

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus*
İzolatlarının “Staphylococcal Cassette Chromosome
mec”(SCC*mec*) Analizi ile Moleküler Tiplendirilmesi**

MERYEM BAĞSEVER

MİKROBİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2011

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2008970023

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus*
İzolatlarının “Staphylococcal Cassette Chromosome
mec”(SCC*mec*) Analizi ile Moleküler Tiplendirilmesi**

MİKROBİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

MERYEM BAĞSEVER

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. ZEYNEP GÜLAY

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından
2010.KB.SAG. 002 sayı ile desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2008970023

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
TABLO DİZİNİ.....	v
ŞEKİL DİZİNİ.....	vii
KISALTMALAR	viii
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ VE AMAC	5
2. GENEL BİLGİLER	8
2.1. Tarihçe ve sınıflandırma	8
2.2. “Staphylococcus aureus”	8
2.2.1. Üreme ve Tür Özellikleri.....	8
2.2.2. Yapısal Bileşenleri.....	9
2.2.2.1. Mikrokapşül Yapısı	9
2.2.2.2. Hücre Duvarı	9
2.2.3. Virulans Faktörleri.....	10
2.2.3.1. Hücre Duvar Elemanları	10
2.2.3.2. Enzimleri.....	11
2.2.3.3. Toksinler	12
2.2.4. Virulans Genlerinin Düzenlenmesi	16
2.3. “Staphylococcus aureus”’un Yaptığı Hastalıklar	17
2.4. Stafilokokların Laboratuvar Tanısı	19
2.4.1. Gram Boyama ve mikroskopik inceleme	19
2.4.2. Koloni Morfolojisi	19
2.4.3. Katalaz Testi	19
2.4.4. S. aureus’u diğer stafilokoklardan ayıran yöntemler.....	19
2.4.4.1. Koagülaz Testi	19
2.4.4.2. Lam Koagülaz Testi	20
2.4.4.3. Tüp Koagülaz Testi.....	20
2.4.4.4. Mannitol Hidrolizi	20

2.4.4.5. <i>Protein A</i> Saptanması	21
2.4.4.6. <i>Hızlı Termonükleaz Testi</i>	21
2.5. Stafilokok İnfeksiyonlarının Tedavisinde Kullanılabilen Antibiyotikler	22
2.6. Stafilokoklarda Antibiyotik Direnç Mekanizmaları ve Metisilin Direnci	23
2.6.1. Beta Laktam Antibiyotiklere Genel Direnç Mekanizmaları	23
2.6.1.1. <i>İlacın hedefine etkin konsantrasyonda ulaşmasının engellenmesi:</i>	23
2.6.1.2. <i>Hedef Penisilin Bağlayan Protein (PBP) moleküllerinin değişmesi</i>	23
2.6.1.3. <i>İlacı inaktive eden beta laktamazların üretimi</i>	24
2.6.2. Glikopeptit Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları	25
2.6.3. Aminoglikozid Direnci	25
2.6.4. Makrolid, Linkozamid, Streptogramin(MLS _B) Direnci	26
2.6.5. Kloramfenikol Direnci	27
2.6.6. Sulfonamid ve Trimetoprim Direnç	27
2.6.7. Kinolon Direnci	27
2.6.8. Rifampin Direnci	27
2.6.9. Metisilin Direnci	28
2.6.9.1. <i>Penisilin Bağlayan Protein 2a (PBP 2a)</i>	28
2.6.9.2. <i>Heterojen – Homojen Direnç</i>	28
2.6.9.3. <i>mecA Gen Ekspresyonu</i>	29
2.6.9.4. <i>“Staphylococcal chromosome cassette mec” (SCCmec)</i>	29
2.7. Metisiline Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>'un Tiplendirme Yöntemleri	34
2.7.1. Fenotipik yöntemler	34
2.7.1.1. <i>Antimikrobial Duyarlılık Testleri</i>	35
2.7.1.2. <i>Faj tiplendirme</i>	35
2.7.1.3. <i>Multilokus Enzim Elektroforezi (MLEE)</i>	36
2.7.1.4. <i>Zimotiplendirme</i>	36
2.7.2. Genotipik yöntemler	37
2.7.2.1. <i>Plazmid Analizi</i>	37
2.7.2.2. <i>Kromozomal DNA'nın Makrorestriksiyon Analizi ve [(“Pulsed-Field Gel Electrophoresis” (PFGE)]</i>	37
2.7.2.3. <i>Restriksiyon Enzim Analizi (REA)</i>	39
2.7.2.4. <i>Ribotiplendirme</i>	39

