitifdir (76).

2.8.12. Basitrasin Duyarlılığı

Bu testte group A β -hemolytic streptokokların tiplendirilmesinde de kullanılan basitrasin diski kullanılır. Bakteri süspansiyonu Mueller Hinton agara veya kanlı agara inoküle edilir ve 0.04 U basitrasin içeren disk besiyerine yerleştirilir. Bir gece inkübasyondan sonra zon çapına bakılır. Stafilokoklar basitrasine dirençli oldukları için diskin kenarından itibaren üreyebilirken, mikrokoklarda 10 mm yahut daha fazla inhibisyon zonu görülür (76).

2.8.13. Protein A Tespiti

Bu testte üzerinde fibrinojen ve immunglobulin bulunan lateks partikülleri kullanılır. Protein A, IgG'nin Fc bölgesine bağlanır, kümeleşme faktörü (clumping factor) de fibrinojene bağlanır. Besiyerinden alınan koloniler test materyali ile karıştırıldığında süspansiyon içinde aglütinasyon gözlenirse test pozitif demektir (81).

2.9. Staphylococcus Tedavisinde Kullanılan Antibiyotikler

Staphylococcus enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılacak antibiyotikler diğer patojenlerde olduğu gibi antibiyotik duyarlılık testlerine göre seçilmeli ve tedaviye

başlanmalıdır. Ampirik olarak başlanan tedavilerde ise duyarlılık testlerine göre antibiyoterapi modifiye edilerek tedaviye devam edilmelidir.

Staphylococcus enfeksiyonlarında kullanılan antibiyotikleri 3 grupta incelemek mümkündür.

- 1- Hücre duvarı sentez inhibitörleri
- 2- Protein sentez inhibitörleri
- 3- Nükleik asit sentez inhibitörleri

Tablo 2. Stafilokokların tedavisinde kullanılan antibiyotik sınıfları ve etki mekanizmaları.

Hücre Duvarının Sentezini Bozanlar	Nükleik Asit Sentezini Bozanlar	Protein Sentezini Bozanlar
Beta-laktam Grubu -Penisilinler -Sefalosporinler -Karbapenemler -Monobaktamlar Glikopeptidler	Kinolonlar Rifampin Trimetoprim Sülfonamidler	Aminoglikozidler Makrolidler Linezolid Streptograminler Linkozamidler Kloramfenikol

2.10. Staphylococcuslarda Antibiyotik Direnç Mekanizmaları

2.10.1. Beta-Laktam Direnci

Yapısında biri azot üçü karbon olan 4 üyeli heterosiklik beta laktam halkası içeren antibiyotiklere beta laktam grubu antibiyotikler veya kısaca beta laktamlar denir (82). Beta laktam grubu antibiyotikler bakteri hücre duvarındaki penisilin bağlayan proteinlere (PBP) bağlanarak etki gösterirler. Penisilin bağlayan proteinler, peptidoglikan sentezindeki çapraz bağların oluşmasını sağlayan transpeptidazlardır. Beta laktamlar, PBP'nin bağlandığı D-alanil-D-alanin yapısına benzedikleri için bu transpeptidazlar beta laktamlara kovalent bağlanıp inhibe olurlar ve neticede hücre duvar sentezini bozarlar. Hücre duvar sentezinin inhibe olması tek başına hücreleri öldürmeyip hücre üremesini inhibe eder. Ancak aynı zamanda beta laktamların PBP'ler ile etkileşimi otolizin olarak bilinen, hücre duvarını parçalayan moleküllerin aktivitesini tetiklemekte ve hücreyi parçalayarak hücrenin ölümüne yol açmaktadır (83,84).

Beta laktamazlar, beta laktam halkasının siklik amid bağı kopararak halkayı açar ve antibiyotik aktivitesini inhibe eder (85). İlk bulunan beta laktamaz,

stafilokokların ürettiği ve bakterinin penisiline dirençli olmalarını sağlayan penisilinazdır (86). Şu ana kadar 350’den fazla değişik türde beta laktamaz enzimi tanımlanmış olup sayı her geçen gün artmaktadır (85).

Beta laktamazlar, aktif bölgelerinde serin aminoasiti veya çinko atomu taşımalarına göre (Ambler Sınıflaması) yahut substrat profili veya inhibitör profili gibi fonksiyonlarına göre (Bush-Medeiros-Jacoby sınıflaması) sınıflandırılırlar (85).

Ambler sınıflamasına göre grup A, C, D serin beta laktamazlardır, grup B ise aktivitesi için çinkoya ihtiyaç duyduğu için metallo beta laktamazlardır. *S. aureus*’un salgıladığı penisilinaz Ambler sınıflamasına göre grup A’da, Bush-jacoby sınıflamasına göre 2a’dadır (87).

Stafilokokların beta laktamaz üretmesini sağlayan *blaI* geni genellikle bir plazmid vasıtasıyla taşınır. Penisilin varlığında *blaI* geni üzerindeki represör etki ortadan kalkarak gen indüklenir ve beta laktamaz sentezlenmeye başlanır. Penisiline dirençli metisiline duyarlı olan suşlar penisilinaz üretiyor demektir. Bu suşlar dolayısıyla ampisilin, amoksisilin, karbenisilin, piperasilin gibi penisilin türevlerine dirençlidir fakat penisilinaza dirençli penisilinlere, beta laktam/beta laktamaz inhibitörü kombinasyonlarına, karbapenemlere ve sefalosporinlere duyarlıdır. Penisiline duyarlı suşlar ise bütün beta laktam grubu antibiyotiklere duyarlıdır (88).

2.10.1.1. Metisilin Direnci

Staphylococcus aureus’un peptidoglikan tabakasında bulunan ve beta laktam antibiyotiklerin bağlanma bölgesi olan PBP yerine PBP2a (veya PBP2’) sentezlenir. PBP2a’nın beta laktam antibiyotiklere affinitesi düşüktür. Metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) suşları metisilinle birlikte bütün beta laktam antibiyotiklere dirençlidir (89,90).

PBP2a’yı kodlayan *mecA* geninin kaynağı bilinmemektedir. *Staphylococcus sciuri*’de *mecA* geninin homologue tanımlanmış olsa da *S. sciuri*’nin metisiline duyarlı olması genin çalışma sisteminde etkili promotorlar olduğunu düşündürmektedir (89,90).

Daha sonra *mecA*’nın kromozomda veya replikasyon orijinine yakın entegre olmuş, *Staphylococcal cassette chromosome mec* (SCCmec) olarak isimlendirilen bir bölgede taşındığı gösterildi (91). *S. aureus* SCCmec’i koagülaz negatif stafilokok türlerinden horizontal olarak kazanır. Bugüne kadar 11 farklı SCCmec tipi tanımlanmıştır (91). Büyüklüğü 21-67 kb olan SCCmec’ler farklı antibiyotik sınıflarına direnç genleri taşımaktadır (92).

Avrupa’da tanımlanmış bazı MRSA suşlarında *mecA* genine homolog olan ve *mecALGA251* olarak isimlendirilen bir gen bulunmuştur. İsmi daha sonra *mecC* olarak değiştirilmiştir (93). Bu direnç genlerinde *mecC* geni *mecA* geni ile %69 benzerlik gösterse de sentezinde rol oynadığı PBP, *mecA* tarafından kodlanan PBP2a’dan çok farklı bir homolojiye sahiptir (94).

Stafilokoklarda metisiline nadir de olsa dirence sebep olan bir yol da PBP4’ün aşırı sentezlenmesidir. Bu da duyarlılık veya direncin hedef sayısına nispetle beta laktam moleküllerinin sayısına bağlı olduğunu hatırlatır(95).

Staphylococcus aureus’ta metisilin direncinin ekspresyonu genin üst bölgesindeki *mecI* veya beta laktamaz ekspresyonunu düzenleyen homolog *blaI* geninin ürünü ile kontrol edilir. *mecI* ve *blaI* represörleri de *mecR1* ve *blaR1* ‘sensor-transducer’ tarafından kontrol edilir. *mecI* ve *mecR1* proteinleri beta laktamaz sentezinde regulator olarak görev yapan *BlaI* ve *BlaR1* proteinleri ile büyük oranda benzerdir (90,96).

blaI geni tarafından kodlanan *BlaI* proteini beta laktamazların sentezini sağlayan *blaZ* geninin transkripsiyonunu inhibe eder. *blaR1* geni tarafından kodlanan *BlaR1* ise beta laktamaz genlerinin transkripsiyonuna sebep olur. *mecRI* ve *mecI* da *mecA* geni için buna benzer bir görev alır. *mecI*, *mecA*’nın ekspresyonunu inhibe eder, *mecRI* ise *mecA*’nın ekspresyonunda sinyal uyarıcı bir proteindir. *mecA* ve *blaZ* beta laktamaz genlerinin promotor bölgeleri benzerlik gösterdiği için *blaZ* geni PBP2a sentezini indükleyebilir. Beta laktamaz genleri indüklenebilir özellikteyken normal düzenleyici genler varlığında PBP2a sentezi indüklenebilir değildir. Fakat bazı suşlarda ortamdaki metisilin konstrasyonunun yüksekliği sebebiyle PBP2a sentezi bir miktar artabilir. Bunun sebebi *MecI* proteininin *mecA* geni üzerine baskılayıcı etkisinin, *BlaI* proteininin *blaZ* geni üzerindeki baskılayıcısı etkisinin aksine çok yüksek olmasıdır (96,97).

Staphylococcus aureus’ta beta laktamlara PBP2a ile oluşan direnç ayrıca *fem* (factors essential for methicillin resistance) veya *aux* (auxiliary) genler olarak isimlendirilen başka genetik bölgelerin etkisindedir. Şimdi birçok *fem* ve *aux* faktörleri tanımlanmıştır ve tümü stafilokokların hücre duvarının sentezinde rol oynamaktadır. *Fem* faktörleri metisilin direncine doğrudan sebep olmasalar da hücre duvarının sentezindeki değişiklikler sebebiyle ikincil olarak metisilin direncine sebep olabilirler (90).

2.10.2. Aminoglikozitlere Direnç

Aminoglikozitler *Actinomyces*, *Streptomyces* ve *Micromonospora* tarafından sentez edilen antibiyotiklerdir. Bakteriyel ribozomun 30S subunitine bağlanır ve translasyonu bozarak protein sentezini inhibe eder. Aminoglikozitlere direnç gelişmesinin sebebi bakterinin intraselüler modifiye edici enzimleridir. Bu enzimler asetiltransferazlar, fosfotransferazlar ve nükleotidil transferazlardır. Asetil transferaz aminoglikozidin amino grubunu asetiller, fosfotransferazlar hidroksil grubunu fosforiller, nükleotidiltransferaz ise hidroksil grubunu adenile eder. Enzimler tarafından modifiye edilen aminoglikozitler etkinliğini kaybederler. Bu enzimleri kodlayan genler genellikle integronlarla taşınır ve bu sayede bir bakteriden diğerine yayılabilir (98,99).

2.10.3. Kloramfenikol direnci

Kloramfenikol bakteriyel ribozomun 50S subunitine bağlanarak protein sentezinin bozulmasına sebep olur. Kloramfenikol direnci, aminoglikozitleri modifiye eden enzimlere benzer şekilde aktivite gösteren kloramfenikol asetil transferaz (CAT) enziminin antibiyotiği etkisiz hale getirmesiyle ortaya çıkar. Kloramfenikol asetil transferaz kodlayan genler plazmid veya transpozon ile taşınabilir (100).

2.10.4. Kinolon Direnci

Kinolonlar DNA sentezinde rol oynayan DNA giraz ve topoizomeraz IV enzimlerine bağlanarak DNA sentezini bozar ve hücreyi ölüme götürürler. DNA giraz ve topoizomeraz IV'ü kodlayan genlerde (sırasıyla *gyrA* ve *gyrB*, *griA* ve *griB*) meydana gelen nokta mutasyon bakteriyi kinolonlara dirençli hale getirir. Ayrıca effluks pompası ile antibiyotiğin hücrede birikmesi engellenir (101).

2.10.5. Makrolid, Linkozamid, Streptogramin (MLS) Direnci

Makrolid, linkozamid ve streptogramin kimyasal olarak farklı yapıda antibiyotik olmalarına rağmen etki mekanizmaları birbirine benzemektedir. Makrolidler bakteriyel ribozomun 50S subunitindeki peptidil-tRNA'nın bağlanma bölgesine geri dönüşümlü bir şekilde bağlanarak yeni sentezlenen peptidil-tRNA molekülünün ribozomdaki akseptör bölgeden peptidil bölgeye translokasyonunu engelleyip protein sentezini inhibe eder. MLS direnci bakteriyel ribozomunun metillenmesine sebep olan *erm* genleri tarafından meydana gelir. Metillenen ribozomlar makrolidlere, linkozamidlere ve streptograminlere dirençli hale gelir. Birçok *erm* geni tanımlanmıştır. MRSA'larda

kromozomal bir gen olan *ermA*, MSSA’larda daha çok plazmidler ile taşınan *ermC* daha çok görülür. Makrolid, linkozamid, streptogramin direnci makrolidler tarafından indüklenir fakat klindamisin tarafından indüklenmez (100-102).

2.10.6. Rifampin Direnci

Rifampin bakterinin DNA’ya bağımlı RNA polimerazını inhibe ederek etki gösterir. Bu enzimi kodlayan *rpoB* genindeki nokta mutasyonlar rifampin direncine sebep olur (103).

2.10.7. Trimetoprim-Sulfametoksazol Direnci

Trimetoprim-Sulfametoksazol, amino asit ve pürinlerin biyosentezinde gerekli olan tetrahidrofolatın sentezinde rol olan iki enzimi (dihidropteroik asit sentetaz [DHPS], dihidrofolat redüktaz [DHFR]) inhibe ederek etki gösterir. Dihidrofolat redüktazı kodlayan *dhfr* genindeki nokta mutasyon veya *DHPS*’yi kodlayan *dhps* genindeki nokta mutasyon bakteriyi trimetoprim-sulfametaksazole dirençli hale getirir (104).

2.10.8. Linezolid Direnci

Oksazolidinon grubuna ait olan linezolid bakteriyel ribozomun 23S alt birimine bağlanarak protein sentezinin başlamasını engellemektedir. Neticede protein sentezinin başlama kompleksi ‘N-formilmetionil-tRNA-ribozom-mRNA’ yı durdururlar. Linezolid metisiline dirençli stafilokok ve çoklu ilaca dirençli enterokoklar da dahil olmak üzere birçok gram pozitif patojene iyi bakteriyostatik bir etki gösterir. 23S rRNA’daki nokta mutasyonun linezolid direncine sebep olduğu düşünülmektedir (105).

2.10.9. Glikopeptid Direnci

Stafilokoklarda vankomisin duyarlılığının azalması vankomisin klinik kullanımındaki artışın bir neticesidir. Her ne kadar vankomisin duyarlılığının azalması daha çok *S. aureus* haricindeki *Staphylococcus spp*’de görülüyor olsa da suşlar arasında direncin nakledilmesi büyük bir risk oluşturmaktadır. Vankomisin bakterinin peptidoglikan tabakasındaki pentapeptidin ucundaki D-alanin-D-alanin’e bağlanır. *S. aureus*’ta glikopeptidlere karşı mutasyonel direnç tam bir dirençten çok azalmış duyarlılık şeklindedir. Vankomisine orta duyarlı *S. aureus* (GISA olarak da isimlendirilir) suşları için vankomisin mik değeri 4-8 mg/ml arasındadır. GISA suşlarındaki glikopeptid direnç mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır fakat bulgular

peptidoglikan prekürsörlerinin sayısında artış olduğunu ve anormal septaların oluşturduğu hücre duvarı kalınlaşması olduğunu göstermektedir (106).

2.11. Epidemiyoloji

Stafilokoklar doğumla beraber insan derisinde kolonize olmaya başlayarak deri florasını oluştururlar. Hastalarda ve hastane personeline dirençli stafilokok kolonizasyonu stafilokokların sebep olduğu enfeksiyonun yayılmasına ve antibiyotik direnç kontrolünün güçleşmesine sebep olur. El yıkama gibi temizlik ve hijyen tedbirlerinin alınması, nazal taşıyıcılığın ortadan kaldırılması için topikal ajanların kullanılması gibi metotlarla ameliyathane, yoğun bakım üniteleri gibi riskli hasta gruplarının bulunduğu bölümlerde stafilokokların yayılması engellenebilir (107).

2.12. Mobil Genetik Elementler

Mobil genetik elementler (MGEs), hücre içi veya bakteri hücreleri arasında DNA aktarılmasına aracılık eden enzim ve proteinleri kodlayan DNA segmentleridir. Aktarılan DNA, antibiyotik direnç genlerini, virulans faktörlerini kodlayabilir, direncin veya bakteriye avantaj sağlayan özelliklerin başka bakterilere yayılmasına sebep olabilir. Prokaryotlarda transformasyon, transdüksiyon ve konjugasyon olmak üzere üç yol ile hücreler gen alışverişi meydana gelir Mobil genetik elementlerin enfeksiyon hastalıklarında, antibiyotik direncinde, bakteriyel simbiyozda aldıkları rollerin önemi çalışmalar ilerledikçe daha iyi anlaşıldı (108,109).

Bakterilerde antibiyotik direncini kodlayan genlerin hareketlerine aracılık eden MGEs, plazmidler, transpozonlar, insersiyon sekansları, gen kasetleri, patojenite adaları ve integronlardır (109).

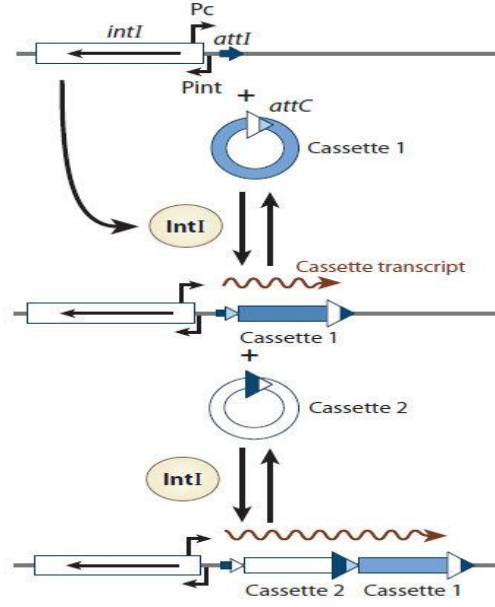
2.12.1. İntegronlar

Birden çok antibiyotiğe dirençli bakteri 1950’lerde ilk defa izole edilmesinden ancak 20 yıl sonra antibiyotik direncinin nakledilebilir bir yapıda olduğu keşfedildi (110). 1980’lere gelindiğinde çeşitli antibiyotik direnç genlerini kodlayan ve birçok bölgede lokalize olabilen yeni bir DNA elementi olan integronlar tanımlandı (111).

İntegronlar ekzojen genlerin yakalanmasını ve ifade edilmesini sağlayan genetik elementlerdir. Son yıllarda, antibiyotik direncinin yayılmasındaki rolleri ile iyice ön plana çıkmışlardır. Klinik örneklerle olan münasebeti ilk keşfedildiğinden bu yana integronların bakteriyel genomun ana unsurlarından olduğu tespit edilmiştir. İntegronlar

bütün çevrede bulunabilirler, türler arasında veya vertikal olarak nakledilebilir ve fonksiyonları tam olarak anlaşılamamış geniş bir gen havuzundaki genleri taşıyabilir (113).

Bütün integronlar, çalışma mekanizmasını sağlayan fonksiyonel bir kısımdan ve çeşitli gen kaset dizileri eklenebilen ve bu sayede sekonder etkilere sebep olan ikinci bir kısımdan oluşur.



Şekil 1. İntegron aracılı gen kaseti yakalanması ve çıkarılması modeli (113).

İntegronların fonksiyonlarındaki esas kısım site-spesifik tirozin rekombinazı kodlayan *intI* genidir. Bu enzim gen kasetleri olarak bilinen farklı genetik elementlerin kesilmesi ve integrona yerleştirilmesini sağlar (111). Gen kaseti perimer rekombinasyon bölgesi olarak bilinen ve *intI* geninin bitişiğinde bulunan *attI* spesifik bölgesine yerleştirilir (114). Kasetlerin büyük çoğunluğu promotordan mahrumdur. Taşıyan genlerin ekspresyonunu sağlayan *Pc* promotorları *intI* genine, *attI* bölgesine veya integrasyon noktası doğrultusunda yerleşmiştir. Fonksiyonel kısım sabit ve hareketsizdir (115,116).

attI bölgesine başarılı bir integrasyonda gen kasetleri bir çizgi doğrultusunda yan yana dizilir (117). Kaset dizisi integronun değişken kısmını teşkil eder. Gen kasetleri integrazlar sayesinde hareketli bir hal alan, integronun minimal fonksiyon gösteren kısmıdır. Genellikle tek bir açık okuma çerçevesinden (ORF) ve onu takip eden bölgeye yerleşmiş ve *IntI*'in spesifik olarak tanıdığı *attC* olarak isimlendirilen rekombinasyon bölgesinden oluşur. Gen kasetleri de çok yüksek oranlarda promotordan mahrumdur ve ekspresyonları ise eksternal promotora olan yakınlığına bağlıdır. Bu nedenle gen

kasetlerindeki ORF'ler sıklıkla *attC* bölgesi doğrultusunda yerleşmiştir. *IntI* tarafından kesilen gen kaseti kovalent olarak bağlanmış çembersel bir şekil aldığı için replikasyon özelliği yoktur (118).

2.12.2. İntegronların Farklı Tipleri

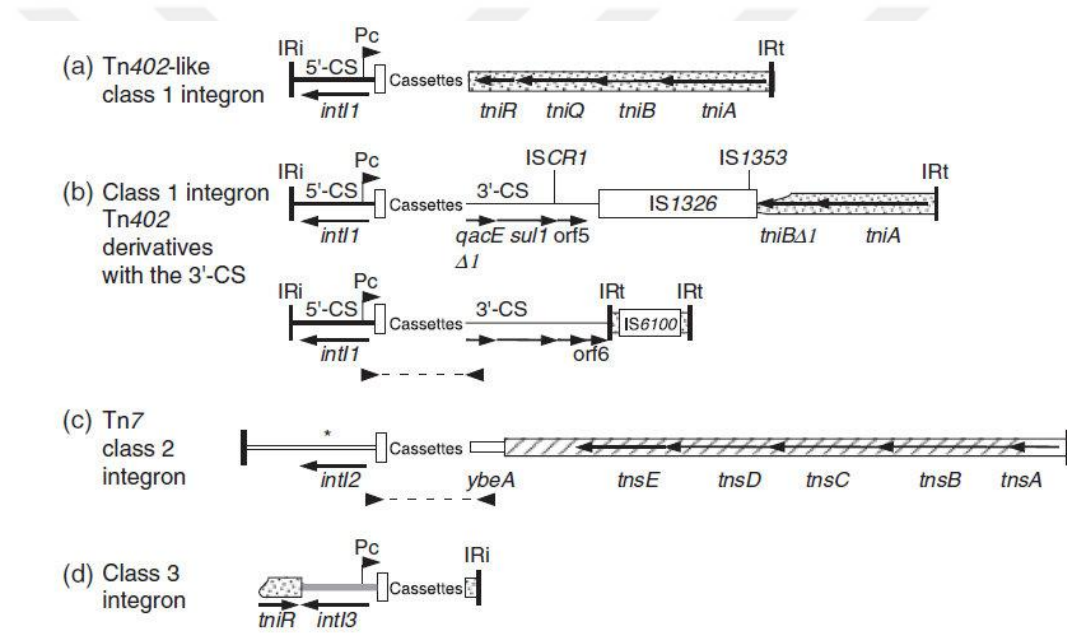
Mobil integronlar (Mİ) ve kromozomal integronlar (Kİ) yapı itibarıyla birbirlerine benzeseler de farklı karakteristik özellikler sergilerler. Genomik bilginin artmasıyla bu iki grup arasında bu iki grubun dışında ara formlar olduğu anlaşılmıştır.