2.7.2.5. “Randomly Amplified Polymorphic DNA” (RAPD) (Arbitrarily Primed (AP PCR)	40
2.7.2.6. <i>coa</i> (Koagülaz) Tiplendirme Yöntemi.....	41
2.7.2.7. “Multi Locus Sequence Typing” (MLST).....	41
2.7.2.8. <i>spa</i> Tiplendirme	43
3. GEREK VE YÖNTEM	45
3.1. Araştırmanın Tipi	45
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	45
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi	45
3.4. Çalışma Materyali	45
3.5. Araştırmanın Değişkenleri	45
3.6. Veri Toplama Araçları	45
3.6.1. Kullanılan cihazlar ve sarf malzemeleri	45
3.6.2. İzolatlar.....	48
3.6.3 Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi	48
3.6.4. Metisiline Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) kolonilerinden DNA eldesi.....	49
3.6.4.1. <i>Akromopeptidaz Yöntemi ile DNA Eldesi</i>	49
3.6.5. Multipleks Polimeraz Zincir Tepkimesi(PZT) için Kullanılan Malzemeler	49
3.6.6. Stafilokokkal Kaset Kromozom <i>mec</i> (SCC<i>mec</i>) Tiplerinin Multipleks PZT ile Belirlenmesi	50
3.6.6.1. <i>SCCmec</i> Multipleks PZT için Kullanılan Öncüller	50
3.6.6.2. Öncül karışımının hazırlanması	51
3.6.6.3. <i>SCCmec</i> Multipleks PZT Reaksiyon Karışımının Hazırlanması	52
3.6.6.4. <i>SCCmec</i> Multipleks PZT – Amplifikasyon Programı.....	52
3.6.6.5. <i>Sonuçların Değerlendirilmesi</i>	52
3.6.7. Ito Yöntemi ile SCC<i>mec</i> PZT Uygulaması	54
3.6.7.1. <i>SCCmec</i> PZT için Kullanılan Öncüller	54
3.6.7.2. <i>SCCmec</i> PZT Karışımının Hazırlanması.....	55
3.6.7.3. <i>SCCmec</i> PZT – Amplifikasyon Programı	55
3.6.7.4. <i>Sonuçların değerlendirilmesi</i>	55
3.6.8. <i>pvl/nuc</i> Multipleks PZT Uygulaması	56
3.6.8.1. <i>pvl/nuc</i> Multipleks PZT için Kullanılan Öncüller	56

3.6.8.2. <i>pvl/nuc</i> Multipleks PZT Karışımının Hazırlanması.....	56
3.6.8.3. <i>pvl/nuc</i> Multipleks PZT – Amplifikasyon Programı	57
3.6.8.4. Sonuçların değerlendirilmesi	57
3.6.9. Makrorestriksiyon Analizi “Pulsed Field” Jel Elektrofrezisi (PFGE)	
Uygulaması	57
3.6.9.1. Kullanılan tamponlar ve karışımlar	57
3.7. Araştırma Planı ve Takvimi	63
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi	64
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları	64
3.10. Etik Kurul Onayı	64
4. <u>BULGULAR</u>	65
5. <u>TARTIŞMA</u>	90
6. <u>SONUÇ VE ÖNERİLER</u>	101
7. <u>KAYNAKLAR</u>	102
8. <u>EKLER</u>	112
8.1. Etik Kurul Onayı	112
8.2. Özgeçmiş	114

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: Stafilokok infeksiyonlarının tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin gruplandırılması	22
Tablo 2: SCC <i>mec</i> tiplerinin içerdikleri <i>ccr</i> gen kompleks tipleri ve <i>mec</i> gen kompleks sınıfları.....	32
Tablo 3: Oksasilin ve sefoksitin disk difüzyon yönteminde kullanılan zon çap değerleri.	48
Tablo 4: SCC <i>mec</i> tayininde kullanılan multipleks PZT öncülleri, öncül dizileri, elde edilen ürün büyüklükleri ve karşılık gelen SCC <i>mec</i> tipleri.	50
Tablo 5: Öncül karışımı için kullanılan öncül konsatrasyonları ve hacimleri.....	51
Tablo 6: SCC <i>mec</i> tiplerinin belirlenmesinde kullanılan gen bölgeleri ve onları simgeyen ürün büyüklükleri.....	53
Tablo 7: Ito yöntemi-SCC <i>mec</i> PZT için kullanılan öncüller	54
Tablo 8: Ito yönteminde kullanılan öncül kombinasyonları, öncül çiftlerinin simgelediği <i>ccr</i> gen kompleks tipleri ve elde edilen ürün büyüklükleri	54
Tablo 9: <i>pvl/nuc</i> multipleks PZT için kullanılan öncüller	56
Tablo 10: PFGE profillerinin Tenover kriterlerine göre yorumlanması.....	61
Tablo 11: Merkezlere göre SCC <i>mec</i> dağılımları	66
Tablo 12: Şehirlere göre SCC <i>mec</i> tiplerinin dağılımları	66
Tablo 13: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nden alınan suşların yıllara göre SCC <i>mec</i> dağılımı.....	67
Tablo 14: Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nden alınan suşların yıllara göre ..	67
Tablo 15: Hacettepe Üniversitesi Çocuk Hastanesi'nden alınan suşların yıllara göre SCC <i>mec</i> dağılımı.....	68
Tablo 16: İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi'nden alınan suşların yıllara göre SCC <i>mec</i> dağılımı.....	68
Tablo 17: SCC <i>mec</i> tip IV/IVE kaset tipine sahip MRSA izolatlarının izole edildikleri örnek türüne göre dağılımları	69
Tablo 18: SCC <i>mec</i> Tip IV/IVE izolatları arasında <i>pvl</i> gen varlığının dağılımı	71
Tablo 19: PVL-pozitif MRSA suşlarının izole edildiği hasta ve suş özellikleri	72
Tablo 20: PFGE tipleri ve içerdikleri izolat sayılarının merkezlere göre dağılımı	73
Tablo 21: PFGE analizi ile saptanan 13 farklı pulsotipin SCC <i>mec</i> tiplerine göre dağılımı....	74

Tablo 22: Çalışmaya dahil edilen izolatların özellikleri, antibiyotik duyarlılıkları, SCC <i>mec</i> ve PFGE analiz sonuçları	80
--	----

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1: SCCmec elemanında yer alan genlerin SCCmec üzerindeki konumları.....	31
Şekil 2: SCCmec tiplerinin (tip I-VIII) ve varyantlarının genetik yapılarını gösteren diyagram	33
Şekil 3: Protein A gen haritası.	43
Şekil 4: SCCmec multipleks PZT yöntemi ile MRSA izolatlarının SCCmec tiplendirilmesi..	65
Şekil 5: Çalışmamızdaki bazı izolatlara ait SCCmec tiplerini doğrulamak amacıyla yapılan Ito yöntemine ait sonuçlar.....	70
Şekil 6: Çalışmamızdaki bazı izolatlara ait <i>pvl/nuc</i> multipleks PZT sonuçları.	71
Şekil 7: SCCmec tip IV/IVE taşıyan MRSA izolatlarının PFGE paternlerinin filogenetik analizi ve dendogram görüntüsü.....	75
Şekil 8: İstanbul Üniversitesi MRSA izolatlarının PFGE paternlerinin filogenetik analizi ve dendogram görüntüsü	76
Şekil 9: Marmara Üniversitesi MRSA izolatlarının PFGE paternlerinin filogenetik analizi ve dendogram görüntüsü.	77
Şekil 10: Hacettepe Üniversitesi MRSA izolatlarının PFGE paternlerinin filogenetik analizi ve dendogram görüntüsü.	78
Şekil 11: Dokuz Eylül Üniversitesi MRSA izolatlarının PFGE paternlerinin filogenetik analizi ve dendogram görüntüsü.....	78

KISALTMALAR

S. aureus: *Staphylococcus aureus*

MRSA: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*: Methicillin resistant *S. aureus*

MSSA: Metisilin duyarlı *Staphylococcus aureus*: Methicillin susceptible *S. aureus*

KNS: Koagülaz negatif stafilokok

TK-MRSA: Toplum kaynaklı MRSA

HK-MRSA: Hastane kaynaklı MRSA

MSCRAMM: Microbial surface component reacting with adherence matrix molecules

PFGE: Değişimli alan elektroforezi; “Pulsed-field” jel elektroforezi; Metinde, DNA makrorestriksiyon analizi olarak da geçmektedir.

MLEE: Multilocus enzyme electrophoresis

RAPD-PCR: Random amplification of polymorphic DNA-PCR

AP-PCR: Arbitrarily-primed Polimerase Chain Reaction

MLST: Multilocus sequence typing

PZT: Polimeraz Zincir Tepkimesi

spa: Stafilokokkal Protein A geni; ve bu gen ile yapılan analiz

SCCmec: Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*

ccr: Cassette Chromosome Recombinase

PBP2A: Penisilin Bağlayan Protein 2A

TSST: Toxic Shock Syndrome Toxin

SSR: Short Sequence Repeat

ST: Sequence Type

eBURST: MLST için kullanılan “Based Upon Related Sequence Types” programı

PVL: Panton-Valentin Lökosidin

ETA-ETB: Eksolyatif toksin A-B

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

CDC: Center of Diseases Control and Prevention

TEŐEKKÜR

Yüksek lisans eğitimin süresince ve tezimin hazırlanması sırasında bilimsel desteklerini esirgemeyen, bilgisiyle ve anlayışıyla her zaman yanımda olan Sayın danışman hocam Prof. Dr. Zeynep Gülay'a,

Tezimde kullandığım izolatları gönderen Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi'nden Sayın Prof. Dr. Deniz Gür'e, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi'nden Sayın Prof. Dr. Çiğdem Kayacan'a, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden Sayın Prof. Dr. Güner Söyletir'e,

Yetişmemde emeği geçen Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilimdalı hocalarıma, manevi destekleri ile yanımda olan yüksek lisans, doktora ve uzmanlık eğitimi alan arkadaşlarıma, bölüm çalışanlarına,

Eğitim hayatım boyunca hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, her zaman maddi ve manevi destekleri ile yanımda olan aileme ve ev arkadaşım Gülcan Faika Ülvey'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Meryem Bağsever

Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* İzolatlarının “Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*”(SCC*mec*) Analizi ile Moleküler Tiplendirilmesi

Meryem BAĞSEVER, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilimdalı İnciraltı/İzmir

ÖZET

Amaç: *Staphylococcus aureus*, gerek virulans mekanizmaları gerekse antimikrobiyal ajanlara karşı hızla direnç kazanma yeteneğinde olması nedeniyle yaşamı tehdit eden ciddi enfeksiyonlara yol açabilen bir mikroorganizmadır. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşları birçok ülkede hastane enfeksiyonlarının başlıca sebebidir. MRSA klonlarının sınır tanımadan yayılma özelliğinden dolayı bu klonların genotipik özelliklerinin ve evrimsel gelişiminin, farklı coğrafik bölgelerden izole edilen suşların genetik ve evrimsel ilişkilerinin araştırılması önem kazanmıştır. Bu çalışmada, 2006-2009 yıllarında Dokuz Eylül Üniversitesi, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Marmara Üniversitesi ve Hacettepe Üniversitesi (Çocuk) Hastanelerinde çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş MRSA izolatlarının “Stafilokok Kaset Kromozom *mec*” (Staphylococcal Cassette Chromosome (SCC) *mec*) tiplerinin belirlenmesi, “Panton-Valentine Lökosidin” (*pvl*) gen varlığının araştırılması, aynı merkez ve farklı merkezlerdeki moleküler epidemiyolojik ilişkilerin makrorestriksiyon analiz yöntemi ile saptanması amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışmaya, Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi’nden 100 izolat, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi’nden 21 izolat, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi’nden 34 izolat ve Hacettepe Üniversitesi Çocuk Hastanesi’nden 52 izolat olmak üzere, her hastadan tek bir izolat olacak şekilde, toplam 207 izolat dahil edilmiştir. İzolatların identifikasyonu, her merkezin kendi mikrobiyoloji laboratuvarlarında yapılmıştır. Tüm izolatların metisilin direnci “CLSI” (Clinical and Laboratory Standarts Institute) önerilerine uygun olarak merkezimizde tekrar çalışılmıştır. SCC*mec* tipleri ve PVL varlığı iki farklı multipleks polimeraz zincir tepkimesi (PZT) kullanılarak araştırıldı. İzolatlar arasındaki klonal ilişki ve merkezlerin kendi içlerindeki moleküler epidemiyolojik durumu *SmaI* enzimi ile restriksiyonu takiben PFGE yöntemi ile belirlenmiştir.