2.12.3. Mobil İntegronlar (Mİs)

Mobil integronlar, konjugatif plazmidlerle taşınabilen hareketli DNA elementleriyle fiziksel olarak ilişkili olan fonksiyonel platformlardır. Bu elementler aynı veya farklı bakteri türleri arasında genetik bilginin nakledilmesini sağlayan doğal genetik araçlardır. Mobil integronlar, muhtemelen farklı kaynaklardan toplanmış bulunan yalnız birkaç kaset içerir. En uzun dizi 8 kasetten olmaktadır (119). Kasetlerdeki heterojenite, kodlanan ORF'lerdeki tutarsız kodon kullanımı ve *attC* bölgelerinin dizi ve dizi büyüklüğü ile sağlanır. Heterojen kaynaklardan çıkmasına rağmen Mİ ile ilişkili kasetler fonksiyonel olarak dikkat çekici homojenite gösterirler, büyük oranda antibiyotik direncinde rol oynarlar. Mobil integronlarda çeşitli antibiyotik direnç genleri içeren birbirinden farklı 130'dan fazla gen kaseti tiplendirilmiştir (kasetlerde %98 nükleotid benzerliği bulunur)(120). Bu gen kasetleri beta laktamlar, kinolonlar bütün aminoglikozitler, rifampin, eritromisin, kolaramfenikol, antiseptikler gibi birçok farklı ajana karşı dirence sebep olurlar (121).

Kodlanan integrazların sekansına dayanılarak bugüne kadar beş sınıf integron tarif edilmiştir. İlk üçü tarihi olarak çoklu ilaç direncinin yayılmasında rol oynamıştır fakat beş sınıf da antibiyotik direnci ile ilişkilidir (121). Sınıf 1 klinikte en sık rastlanan ve klinik olarak önemli sınıftır. Gram negatif ve gram pozitif bakterilerde bulunur (122). Bu sebeple deneysel integron modelini oluştururlar. Mobil integronlar *Tn402*'den köken alan veya *Tn21* gibi daha büyük transpozonlarda gömülü olarak bulunabilen fonksiyonel ve nonfonksiyonel transpozonlarla ilişkilidir. Sınıf 2 özellikle *Tn7* deriveleriyle ilişkilidir ve bir düzine farklı kaset içerebilir (123). Sınıf 3 integronlar da bir transpozonda lokalize olduğu düşünülür ve prevalansı sınıf 2'den daha azdır (124). Diğer iki sınıf ise *Vibrio* türlerinde trimetoprim direncinin gelimesindeki rolleri ile tiplendirildiler. Sınıf 4 integron, integratif ve konjugatif SXT elementinin alt birimine

gömülü olarak *V. cholera*'da bulunmuştur (125). Sınıf 5 integron ise *Alivibrio salmonicida*'nın *pRSV1* plazmidi üzerinde taşınan birleşik bir transpozonda lokalizedir (126). Antibiyotik direnciyle ilişkili olmayan sınıf 1 ve sınıf 3 integronlar ise çevresel bakterilerden izole edilmiştir (127,128). Fakat integronların taşıdığı kasetlerin fonksiyonları anlaşılamamıştır. Fonksiyonel bir integras kodlayan sınıf 2 integron iki örnekte izole edilmiştir (129). Birincisinde dört adet nonantibiyotik direnç gen kasetleriyle ilişkili bulunmuştur (130). Bu veri, mobil integronların antibiyotik direncine spesifik olmadığını, daha önemli olarak bakterinin adaptasyonuna aracılık ettiğini göstermektedir. Direnç fonksiyonlarının prevalansı muhtemelen klinikle ilişkili çevreye odaklandığı için yanlış yapılan örneklemelerin bir neticesidir.



Şekil 2. Sınıf 1, sınıf 2 ve sınıf 3 integronların yapısı (131).

2.12.4. Kromozomal İntegronlar (CIs)

Bindokuzyüzdoksanların sonlarında, mobil integronların gen kaset dizileri ile *Vibrio cholerae* genomunda tekrarlayan DNA sekans kümeleri arasındaki ilişki incelenirken *V. cholerae* serotype O1 biotype El Tor N16961 genomunda, ikinci kromozom üzerinde farklı türde bir integron keşfedildi (121). Bu integron, mobil integronlarla ilişkili olan ve spesifik integras aktivitesi bulunan bir integrasa sahipti ve hareketli görünmüyordu. Aslında kromozomda lokalize idi ve mobil elementlerle ilişkili değildi (132).

Kromozomal integronlar bakteri türlerinde geniş bir dağılım gösterir. Yapılan bir çalışmada kısmen veya tamamen sekanslanmış 603 genomun karşılaştırmalı analizi genomların %9'unun bir integron integrazı taşıdığını göstermiştir. Bu filogenetik ilişkili integrazlardan yola çıkarak üç farklı major grup oluşturulur: a-toprak ve su protobakteri grubu integronları, b-deniz γ -proteobakteri grubu, c-ters integraz grubu, *attC* bölgesinin integrazın 3' bitiş noktasında bulunması. İlk iki grup ekolojik olarak ilişkilidir. Fakat üçüncüsü garip bir şekilde yapı olarak ilk ikisine korelasyon gösterse de farklı organizmaları yeniden gruplandırmaktadır (133).

Kromozomal integronların dağılımı birkaç şubenin oluşmasına sebep olmuştur ve integrazların dallanma paternleri organizma ile filogenetik olarak yakından ilişkilidir. Bu da integronların çok eski ve stabil bir yapıya sahip olduğunu gösterir (121,134). Kromozomal integronlar birkaç filogenetik uyumsuzluğa rağmen konak genomunun yerleşik sakinleridir (121). Kromozomal integronların kaset dizileri çok fazla sayıda kaset içerebilir (*V. vulnificus*'un 217 kaset taşıması gibi). Bunun aksine bazıları hiç kaset taşımazlar, bazıları birkaç tane taşırlar. Kromozomal integronlar arasında spesifik özelliklerine dayanılarak superintegronlar olarak tarif edilen bir alt grup vardır. Büyük kaset dizilerine (>20) sahiptirler ve *attC* bölgeleri yüksek benzerlik gösterir (>%80). *Vibrio* türlerinde bulunan birçok integron, superintegrondur. Homolog *attC* bölgeleri esasen türlere spesifiktir ve genetik olarak uyumlu bir tipoloji tarif ederler (135).

Kromozomal integronlar ile kıyaslandığında mobil integronların integrazları birlikte gruplandırılmazlar, dallanan bir şema olarak gösterilebilirler(135). *Int1* ve *Int3* birbiriyle yakından ilişkilidirler ve toprak-su protobakteriler grubuna aittirler. *Int2* ve *Vibrio* türlerinde raporlanan iki mobil integronun integrazları deniz protobakteriler grubunda birçok noktaya dallanırlar (121).

Sınıf 1 integronların hareketleri ve yayılma süreçleri iyice anlaşılmıştır (136). Aslında direnç kasetlerinden mahrum sınıf 1 integronlar çevresel bakteriler olan *Azoarcus communis* MUL2G9 ve *Acidovorax* sp. MUL2G8A kromozomlarında raporlanmıştı (136). Bu integronlar mobil elementlerle ilişkisizdi ve hareketli sınıf 1 integronların atası olarak kabul edildi. İki akraba ters tekrarlarla ilişkili tranpozisyon genlerinin eklenmesi vasıtasıyla kromozomal integronlar fonksiyonel transpozonun içine gömülür. Bu yapı daha sonra atasal *Tn402*'ye kaynaklık eden *qacE* (kuarterner amonyum bileşiklerine direnç) kasetini yakalar. Ardından *qacE*'nin 5' ucundaki delesyon ve ilişkili *attC* bölgesi sayesinde alışılmadık bir mekanizmanın neticesinde

sulI (sülfonamid direnç geni) kazanır. Bu major direnç genlerinin kazanılması muhtemelen *Tn402* derivelerinin yayılmasını arttırmaktadır. Bu mobil integron potansiyel direnç genlerini içeren geniş bir kaset repertuvarına erişim sağlar (137,138).

2.12.5. Stafilokokkal Kaset Kromozomu (SCCmec)

Stafilokokkal kaset kromozomu metisilin direncine yol açan *mec* genini taşıyan benzersiz bir mobil genetik elementtir. *mecA* geninin yanında iki tane bölgeye spesifik rekombinaz genlerini taşır: rekombinaz A ve B (*ccrA* and *ccrB*) ve bu iki rekombinaz geninin sonları aynı nükleotid sekansı ile sonlanır (147). Stafilokokkal kaset kromozomu *ccrA* ve *ccrB* genlerinin fonksiyonları neticesinde hücreden kesilir ve kromozomun spesifik bölgesine yerleştirilir (148).

Tablo 3. Kromozomal integron taşıyan bazı bakteriyel türlerden örnekler ve alakalı gen kasetlerin yapısal özellikleri (149)

Bacterial group	Bacterial strain	Number of gene cassettes	Typical length of <i>attC</i>
<i>γ</i>-proteobacteria			
Vibrionaceae	<i>Vibrio vulnificus</i> CMCP6	217	126–129
	<i>Vibrio cholerae</i> N16961	179	126–129
	<i>Vibrio</i> sp. DAT722	116	126–128
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> RIMD2210633	69	125–128
	<i>Vibrio alginolyticus</i> 12G1	51	126–129
	<i>Vibrio fischeri</i> ES114	38	125–127
	<i>Vibrio splendidus</i> LGP32	25	126–129
Pseudoalteromonas	<i>Pseudoalteromonas tunicata</i> D2	7	78–129
	<i>Pseudoalteromonas baloplanktis</i> TAC125	5	98–102
Xanthomonadaceae	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> ATCC 33913	22	60
	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	3	79–94
Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas stutzeri</i> Q	>7	76–77
	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	32	76–90
Shewanellaceae	<i>Shewanella</i> sp. MR-7	2	90–92
	<i>Shewanella denitrificans</i> OS217	0	NA
Alteromonadaceae	<i>Saccharophagus degradans</i> 2–40	73	111–140
<i>β</i>-proteobacteria			
	<i>Nitrosomonas europaea</i> ATCC19718	0	NA
	<i>Nitrosomonas eutropha</i> C71	3	60–120
	<i>Azoarcus</i> sp. EbN1	3	59–73
	<i>Rubricoccus gelatinosus</i> PM1	2	70–126
<i>δ</i>-proteobacteria			
	<i>Geobacter metallireducens</i> GS-15	3	59–63
Planctomycetes	<i>Rhodopirillum rubrum</i> SH1	0	NA
Spirochaetales	<i>Treponema denticola</i> ATCC35405	45	63–68

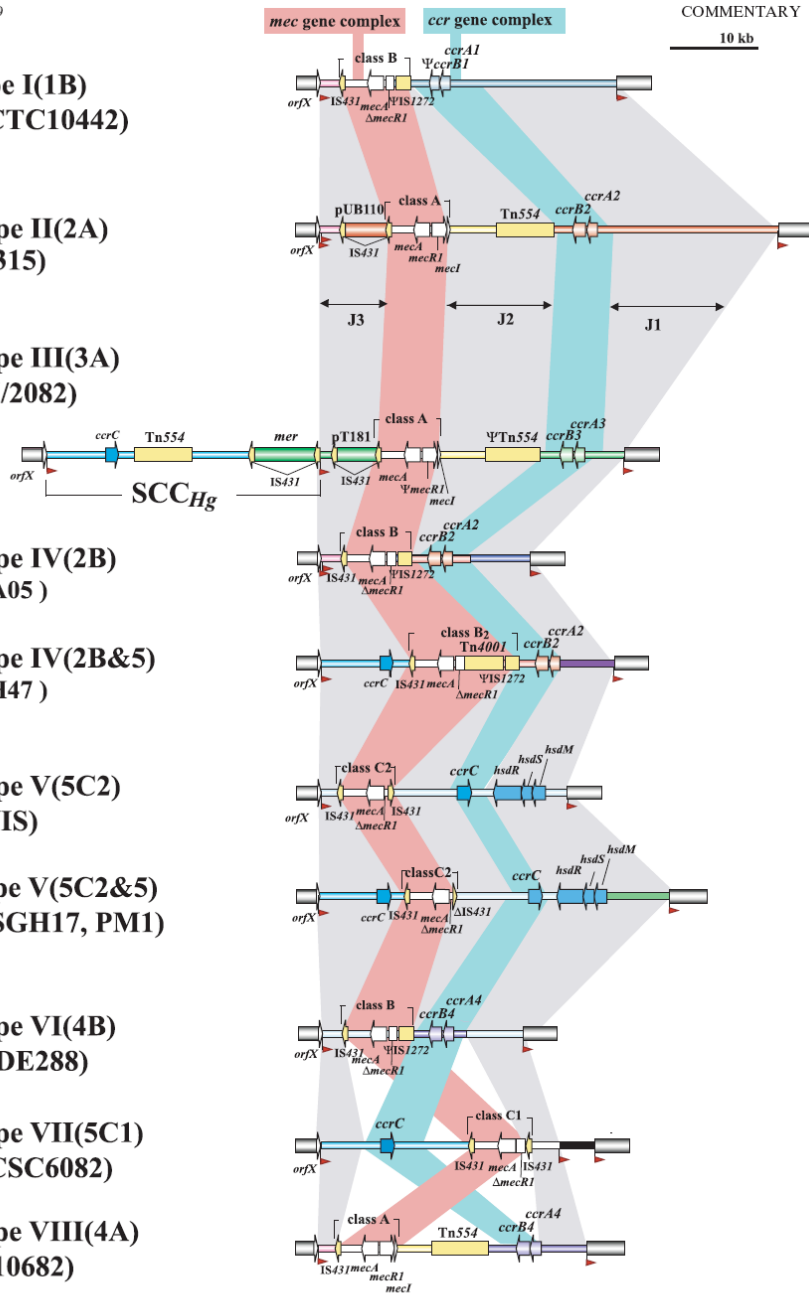
İlk tespit edildiğinden bu yana, yapısal olarak farklı çok sayıda SCCmec elementi bulundu. Stafilokokkal kaset kromozomu *S. aureus*'ta iki temel yapının kombinasyonlarına göre, *mec* gen kompleksi ve *ccr* gen kompleksi olarak sınıflanırlar Bugüne kadar 11 sınıf SCCmec tespit edilmiştir (150).

Stafilokokkal kaset kromozomu *mec* gen kompleksi, *mecA*'nın aşağısında yerleşmiş bulunan *IS431mec* ve *mec* geni ile bağlantılıdır. Yapısında *mec* geninin düzenlenmesini sağlayan proteinleri kodlayan *mecR* ve *mecI* olmak üzere iki gen bulunur. 40 bp'dan oluşan ve çok değişken bölge olarak isimlendirilen direkt tekrar üniteleri haricinde *IS431* ve *mecA* arası bölge yüksek derecede homoloji gösterir (151). *IS 431mec-mecA-mecR1-mecI* genleri arasındaki bağlantı ilk olarak İsviçre'de rapor edildi ve A sınıfı *mec* kompleksi ismiyle bir prototip olarak kabul edildi (152). *mecR1* geni başka bir insersiyon sekansı tarafından kesildiğinde farklı bir *mec* kompleksi meydana geldiği görüldü: Sınıf B, *IS 431mec - mecA -Δ mecR1 -IS 1272*; Sınıf C1, *IS 431mec - mecA -Δ mecR1 -IS 431* (iki tane *IS 431*, aynı yönde düzenleme); ve sınıf C2, *IS 431mec -mecA -Δ mecR1 -IS 431* (iki tane *IS* zıt yönde düzenleme)(152).

Yakın zamanda *mecA*'nın homologu olan *mecC* tespit edildi. *mecR1* ve *mecI* homologları *mecC* geninin yukarısında yerleşmişti ve *bla-mecC-mecR1* homologu-*mecI* homologu arasındaki bağlantı E sınıfı *mec* kompleksi olarak isimlendirildi (153). *ccr* gen kompleksi, ortasında *ccr* genleri bulunan ve 2 ila 8 ORF'den oluşmuş bir platformdur. Bugüne kadar üç çeşit *ccr* gen bulunmuştur: *ccrA* , *ccrB* ve *ccrC*. Stafilokok türleri arasındaki yaygın *mec* genlerinin yüksek benzerliğinin aksine *ccr* genleri çok farklılık gösterir (154).

Tüm bunlara ek olarak *mec* ve *ccr* bölgeleri dışında J-bölgeleri olarak isimlendirilen ve *J1*, *J2*, *J3* olarak sınıflandırılan bir bölge vardır. Her bir SCCmec'e spesifik çok farklı yapıda *J* bölgeleri rapor edildi. *J* bölgesindeki yapısal farklılığa göre SCCmec elementi alt tiplere ayrılmıştır (155).

Hastane kaynaklı MRSA enfeksiyonlarında genellikle SCCmec 1-2 ve 3 bulunurken, toplum kökenli MRSA enfeksiyonlarında genellikle SCCmec 4 veya SCCmec 5 bulunmuştur (156).



33

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hasta grubu

Mart 2016- art 2017 yılları arasında Turgut Özal Tıp Merkezi, Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarına çeşitli servis ve polikliniklerden gelen numunelerden izole edilen enfeksiyon etkeni 138 tane *S. aureus* izolatu çalışmaya dahil edildi. Suşların 54 tanesi metisiline dirençli, 84 tanesi metisiline duyarlıydı.

3.2. *Staphylococcus aureus* Suşlarının Tanımlanması

Laboratuvarımıza gelen hasta numunelerinden besiyerinde üreyen kolonilerden stafilocok morfolojisi ile uyumlu olanlara gram boyama yapılmıştır. Gram boyamasında Gram (+) kümeler oluşturan koklardan, katalaz testinde pozitif olan izolatlar ileri tanımla işlemlerine alınmıştır.

3.2.1 Otomatize Bakteriyel Tanımlama Sistemi

Yukarıda belirtilen işlemler neticesinde stafilocok şüphesi bulunan koloniler için Microscan Walkaway PC42 gram pozitif bakteri identifikasyon ve antibiyogram kiti kullanıldı. *Staphylococcus aureus* olarak tiplendirilen koloniler %25 gliserol bulunan milk brothta -80 C° derecede stoklandı.

3.2.3. *Staphylococcus aureus* İzolatlarında Antibiyotik Dirençlerinin Tespiti

Değerlendirmeye alınan izolatlara MicroScan Walkaway 96 PC42 kitiyle ampisilin, amikasin, oksasilin, penisilin, gentamisin, tetrasiklin, ciprofloksasin, trimetoprim-sulfametaksazol, vankomisin ve teikoplanin antibiyotiklerine direnç araştırıldı. Yönerem kısaca aşağıdaki basamaklarda gerçekleştirildi.

- Bir gün önce stoklandığı besiyerinden %5'lik koyun kanlı agarı pasajlanan izolatlardan besiyerinde saf üreyen kolonileri alındı.
- Firmanın talimatları doğrultusunda inokulum hazırlandı ve kit içindeki kuyucuklara eklendi ve bir gün inkübasyondan sonra kitteki sonuçlar EUCAST'e göre değerlendirildi.

3.3. *Staphylococcus aureus*'ta Metisilin Direnci Tespitinde Disk Difüzyon Yöntemi

Staphylococcus aureus 'ta metisilin direnci CLSI M2-A9 talimatları çerçevesinde araştırıldı. Çalışma yapılırken Mueller Hinton Agar (MHA) ve 30 µg sefoksitin diski kullanıldı.

- +4 C° de buzdolabında saklanan disklerin oda sıcaklığına ulaşması beklenildi.
- %5'lik koyun kanlı agarda üreyen koloniler %0.9 NaCl ile 0.5 McFarland bulanıklık derecesinde olacak şekilde süspanse edildi.
- Süspansiyon MHA'a steril eküvyon çubuğu ile inoküle edildi.
- Birkaç dakika sonra bir pens yardımıyla sefoksitin diski yüzeye tamamen temas edecek şekilde yerleştirildi.
- 10 dakika içinde plaklar etüvlere konuldu. 35+/-2 derecede 24 saat inkübasyondan sonra zon çapları CLSI M100-S21'e göre değerlendirildi. *Staphylococcus aureus* için zon çapı ≥ 22 mm duyarlı, $22 >$ mm ise dirençli olarak kabul edildi.

3.4. Metisilin Direnç Genlerinin Tespit Edilmesi

3.4.1. *Staphylococcus aureus* İzolatlarından DNA Ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu yapılacak izolatlar bir gün öncesinden stoklandığı besiyerinden alınıp kanlı agar besiyerine pasajlandı. Saf üreyen *S. aureus* kolonilerinden Qiagen QIASymphony Pathogen Midi Kit (İzolasyon kiti) kullanılarak üretici firmanın talimatları çerçevesinde DNA ekstraksiyonu yapıldı.

3.4.2. *MecA* gen Bölgelerinin Çoğaltılması

Metisiline dirençli bulunan *S. aureus* izolatlarında, bakteri cinsine özgü 16S rRNA, metisilin direncine sebep olan *mecA* ve bakteri türüne özgü *nuc* gen bölgeleri PCR ile çoğaltıldı (158). Kullanılan primerler ve çoğaltılan ampikonların büyüklüğü tabloda verilmiştir.

Tablo 4. *MecA* gen bölgesini çoğaltan primerler ve çoğaltılan ampikonun büyüklüğü.

Primer Adı	Primer Dizisi 5'→3'	Ampikonun Büyüklüğü Baz Çifti (bp)
MecA-1	AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C	533
MecA-2	AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C	

PCR reaksiyonu için hazırlanan master mix tablo'tadır. Pozitif kontrol olarak standart *S. aureus* ATCC 43300 suşu, negatif kontrol olarak kalıp DNA yerine steril su kullanıldı.

Tablo 5. *MecA* tespiti için kullanılan PCR karışımı.