Bulgular: Çalışmaya alınan izolatların 1’i (%0.5) SCC*mec* tip II, 7’si (%3.4) SCC*mec* tip III, 179’ u (%86.5) SCC*mec* tip III varyantı, 14’ ü (% 6.7) SCC*mec* tip IV ve 6’ sı (% 2.9)

SCC*mec* tip IVE olarak saptanmıştır. İzolatların 5'inde (% 2.4) *pvl* gen varlığı tespit edilmiştir. PVL pozitif suşların tümü tip IV SCC*mec* elemanı taşımaktadır. Ancak tüm SCC*mec* tip IV/IVE' lerin tümü *pvl* geni taşımamaktadır. Tip IV dışındaki diğer SCC*mec* tiplerinde *pvl* geni bulunmamıştır. PFGE paternlerine göre izolatların, 13 farklı pulstipe ayrıldığı saptanmıştır. İzolatların tümü değerlendirildiğinde %87.4' ünün dominant bir klona (A klonuna) ait olduğu belirlenmiştir. Bu durum özellikle SCC*mec* tip III varyantı taşıyan izolatlar için geçerlidir. Buna karşın, tip IV/IVE SCC*mec* elemanı taşıyan suşların hiçbirinin bu klona ait olmadığı saptanmıştır. SCC*mec* tip IV/IVE taşıyan izolatların %55'inin K pulstipi içerisinde yer aldığı belirlenmiştir.

Sonuç: Farklı merkezlerden izole edilen MRSA izolatlarının büyük bir çoğunluğunun SCC*mec* tip III varyantı taşıdığını saptadığımız çalışmamızda, SCC*mec* tip IV/IVE taşıyan izolatların tespit edilmesi ve bu izolatların sadece bir kısmının *pvl* geni taşıması çalışmamızın dikkat çekilmesi gereken noktalarıdır. Hastane kökenli MRSA'larda, toplum kökenli MRSA SCC*mec* tipi olarak bilinen tip IV/IVE SCC*mec* elemanın bulunması, MRSA epidemiyolojisindeki değişimi yansıtmaktadır. SCC*mec* tip IV MRSA izolatlarının virülans faktörü olan *pvl* geninin, izolatların bazılarında tespit edilmemesi de SCC*mec* tip IV ile PVL arasındaki bağlantının kesinliğinin sorgulanması gerektiğini göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), "Stafilokokkal Kaset Kromozom *mec*" (SCC*mec*), Panton-Valentine Lökosidin (PVL), "Pulsed Field" Jel Elektroforez.

Molecular Typing of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates Using Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*) Analysis

ABSTRACT

Objective: *Staphylococcus aureus*, with its virulence mechanisms and capacity to develop resistance against antimicrobial agents, is an organism that can cause serious, life-threatening infections. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains are the leading cause of hospital-acquired infections in many countries. Since MRSA clones are easily spread throughout the world, it has become even more important to investigate the genotypic and evolutionary characteristics of these clones, along with the genetic and evolutionary relations between the strains isolated from different geographical regions.

The aim of the present study was to determine the Staphylococcal Cassette Chromosome (SCC) *mec* types of MRSA strains isolated from various clinical samples obtained from hospitals of Dokuz Eylül University, İstanbul Medical School, Marmara University and the pediatric hospital of Hacettepe University, to investigate the presence of Panton-Valentine Leukocidin (*pvl*) gene in these isolates and to determine the molecular epidemiological relations in each center and between different centers using macrorestriction analysis.

Method: A total of 207 isolates including 100 isolates from Dokuz Eylül University, 21 isolates from İstanbul University Medical School, 34 isolates from Marmara University Medical School and 52 isolates from Hacettepe University Pediatric Hospital were included in the study. There were no duplicate isolates from the same patients. The identification of the isolates was made in the respective microbiology laboratories of each center. The methicillin resistance of all isolates was tested again in our center, according to the “CLSI” (Clinical and Laboratory Standards Institute) recommendations. SCC*mec* types and the presence of PVL were investigated using multiplex polymerase chain reaction (PCR). The clonal relation between the isolates and the epidemiological status of each center was determined using the PFGE method, following *Sma*I enzyme restriction.

Results: Of the isolates included in the study, 1 (0.5%) harbored SCC*mec* type II, 7 (3.4%) had SCC*mec* type III, 179 had SCC*mec* type III, 12 (6.7%) carried SCC*mec* type IV and 6 (2.9%) carried SCC*mec* type IVE. *pvl* gene was identified in 5 (2.4%) isolates. All PVL-

positive strains contained the type IV *SCCmec* element. However, *pvl* gene was not present in all *SCCmec* type IV/IVE isolates. Except for type IV, *pvl* gene was not detected in the *SCCmec* types. It was determined that the isolates had 13 different pulsotypes according to their PFGE patterns. Overall, 87.4% of the isolates belonged to a dominant clone (the A clone). However, it was also determined that none of the strains carrying type IV/IVE *SCCmec* elements belonged to this clone. Of the isolates harboring *SCCmec* type IV/IVE, 55% were in the K pulsotype.

Conclusion: The important aspects of our study, in which the great majority of the MRSA isolates harbored the *SCCmec* type III variant, are the detection of *SCCmec* type IV/IVE isolates and the finding that only a small part of these isolates contained the *pvl* gene. Additionally, the fact that the type IV/IVE *SCCmec* element, which is known as a community-acquired MRSA *SCCmec* type, was detected in the hospital-acquired MRSA strains reflects the change in the epidemiology of MRSA. On the other hand, the finding that the *pvl* gene, which is a virulence factor of *SCCmec* type IV MRSA isolates, was not present in some isolates, points out to the necessity of querying the certainty of the relation between of *SCCmec* type IV and PVL.