Komponent	Miktar (µl)
10X PCR Tamponu	2.5
25mM MgCl ₂	3
10 mM dNTP Karışımı	0.5
Taq DNA polimeraz (5U)	0.5
Distile su	13
Kalıp DNA	1
Primerler	
MecA 1 (10 pmol/ µl)	1.25
MecA 2(10pmol/ µl)	1.25
Toplam Hacim	25 µl

Hazırlanan karışım Qiagen Rotor Gene cihazına yüklendi ve amplifikasyon için şu şema takip edildi :

94 °C	4 dk (ön denatürasyon)	
94 °C	30 sn (DNA denatürasyonu)	} 35 siklus
55 °C	30 sn (primerlerin bağlanması)	
72 °C	1 dk (primer uzaması)	
72 °C	10 dk (son uzama)	

Reaksiyon neticesinde çoğalan DNA'ların görüntülenebilmesi için %1,5'lik agaroz içeren 1x TBE ile agaroz jel hazırlandı. Mikro dalga fırın ile agarın erimesi sağlandı, belli bir miktar soğuduktan sonra içine 5 µg/ml etidyum bromür çözeltisinden 20 µl eklendi ve jel kalıbına dökülerek tamamen soğumaya bırakıldı. İlk kuyucuğa Promega 100 bp DNA ladder koyuldu. Geri kalan kuyucuklara 10 ml PCR ampliconu+2 ml 6x jel yükleme tamponu sırayla konuldu. 120 V altında 75 dakika uygulanan elektrik akımı ile ampliconlar yürütüldü ve bantlar birbirinden ayıştırıldı. Bio Rad Gel Doc XR cihazında UV ışık altında bantlar görüntülendi ve Gel logic 2200 imaging system (Kodak Company, NY, USA) cihazı ile jel görüntüleri alındı.

3.4.3. *Staphylococcus aureus*'ta *mecC* Geninin Çoğaltılması

Metisilin direncine nadiren sebep olabilen *mecC* geninin çoğaltılmasında *mecC* genine özgü primerler kullanıldı ve PCR hazırlığı için aşağıdaki şema kullanıldı (159). Reaksiyonda pozitif kontrol olarak Suşu, negatif kontrol olarak kalıp DNA yerine steril su kullanılmıştır.

Tablo 6. *MecC* gen bölgesini çoğaltan primerler ve çoğaltılan ampliconun büyüklüğü.

Primer Adı	Primer Dizisi 5'→3'	Ampliconun Büyüklüğü Baz Çifti (bp)
mecC F	GAAAAAAGGCTTAGAACGCCTC	138
mecC R	GAAGATCTTTTCCGTTTTCAGC	

Tablo 7. *MecC* tespiti için kullanılan PCR karışımı.

Komponent	Miktar (µl)
5x Master mix	12.5
Coral Load	2.5
Primer 1(10 pmol/ µl)	0.5
Primer 2 (10 pmol/ µl)	0.5
DNA	2
H2O	7
Toplam Hacim	25 µl

Hazırlanan karışım Qiagen Rotor Gene cihazına yüklendi ve amplifikasyon için şu şema takip edildi :

94 °C	4 dk (ön denatürasyon)	} 35 siklus
94 °C	30 sn (DNA denatürasyonu)	
55 °C	30 sn (primerlerin bağlanması)	
72 °C	1 dk (primer uzaması)	
72 °C	10 dk (son uzama)	

Reaksiyon neticesinde çoğalan DNA'ların görüntülenebilmesi için %1,5'lik agaroz içeren 1x TBE ile agaroz jel hazırlandı. Mikro dalga fırın ile agarın erimesi sağlandı, belli bir miktar soğuduktan sonra içine 5 µg/ml etidyum bromür çözeltisinden 20 µl eklendi ve jel kalıbına dökülerek tamamen soğumaya bırakıldı. İlk kuyucuğa Promega 100 bp DNA ladder koyuldu. Geri kalan kuyucuklara 10 ml PCR ampliconu+2 ml 6x jel yükleme tamponu sırayla konuldu. 120 V altında 75 dakika uygulanan elektrik akımı ile ampliconlar yürütüldü ve bantlar birbirinden ayıştırıldı. Bio Rad Gel Doc XR cihazında UV ışık altında bantlar görüntülendi ve Gel logic 2200 imaging system (Kodak Company, NY, USA) cihazı ile jel görüntüleri alındı.

3.5. *Staphylococcus aureus*'ta Sınıf 1, Sınıf 2 ve Sınıf 3 İntegron Tespiti

Staphylococcus aureus'ta sınıf 1, sınıf 2 ve sınıf 3 integron varlığının araştırılmasında araştırılan integron sınıfına özgü primerler kullanıldı ve monopleks PCR yöntemiyle her integron sınıfı teker teker araştırıldı (160).

Tablo 8. Sınıf 1,2,3 integronları çoğaltan primerler ve çoğaltılan ampliconların büyüklüğü.

Primer Adı	Primer Dizisi 5'→3'	Ampliconun Büyüklüğü Baz Çifti (bp)
intI-1F	CCT CCC GCA CGA TGA TC	280
intI-1R	TCC ACG CAT CGT CAG GC	
intI-2 F	GTA GCA AAC GAG TGA CGA AAT G	788
intI-2 R	CAC GGA TAT GCG ACA AAA AGG T	
intI-3 F	GCC TCC GGC AGC GAC TTT CAG	979
intI-3 R	ACG GAT CTG CCA AAC CTG ACT	

PCR ile integron varlığının araştırılmasında hazırlanan master mix tablosu aşağıdadır. Reaksiyonda pozitif kontrol olarak Suşu, negatif kontrol olarak kalıp DNA yerine steril su kullanılmıştır.

Tablo 9. Herbir integronun tespiti için kullanılan PCR karışımı.

Komponent	Miktar (µl)
5x Master mix	12.5
Coral Load	2.5
Primer 1(10 pmol/ µl)	0.5
Primer 2 (10 pmol/ µl)	0.5
DNA	2
H2O	7
Toplam Hacim	25 µl

Hazırlanan karışım Qiagen Rotor Gene cihazına yüklendi ve amplifikasyon için aşağıdaki şema takip edildi :

94 °C	4 dk (ön denatürasyon)	} 35 siklus
94 °C	30 sn (DNA denatürasyonu)	
55 °C	30 sn (primerlerin bağlanması)	
72 °C	1 dk (primer uzaması)	
72 °C	10 dk (son uzama)	

Reaksiyon neticesinde çoğalan DNA'ların görüntülenebilmesi için %1,5'lik agaroz içeren 1x TBE ile agaroz jel hazırlandı. Mikro dalga fırın ile agarın erimesi sağlandı, belli bir miktar soğuduktan sonra içine 5 µg/ml etidyum bromür çözeltisinden 20 µl eklendi ve jel kalıbına dökülerek tamamen soğumaya bırakıldı. İlk kuyucuğa Promega 100 bp DNA ladder koyuldu. Geri kalan kuyucuklara 10 ml PCR amplikonu+2 ml 6x jel yükleme tamponu sırayla konuldu. 120 V altında 75 dakika uygulanan elektrik akımı ile amplikonlar yürütüldü ve bantlar birbirinden ayıştırıldı. Bio Rad Gel Doc XR cihazında UV ışık altında bantlar görüntülendi ve Gel logic 2200 imaging system (Kodak Company, NY, USA) cihazı ile jel görüntüleri alındı.

3.6. Tespit Edilen İntegronların Dizi Analizi ile Doğrulanması

3.6.1. Jelden DNA Ekstraksiyonu

Jelden DNA ekstraksiyonu için Qiaquick Jel Au-kut kiti kullanıldı. İşlemler firmanın talimatları çerçevesinde yapıldı.

1-İntegron pozitif bulunan örnekler jelde yürütüldü ve UV ışık altında bantlar dikkatlice kesilip çıkarıldı, 1.5 ml'lik ependorf tüplere yerleştirildi.

2- Tüplere kesilen jel hacminin 3 katı kadar (300 mikrolitre) QG buffer eklendi.

3-Arada vortekslenmek şartı ile 50 ° C'lik ısı bloğunda 10 dakika bekletildi.

4-Jel tamamen eridiğinde tüpe 1 jel hacmi (100 mikrolitre) kadar isopropanol eklendi ve karıştırıldı.

5-2 ml'lik toplama tüpüne spin column yerleştirilerek içine eriyen jel karışımı ilave edildi ve 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

6-Column üzerine 500 mikrolitre QG buffer eklendi ve 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpüne geçen sıvı boşaltıldı.

7-Yıkama için column üzerine 750 mikrolitre PE buffer eklendi ve 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpüne geçen sıvı boşaltıldı.

8-Tekrar 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

9-Column tepiz bir tüpe yerleştirildikten sonra içine 50 mikrolitre EB ilave edildi ve 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.

3.6.2. Dizi Analizi Tepkimesi

Dizi analizi tepkimesi için aşağıdaki tablo takip edilmiştir.

Tablo 10. Sekans analizi için PCR karışımı.

Komponent	Miktar (µl)
5x Cycle Sequencing Buffer (AB)	3
BigDye	2
Primer (10 pmol/ µl)	0.32
H2O	12.68
DNA	2
Toplam Hacim	20 µl

Bu şekilde hazırlanan karışım Qiagen Rotor Gene cihazına yüklendi ve amplifikasyon için şu şema takip edildi :

95 °C	5 sn (denatürasyon)	} 60 siklus
50 °C	20 sn (bağlanma)	
60 °C	4 dk (primer uzaması)	

BigDye Presipitasyon

BigDye presipitasyon yapmak için tablodaki stok solüsyonları uygun miktarlarda kullanıldı.

A	Sodyum asetat pH 4.6 Na-EDTA Glikojen Su	3000 mM 100 mM 20 mg/ml
B	Sekans karışımı	
C	Etanol (-20 °C)	%99

1-B, buz üzerinde 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alındı.

2-B'nin üzerine 12.39 µl A'dan ilave edildi.

3-Daha sonra mikrosantrifüj tüpüne soğuk etanol eklenir eklenmez >18 k x g ivmesi ile 45 dakika santrifüj edildi, ardından süpernatant uzaklaştırıldı.

4-İki defa 200 µl %70 etanol (-20 °C) ile yıkama yapıldı, süpernatant uzaklaştırıldı.

5-Pellet kurutuldu.

6-Pellet 40 µl deiyonize formamid ile çözülür.

7-Çöktürülen ve kapiller jel elektroforezine hazır hale getirilen DNA, dizi analizi için cihaza yüklenmeden hemen önce 95 °C’de 5 dakika bekletilerek denatürasyon sağlandı.

3.7. Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus*’ta SCCmec Tiplendirilmesi

MRSA’larda SCCmec tiplendirilmesi için SCCmec tipine özgü primerler kullanıldı. *S. aureus*’larda sıklıkla bulunan ilk dört tip araştırıldı. Her tip tayini için monopleks PCR yöntemi kullanıldı. Kullanılan primerler ve hazırlanan reaksiyon karışımı aşağıdadır (161).

Tablo 11. SCCmec tiplendirilmesi için kullanılan primerler ve çoğaltılan ampikonların büyüklüğü.

Primer Adı	Primer Dizisi 5’→3’	Ampikonun Büyüklüğü Baz Çifti (bp)
SCCmec Tip 1 F	GCT TTA AAG AGT GTC GTT ACA GG	
SCCmec Tip 1 R	GTT CTC TCA TAG TAT GAC GTC C	
SCCmec Tip 2 F	CGT TGA AGA TGA TGA AGC G	
SCCmec Tip 2 R	CGA AAT CAA TGG TTA ATG GAC C	
SCCmec Tip 3 F	CCA TAT TGT GTA CGA TGC G	
SCCmec Tip 3 R	CCT TAG TTG TCG TAA CAG ATC G	
SCCmec Tip 4 F	CTC AAA ATA CGG ACC CCA ATA CA	
SCCmec Tip 4 R	TGC TCC AGT AAT TGC TAA AG	

Tablo 12. SCCmec tiplendirilmesi için kullanılan PCR karışımı.

Komponent	Miktar (µl)
5x Master mix	12.5
Coral Load	2.5
Primer 1(10 pmol/ µl)	1
Primer 2 (10 pmol/ µl)	1
DNA	2
H ₂ O	6
Toplam Hacim	25 µl

Hazırlanan karışım Qiagen Rotor Gene cihazına yüklendi ve amplifikasyon için şu şema takip edildi :

94 °C	4 dk (ön denatürasyon)	
94 °C	30 sn (DNA denatürasyonu)	} 35 siklus
55 °C	30 sn (primerlerin bağlanması)	
72 °C	1 dk (primer uzaması)	
72 °C	10 dk (son uzama)	

Reaksiyon neticesinde çoğalan DNA'ların görüntülenebilmesi için %1,5'lik agaroz içeren 1x TBE ile agaroz jel hazırlandı. Mikro dalga fırın ile agarın erimesi sağlandı, belli bir miktar soğuduktan sonra içine 5 µg/ml etidyum bromür çözeltisinden 20 µl eklendi ve jel kalıbına dökülerek tamamen soğumaya bırakıldı. İlk kuyucuğa Promega 100 bp DNA ladder koyuldu. Geri kalan kuyucuklara 10 ml PCR amplikonu+2 ml 6x jel yükleme tamponu sırayla konuldu. 120 V altında 75 dakika uygulanan elektrik akımı ile amplikonlar yürütüldü ve bantlar birbirinden ayıştırıldı. Bio Rad Gel Doc XR cihazında UV ışık altında bantlar görüntüledi, Gel logic 2200 imaging system (Kodak Company, NY, USA) cihazı ile jel görüntüleri alındı.

3.8. Pulse Field Gel Elektroforez (PFGE) İle İzolatlar arası Klonal İlişkinin Araştırılması

PFGE, Bannerman ve ark.'nın önerdiği protokol takip edilerek yapıldı.

Kullanılan karışımlar ve tamponlar:

Lizis Tamponu: 3 ml 6mM Tris-HCl, 100 ml 1M NaCl, 100 ml 100mM EDTA, 2.5 g % 0.5 Brij 58, 1 gr % 0.2 deoksikolat, 2.5g % 0.5 N-Lauroyl sarcosine pH 7.6 olacak şekilde hazırlandı. Hacim, su ile 500 ml'ye tamamlandı. Steril edildikten sonra +4 °C'de saklandı.

TE Buffer (pH 8.0): 2.5ml hacimde 10mM Tris, 0.25 ml hacimde 1mM EDTA (pH 8.0),

NET Tamponu: 10 mM NaCl + 1 mM EDTA +10 mM Tris. Oda sıcaklığında saklandı. 247.25 ml su ile karıştırılarak pH 8.0'e ayarlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

Restriksiyon Enzimi Karışımı: Kullanmadan hemen önce her izolat için 87 µl deiyonize su, 10 µl 10X reaksiyon tamponu, 3 µl (10 U/ µl) SmaI restriksiyon enzimi eklenerek restriksiyon enzim karışımı hazırlandı.

3.8.1. İzolatların Hazırlanması

Mikrobiyal tanımlaması yapılan bakteriler KKA besiyerine tek koloni ekim yapıldı. Saf olarak üreyen kolonilerden bir öze dolusu alınıp içine 250µl NET tamponu eklenmiş 1.5 ml'lik tüplerde süspanse edildi.

3.8.2. İzolatların Agaroza Gömülmesi

0.1 g düşük erime ısıları agaroz içinde 5 ml TE tamponu bulunan 20ml cam balona konuldu. Agarozun dağılması için yavaşça karıştırıldı. Balonun ağzı alüminyum folyo ile kapatılarak agaroz tamamen çözününceye kadar mikrodalga fırında bekletildi. Daha sonra kullanılıncaya kadar 50 °C'lik su banyosunda bekletildi. Bakteri süspansiyonu bulunan tüplere 20 µl akromopeptidaz ve 250 µl düşük erime ısıları agaroz eklendi ve yavaşça karıştırıldı. Her suş için iki kalıp olacak şekilde son karışım kalıplara döküldü. Agaroz katılaşıncaya kadar 10-15 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

3.8.3. Agaroz İçindeki Hücrelerin Parçalanması ve Yıkınması

Her izolat için hazırlanmış iki kalıp içine önceden 50° C'ye ısıtılmış 2 ml lizis tamponu bulunan steril cam tüpe aktarıldı. 50° C'de 1 saat bekletildi. Daha sonra lizis tamponu bir pipet vasıtasıyla uzaklaştırıldı. Cam tüplere her defasında 2 ml TE tamponu konuldu ve 10 dakika beklendikten sonra tampon uzaklaştırıldı. Bu işlem 3 defa tekrarlanarak yıkama işlemi tamamlandı.

3.8.4. Agaroz Bloktaki DNA'nın Kesilmesi

Hazırlanmış DNA kalıpları uygun büyüklükte kesilerek içinde restriksiyon karışımı olan tüpe konuldu. Restriksiyon karışımı her tüp için şöyledir:

10x tampon → 10 µl

smal → 3 µl (100U/ µl'lik stoktan hazırlandı)

Su → 87 µl

İçinde agaroz blok bulunan tüpler 30°C'de 3 saat boyunca su banyosunda bekletildi. Geri kalan agaroz kalıplar 1 ml TE tampon içine konuldu ve 4°C'de saklandı.

3.8.5. Elektroforez Jelinin Hazırlanması ve Kalıpların Jele Yüklmesi

0.5x TBE (44,5 mM Trisma base, 44,5 mM Borik asit, 1 mM EDTA, pH 8,0) içinde 100 ml olacak şekilde %1' lik agaroz (pulsed-field certified agarose, Bio-Rad Laboratories) 200 ml'lik cam balon içinde hazırlandı ve balonun ağzı alüminyum folyo ile kapatıldıktan sonra agarozun mikrodalga fırın içinde iyice çözünmesi sağlandı. Balon mikrodalga fırınından çıkarılarak 45-50 °C'lik su banyosuna konuldu. Agarozun döküleceği kaset hazırlandı ve enzim ile kesilmiş agaroz kalıbı tarağın uç kısmına (uçlara paralel olacak şekilde) yerleştirildi. Su banyosundan çıkarılan agaroz dikkatli bir

şekilde kaset içine döküldü. Oda ısısında katılaştıktan sonra taraklar dikkatli bir şekilde çıkarıldı ve jel içine 1900-2000 ml TBE tamponu konulan PFGE tankına yerleştirildi.

3.8.6. Elektroforez

Hazırlanan jel cihaza yerleştirildikten sonra aşağıdaki protokole göre elektroforeze tabi tutuldu:

CHEF-DR II sisteminde (Bio-Rad Laboratories, Nazareth, Belgium) yürütme şartları:

Isı: 14°C

Yürütme zamanı: 23 saat

İlk sinyal (initial switch time): 6.8sn

Son sinyal (final switch time): 63.8sn

Akım: 6.0 volt/cm²

3.8.7. Jelin Görüntülenmesi

Elektroforez bittikten sonra jel 5µg/ml etidyum bromür içeren 400 ml ultra saf suda 20 dakika bekletildi. Ardından UV ışık altında görüntülendi. Gel logic 2200 imaging system (Kodak Company, NY, USA) kullanılarak DNA bant görüntülerinin fotoğrafı çekildi. Resimler TIFF formatında kaydedildi. Gel Compar II yazılım sistemi (version 3.0; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) kullanılarak bant profilleri analiz edildi. Elde edilen neticeler Tenover kriterlerine göre değerlendirildi.(147)

Elektroforez neticesinde görülen bant analizleri için benzerlik hesaplarının yapılmasında Pearson korelasyon katsayısı ve kümeleşme analizi için de UPGMA ("Unweighthed Pairwise Grouping Matematical Avenaging" matematiksel ortalama ile ağırlıksız çiftlerin gruplandırılması) yöntemi kullanıldı. İzolatlar benzerlik katsayılarına göre ayırt edilemez (benzerlik >%95), benzer (benzerlik >%90-95) ve farklı (benzerlik <%90) olarak sınıflandırıldı. Birbirleriyle %95'in üzerinde benzerlik gösteren suşlar ana klon, ana klonlar içerisinde de %90'nın üzerinde benzer klonlar alt tip olarak kabul edildi. Benzerlik oranları %90'ın altında olan suşlar ise diğerlerinden farklı olarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. Hasta grubu

Mart 2016-Mart 2017 arasında Turgut Özal Tıp Merkezi Mikrobiyoloji Laboratuvarına servis ve polikliniklerden gönderilen hasta numunelerinde enfeksiyon etkeni olarak tanımlanmış 54 MRSA, 84 MSSA olmak üzere toplam 138 izolat çalışmaya alınmıştır. Metisilin direnci disk difüzyon yöntemi ile doğrulanmıştır.

4.2. *Staphylococcus aureus* Suşlarının Tanımlanması

Çalışmaya dahil edilen izolatların mikrobiyal tanımlanması otomatize akteriyel tanımlama sistemi Microscan Walkaway PC42 ile ve Maldi-Toff MS sistemi ile gerçekleştirildi.

4.3. *Staphylococcus aureus* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıkları

Çalışmaya alınan *S. aureus* izolatlarında *Microscan Walkaway PC42* kiti ile çalışılan klindamisin, eritromisin, penisilin, teikoplanin, trimetoprim-sulfametaksazol, ampisilin, ciprofloksasin, linezolid, gentamisin, oksasilin, tetrasiklin, vankomisin sonuçları **tablo 12’de** verilmiştir.

Tablo 13. *Staphylococcus aureus* izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları

No	DA	E	P	TEC	SXT	AM	CİP	LNZ	GN	OX	TET	VA
	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	S	S
2	S	S	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S
3	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S
6	S	S	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S
7	I	S	R	S	S	R	R	S	R	R	S	S
8	I	S	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S
10	I	S	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S
11	I	S	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S
14	I	S	R	S	S	R	S	S	S	R	R	S
15	R	R	R	S	S	R	S	S	R	R	R	S
19	I	S	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S
20	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R	R	S
21	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S
28	S	S	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S

No	DA	E	P	TEC	SXT	AM	CÌP	LNZ	GN	OX	TET	VA
31	I	S	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S
33	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R	R	S
36	I	S	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S
37	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R	S
38	R	R	R	S	S	R	S	S	R	R	R	S
44	I	S	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S
45	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	R	S
46	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
47	I	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
48	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	S	S
49	I	S	R	S	S	R	S	S	R	S	S	S
50	I	S	R	S	S	R	R	S	S	S	R	S
51	I	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
52	I	S	R	S	S	R	S	S	S	S	R	S
53	I	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S
54	R	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
55	I	S	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S
57	I	S	R	S	S	R	S	S	R	S	S	S
58	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
60	I	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
61	R	I	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S
62	S	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	S
63	I	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
64	I	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R	S
65	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	R	S
66	I	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
67	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
69	S	S	R	S	I	R	S	S	S	S	S	S
70	S	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S
71	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
72	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
73	I	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S

No	DA	E	P	TEC	SXT	AM	CÌP	LNZ	GN	OX	TET	VA
74	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
75	I	S	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S
76	I	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
77	S	S	R	S	S	R	S	S	S	R	R	S
78	I	S	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S
79	I	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
80	S	S	R	S	S	R	R	S	S	R	R	S
81	I	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
82	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
83	I	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
84	R	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
85	I	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
86	I	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
88	R	S	R	S	S	R	R	S	R	R	S	S
89	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
90	S	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S
91	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R	S
92	I	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
94	S	S	R	S	I	R	R	S	R	S	S	S
95	I	S	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S
96	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
97	I	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
98	I	S	R	S	S	R	S	S	R	S	S	S
99	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R	S	S
100	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S
104	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
105	I	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	S
107	I	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
109	I	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
110	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
111	I	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
112	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S

No	DA	E	P	TEC	SXT	AM	CÌP	LNZ	GN	OX	TET	VA
116	R	R	R	S	S	R	S	S	R	S	R	S
117	I	S	R	S	S	R	R	S	R	R	R	S
118	I	S	R	S	S	R	S	S	S	S	R	S
119	I	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
120	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R	S
121	S	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S
122	I	S	R	S	S	R	S	S	S	R	R	S
123	I	S	R	S	S	R	S	S	S	R	R	S
124	I	S	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S
125	I	S	R	S	S	R	S	S	R	S	S	S
126	I	S	R	S	S	R	S	S	S	R	R	S
127	I	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
128	I	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
129	I	S	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S
130	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
131	I	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
132	I	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
133	I	S	R	S	R	R	R	S	R	S	R	S
134	I	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
135	S	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S
136	I	S	R	S	S	R	S	S	S	R	R	S
137	I	S	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S
138	I	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
139	I	S	R	S	S	R	S	S	R	S	S	S
140	I	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
141	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
142	S	S	R	S	S	R	S	R	S	S	S	S
143	I	S	R	S	S	R	S	S	R	R	S	S
144	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
145	I	S	R	S	S	R	R	S	R	S	S	S
146	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R	S
147	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S

No	DA	E	P	TEC	SXT	AM	CİP	LNZ	GN	OX	TET	VA
148	I	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
149	I	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
150	I	S	R	S	S	R	S	S	R	S	S	S
151	I	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
152	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
153	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
154	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
155	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
156	I	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
157	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R	R	S
158	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
159	S	S	R	S	S	R	S	S	R	S	R	S
160	I	S	R	S	S	R	S	S	R	S	R	S
161	I	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
162	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	R	S
163	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R	S
164	S	S	R	S	S	R	R	S	S	S	R	S
165	S	S	R	S	S	R	R	S	R	S	S	S
166	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R	S
167	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
168	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
169	S	R	R	S	S	R	S	S	R	S	S	S
170	I	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
171	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S
172	R	R	R	S	S	R	S	S	R	R	S	S
173	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S

DA: Klindamisin, E:Eritromisin, P:Penisilin, TEC:Teikoplanin, SXT-Trimetoprim-Sulfametaksazol, AM: Ampisilin, CİP: Siprofloksasin, LNZ: Linezolid, GN: Gentamisin, OX: Oksasilin, TET: Tetrasiklin, VA: Vankomisin

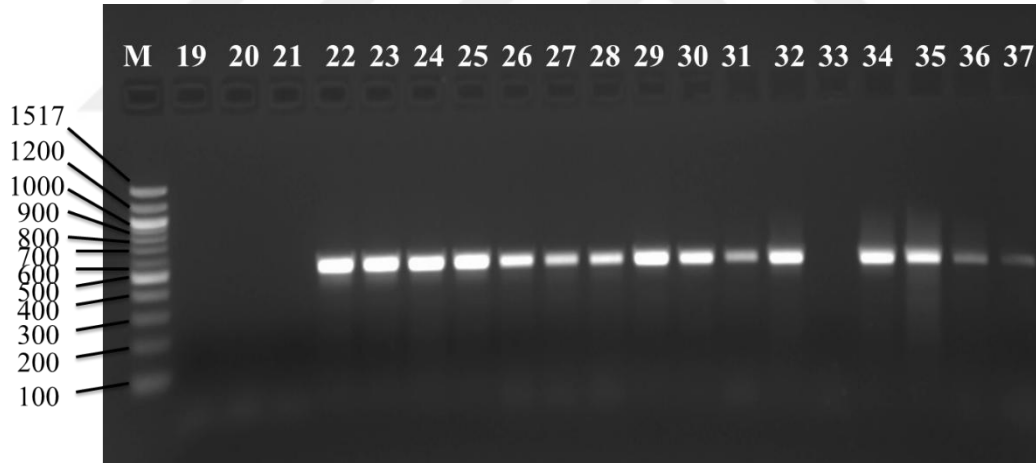
4.4. Metisilin direnç genlerinin tespiti

4.4.1. *Stapylococcus aures*'ta *mecA* Geninin Çoğaltılması

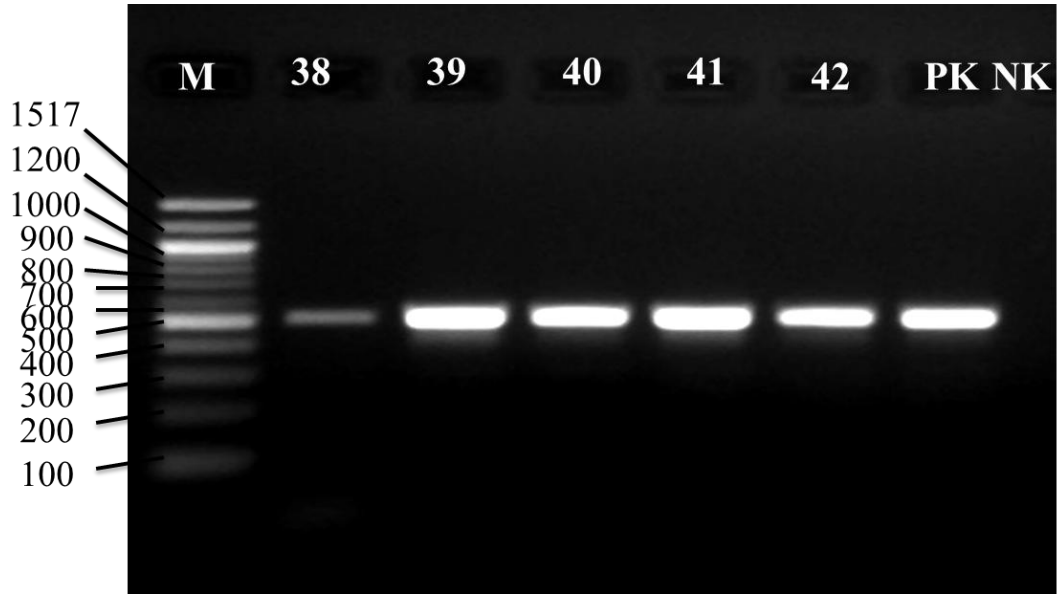
Toplam 138 *S. aureus* izolatının 48'inde (%38) *mecA* geni pozitif olarak bulunurken, metisilin direnci tespit edilmeyen tüm izolatlarda *meA* geni negatifti.



Şekil. 4: *Stapylococcus aures*'ta *mecA* geninin çoğaltılması



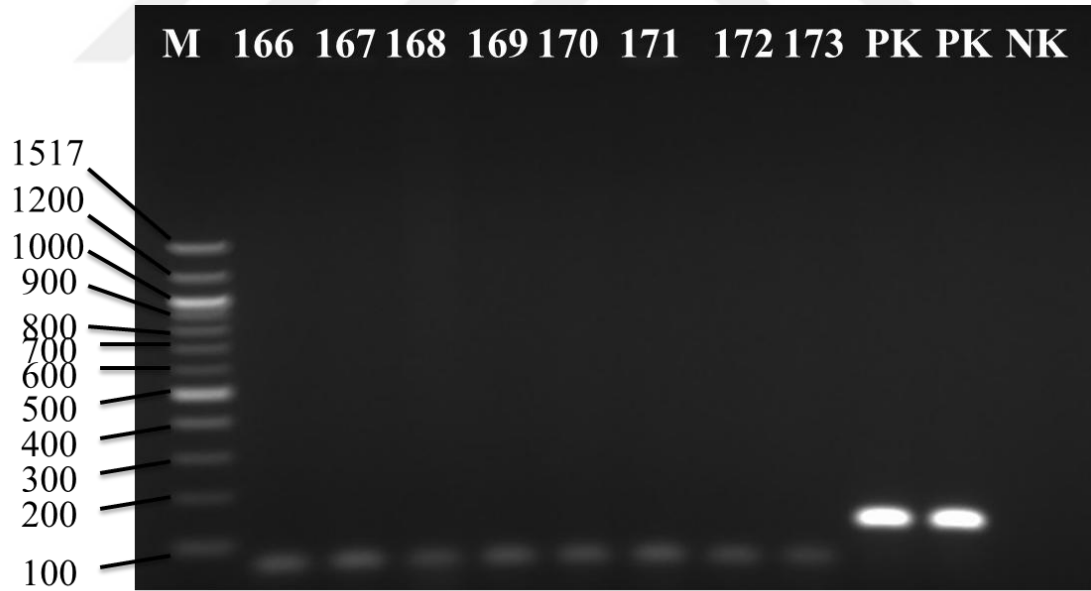
Şekil. 5: *Stapylococcus aures*'ta *mecA* geninin çoğaltılması



Şekil. 6: *Staphylococcus aureus*'ta *mecA* geninin çoğaltılması

4.4.2 *Staphylococcus aureus*'ta *mecC* Geninin Çoğaltılması

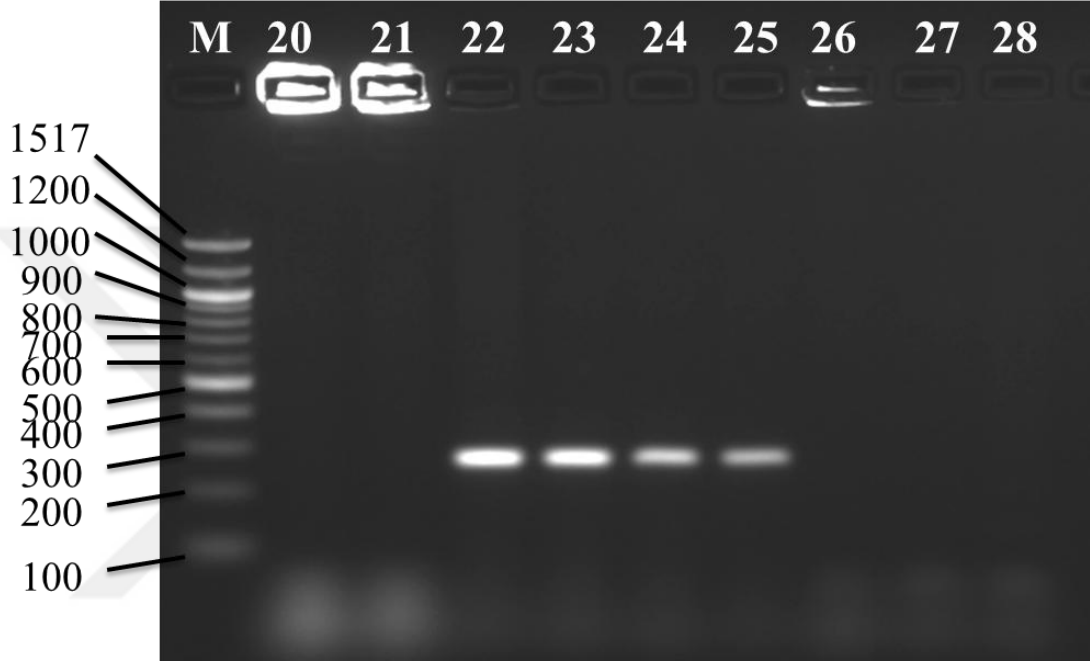
Çalışmaya dahil edile toplam 138 izolatın hiçbirinde *mecC* geni tespit edilemedi.



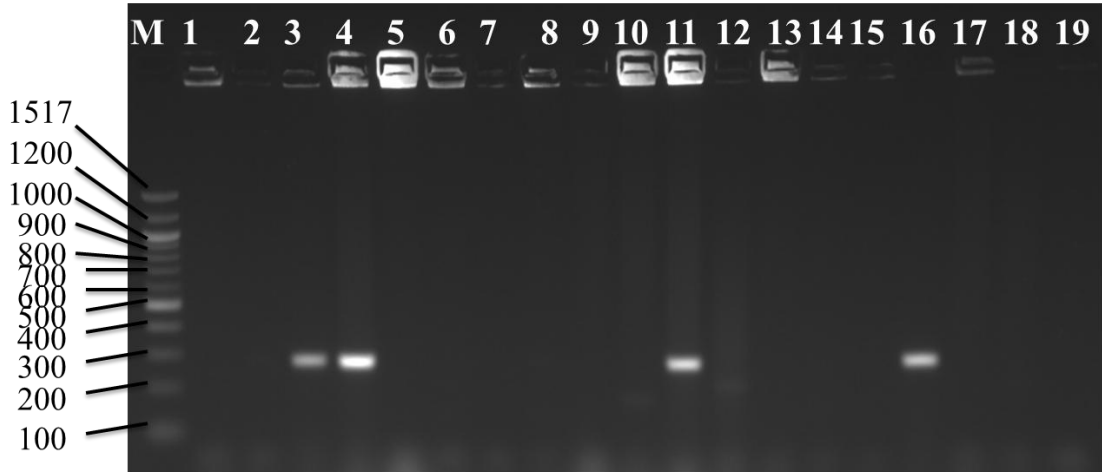
Şekil. 7: *Staphylococcus aureus*'ta *mecC* geninin çoğaltılması

4.5. Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus*'ta SCCmec Tiplendirilmesi

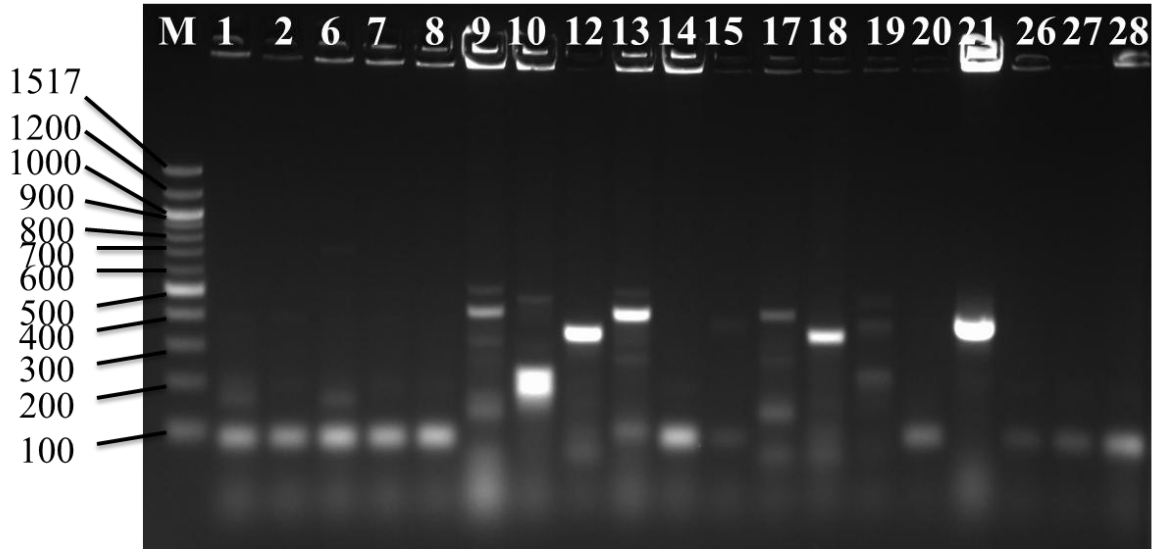
Genotipik olarak mecA geni tespit edilen toplam 38 izolatın 5'inde (%13) SCCmecI, 5'inde SCCmecII (%13), 10'unda (%26) SCCmec III olarak bulundu. Geri 18 izolatın SCCmec tipi belirlenemedi.



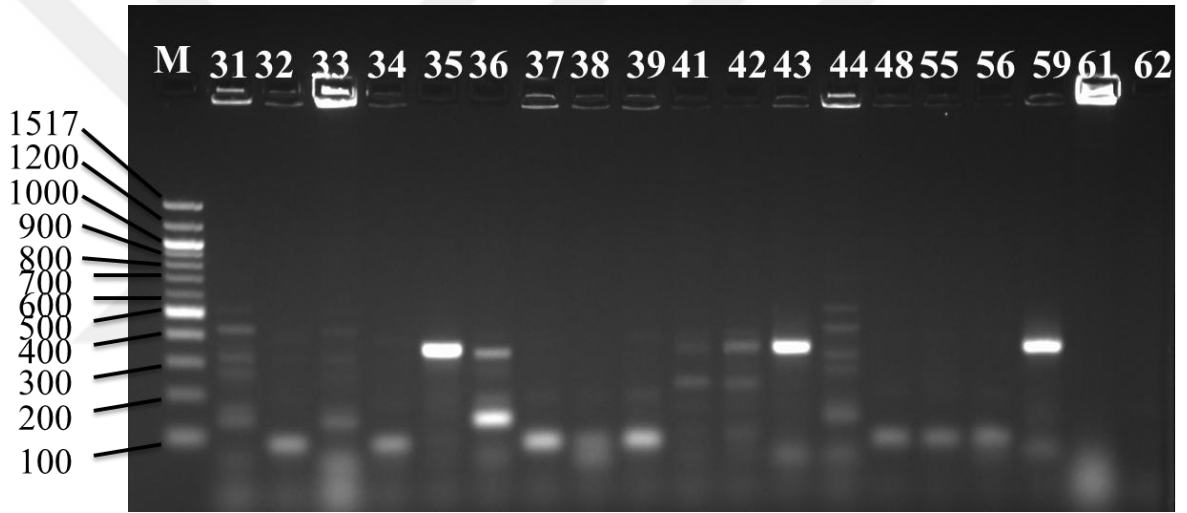
Şekil. 8: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'ta SCCmec tiplendirilmesi



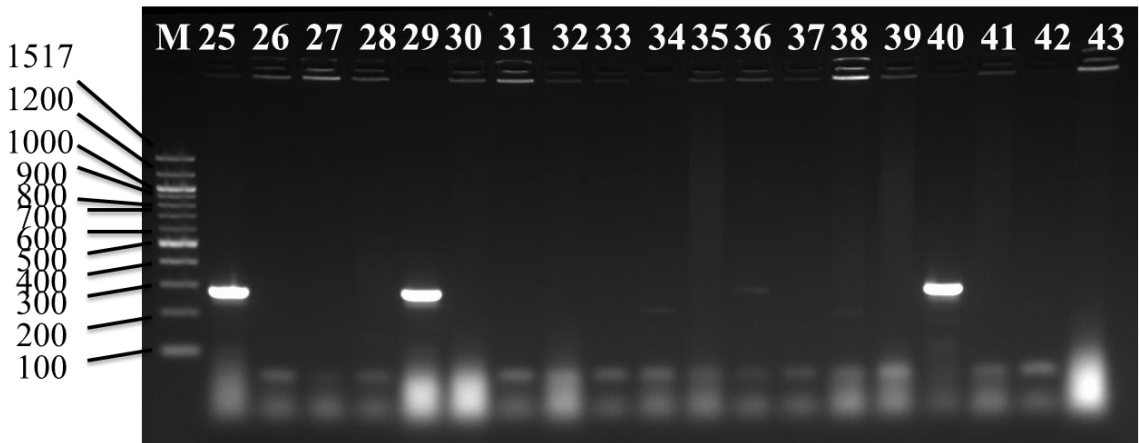
Şekil. 9: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'ta SCCmec tiplendirilmesi



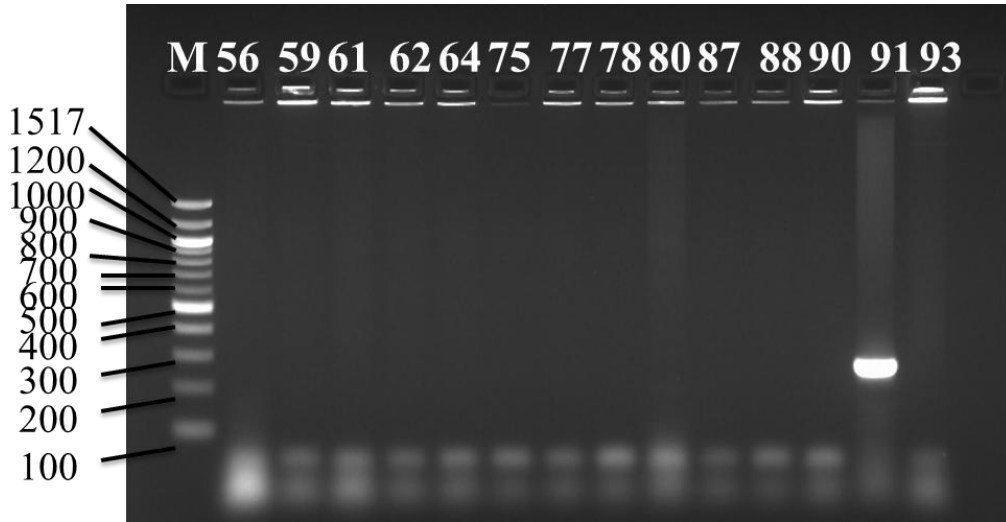
Şekil. 10: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'ta SCCmec tiplendirilmesi



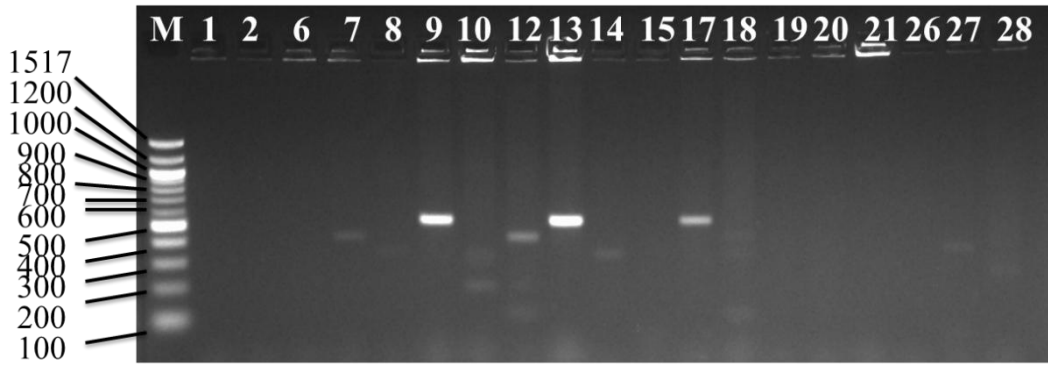
Şekil. 11: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'ta SCCmec tiplendirilmesi