Keywords: Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (*SCCmec*), Panton-Valentine Leukocidin (PVL), Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE).

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Staphylococcus aureus, dünyada hem hastane kökenli hem de toplum kökenli infeksiyonlara neden olan önemli bir insan patojenidir (1,2). Bu patojenin tedavide kullanılan antibiyotiklere hızla direnç kazanması, infeksiyonlardaki mortalite ve morbiditeyi arttırmaktadır. *S.aureus*'un tedavide kullanılan tüm antibiyotiklere direnç geliştirme yeteneği bulunmakla birlikte, bunlar arasında en önemlilerinden biri metisilin (okasilin) direncidir. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), infeksiyonlarının ilk kez 1961'de İngiltere'de tanımlanmasından bu yana, MRSA tüm dünyada, özellikle hastanelerde önemli bir problem haline gelmiştir (3).

İnvazif izolatlarla ilgili bilgilerin toplandığı EARSS verilerine göre, Avrupa ülkelerinin üçte birinde MRSA oranı halen %25'in üzerindedir. En yüksek MRSA oranları, Malta ve Portekiz'den (%50'nin üzerinde) bildirilmiştir. MRSA, tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de önemli hastane infeksiyon etkenleri arasında yer almaktadır. Ülkemiz 2003-2009 EARSS verilerine bakıldığında, *S.aureus* izolatlarının metisiline direnç oranlarının %37 ile %43 arasında değiştiği görülmektedir. 2003 yılındaki yüksek MRSA prevalansının, 2009 yılında azaldığı gözlenmiştir (4, 5). Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi'nde ise 2006-2010 yılları arasında izole edilen *Staphylococcus aureus* izolatlarının %19.6 (2010) - %44.7 (2006) 'sinin metisiline dirençli olduğu saptanırken yoğun bakım hastalarında bu oranın % 51.6 (2010) - %67.6 (2006) şeklinde değiştiği görülmektedir.

Metisiline karşı direnç, *mecA* geninin kodladığı ve beta laktam ajanlara afinitesi düşük olduğu için bağlanmayan yeni bir penisiline bağlanan protein (PBP2a)'nın üretimine bağlı olarak ortaya çıkmaktadır (6). *mecA* geni "Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*" (SCC*mec*), olarak adlandırılan bir hareketli genetik eleman tarafından taşınmaktadır. SCC*mec* elemanları, içerisinde yer alan ve beta laktam direnç fenotipinden sorumlu *mec* gen kompleksi ile SCC*mec* elemanının hareketinden sorumlu *ccr* gen komplekslerinin farklı yapı ve rekombinasyonlarına göre sınıflandırılmaktadır (7,8). Günümüze kadar 8 farklı tip SCC*mec* elemanı (Tip I-VIII) tanımlanmıştır. Bunlardan, tip I, II, III ve VIII genellikle hastane kökenli izolatlarda saptanırken tip IV, V, VI ve VII toplum kökenli MRSA izolatlarında bulunmaktadır (6, 9, 10).

MRSA izolatlarının hastane ve toplumdaki yayılımlarını izlemekte birçok farklı

yöntem kullanılmaktadır. Pulsed-field jel elektroforezi (PFGE), spa gen sekanslama ve multilokus sekans tiplendirme gibi yöntemlerin yanı sıra SCCmec tiplendirme tekniği de hastane kökenli ve toplumsal kökenli MRSA klonlarındaki epidemiyolojik değişikliği yansıtmak amacıyla uygulanmaktadır. Hatta, *S.aureus* klonlarının adlandırılmasında kromozomal veriler (örneğin; multilokus sekans tiplendirme ile tanımlanan sekans tipi, ST239) ve SCCmec tipi kullanılmaktadır (6,7). Örneğin, son yıllarda tip IV SCCmec elemanının sebep olduğu hastane kökenli MRSA infeksiyonlarının artış göstermesi ve bu suşların hastane ortamlarında yayılmaya başlaması, MRSA'nın değişen epidemiyolojisinin göstergesi olmuştur (11,12).

Bunun yanı sıra *S. aureus* izolatlarının virulansını artıran, doku ve yumuşak doku enfeksiyonlarına sebep olan Panton Valentin Lökosidin (PVL) toksini, genellikle toplum kökenli MRSA izolatlarında sıklıkla SCCmec tip IV ile birlikte saptanmaktadır. Ancak, son zamanlarda yapılan çalışmalar, *pvl* geninin SCCmec tip IV ve TK- MRSA için iyi bir belirteç olmadığını göstermektedir. Uluslararası literatürde özellikle TK-MRSA ile ilişkili olduğu bilinen PVL'nin, hastane kökenli MRSA izolatlarında da saptanabildiğinden söz edilmektedir (13).