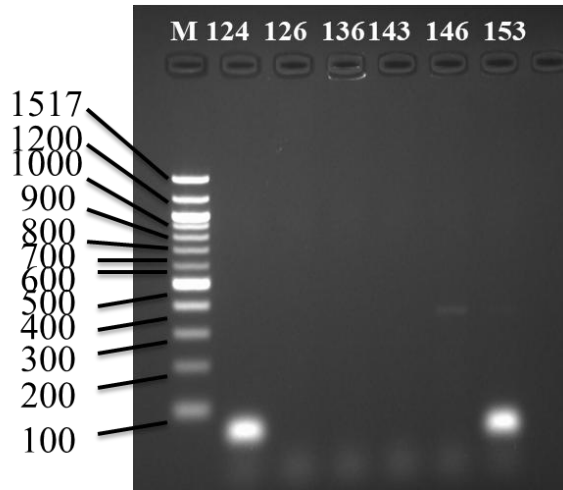
Şekil. 12: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'ta SCCmec tiplendirilmesi



Şekil. 13: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'ta SCCmec tiplendirilmesi



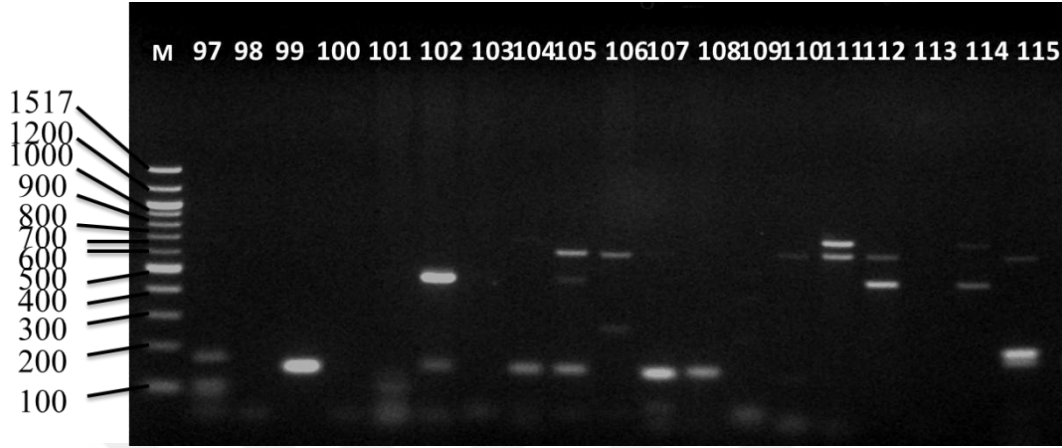
Şekil. 14: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'ta SCCmec tiplendirilmesi



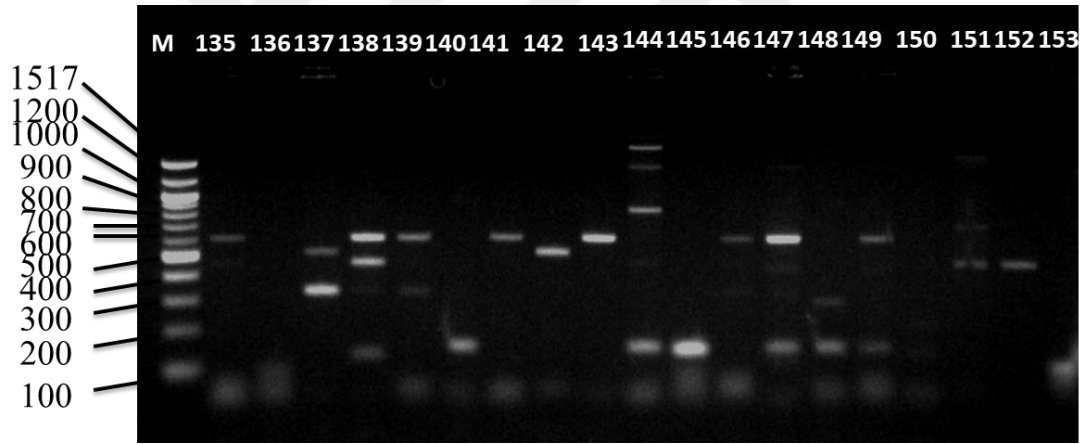
Şekil. 15: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'ta SCCmec tiplendirilmesi

4.6. *Staphylococcus aureus*'ta Sınıf 1, Sınıf 2 ve Sınıf 3 integron Tespiti

Çalışmaya dahil edilen toplam 138 *S. aureus* izolatının 19'unda (%14) Sınıf I integron tespit edilirken, izolatların hiçbirinde diğer tipte integronlar tespit edilemedi. Sınıf I integron tespit edilen izolatların 4'ü *mecA* geni taşımaktaydı.



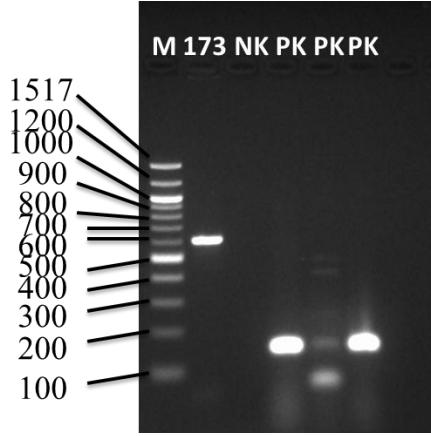
Şekil. 16: *Staphylococcus aureus*'ta sınıf 1 integron tespiti



Şekil. 17: *Staphylococcus aureus*'ta sınıf 1 integron tespiti



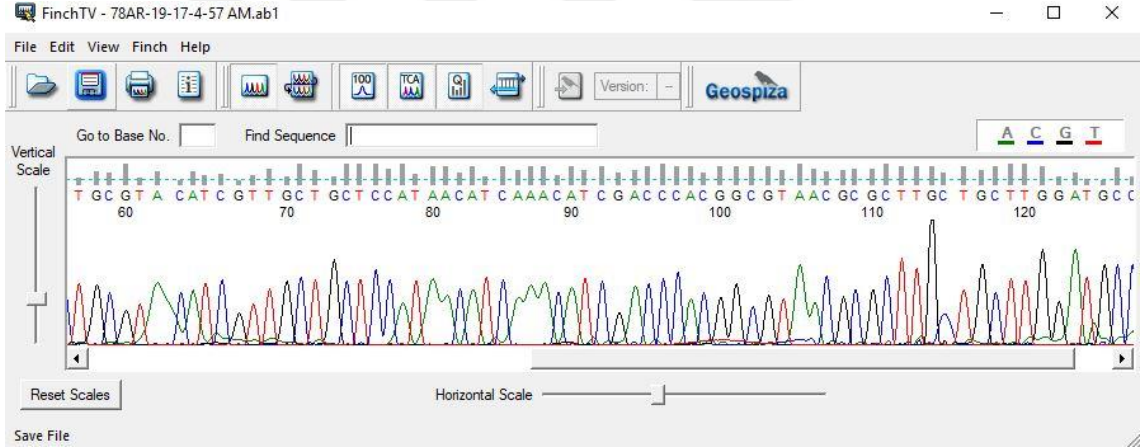
Şekil. 18: *Staphylococcus aureus*'ta sınıf 1 integron tespiti



Şekil. 19: *Staphylococcus aureus*'ta sınıf 1 integron tespiti

4.7. Tespit edilen integronların dizi analizi ile doğrulanması

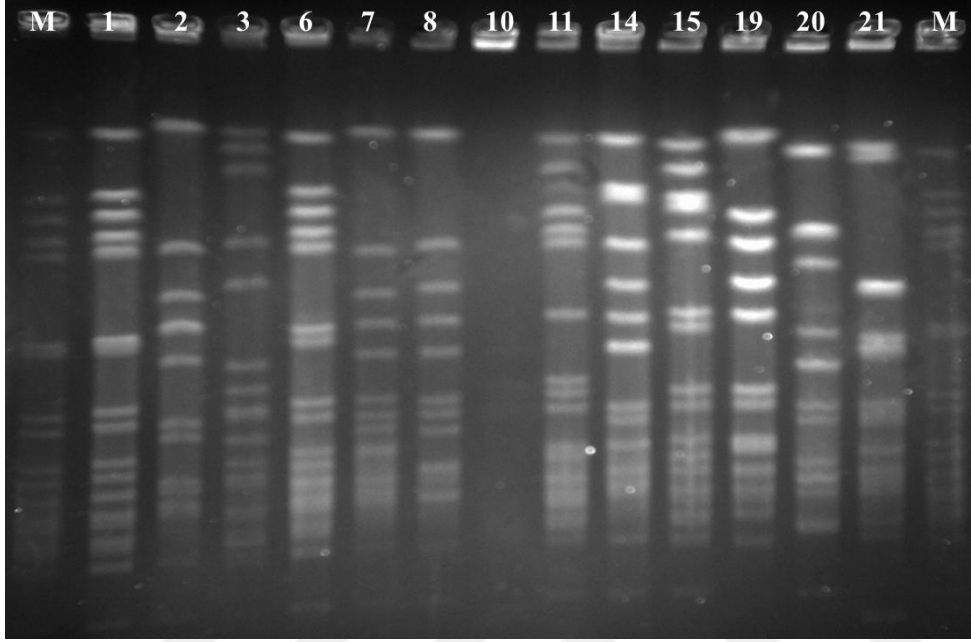
Yapılan PCR analizleri sonucu Sınıf I integron şüpheli 84 örneğin 19'unda integron varlığı dizi analizi ile doğrulanmıştır.



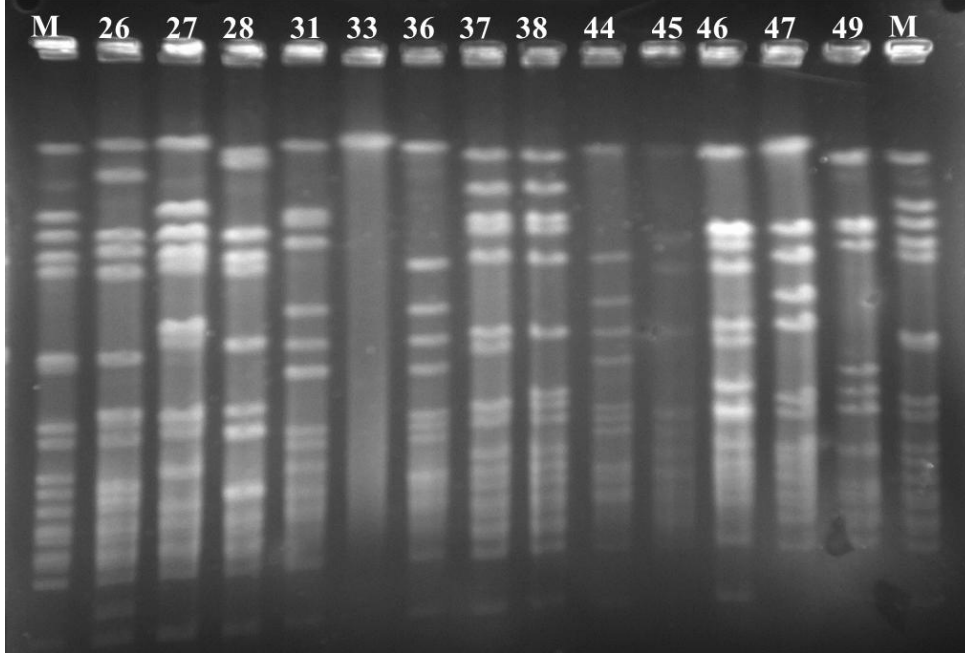
Şekil. 20: 78 numaralı örneğin electroferogram sonucu.

4.8. Pulse Field Gel Elektroforez (PFGE) İle İzolatlar arası Klonal İlişkinin Araştırılması

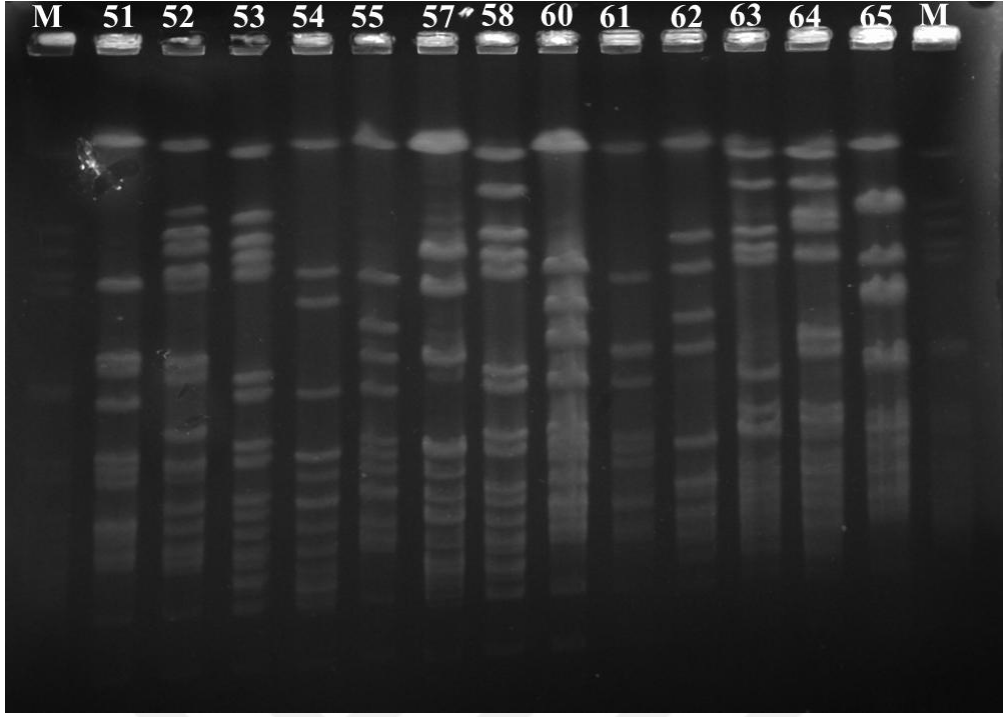
Toplam 138 izolatın PFGE ile tiplendirilmesi sonucunda, 18 izolat 9 farklı küme içerisinde yer alırken, 116 izolat ise herhangi küme içerisinde yer almadı. İzolatların kümeleşme oranı %13 olarak bulunurken toplam 116 farklı genotip elde edildi.



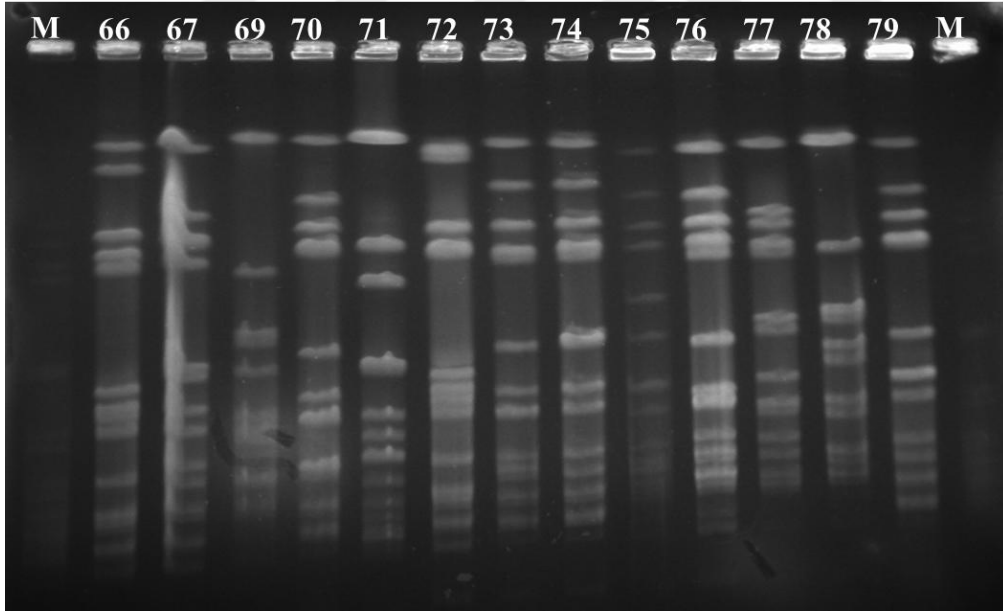
Şekil. 21: Pulse Field Gel Elektroforez (PFGE) ile izolatlar arası klonal ilişkinin tespiti



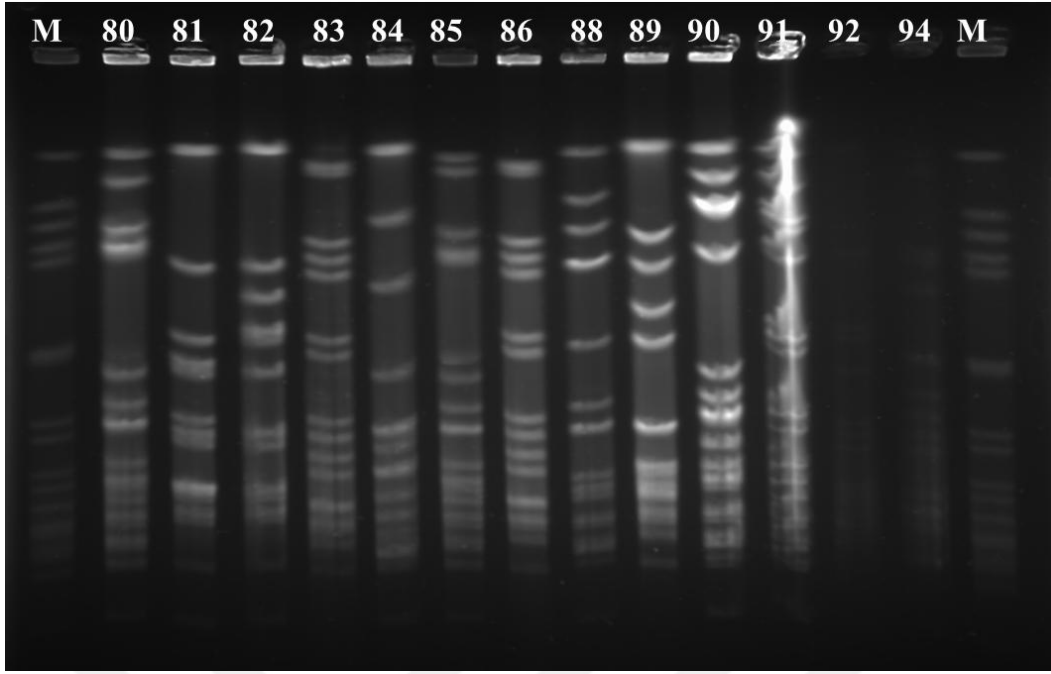
Şekil. 22: Pulse Field Gel Elektroforez (PFGE) ile izolatlar arası klonal ilişkinin tespiti



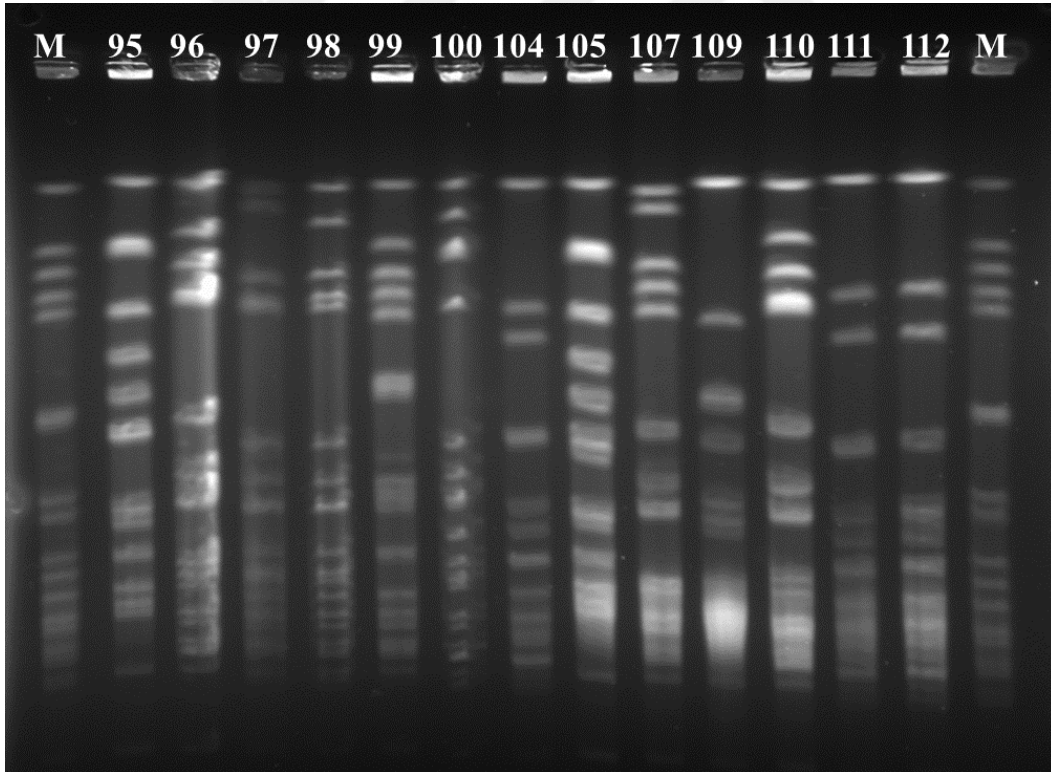
Şekil. 23: Pulse Field Gel Elektroforez (PFGE) ile izolatlar arası klonal ilişkinin tespiti



Şekil. 24: Pulse Field Gel Elektroforez (PFGE) ile izolatlar arası klonal ilişkinin tespiti

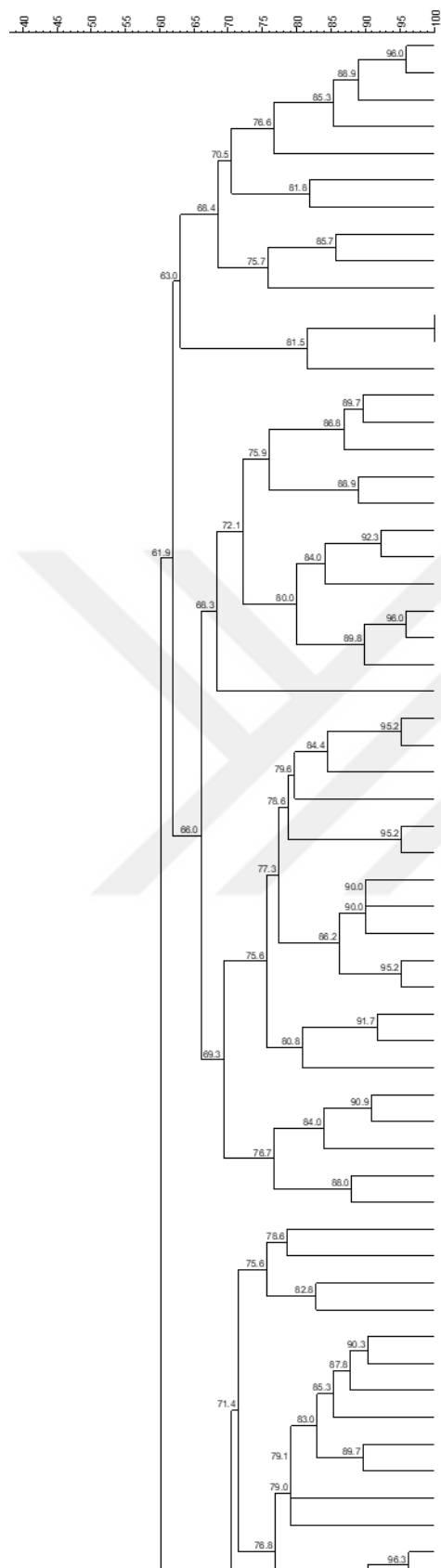


Şekil. 25: Pulse Field Gel Elektrophorez (PFGE) ile izolatlar arası klonal ilişkinin tespiti

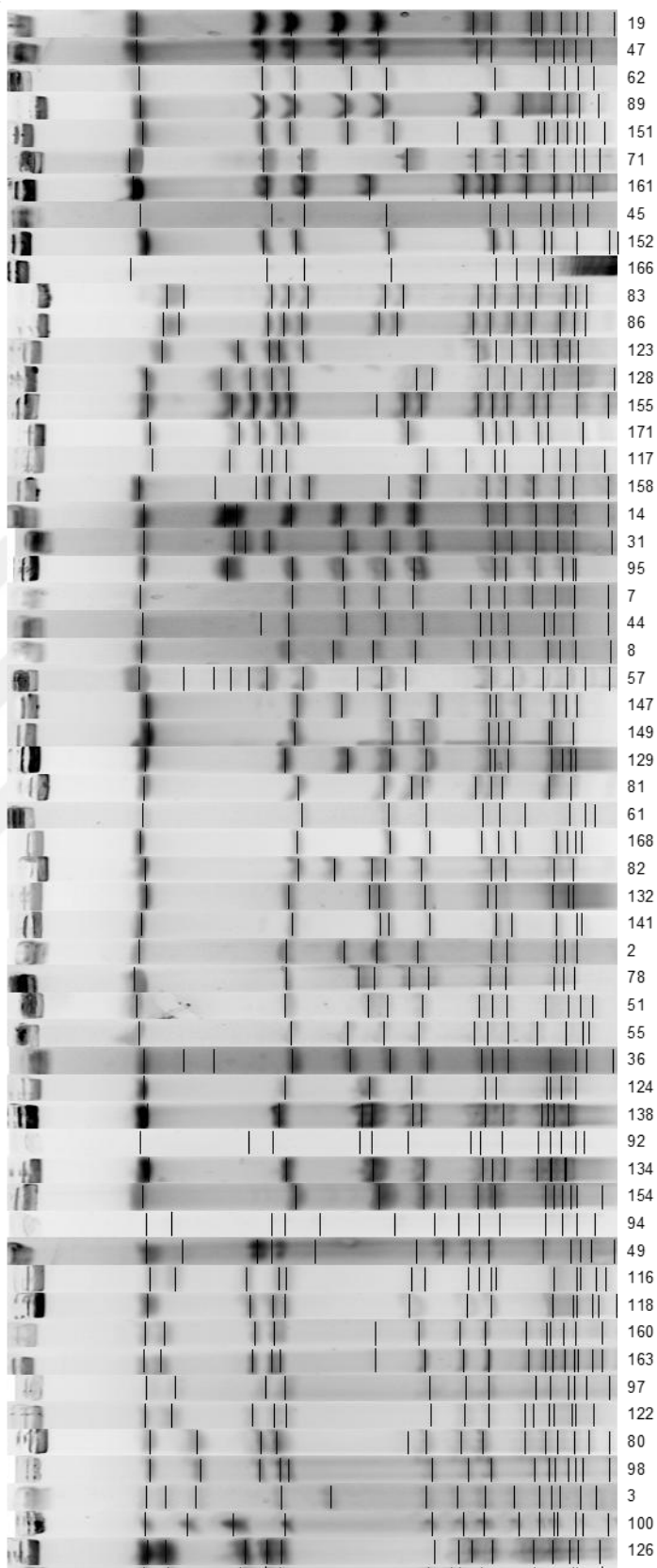


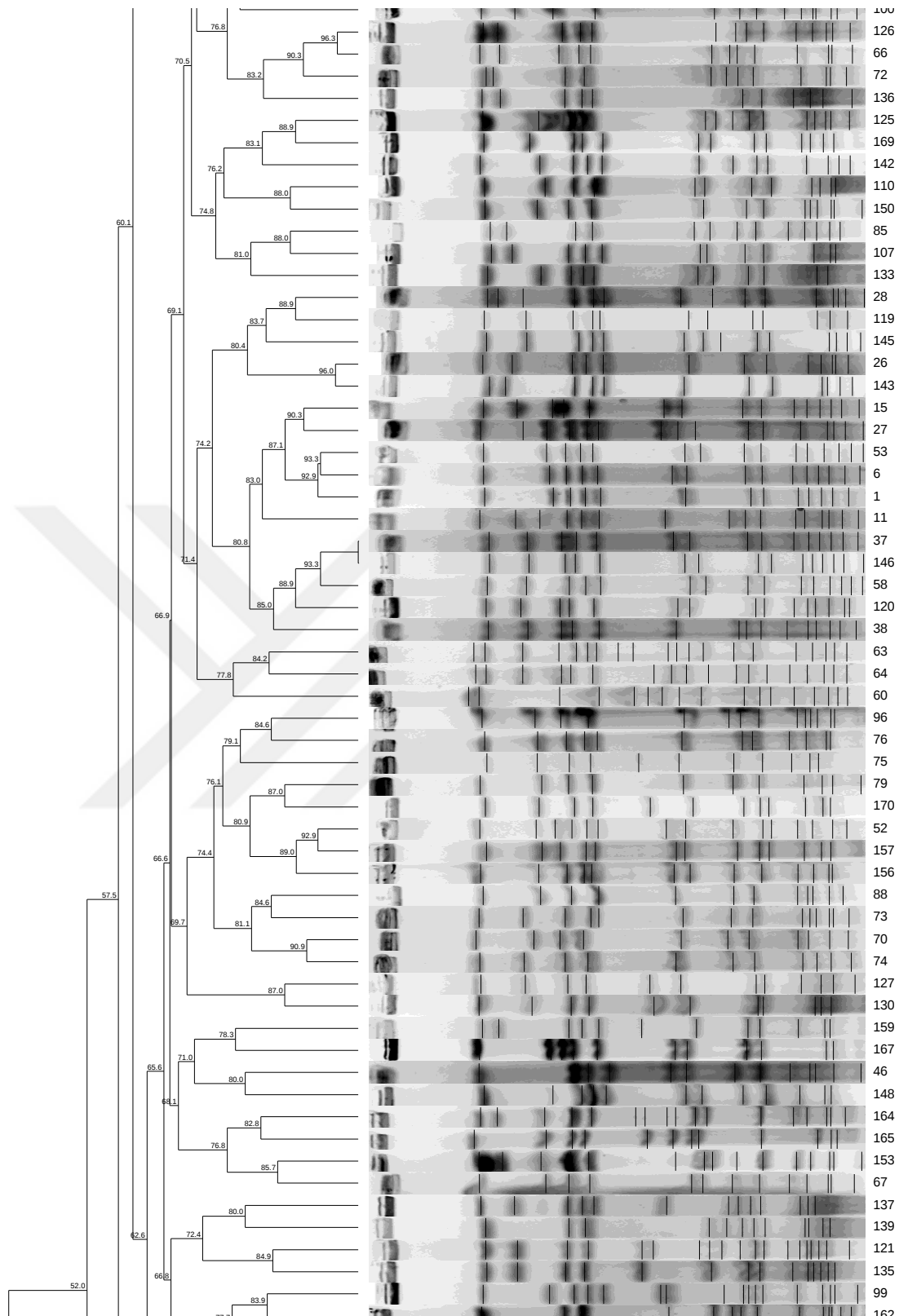
Şekil. 26: Pulse Field Gel Elektrophorez (PFGE) ile izolatlar arası klonal ilişkinin tespiti

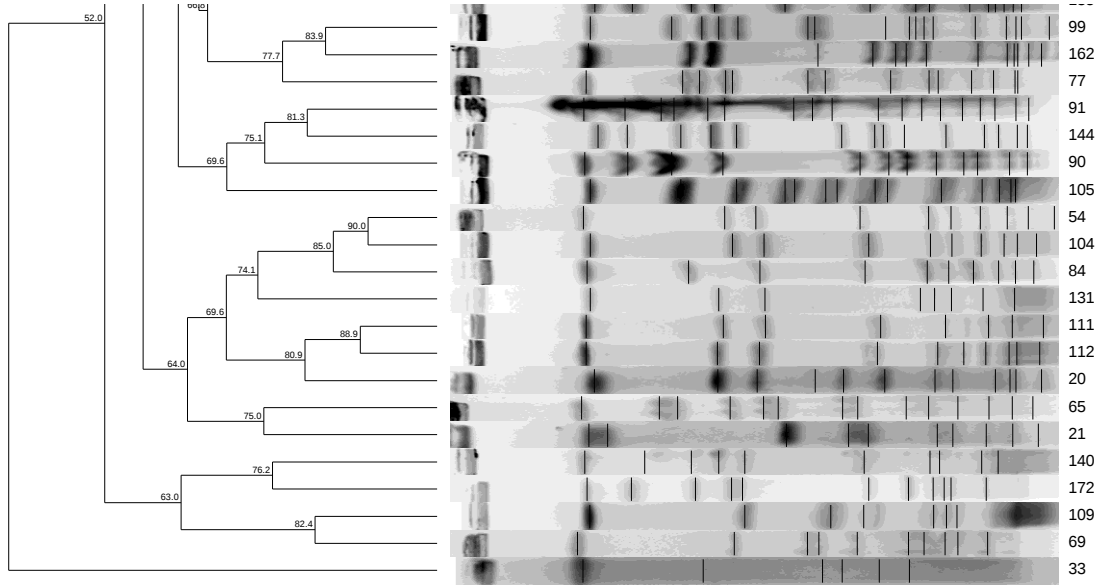
Staphylococcus aureus PFGE



Staphylococcus aureus PFGE







Şekil. 27: Toplam 138 izolatın PFGE ile tiplendirilmesi.

5. TARTIŞMA

Staphylococcus aureus, insanlarda hem kommensal hem de patojen olarak yaşayabilen bir bakteridir. Gram pozitif bakterilerin sebep olduğu bakteriyemilerin en sık sebebi olması ile beraber deri lezyonları, derin doku enfeksiyonları, plüropulmoner enfeksiyonlar, osteoartiküler enfeksiyonlar, katater ile ilişkili enfeksiyonlar, üriner sistem enfeksiyonları gibi çok çeşitli hastalıklara sebep olabilir (1-3). Koagülaz negatif *Staphylococcus*'lar ise deri ve müköz membranlardaki floranın doğal üyeleri olmalarına rağmen yabancı cisimle ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonlarına, endokardit ve prostetik kapak enfeksiyonlarına, cerrahi yara yeri enfeksiyonlarına sebep olabilirler (5).

Antibiyotik öncesi zamanlarda *S. aureus* bakteriyemisine bağlı mortalite %80'lerdeydi(20). 1940'ta penisilinin *S. aureus* enfeksiyonunun tedavisinde kullanılmaya başlanmasıyla hasta prognozunda ciddi bir iyileşme görüldü, ancak birkaç yıl sonra penisilinaz üreten *S. aureus*'lar tespit edilmeye başlandı (27). 1946'da *S. aureus*'ların %6'sı penisilinaz üretirken 1980'lerde bu oran %90'lara çıktı(28). Penisilinaza dirençli beta laktam antibiyotiklerden metisilin 1960'larda tedaviye girmesinden kısa bir zaman sonra direnç görülmeye başlandı(29). Diğer antibiyotiklerin direnç seyri metisilinden farklı olmamıştır(30).

Staphylococcus aureus'larda metisiline direnç gelişmesine sebep olan *mecA* geni metisiline duyarlı izolatlarda bulunmamaktadır. *mecA* geni Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) olarak isimlendirilen bir mobil genetik element ile taşınmaktadır(84) Şu ana kadar tespit edilen 11 tip SCC*mec* tipinin bazıları transpozon ve plazmidlerden de direnç genleri kazanabilmektedir(148). Hastane kaynaklı MRSA enfeksiyonlarında genellikle SCC*mec* 1-2 ve 3 bulunurken, toplum kökenli MRSA enfeksiyonlarında genellikle SCC*mec* 4 veya SCC*mec* 5 bulunmuştur(156).

Avrupa'da tanımlanmış bazı MRSA suşlarında *mecA* genine homolog olan ve *mecALGA251* olarak isimlendirilen bir gen bulunmuştur. İsmi daha sonra *mecC* olarak değiştirilmiştir(86). *mecC* geni *mecA* genine %69 benzerlik gösterse de sentezinde rol oynadığı PBP, *mecA* tarafından kodlanan PBP2a'dan çok farklı bir homolojiye sahiptir(94). Daha önce 10 Batı Avrupa ülkesinde MRSA izolatlarında *mecC* tespit edildi, ancak Batı Avrupa haricinde henüz rapor edilmedi(149). Danimarka'da MRSA izolatlarındaki *mecC* prevalansı 2010'da %1.9 iken 2011'de %2.8 olarak tespit edildi (165). Almanya'da yapılan geniş bir çalışmada bu oran %0.06 olarak raporlandı ve 5

yıllık bir süreçte oranda değişiklik gözlenmedi(151)İngiltere’de 2011-2012 yılları arasında yapılan bir çalışmada 335 MRSA izolatın 9’unda (%0.45) *mecC* rapor edildi(167) İsviçre’de ise 2005-2011 yılları arasında toplanan 565 MRSA izolatının hiçbirinde *mecC* geni bulunmadı(168). Bizim çalışmamızda da ... MRSA izolatının hiçbirinde *mecC* geni tespit edilmedi.

Metisilin direnci ilk defa 1960’ların başında görülmesinden bu yana MRSA’nın etken olduğu hastaneden kazanılmış ve toplumdan kazanılmış enfeksiyonlar her geçen gün daha ciddi bir problem halini almıştır(169). Çünkü bakterinin metisilinle beraber bütün beta laktam antibiyotiklere direnç kazanması hem tedavi seçeneklerini kısıtlamakta hem de morbitide ve mortaliteyi arttırarak tedavi maliyetlerini yükseltmektedir. EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System) verilerine göre 1999’dan itibaren başlanan sürveyans raporlarında metisilin direncinde 2006 yılına kadar artan bir seyir görülmüştür. 2006 yılındaki raporda Avrupa genelinde *S. aureus* izolatlarında metisilin direnç oranı %41.9 olarak raporlandı. Devam eden yıllarda bu oranlarda düşen bir seyir gözlemlendi. 2009 yılında %27.1, 2010 yılında %24.4, 2011’de %18.6, 2012’de 17,80, 2013’te %18.1, 2014’te ise %17,5 olarak tespit edildi. 2015 yılında gelindiğinde ise *S. aureus*’ların metisiline direnç oranı %16.8 olarak tespit edildi ve bu oran Avrupa’da sürveyans raporlarının hazırlanmaya başlandığı 1999 yılından bu güne kadar tespit edilen en düşük orandı (170). Fakat zikredilen oranlar bütün Avrupa’nın ortalama değerleri olsa da *S. aureus*’ların metisilin direnç oranları ülkeden ülkeye çok ciddi farklılıklar gösterir. 2015 yılında İzlanda’da *S. aureus*’larda metisilin direnç oranı %0 iken bu oran Romanya’da %57.2 idi. EARSS verilerine göre ülkemizdeki *S. aureus*’lardaki metisilin direnç oranı 2003 yılında %43, 2004’te %40, 2005’te %35, 2006’da %36, 2007’de %34 ve 2008’de %38’dir. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu UAMDSS (Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi) verilerine göre 2011’de ülkemiz için bu oran %32, 2012’de %25.10, 2013’te ise %26.9’dur. Görünen o ki metisilin direnç oranlarındaki seyir ülkemizde de düşüşe geçmesine rağmen yine de Avrupa ortalamasının üzerindedir. Metisilin direnç oranlarındaki bu düşüşün ve metisilin direncinin ülkeden ülkeye büyük farklılıklar göstermesinin sebebi enfeksiyon kontrol tedbirlerinin değişmesine (el yıkama, kolonizasyonun önlenmesi vs) ve kontrolsüz antibiyotik kullanımının düzeltilmesine bağlı olabilir(171). Yıllar içinde Avrupa ve ülkemizde metisilin direnç oranları düşüşe geçmiş olduğu açıkça görülmesine rağmen hala ciddi bir sağlık problemi olarak karşımızda durmaktadır.

Metisiline dirençli *S. aureus* ile enfeksiyona yakalanan hasta sayısı ve buna bağlı olarak mortalite ve morbidite, ayrıca sağlık harcamaları artmaktadır. Dünyada, *S. aureus* bakteriyemisine yakalanan insan sayısı 100000'de 10-30 kişi/yıldır(15). *Staphylococcus aureus* normal insan mikroflorasında bulunmasına rağmen immun sistem hastalıkları, yabancı cisim invazyonu, lösemi gibi kanserlerde, deri bütünlüğünün bozulması, başka bir ajan (influenza gibi.) ile enfeksiyon gibi altta yatan sebeplerin varlığında fırsatçı enfeksiyonlara sebep olur. (6) *S. aureus* bakteriyemisi komplike ve komplike olmayan şeklinde iki gruba ayrılabilir. Bu sınıflama hastanın teşhisinin değerlendirmesinde, antibiyotik kullanımında ve bütün prognoz hakkında önemli bilgiler verir. Tek merkezli 724 *S. aureus* atağının gözlendiği bir çalışmada komplikasyonların, altta yatan hastalığa, enfeksiyonun santral sinir sistemiyle olan ilişkisine, embolik olaya, metastatik enfeksiyona ve 12 hafta içinde gelişen reenfeksiyona dayandırılabilirdiği gösterilmiştir(172). *S. aureus* bakteriyemisinde altta yatan infektif endokardit, pulmoner enfeksiyon gibi bir zeminin varlığında hastalığın mortalitesinin arttığı tespit edilmiştir (173).

Metisiline dirençli *S. aureus* dünyada olduğu gibi ülkemizde de hastane enfeksiyonları etkenleri arasında üst sıralarda yer almaktadır ve her geçen gün sıklığı artmaktadır. Metisilin direnç geni *mecA*'yı taşıyan SCCmec bölgesinin aynı zamanda diğer antibiyotik direnç genlerini de taşıyor olması ve transpozon, plazmid ve integron gibi mobil elementlerle de antibiyotik direnç genlerinin horizontal yayılımı MRSA enfeksiyonlarının tedavisini zora sokmuştur.

Birden çok antibiyotiğe dirençli bakteri 1950'lerde ilk defa izole edilmesinden ancak 20 yıl sonra antibiyotik direncinin nakledilebilir bir yapıda olduğu keşfedildi (110). 1980'lere gelindiğinde çeşitli antibiyotik direnç genlerini kodlayan ve birçok bölgede lokalize olan yeni bir DNA elementi tarif edildi: integronlar (111).

İntegronlar ekzojen genlerin yakalanmasını ve ifade edilmesini sağlayan genetik elementlerdir. Antibiyotik direncinin yayılmasındaki rolleri ile iyice öne çıkmışlardır. Klinik örneklerle olan münasebeti ilk keşfedildiğinden bu yana integronların bakteriyel genomun ana unsurlarından olduğu ortaya çıkmıştır. İntegronlar bütün çevrede bulunabilirler, türler arasında veya vertikal olarak nakledilebilir ve fonksiyonları tam olarak anlaşılamamış geniş bir gen havuzundaki genleri taşıyabilir(112). Gram negatif bakteriler arasında integronların antibiyotik direnç genlerinin taşınmasındaki önemi

yeterince anlaşılmış olsa da gram pozitif bakterilerdeki rolü hala aydınlatılmaya çalışılmaktadır.

İntegronlar bugünkü tanımı ile ilk defa 1995 yılında Collins ve Hall tarafından tarif edilmiştir (174). Mobil integronlar (MIs) ve kromozomal integronlar (CIs) olmak üzere ikiye ayrılırlar. Mobil integronlar, kodlanan integrazların sekansına dayanılarak bugüne kadar 5 sınıfa ayrılmışlardır. İlk üçü tarihi olarak çoklu ilaç direncinin yayılmasında rol oynamıştır fakat 5 sınıf da antibiyotik direnci ile ilişkilidir.(121) Sınıf 1 klinikte en sık rastlanan ve klinik olarak önemli sınıftır. Gram negatif ve gram pozitif bakterilerde bulunur.(122) Bu sebeple deneysel integron modelini oluştururlar. Sınıf 2 özellikle Tn7 deriveleriyle ilişkilidir ve bir düzine farklı kaset içerebilir.(123) Sınıf 3 integronlar da bir transpozonda lokalize olduğu düşünülür ve prevalansı sınıf 2'den azdır.(124) Diğer iki sınıf ise *Vibrio* türlerinde trimetoprim direncinin gelimesindeki rolleri ile tiplendirildiler. Sınıf 4 integron, integratif ve konjugatif SXT elementinin alt birimine gömülü olarak *V. cholera*'da bulunmuştur (125). Sınıf 5 integron ise *Alivibrio salmonicida*'nın pRSV1 plazmidi üzerinde taşınan birleşik bir transpozonda lokalizedir (126). Sınıf 1 integronlar *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella* ve *Vibrio* gibi bir çok gram negatif bakteride sıklıkla bulunmuştur (175-182).

Sınıf 1 integronların varlığıyla alakalı ülkemizde de birçok araştırma yapılmış ve gram negatif bakterilerde sınıf 1 integronlar tespit edilmiştir. Ülkemizde yapılan bir çalışmada 9 üniversite hastanesinden toplanan 281 *A. baumannii* klinik izolatlarının %6.4 (18/281)'nün sınıf 1 integron pozitif olduğu, sınıf 2 ve sınıf 3 integronun hiçbir izolatta bulunmadığı tespit edilmiştir(183). Yine klinik örneklerden izole edilen 169 gram negatif bakterilerle yapılan bir çalışmada bakterilerin %52.7'sinde sınıf 1 integron tespit edildi. Sınıf bir integron pozitif bulunan 16 *E. coli* izolatının 11'i, 10 *K. pneumonia* izolatının 5'i aynı zamanda sınıf 2 integron taşıdığı görülmüştür (184). Ülkemizde yapılmış çok merkezli bir çalışmada üriner sistem numunelerinden izole edilen 626 *E. coli* izolatının %25.8 (162/626)'i sınıf 1 integron, %16.6 (104/626)'sı sınıf 2 integron pozitif bulunmuştur. Bu çalışmada integronların taşıdığı en sık genin *dfrA1* geni olduğu görülmüştür (185). 2007'de yapılmış olan başka bir çalışmada 100 *P. aeruginosa* izolatında 9 izolatta IMP-1 MBL geninin sınıf 1 integronda taşındığı gösterilmiştir (186). 2009 yılında yapılan bir çalışmada ise akarsulardan izole edilen 183 *Enterobacteriaceae* izolatında sınıf 1 ve sınıf 2 integron taranmış, 14 izolatta sınıf 1,

5 izolatta sınıf 2 integron bulunmuştur. Sekans analizinde integronların *dfrA1*, *dfr2d*, *dfrA7*, *dfrA16*, *dfrA17*, *aadA1*, *aadA5*, *bla(oxA-30)*, ve *sat1* genlerinin taşındığı gösterilmiştir(187). Ülkemizde yakın zamanda yapılan bir başka çalışmada da tavuk etlerinden izole edilen *Salmonella* izolatlarında integron varlığı gösterilmiştir (188). Bir başka çalışmada da birbirinden farklı kliniklerden gelen numunelerden izole edilen 100 *S. maltophilia* izolatında sınıf 1, sınıf 2 ve sınıf 3 integron taranmıştır. 5 izolatta sınıf 1 integron varlığı tespit edilmişse de sınıf 2 ve sınıf 3 integrona rastlanılamamıştır (189). Sınıf 1 integron başta olmak üzere integronların gram negatif bakterilerde sıklıkla bulunuyor olmaları gen kasetlerinin bakteriler arasında taşınmasına ve çoklu ilaç direncinin yayılmasına sebep olmaktadır.