2003 yılında Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi izolatlarıyla yapılan bir çalışmadan sonra ülkemizde MRSA izolatlarının moleküler epidemiyolojisi ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Ancak yapılan çalışmalar genellikle yerel izolatlar ile kısıtlı olduğundan ülkemizde bu konu ile ilgili geniş kapsamlı bir çalışma bulunmamaktadır. 2002-2004 yılları arasında yapılan çalışmalarda Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi MRSA izolatları arasında bir klonal tipin hakim olduğu, bunun İskoç MRSA Referans Laboratuvarı arşivine göre, dünyadaki diğer klonlardan farklı olduğu belirlenmiştir. Yine aynı çalışmada bunların SCCmec Tip III (tanımlanmamış bir varyant) taşıdığı, ST 239 klonunun üyesi olduğu ve *spa* tipinin de WGKQA (t 030) olduğu gösterilmiştir (15). Bu çalışmaya alınan Dokuz Eylül klonu üyeleri PVL üretmemektedir. 2003-2006 yıllarına ait bir çalışmada, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Mikrobiyoloji Laboratuvarında izole edilen 385 MRSA suşunun SCCmec tipleri belirlenmiş, bu suşlarda PVL varlığı araştırılmış, elde edilen moleküler verilerin antibiyotik duyarlılık paternleri ile uyumu incelenmiştir. Çalışmaya alınan izolatlar arasında SCCmec tip III taşıyanların çoğunlukta olduğu bulunurken izolatlar arasında *pvl* gen varlığı % 1.3 oranında saptanmıştır (15).Yine MRSA suşlarının moleküler tiplendirilmesi ile ilgili bir

araştırmada, 2004-2005 yılları arasında Hacettepe Üniversitesi Erişkin Hastanesi'nde izole edilen hastane kaynaklı 110 MRSA suşunun moleküler özellikleri ile klonalite ve antibiyotik duyarlılığının ilişkisi araştırılmıştır. Çoklu antibiyotik direncine sahip bu izolatların büyük çoğunluğunun SCC*mec* tip III veya varyant tip IIIB taşıdığı saptanmış ve izolatların %12.7' sinde *pvl* geni bulunmuştur (16). 2003-2005 İstanbul Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde ve 2002-2004 yılları arasında Ankara Üniversitesi İbni Sina Hastanesi'nde izole edilmiş 304 *S. aureus* izolatının SCC*mec* tipleri, PVL üretimi ve klonal ilişkileri tespit edilmiştir. Bu çalışmada, hastane kökenli MRSA olarak tanımlanan izolatlar arasında tip III SCC*mec* baskın tip olarak belirlenirken toplum kökenli MRSA izolatlarının %50 sinde SCC*mec* tip III elemanı saptanmış, PVL pozitiflik oranının ise toplum kökenli MRSA izolatlarında daha fazla olduğu belirlenmiştir (17). Sekiz üniversite hastanesinin yer aldığı diğer bir çalışmada ise, 2005-2006 yıllarında izole edilen 159 *S. aureus* izolatından 54'ünün MRSA olduğu saptanırken bu izolatların birbirleri ile olan genetik ilişkileri çeşitli moleküler yöntemlerle incelenmiştir. İncelemeler sonucunda PFGE analizine göre 23 farklı genotipin saptandığı, MRSA izolatlarının tümünün SCC*mec* tip III taşıdığı, izolatların hiçbirinde *pvl* geni bulunmadığı tespit edilmiştir (18).

Bu bilgiler ışıkında bu tez çalışmasında, hem Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi MRSA izolatlarının günümüze kadar durumunun değerlendirilmesi hem de farklı merkezlerden (İzmir, Ankara, İstanbul) izole edilen MRSA izolatlarının metisilin direncinden sorumlu *mec A* genini taşıyan “Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*” (SCC*mec*) tiplerinin belirlenmesi, Panton Valentin Lökosidin (PVL) varlığının araştırılması ve klonal ilişkilerinin DNA makrorestriksiyon analizi ile ortaya konması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe ve sınıflandırma

Stafilokoklar ilk kez 1878 yılında Robert Koch tarafından tanımlanmıştır. 1881'de İskoçyalı cerrah Alexander Ogston stafilokokların fare ve kobaylar için patojen olduğunu saptamıştır. Bu bakteriler, üremeleri esnasında birbirinden ayrılmayıp üzüm salkımına benzeyen düzensiz kümeler oluşturduklarından dolayı Alexander Ogston bu bakterilere eski Yunanca da üzüm salkımı anlamına gelen 'Staphyle' ismini vermiştir (19). Hastalık etkeni olarak ise ilk kez 1884 yılında Rosenbach tarafından hasta örneklerinden izole edilmiştir (20).

Önemli bir enfeksiyon etkeni olan *Staphylococcus*, Micrococcaceae ailesi içinde klinik açıdan en önemli genustur. *Staphylococcus* genusu 35 türden ve 17 alttürden meydana gelmektedir. Bu türlerin 17'si insan klinik örneklerinden üretilmiştir. Laboratuvarında diğer stafilokok türlerinden koagülaz üretme özelliği ile ayrılan *Staphylococcus aureus*, en patojen stafilokok türüdür (21, 22).

2.2. “*Staphylococcus aureus*”

2.2.1. Üreme ve Tür Özellikleri

S. aureus, mikroskopik olarak 0.5-1.7 µm çapında, Gram pozitif kok şeklinde görülen bir bakteri türüdür. Koklar tekli, ikili, dörtlü hücreler halinde bulunabilirler, üç veya dört hücreden oluşan kısa zincirler halinde görülebilirler (19). Birden fazla düzlemde bölündüğü ve birbirinden ayrılmadığından tipik üzüm salkımı görünümüne düzensiz kümeler oluşturur (23).

Hareketsiz olan *S. aureus*, fakültatif anaerob olup spor oluşturmaz. Üreme ısı aralığı 18-45 °C'de olan bu bakterinin optimal üreme ısı 37 °C dir. Optimal üreme pH'sı ise 7.4'tür (21,23).

S. aureus, seçici olmayan katı besiyerleri (nutrient agar, triptik soy agar, beyin kalp infüzyon agar) dahil birçok besiyerinde ürer. Kanlı besiyerinde daha iyi çoğalan *S. aureus* izolatları %7.5-10 NaCl içeren besiyerlerinde üreyebilirler (24). Kanlı agarda 24 saatlik inkübasyon sonunda yuvarlak, düzgün yüzeyli, 1-4 mm çapında, hafif konveks S koloniler yaparlar (20). *S. aureus* izolatlarının çoğu, hücre zarındaki karotenoid yapılı pigmentleri nedeni ile altın sarısı renginde koloni oluştururlar. Birçok izolat at, koyun ya da insan kanlı

besiyerlerinde beta hemoliz yapar (21,24).