Gram negatiflerde bakterilerde integron varlığına ve taşınan gen kasetlerine dair dünyada ve ülkemizde birçok çalışma yapılmasına rağmen gram pozitif bakteriler için yapılan çalışmalar hala az sayıdadır. 1998’de *C. glutamicum*’da 29 kb bir plazmidin içinde, streptomycin ve spectinomycin direnciyle ilişkili bir integron bulunması, integronların gram pozitif bakterilerde ilk defa tespit edilmesi anlamına geliyordu.(141) 2004’te ise sınıf 1 integron araştırma programı dahilinde bir kümes çöplüğünden toplanan gram pozitif bakterilerde de (*Corynebacterium spp.*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *Corynebacterium casei* ve *C. glutamicum*, *Aerococcus spp*, *Staphylococcus spp.*) integronlar tespit edilmişti (142). Daha sonra Çin’de yapılan bir çalışmada enterokoklarda sınıf 1 integronların haricinde, ilk defa sınıf 2 integron tespit edildi. Bu çalışmada sınıf 1 integron taşıyan 15 *Enterococcus* izolatının 13’ünde 3 farklı gen kasetinin (*dfrA12-orfF-aadA2*, *dfrA17- aadA5* ve *aadA2*) taşındığı tespit edilmiştir. 13 izolatın 2’sinde integronların gen kaseti taşımadığı belirlenmiştir. Kalan 2 *Enterococcus* izolatında ise sınıf bir integronun yanı sıra *dfrA1–sat1–aadA1* gen kasetini taşıyan sınıf 2 integron tespit edilmiştir. Ve bu gen kaseti *E. coli*’den elde edilen gen kasetiyle %99.8, *P. aeruginosa*’dan elde edilen gen kasetiyle %99.7 benzerlik göstermektedir(143). Sınıf 1 integronlar klinik *S. aureus* izolatlarında ilk defa Çin’de yapılan bir çalışmada gösterilmiştir. 209 MRSA izolatının 122’sinde (%58.3) sınıf 1 integron pozitif bulunmuştur, sınıf 2 ve sınıf 3 integron tespit edilememiştir. 122 izolatın 115’inde (%94.3) *DqacE*, *sulI* geni ve *ORF5* bulunmuştur. Uzunlukları 975 ile 2360 bp arasında değişen 4 farklı gen kasetinin taşındığı belirlenmiştir. Gen kasetlerinin dizi analizi yapıldığında bunların *aadA2* (975-bp, 53 izolatta), *dfrA12-orfF-aadA2* (1913-b, 61 izolatta), *dfrA17-aadA5* (1664-bp, 3 izolatta) ve *aacA4-cmlA1* (2360-b, 5

izolatta) olduğu görülmüştür. Yaygın görülen *dfrA12-orfF-aadA2* ve *aadA2* gen kasetleri aminoglikozid, kloramfenikol ve trimetoprim direncine sebep olurlar. İntegron taşıyan 58 izolatta Southern blot hibridizasyon metodu ile integronların kromozomda lokalize olduğu gösterilmiştir(143). Çinde yapılan bir başka çalışmada çevresel ve cerrahi numunelerden izole edilen 30 *S. aureus* izolatında sınıf 1 integron varlığı araştırılmıştır. 30 izolatın 16'sında (%53) sınıf 1 integron bulunduğu ve bu integronların *aadA2* geni kasetini taşıdığı gösterilmiştir. RAPD-PCR yapıldığında 30 izolatın 6 farklı genotipe ayrıldığı belirlenmiş, yapılan MLST'de ise bütün izolatların aynı sekans tipine sahip olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar gösteriyor ki çevresel ve klinik izolatlar arasında integron transferi olmaktadır (190). Yine Çin'de yapılan bir başka araştırmada 2001-2006 yılları arasında klinikten toplanan 179 MRSA izolatında sınıf 1 integron varlığı araştırılmıştır. PCR yöntemiyle yapılan taramada 76 izolatta (76/179, %42.5) sınıf 1 integron tespit edilmiştir. Sınıf 1 integron taşıyan bütün suşların birbirinden farklı gen kasetlerinden 1 ile 4 adet, 73 izolatın da *qacE41-sul1* taşıdığı gösterilmiştir. İntegron taşıyan ve taşımayan MRSA izolatları arasında amikasin, eritromisin, gentamisin, trimetoprim-sulfametoksazol ve tetrasiklin antibiyotiklerine direnç yönünden belirgin farklılık olduğu gözlenmiştir. Yapılan SCCmec tiplendirmesinde 3 izolat SCCmec tip 2, 168 izolat SCCmec tip 3 olarak klasik nozokomiyal SCCmec tipleri arasında bulunurken, 8 izolat tiplendirilemedi. İntegron ve SCCmec elementlerinin türler arasında fonksiyonel genlerin ve antimikrobiyal direnç genlerinin yayılmasına aracılık etmesi bu elementlerin bakterilerin zorlu çevresel şartlara uyumunu arttırdığını düşündürmektedir. Bu çalışmada sınıf 1 integronunda en sık rastlanan gen kasetleri *aadA* (%97.4) ve *dfrA* ailesidir(%50). Test edilen izolatlarda *dfrA12-orfF-aadA2* ve *aadA2* en baskın dizi olarak gözlenmiştir. *dfrA12-orfF-aadA2* dizisi 2001-2004 arasında sıklıkla görülmesine rağmen 2005 yılında tespit edilememiştir. *aadA2* dizisi 2004'te görülmeye başlanmış ve 2005-2006 arasında baskın hale gelmiştir(191).

Sınıf 1 integronun 2001-2006 yılları arasındaki insidansında bir düşüş görülmektedir. İnsidans, 2001 yılında 65.0% (13/20) , 2002'de 55.0% (11/20) , 2003'te 46.7% (7/15), 2004'te 44.0% (15/34), 2005'te 36.0% (18/50), 2006'da 30.0% (12/40) olarak tespit edilmiştir (190).

2013 yılında İran'da yapılan bir çalışmada hasta numunelerinden izole edilen 90 *S. aureus* suşunda PCR yöntemiyle sınıf 1 integron taranmıştır. 90 izolatın 37 (%41.1)'sinde sınıf 1 integron pozitif bulunmuştur. Ancak araştırmada integronların gen

kaseti taşıyıp taşımadıkları, taşıyorlarsa hangi gen dizisi olduğu ve izolatların antibiyotik dirençleriyle integronlar arasında bir bağ olup olmadığı bakılmamıştır(192).

2015 yılında Hindistan’da yapılan bir çalışmada ise 2 farklı şehirden toplanan 143 klinik MRSA izolatının %71’inin (101/143) sınıf 1 integron taşıdığı gösterilmiştir. *sul1/qacEΔ1* (sınıf 1 integronun 3’ bölgesi) prevalansı sınıf 1 integron taşıyan suşların %39’unda pozitif bulundu. *sul1* geni sülfonamid direncine, *qacEΔ1* ise etidyum bromid ve kuarternler amonyum bileşiklerine dirence sebep olmaktadır(193). Çalışmalar göstermiştir ki integronların 3’ bölgesinde *sul1/qacEΔ1* eksikliği başka gen kasetlerinin taşınabilmesine yardım etmektedir (194). Daha önce Çin’de yapılan çalışmalarda klinik *S. aureus* izolatlarında sınıf integron taşıma sıklığı farklı yıllarda %30 ile %56 arasında değişmekteydi(195).

Ülkemizde ise stafilokoklarda integron varlığına dair bizim çalışmamıza kadar yalnız bir yayın yapılmıştır. 2014’te yayınlanan bu makalede 50 MRSA, 50 MRCNS olmak üzere 100 klinik stafilokok izolatında sınıf bir integron varlığı PCR yöntemiyle taranmıştır. Hiçbir izolatta sınıf bir integron tespit edilememiştir. Çalışmada Sınıf 2 ve sınıf 3 integron araştırılmamıştır (196). Bizim çalışmamızda ise 138 *S. aureus* izolatının 21’inde (%15) Sınıf 1 integron tespit edilmiş ve dizi analizi ile doğrulanmıştır. Bunların birlikte çalışmamız kapsamında araştırdığı sınıf 2 ve sınıf 3 integronlar hiçbir örnekte pozitif olarak saptanmamıştır.

KAYNAKLAR

- 1-Bhakdi S, Tranum-Jensen J. Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Rev*. 1991;55:733.
- 2-Easmon CSF, Adlam C: *Staphylococci and staphylococcal infections*. Vols 1 and 2. Academic Press, London, 1983 .
- 3-Foster TJ. Potential for vaccination against infections caused by *Staphylococcus aureus*. *Vaccine*. 1991;9:221.
- 4-Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, Nouwen JL. 2005. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis* 5:751–762.
- 5- Karsten Becker, Christine Heilmann, Georg Peters. Coagulase-Negative *Staphylococci*. *Clin Microbiol Rev*. 2014 Oct; 27(4): 870–926.
- 6- Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, Woods GL (ed). 2017. *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*, 7th ed. Wolters Kluwer, Philadelphia, PA. p 670–732,
- 7-Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis* 2005;5:751–62.
- 8-Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:505–20.
- 9-Williams REO, Jevons MP, Shooter RA, et al. Nasal staphylococci and sepsis in hospital patients. *BrMed J* 1959;2:658–62.
- 10-Kılıc A, Li H, Stratton C.W. and Tang Y.W. Antimicrobial Susceptibility Patterns and *Staphylococcal* Cassette Chromosome mec types of, as well as Pantone- Valentine Leukocidin occurrence among, methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Children and Adults in middle Tennessee. *J. Clin. Microbio*.2006; 44(12): 4436-4440.
- 11-Chambers H.F. Methicillin Resistance in *Staphylococci*: Molecular and Biochemical Basis and Clinical Implications. *Clinical Microbiology Reviews*. 1997;10(4): 781-791.
- 12-European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (Ears-Net). <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-europe-2014.pdf>. Erişim Tarihi: 25 Eylül 2016.

- 13-Shorr AF. Epidemiology of staphylococcal resistance. *Clin Infect Dis* 2007; 45(Suppl 3): S171-6.
- 14-Aires de Sousa M, de Lencastre H. Bridges from hospitals to the laboratory: genetic portraits of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2004;40(2):101-11.
- 15-Laupland KB, Lyytikainen O, Sogaard M, Kennedy KJ, Knudsen JD, Ostergaard C, Galbraith JC, Valiquette L, Jacobsson G, Collignon P, Schonheyder HC, International Bacteremia Surveillance Collaborative. 2013. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus* bloodstream infection: a multinational population-based surveillance study. *Clin Microbiol Infect* 19:465–471.
- 16-Frimodt-Moller N, Espersen F, Skinhoj P, Rosdahl VT. 1997. Epidemiology of *Staphylococcus aureus* bacteremia in Denmark from 1957 to 1990. *Clin Microbiol Infect* 3:297–305.
- 17-Mejer N, Westh H, Schonheyder HC, Jensen AG, Larsen AR, Skov R, Benfield T, Danish Staphylococcal Bacteraemia Study Group. 2012. Stable incidence and continued improvement in short term mortality of *Staphylococcus aureus* bacteraemia between 1995 and 2008. *BMC Infect Dis* 12:260.
- 18-Allard C, Carignan A, Bergevin M, Boulais I, Tremblay V, Robichaud P, Duperval R, Pepin J. 2008. Secular changes in incidence and mortality associated with *Staphylococcus aureus* bacteraemia in Quebec, Canada, 1991-2005. *Clin Microbiol Infect* 14:421–428
- 19-Kallen AJ, Mu Y, Bulens S, Reingold A, Petit S, Gershman K, Ray SM, Harrison LH, Lynfield R, Dumyati G, Townes JM, Schaffner W, Patel PR, Fridkin SK. 2010. Health care-associated invasive MRSA infections, 2005- 2008. *JAMA* 304:641–648
- 20-Johnson AP, Pearson A, Duckworth G. 2005. Surveillance and epidemiology of MRSA bacteraemia in the UK. *J Antimicrob Chemother* 56: 455–462.
- 21-Jarlier V, Trystram D, Brun-Buisson C, Fournier S, Carbonne A, Marty L, Andremont A, Arlet G, Buu-Hoi A, Carlet J, Decre D, Gottot S, Gutmann L, Joly-Guillou ML, Legrand P, Nicolas-Chanoine MH, Soussy CJ, Wolf M, Lucet JC, Aggoune M, Brucker G, Regnier B. 2010. Curbing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 38 French hospitals through a 15-year institutional control program. *Arch Intern Med* 170:552–559
- 22-Grayson ML, Jarvie LJ, Martin R, Johnson PD, Jodoin ME, McMullan C, Gregory RH, Bellis K, Cunningham K, Wilson FL, Quin D, Kelly AM. 2008. Significant

reductions in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia and clinical isolates associated with a multisite, hand hygiene culture-change program and subsequent successful statewide roll-out. *Med J Aust* 188:633-640.

23- EARSS 2015 Sürveyans Raporu

24- Giancarlo Licitra, Etymologia: *Staphylococcus*. *Emerg Infect Dis*. 2013 Sep; 19(9): 1553.

25-Skinner, D., and Keefer, C.S. 1941. Significance of bacteremia caused by *Staphylococcus aureus*. *Arch. Intern. Med*. 68:851–875.

26-Rammelkamp, C.H., and Maxon, T. 1942. Resistance of *Staphylococcus aureus* to the action of penicillin. *Proc. Royal Soc. Exper. Biol. Med*. 51:386–389.

27-Kirby, W.M.M. 1944. Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant staphylococci. *Science*. 99:452–453.

28-Chambers, H.F. 2001. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerg. Infect. Dis*. 7:178–182.

29-Jevons, M.P. 1961. “Celbenin”-resistant staphylococci. *Br. Med. J*. 1:124–125.

30-Ünal S. *Staphylococcus aureus*: Direnç mekanizmaları.. Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S (eds.) *Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler*. Ankara. Bilimsel Tıp Yayınevi. 2003;23-38

31-Lyon, B.R., Iuorio, J.L., May, J.W., and Skurray, R.A. 1984. Molecular epidemiology of multiresistant *Staphylococcus aureus* in Australian hospitals. *J. Med. Microbiol*. 17:79–89.

32-Schmitz FJ, Jones ME. Antibiotics for treatment of infections caused by MRSA and elimination of MRSA carriage. What are the choices? *Int J Antimicrob Agents*. 1997; 9: 1-19.

33-Bilgehan H. Gram Olumlu Koklar. *Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları*. Fakülteler Kitabevi. İzmir. 2000; 239-268.

34- Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, Woods GL (ed). 2017. *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*, 7th ed. Wolters Kluwer, Philadelphia, PA. Page:671

35-Bannerman TL. *Staphylococcus*, *Micrococcus* and other catalase positive cocci that grow aerobically, “Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds): *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed., ASM Press, Washington D.C. 2003; 384-404.

- 36- Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, Woods GL (ed). 2017. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 7th ed. Wolters Kluwer, Philadelphia, PA. Page:672
- 37- Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, Woods GL (ed). 2017. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 7th ed. Wolters Kluwer, Philadelphia, PA. Page:672
- 38-Bannerman TL, Peacock S.J. Murray P R, Baron JE, Jorgensen HJ, Landry LM, Pfaller AM. Manual of Clinical Microbiology, 9th 1: (28) 390-411, 2007. Staphylococcus, Micrococcus ve diğer katalaz pozitif koklar (Çev. Ed: Gümral R.). Klinik Mikrobiyoloji cilt 1, Başustaoğlu A, Atlas Kitapçılık, Ankara, 2009.
- 39-Cengiz AT. Staphylococcus. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ustaçelebi Ş. Güneş kitabevi. Ankara. 1999: 339-347.
- 40- Bannerman TL, Peacock S.J. Murray P R, Baron JE, Jorgensen HJ, Landry LM, Pfaller AM. Manual of Clinical Microbiology, 9th 1: (28) 390-411, 2007. Staphylococcus, Micrococcus ve diğer katalaz pozitif koklar (Çev. Ed: Gümral R.). Klinik Mikrobiyoloji cilt 1, sayfa 395, Başustaoğlu A, Atlas Kitapçılık, Ankara, 2009.
- 41- Harrison LS. Staphylococci. Ed: Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G, Test Book of Diagnostic Microbiology. Elsevier Inc, St. Louis Missouri, 2007: 367-381
- 42- Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, Woods GL (ed). 2017. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 7th ed. Wolters Kluwer, Philadelphia, PA. Page:693
- 43- Proctor, R. A., G. Peters.2998. Small colony variants in staphylococcal infections: diagnostic ve therapeutic implications. Clin. Infect. Dis. 27:419-423
- 44- Bilgehan H. Gram Olumlu Koklar. Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. Fakülteler Kitabevi. İzmir. 2000; 239-268.
- 45- Cengiz AT. Tıp ve diş hekimliğinde genel ve özel mikrobiyoloji. Güneş Kitapevi, Ankara2004: 343-50 s.
- 46- Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, Woods GL (ed). 2017. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 7th ed. Wolters Kluwer, Philadelphia, PA. Page:694
- 47- Bilgehan H. Gram Olumlu Koklar. Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. Fakülteler Kitabevi. İzmir. 2000; 239-268.
- 48-Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Fakülteler Kitabevi. 5. Baskı. İzmir. 2009. S:501

- 49- Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, Woods GL (ed). 2017. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 7th ed. Wolters Kluwer, Philadelphia, PA. Page:681
- 50-Koneman EW AS, Janda WM, et al. Gram positive cocci part I:Staphylococci and related gram positive cocci. Colar Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology 6th ed. Lippincott Company Philadelphia USA, 2006;12:623-662.
- 51-Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS et al. Staphylococcus and related organisms. Medical Microbiology 4th ed. St. Louis Mosby Inc; 202-216.
- 52- Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, Woods GL (ed). 2017. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 7th ed. Wolters Kluwer, Philadelphia, PA. Page:188
- 53-Langevelde P, Dissel JT, Ravensbergen E, Appelmelk BJ et all. Antibiotic- Induced Release of Lipoteicoic Asid and Peptidoglycan from Staphylococcus aureus; Quantitative Measurements and Biological Reactivities. Antimicrob Agents and Chemother 1998; 42: 3073-3078.
- 54- Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, Woods GL (ed). 2017. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 7th ed. Wolters Kluwer, Philadelphia, PA. Page:681
- 55-Murray, Rosenthal, Phaller. Medical Microbiology seveth edition 2013;18:174-187
- 56- Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, Woods GL (ed). 2017. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 7th ed. Wolters Kluwer, Philadelphia, PA. Page:682
- 57- Walvogel FA, Mandell GL, Bennet JE, Dolin R (eds). Staphylococcus aureus, Principles and Practice of İnfectious Diseases. Newyork
- 58-Geo. F. Brooks, Karen C. Carroll, Janet S. Butel, Stephen A. Morse. Jawetz, Melnick ve Adelberg Tıbbi Mikrobiyoloji, çev. Şadi O. Y. Nobel Tıp Kitabevi.2010. S: 226
- 59- Bannerman TI. Staphylococcus, Micrococcus and Other Catalase Positive Cocci That Grow Aerobically. Manual of Clinical Microbiology. 8th ed. Washington, DC. ASM pres.2003:284-404.
- 60- Bilgehan H. Gram Olumlu Koklar. Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. Fakülteler Kitabevi. İzmir. 2000; 239-268.
- 61- Cengiz AT. Staphylococcus aureus. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, 1.Baskı Ustaçelebi Ş. Ankara: Güneş Kitabevi 1999:339-349

- 62- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Staphylococcus and related gram-positive cocci. Murray PR (ed). Medical Microbiology, 7th ed., Philadelphia PA, Mosby-Elsevier, 2012; p.174-87.
- 63- Moreillon P, Que Y. Staphylococcus aureus (Including staphylococcal toxic shock). Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 7th ed., Philadelphia, Churchill Livingstone, 2010; 2543-78.
- 64- Cengiz AT. Staphylococcus. Ustaçelebi S. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara, Güneş Kitabevi, 1999; 339-46.
- 65- Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS et al. Staphylococcus and related organisms. Medical Microbiology 4th ed. St. Louis Mosby Inc; 202-216.
- 66- Bannerman TL. Staphylococcus, Micrococcus and other catalase positive cocci that grow aerobically, "Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover JC (eds): Manual of Clinical Microbiology, 8th ed., ASM Press, Washington D.C. 2003; 384-404.
- 67- Moreillon P, Que Y, Glauser MP. Staphylococcus aureus (Including Staphylococcal Toxic Shock) In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th Ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2005; 2321-2351.
- 68-Tünger A, Çavuşoğlu C, Korkmaz M. Stafilokoklar ve Benzer Bakteriler. Asya Mikrobiyoloji. 2005; 72-81.
- 69- Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, Woods GL (ed). 2017. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 7th ed. Wolters Kluwer, Philadelphia, PA. page:672
- 70- Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds), Başustaoglu A (çeviri ed), Klinik Mikrobiyoloji, 2009, 9. baskı. Atlas Kitapçılık, Ankara. S:392
- 71- Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, Woods GL (ed). 2017. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 7th ed. Wolters Kluwer, Philadelphia, PA. Page:677
- 72- Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, Woods GL (ed). 2017. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 7th ed. Wolters Kluwer, Philadelphia, PA. Page:679
- 73-Aydın K, Koagülaz Negatif Stafilokokların neden olduğu infeksiyonlar ve tedavi seçenekleri Usluer G, Ulusoy S, Ünal S. Gram-Pozitif Bakteri İnfeksiyonları. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara 2004: 105-119.

- 74-Bannerman TL. Staphylococcus, Micrococcus and other catalase positive cocci that grow aerobically, "Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds): Manual of Clinical Microbiology, 8th ed., ASM Press, Washington D.C. 2003; 384-404.
- 75- Bilgehan H. Gram Olumlu Koklar. Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. Fakülteler Kitabevi. İzmir. 2000; 239-268.
- 76- Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, Woods GL (ed). 2017. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 7th ed. Wolters Kluwer, Philadelphia, PA. Page:693
- 77- Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, Woods GL (ed). 2017. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 7th ed. Wolters Kluwer, Philadelphia, PA. Page:702
- 78- Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds), Başustaoğlu A (çeviri ed), Klinik Mikrobiyoloji, 2009, 9. baskı. Atlas Kitapçılık, Ankara. S:337
- 79- Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, Woods GL (ed). 2017. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 7th ed. Wolters Kluwer, Philadelphia, PA. Page:703
- 80- Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, Woods GL (ed). 2017. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 7th ed. Wolters Kluwer, Philadelphia, PA. Page:703
- 81-Plata K, Rosato A E and Węgrzyn G. Staphylococcus aureus as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. Acta Biochimica Polonica. Vol. 56 No. 4/2009, 597–612.
- 82-Kayaalp O. Tıbbi Farmakoloji, 10. Baskı. 2002. Hacettepe Taş Yayıncılık. S: 210
- 83-Gülay Z. Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları ve Çözüm Önerileri: Betalaktamazlara Ve Karbapenemlere Direnç. Hastane Enfeksiyonları Dergisi 2001; 5: 2110-229.
- 84- Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds), Başustaoğlu A (çeviri ed), Klinik Mikrobiyoloji, 2009, 9. baskı. Atlas Kitapçılık, Ankara. S:1123
- 85- Kayaalp O. Tıbbi Farmakoloji, 10. Baskı. 2002. Hacettepe Taş Yayıncılık. S:216
- 86- Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, Woods GL (ed). 2017. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 7th ed. Wolters Kluwer, Philadelphia, PA. Page:1088
- 87- Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds), Başustaoğlu A (çeviri ed), Klinik Mikrobiyoloji, 2009, 9. baskı. Atlas Kitapçılık, Ankara. S:1125

- 88-Clinical and Laboratory Standarts Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 16th Informational Supplement (M100- S16) CLSI, Wayne, Pennsylvania 2006.
- 89- Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, Woods GL (ed). 2017. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 7th ed. Wolters Kluwer, Philadelphia, PA. Page:1092
- 90- Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds), Başustaoğlu A (çeviri ed), Klinik Mikrobiyoloji, 2009, 9. baskı. Atlas Kitapçılık, Ankara. S:1123
- 91-Hiramatsu K, Katayama Y, Yuzawa H, et al. Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol* 2002;292:67–74.
- 92-Turlej A, Hryniewicz W, Empel J. Staphylococcal cassette chromosome mec (Scmec) classification and typing methods: an overview. *Pol J Microbiol* 2011;60:95–103.
- 93-Shore AC, Deasy EC, Slickers P, et al. Detection of staphylococcal cassette chromosome mec type XI carrying highly divergent *mecA*, *mecI*, *mecRI*, *blaZ*, and *ccr* genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:3765–3773.
- 94-Ito T, Hiramatsu K, Tomasz A, et al. Guidelines for reporting novel *mecA* gene homologues. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:4997–4999.
- 95-Henze, U.U ve B. Berger-Bachi. 1995. *Staphylococcus aureus* *pbp4* and intrinsic beta-laktam resistanc. *Antimicrob. Agents Chemother*.49:4174-4179
- 96- Stapleton PD, Taylor PW. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Sci Prog*. 2002; 85: 57-72.
- 97- Kırca F. *Staphylococcus aureus* suşlarında metisilin direnci tanısında kullanılan bazı fenotipik yöntemlerin karşılaştırılması. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, Ankara 2008.
- 98-Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat* 2010;13:151–171.
- 99- Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds), Başustaoğlu A (çeviri ed), Klinik Mikrobiyoloji, 2009, 9. baskı. Atlas Kitapçılık, Ankara. S:1122
- 100-Gülay Z. Antimikrobiyal İlaçlara Direnç. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Ustaçelebi Ş. Güneş kitabevi. Ankara. 1999: 91-108.
- 101- Maranan M.C. , Moreira B. , Boyle-Vavra S. and Daum R.S. Antimicrobial resistance in *Staphylococci*: Epidemiology, Molecular Mechanisms and Clinical

Relevance. Infectious Disease Clinics of North America. 1997; 11(4): 813-836.

102- Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds), Başustaoğlu A (çeviri ed), Klinik Mikrobiyoloji, 2009, 9. baskı. Atlas Kitapçılık, Ankara. S:1132

103- Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds), Başustaoğlu A (çeviri ed), Klinik Mikrobiyoloji, 2009, 9. baskı. Atlas Kitapçılık, Ankara. S:1134

104- Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds), Başustaoğlu A (çeviri ed), Klinik Mikrobiyoloji, 2009, 9. baskı. Atlas Kitapçılık, Ankara. S:1136

105- Nakipoğlu Y, Katrancı H, Çağatay A, et al. İstanbul Tıp Fakültesinde çeşitli örneklerden izole edilen stafilocok suşlarında glikopeptit direncinin araştırılması. ANKEM Derg 2004;18(4):209-212.

106-Climo, M. W., R. L. Patron ve G. L. Archer. 1999. Combinations of vancomycin and beta-lactams are synergistic against staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin. Antimicrob. Agents Chemother. 43:1747-1753

107-Jawetz E, Melnick JL,Adelberg EA.1987. Staphylococci. Review of Medical Microbiology. Appleton and Lange, California, 17. Edition, 217-222

108- Frost LS, Leplae R, Summers AO, Toussaint A. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. Nat Rev Microbiol. 2005 Sep;3(9):722-32.

109- Malachowa N, DeLeo FR. Mobile genetic elements of Staphylococcus aureus. Cell Mol Life Sci. 2010 Sep;67(18):3057-71

110-Liebert CA, Hall RM, Summers AO. 1999. Transposon Tn21, flagship of the floating genome. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63:507–22

111- Stokes HW, Hall RM. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. Mol Microbiol. 1989 Dec;3(12):1669-83.

112- Gillings MR. Integrons: past, present, and future. Microbiol Mol Biol Rev. 2014 Jun;78(2):257-77.

113- Gillings MR. Integrons: past, present, and future. Microbiol Mol Biol Rev. 2014 Jun; sayfa:142

114- Collis CM, Grammaticopoulos G, Briton J, Stokes HW, Hall RM. 1993. Site-specific insertion of gene cassettes into integrons. Mol. Microbiol. 9:41–52

115- Collis CM, Hall RM. 1995. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. Antimicrob. Agents Chemother. 39:155–62

116- Jove T, Da Re S, Denis F,Mazel D, PloyMC. 2010. Inverse correlation between promoter strength and excision activity in class 1 integrons. PLoS Genet. 6:e1000793

- 117- Recchia GD, Stokes HW, Hall RM. 1994. Characterisation of specific and secondary recombination sites recognised by the integron DNA integrase. *Nucleic Acids Res.* 22:2071–78
- 118- Collis CM, Hall RM. 1992. Gene cassettes from the insert region of integrons are excised as covalently closed circles. *Mol. Microbiol.* 6:2875–85
- 119- Naas T, Mikami Y, Imai T, Poirel L, Nordmann P. 2001. Characterization of In53, a class 1 plasmid and composite transposon-located integron of *Escherichia coli* which carries an unusual array of gene cassettes. *J. Bacteriol.* 183:235–49
- 120- Partridge SR, Tsafnat G, Coiera E, Iredell JR. 2009. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol. Rev.* 33:757–84
- 121- Mazel D. 2006. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 4:608–20
- 122- Labbate M, Case RJ, Stokes HW. 2009. The integron/gene cassette system: an active player in bacterial adaptation. *Methods Mol. Biol.* 532:103–25
- 123- Ramirez MS, Pineiro S, Centron D. 2010. Novel insights about class 2 integrons from experimental and genomic epidemiology. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:699–706
- 124- Collis CM, Kim MJ, Partridge SR, Stokes HW, Hall RM. 2002. Characterization of the class 3 integron and the site-specific recombination system it determines. *J. Bacteriol.* 184:3017–26
- 125- Hochhut B, Lotfi Y, Mazel D, Faruque SM, Woodgate R, Waldor MK. 2001. Molecular analysis of antibiotic resistance gene clusters in *Vibrio cholerae* O139 and O1 SXT constains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:2991–3000
- 126- Sorum H, Roberts MC, Crosa JH. 1992. Identification and cloning of a tetracycline resistance gene from the fish pathogen *Vibrio salmonicida*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:611–15
- 127- Gillings M, Boucher Y, Labbate M, Holmes A, Krishnan S, et al. 2008. The evolution of class 1 integrons and the rise of antibiotic resistance. *J. Bacteriol.* 190:5095–100
- 128- Xu H, Davies J, Miao V. 2007. Molecular characterization of class 3 integrons from *Delftia* spp. *J. Bacteriol.* 189:6276–83
- 129- Marquez C, Labbate M, Ingold AJ, Chowdhury PR, Ramirez MS, et al. 2008. Recovery of a functional class 2 integron from an *Escherichia coli* strain mediating a urinary tract infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:4153–54

- 130- Barlow RS, Gobius KS. 2006. Diverse class 2 integrons in bacteria from beef cattle sources. *J. Antimicrob. Chemother.* 58:1133–38
- 131-Partridge SR1, Tsafnat G, Coiera E, Iredell JR. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol Rev.* 2009 Jul;33(4):757-84.
- 132-Heidelberg JF, Eisen JA, Nelson WC, Clayton RA, Gwinn ML, et al. 2000. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* 406:477–83
- 133-Boucher Y, Labbate M, Koenig JE, Stokes HW. 2007. Integrons: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria. *Trends Microbiol.* 15:301–9
- 134-Nemergut DR, Robeson MS, Kysela RF, Martin AP, Schmidt SK, Knight R. 2008. Insights and inferences about integron evolution from genomic data. *BMC Genomics* 9:261
- 135-Rowe-Magnus DA, Guerout AM, Biskri L, Bouige P, Mazel D. 2003. Comparative analysis of superintegrons: engineering extensive genetic diversity in the vibrionaceae. *Genome Res.* 13:428–42
- 136-Labbate M, Case RJ, Stokes HW. 2009. The integron/gene cassette system: an active player in bacterial adaptation. *Methods Mol. Biol.* 532:103–25
- 137-Stokes HW, Nesbo CL, Holley M, Bahl MI, Gillings MR, Boucher Y. 2006. Class 1 integrons potentially predating the association with *n402*-like transposition genes are present in a sediment microbial community. *J. Bacteriol.* 188:5722–30
- 138-Cambray G, Guerout AM, Mazel D. 2010. Integrons, *Annu. Rev. Genet.* 44:141-66
- 139-Fluit AC, Schmitz FJ. Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18:761– 770.
- 140-Labbate M, Case RJ, Stokes HW. The integron/gene cassette system: an active player in bacterial adaptation. *Methods Mol Biol* 2009; 532:103–125.
- 141-Nesřvera J, Hochmannová J, Pařtek M. An integron of class 1 is present on the plasmid pCG4 from Gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Lett* 1998; 169:391–395.
- 142-Nandi S, Maurer JJ, Hofacre C, Summers AO. Gram-positive bacteria are a major reservoir of class 1 antibiotic resistance integrons in poultry litter. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:7118–7122.
- 143-Xu Z, Li L, Shirtliff M, Peters B, Peng Y, Alam M, et al. First report of class 2 integron in clinical *Enterococcus faecalis* and class 1 integron in *Enterococcus faecium* in South China. *Diag Microbiol Infect Dis* 2010; 68:315–317.

- 144-Pinilla G, Muñoz L, Ruiz A, Chavarro B, Cifuentes Y. Isolation of *Staphylococcus epidermidis* strain carrier of the class one integron in a septic neonatal patient. *Infection* 2009; 13:196–202.
- 145-Veise P, Ramazanzadeh R, Khiabani Z, Derakhshi B, Amirmozafari N. Identification of class I integrons gene in *Staphylococcus* strains isolated from clinical samples. *Cell Biol* 2013; 1:24–27.
- 146-Xu Z, Li L, Shirliff M, Peters B, Li B, Peng Y, et al. Resistance class 1 integron in clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in Southern China, 2001–2006. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17:714–717.
- 147-Ito T, Katayama Y, Hiramatsu K (1999) Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob Agents Chemother* 43:1449–1458
- 148-Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K (2000) A new class of genetic element, staphylococcal cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 44:1549–1555
- 149- Gillings MR. Integrons: past, present, and future. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2014 Jun; sayfa:145
- 150-International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC) (2009) Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC *mec*): guidelines for reporting novel SCC *mec* elements. *Antimicrob Agents Chemother* 53:4961–4967
- 151-Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K (2001) Genetic organization of the chromosome region surrounding *mecA* in clinical Staphylococcal strains: role of IS 431-mediated *mecI* deletion in expression of resistance in *mecA*-carrying, low-level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrob Agents Chemother* 45:1955–1963
- 152- Ryffel C, Bucher R, Kayser FH et al (1991) The *Staphylococcus aureus* *mec* determinant comprises an unusual cluster of direct repeats and codes for gene product similar to the *Escherichia coli* sn-glycerophosphoryl diester phosphodiesterase. *J Bacteriol* 173:7416–7422
- 153- Ito T, Hiramatsu K, Tomasz A et al (2012) Guidelines for reporting novel *mecA* gene homologues. *Antimicrob Agents Chemother* 56:4997–4999
- 154-Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Protocols Yinduo Ji Editor Second Edition

155-Han X, Ito T, Takeuchi F et al (2009) Identification of a novel variant of staphylococcal cassette chromosome mec, type II.5, and its truncated form by insertion of putative conjugative transposon Tn 6012 . *Antimicrob Agents Chemother* 53:2616–2619

156-Eady EA, Cove JH (2003) Staphylococcal resistance revisited: community-acquired Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCC mec) Analysis of MRSA methicillin resistant *Staphylococcus aureus* —an emerging problem for the management of skin and soft tissue infections. *Curr Opin Infect Dis* 16:103–124

157-

www.hpsc.ie/.../EuropeanAntimicrobialResistanceSurveillanceSystemEARSS/EARSSSsurveillanceReports/.../File,3999,en.pdf.

158-Wong H, Louie L, Lo RY, Simor AE. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates with a partial or complete absence of staphylococcal cassette chromosome elements. *J Clin Microbiol*. 2010 Oct;48(10):3525-31.

159-PROTOCOL FOR PCR AMPLIFICATION OF MECA, MECC (MECALGA251), SPA AND PVL RECOMMENDED BY THE EURL-AR 2ST VERSION, SEPTEMBER 2012. European Union Reference Laboratory.

160-CHUNFENG REN, YONGJING ZHAO, YAN SHEN. Analysis of the effect of integrons on drug-resistant *Staphylococcus aureus* by multiplex PCR detection. *Mol Med Rep*. 2013 Mar; 7(3): 719–724

161-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 May;45(5):1323-36. /Update to the Multiplex PCR Strategy for Assignment of mec Element Types in *Staphylococcus aureus*. Catarina Milheiric, Duarte C. Oliveira, Hermínia de Lencastre. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, Sept. 2007, p. 3374–3377

162-Tenover F.C., Arbeit R.D., Goering R.V., Mickelsen P.A., Murray B.E., Persing D.H., and Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*. 1995 September; 33(9): 2233–2239.

- 163-Cattoir V, Leclerc R. 2010. Beta lactams and Staphylococci. Courvalin P. Leclerc R, Rice LB. Antibigram. ESKA Publishing, ASM Press. 99-107
- 164- Ganesan A. Evaluation for a novel methicillin resistance (*mecC*) homologue in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates obtained from injured military personnel. *J. Clin. Microbiol.* 2013;51:3073–3075.
- 165- Petersen A. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the novel *mecC* gene in Denmark corroborates a zoonotic reservoir with transmission to humans. *Clin. Microbiol. Infect.* 2013;19:E16–E22.
- 166- Schaumburg F. Population dynamics among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Germany during a 6-year period. *J. Clin. Microbiol.* 2012;50:3186–3192.
- 167- Paterson G.K. Prevalence and characterisation of human *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in England. *J. Antimicrob. Chemother.* 2013
- 168-Basset P. Very low prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the *mecC* gene in western Switzerland. *J. Hosp. Infect.* 2013;83:257–259.
- 169- Edmond, M. B., S. E. Wallace, D. K. McClish, M. A. Pfaller, R. N. Jones, and R. P. Wenzel. 1999. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clin. Infect. Dis.* 29:239-244.
- 170-EARSS 2015 Raportu
- 171-Charani E, Cooke J, Holmes A. 2010. Antibiotic stewardship programmes-what's missing?. *J Antimicrob Chemother*, 65, 2275,-7.
- 172- Fowler VG, Jr, Olsen MK, Corey GR, Woods CW, Cabell CH, Reller LB, Cheng AC, Dudley T, Oddone EZ. 2003. Clinical identifiers of complicated *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Arch Intern Med* 163: 2066–2072.
- 173-van Hal SJ, Jensen SO, Vaska VL, Espedido BA, Paterson DL, Gosbell IB. 2012. Predictors of mortality in *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Microbiol Rev* 25:362–386.
- 174- Hall RM, Collis CM. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol Microbiol.* 1995 Feb;15(4):593-600.
- 175- Moura A, Henriques I, Ribeiro R, Correia A. Prevalence and characterization of integrons from bacteria isolated from a slaughterhouse wastewater treatment plant. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60:1243-50; PMID:17913715

- 176- Gu B, Tong M, Zhao W, Liu G, Ning M, Pan S, et al. Prevalence and characterization of class I integrons among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolates from patients in Nanjing, China. *J Clin Microbiol* 2007
- 177- Xu H, Su Z, Wang S, Dai X, Chen J, Kong F, et al. Four novel resistance integron gene-cassette occurrences in bacterial isolates from Zhenjiang, China. *Curr Microbiol* 2009
- 178- Crowley D, Daly M, Lucey B, Shine P, Collins JJ, Cryan B, et al. Molecular epidemiology of cystic fibrosis-linked *Burkholderia cepacia* complex isolates from three national referral centres in Ireland. *J Appl Microbiol* 2002
- 179- White PA, McIver CJ, Rawlinson WD. Integrons and gene cassettes in the enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:2658- 61
- 180- Antunes P, Machado J, Peixe L. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 and 2 integrons in *Salmonella enterica* isolates from different sources in Portugal. *J Antimicrob Chemother* 2006
- 181- Krauland MG, Marsh JW, Paterson DL, Harrison LH. Integron-mediated multidrug resistance in a global collection of nontyphoidal *Salmonella enterica* isolates. *Emerg Infect Dis* 2009; 15:388-96
- 182- Falbo V, Carattoli A, Tosini F, Pezzella C, Dionisi AM, Luzzi I. Antibiotic resistance conferred by a conjugative plasmid and a class I integron in *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains isolated in Albania and Italy. *Antimicrob Agents Chemother* 1999
- 183-Çiçek AÇ, Düzgün AÖ, Saral A, Kayman T, Çizmeci Z, Balcı PÖ, Dal T, Fırat M, Tosun İ, Altıntop YA, Çalışkan A, Yazıcı Y, Sandallı C. Detection of class 1 integron in *Acinetobacter baumannii* isolates collected from nine hospitals in Turkey. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2013 Sep;3(9):743-7.
- 184-Eraç B, Hoşgör-Limoncu M, Ermertcan Ş, Taşlı H, Aydemir Ş. Prevalence of blaPER-1 and integrons in ceftazidime-resistant Gram-negative bacteria at a university hospital in Turkey. *Jpn J Infect Dis*. 2013;66(2):146-8.
- 185-Çopur Çiçek A, Sandallı C, Budak EE, Yağmur G, Çizmeci Z, Ak S, Balcı PÖ, Şay Coşkun SU, Ay Altıntop Y, Fırat M, Sarı F, Çalışkan A, Yıldız N, Sancaktar M, Özgümüş OB. [Characterization of class 1 and class 2 integron gene cassettes in *Escherichia coli* strains isolated from urine cultures: a multicenter study]. *Mikrobiyol Bul*. 2016 Apr;50(2):175-85.
- 186-Ozgumus OB, Caylan R, Tosun I, Sandalli C, Aydin K, Koksali I. Molecular epidemiology of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates carrying IMP-1 metallo-beta-

lactamase gene in a University Hospital in Turkey. *Microb Drug Resist.* 2007 Fall;13(3):191-8.

187-Ozgumus OB, Sandalli C, Sevim A, Celik-Sevim E, Sivri N. Class 1 and class 2 integrons and plasmid-mediated antibiotic resistance in coliforms isolated from ten rivers in northern Turkey. *J Microbiol.* 2009 Feb;47(1):19-27.

188-Siriken B, Türk H, Yildirim T, Durupinar B, Erol I. Prevalence and characterization of *Salmonella* isolated from chicken meat in Turkey. *J Food Sci.* 2015 May;80(5):M1044-50.

189-Usta E, Eroğlu C, Yanık K1, Karadağ A, Güney AK, Günaydın M. [Investigation of the presence of class 1, 2, 3 integrons and their relationships with antibiotic resistance in clinical *Stenotrophomonas maltophilia* isolates]. *Mikrobiyol Bul.* 2015 Jan;49(1):35-46.

190- Z. Xu, L. Shi, C. Zhang, L. Zhang, X. Li, Y. Cao, L. Li and S. Yamasaki. Nosocomial infection caused by class 1 integron-carrying *Staphylococcus aureus* in a hospital in South China. *Clin Microbiol Infect.* 2007 Oct;13(10):980-4.

191-Yang Deng, Xuerui Bao, Lili Ji, Lei Chen, Junyan Liu, Jian Miao, Dingqiang Chen, Huawei Bian, Yanmei Li,corresponding author and Guangchao Yu. Resistance integrons: class 1, 2 and 3 integrons. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2015; 14: 45.

192-Parasto Veise, Rashid Ramazanzadeh, Zahra Dailami Khiababi, Bahare Derakhshi, Nour Amirmozafari. Identification of Class I Integrons Gene in *Staphylococcus* Strains Isolated from Clinical Samples. *Cell Biology* Volume 1, Issue 3, September 2013, Pages: 24-27

193-NP Marathe, SS Nagarkar, AA Vaishampayan, MH Rasane, SA Samant, V Dohe, A Kagal, YS Shouche, N Deshpande. High prevalence of class 1 integrons in clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from India. *Indian Journal of Medical Microbiology.* 2015 Volume : 33 Issue :2 Page : 231-236

194- Paulsen IT, Littlejohn TG, Rådström P, Sundström L, Sköld O, Swedberg G, et al. The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:761-8.

195-Xu Z, Li L, Shi L, Shirliff ME. Class 1 integron in *Staphylococci*. *Mol Biol Rep* 2011;38:5261-79.

196- Akif Koray Guney, Tuba Yildirim, Belma Durupinar. A Study on Class I Integrins and Antimicrobial Resistance among Clinical Staphylococci Isolates from a Turkish Hospital. Clin Microbial 2014, 3:6.