Katalaz pozitif olan *S. aureus*, glukoz ve mannitol başta olmak üzere birçok karbonhidratı ve şeker alkollerini fermente ederek çoğunlukla laktik asit oluşturur. Mannitol fermentasyonu *S. aureus* için ayırt edici bir özelliktir (21,22,24).

2.2.2. Yapısal Bileşenleri

2.2.2.1. Mikrokapsül Yapısı

Klinik *S. aureus* izolatlarında polisakkarit yapısında bir mikrokapsül bulunmaktadır. Bu kapsül bakteriyi polimorfonükleer lökositlere ve çoğalan mononükleer hücrelere karşı korumaktadır. Kapsüller polisakkarit immunitiplendirmesine göre günümüze kadar 11 farklı kapsül tipi tanımlanmıştır. Önemli klinik izolatların % 70-80'i kapsüller serotip 5 ve 8 de yer almaktadır. Bu iki kapsül tipi, özellikle de tip 8'in, *S. aureus*'un Toksik Şok Sendrom Toksini üretimi ile bağlantılı olduğu, oksasiline dirençli *S. aureus* izolatlarının büyük bir kısmının ise kapsüller serotip 5 ekspresyonu yaptığı gösterilmiştir (21).

2.2.2.2. Hücre Duvarı

Stafilokok hücre duvarının başlıca yapısal bileşeni, peptid çapraz bağlı glikan zincirlerinden oluşan peptidoglikan tabakasıdır. Glikan zincirleri, yaklaşık 10-12 N-asetil glukozamin (NAG) ve N-asetil muramik asit (NAM) ünitelerinin dönüşümlü olarak dizilmeleri ile oluşan disakkarit zincirlerinden oluşmaktadır. L-alanin, D-glutamik asit, L-lizin ve D-alanin D-alanin aminoasitleri NAM'a bağlı peptid zincirini meydana getirir. Stafilokok hücre duvarında bir penta peptid zincirde dördüncü pozisyonda bulunan D-alaninin karboksi terminali ile, bir diğer pentapeptiddeki L-lizinin amin grubu pentaglisin köprüleri aracılığı ile çapraz bağlanır (23). Çapraz bağlar hücre duvarının sağlamlığını belirler. Bu bağların yapısı türler arasında farklılık göstermektedir. *S. aureus*'da çapraz bağlantı oranı yüksek olması bakterinin lizozim enzimine karşı dirençli olmasını sağlamaktadır (25). Peptidoglikan tabakanın dışında hücre duvarının diğer önemli bileşeni olan teikoik asit bulunmaktadır. Teikoik asitin fibronektine bağlanma özelliği, stafilokokların mukozal yüzeylere tutunabilmesini sağlar (22).

Hücre duvar yapısında yer alan diğer bileşen ise Protein A'dır. Bu protein, *S. aureus* hücre duvar peptidoglikanına kovalan olarak bağlanan ve virulans açısından oldukça önemli olan bir yapıdır. IgG3 dışındaki IgG moleküllerinin Fc bölgesine bağlanabilme yeteneğine sahiptir (21). Protein A, komplemanı aktive eder, bakterinin polimorfonükler hücreler tarafından sindirilmesini ve opsonizasyonunu büyük ölçüde engeller, erken ve geç tip aşırı duyarlılık reaksiyonlarının oluşmasını sağlar (21). Stafilokoklarda; ortama salınan serbest, hücreye bağlı ve hücre dışı olmak üzere üç tip protein A bulunmaktadır (23).

2.2.3. Virulans Faktörleri

S. aureus suşlarının, infeksiyon patogenezinde gerek yapısal gerekse açığa çıkmamış olarak bulunan çeşitli virulans faktörleri bulunmaktadır (25). Bu virulans faktörlerini; hücre duvar elemanları, enzimler ve ekzotoksinler olmak üzere üç grupta incelemek mümkündür.

2.2.3.1. Hücre Duvar Elemanları

S. aureus'un bazı virulans faktörleri protein yapıdadır ve hücre duvarında peptidoglikana bağlı olarak bulunurlar. Bu proteinler bakterinin, IgG ve fibrinojen gibi kan proteinlerine veya fibronektin ve kollajen gibi ekstrasellüler matriks proteinlerine bağlanmasına aracılık ederler ve infeksiyon için gerekli kolonizasyonun başlamasına neden olurlar (25). Protein A, clumping factor A ve B, kollajen bağlayıcı protein, fibronektin bağlayıcı protein A ve B, plazmin sensitif protein, serin aspartat tekrarlayıcı protein, *S. aureus* yüzey proteinlerine adheransta rol oynayan yüzey proteinleridir. Bu tip hücre dışı matriks proteinlerine bağlanan yüzey adezinlerine, Adezif Matriks Moleküllerini Tanıyan Mikrobiyal Yüzey Elemanları ("Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecules", MSCRAMM) denmektedir. *S. aureus*'un yapışkan yüzey proteinleri için iki olası rol düşünülmüştür; bunlardan ilki bakterinin kan veya doku komponentleri ile kaplanarak bağışıklık sisteminden korunmasını sağlamak, ikincisi ise dokuya bağlanmasını kolaylaştırmaktır (26). Ayrıca yüzey adezinleri *S. aureus*'un plastik yüzeylere tutunmasından da sorumludur. Vücutta bulunan plastik cihazlar ve kateterler, fibronektin, kollajen ve fibrinojen gibi doku proteinleri ve kan tabakası ile hızla kaplanıp *S. aureus* biyofilmi için ilk tabakayı oluşturur. *S. aureus* yüzey adezinlerinin tamamı protein yapıda değildir. Örneğin, poli-N-süksinil- β -1,6 glukozamin (PNSG) polisakkarit yapıda bir yüzey adezidir. Kemotaksis ve fagositozu önleyip, yabancı cisimlere adheransı sağlayan **kapsül yapısı**;

organizmanın şeklini verip dayanıklılığını sağlayan, konakta endojen pirojenlerin yapımını stimüle edip, lökosit kemotaksisine ve abse oluşumuna neden olan **peptidoglikan**; immunkomplekslerin oluşumuna ve komplemanın aktivasyonuna neden olan **protein A**; fibronektine bağlanma özelliği nedeniyle mukozal yüzeylere tutunmaya aracılık eden **teikoik asit**; kolonizasyonu sağlayan **yüzey proteinleri**, *S. aureus*'un virulansını arttıran yapısal özelliklerdir (21).

2.2.3.2. Enzimleri

S. aureus, virulansına katkıda bulunan çeşitli enzimler üretmektedir. Bu enzimler özellikle stafilokokların komşu dokulara yayılımını kolaylaştırarak infeksiyon patogenezinde rol alırlar.

2.2.3.2.1. Katalaz

Tüm stafilokok suşları tarafından üretilen katalaz enzimi, mikroorganizmanın fagositozunun ardından fagositik hücreler içinde, miyeloperoksidaz sistemi tarafından oluşturulan hidrojen peroksiti inaktive ederek fagositoz sonrasında oluşan hidrojen peroksitin, oksijen ve suya parçalanmasını sağlar (19, 21).

2.2.3.2.2. Koagülaz

S. aureus tarafından üretilen bir plazma pıhtılaştırma proteini olan koagülaz, bağlı ve serbest koagülaz olmak üzere iki ayrı şekilde bulunmaktadır. Serbest koagülaz protein yapıdadır. Plazmadaki 'coagulase reacting factor' (CRF) ile birleşerek, trombine benzer yapıdaki "stafilotrombin"i oluşturmakta, stafilotrombin de fibrinojenin fibrine dönüşümünü sağlamaktadır. 'Clumping factor' olarak da adlandırılan bağlı koagülaz ise hücre duvarında bulunmakta ve plazmadaki fibrinojene direkt olarak bağlanarak fibrinojeni fibrine dönüştürebilmektedir (21,24). Hem serbest hem de bağlı koagülaz proteinleri, bakterinin fibrin ile kaplanmasını ve bu şekilde fagositozdan korunmasını sağlar.

2.2.3.2.3. Fibrinolizin

"Stafilokinaz" olarak da adlandırılan fibrinolizin, fibrin pıhtılarını ortadan kaldırıp, infeksiyonun komşu dokulara yayılmasına sebep olmaktadır (23). *S. aureus* izolatlarının hemen hemen hepsi tarafından salgılanmaktadır (21).

2.2.3.2.4. Hiyaluronidaz

S. aureus suşlarının % 90'ından fazlasının ürettiği hiyaluronidaz, hiyalüronik asitleri hidrolize ederek dokuda mukopolisakkaritlerce oluşturulan hücreler arası matriksi parçalar ve organizmanın doku içinde yayılımını dolayısıyla enfeksiyonun yayılmasını kolaylaştırır (21, 23).

2.2.3.2.5. Lipaz

Bütün *S. aureus* izolatları, birçok farklı lipaz üretir. Lipidleri hidrolize ederek stafilocokların deri ve deri altı bölgelerde yayılımını sağlayan lipaz enzimi, yüzeysel dokuları invaze ederek fronkül ve karbonkül gibi enfeksiyonların gelişimine de neden olmaktadır (21).

2.2.3.2.6. Nükleaz

Tüm *S. aureus* suşları tarafından salgılanan ve ısıya dayanıklı bir enzim olan nükleaz, nükleik asitleri parçalayarak *S. aureus*'un invazyon yeteneğini artırır (21).

2.2.3.2.7. Penisilinaz (β laktamaz)

Penisilinin klinikte kullanıma girdiği ilk zamanlarda, Stafilocok izolatlarının % 90'ından fazlası penisiline duyarlıydı. Ancak, penisiline direnç, penisilinaz enziminin üretimi ile hızlı bir şekilde gelişmeye ve yayılmaya başladı. Bu enzimi kodlayan genler genellikle plazmidle aktarılabilen direnç genleridir. Direnç genleri de transformasyon ve transdüksiyon ile bakteriden bakteriye aktarılabilmektedir.

2.2.3.3. Toksinler

2.2.3.3.1 Ekzotoksinler

S.aureus, konak hücrenin fonksiyonunu veya morfolojisini etkilemesi nedeniyle "toksinler" olarak tanımlanan çeşitli hücre dışı ürünler üretme yeteneğine sahiptirler (19). Bu toksinler makrofajlar üzerindeki sınıf II büyük doku uygunluk kompleks molekülüne bağlanarak toksik etki gösterirler.

Hemolizinler

S. aureus, birbirlerinden antijenik özellikleri bakımından farklı dört tip (α , β , γ , δ) hemolizin (ekzotoksin) üretmektedir. Antijenik farklılıkları dışında bu hemolizinler çeşitli hayvan eritrositleri üzerinde hemolitik etki yapıp yapmamalarına, hemoliz için gerekli ısı derecesine ve zamana, ayrıca toksisite derecelerine bağlı olarak da farklılıklar göstermektedirler (22).

Alfa hemolizin(alfa toksin), insan polimorfonükler hücreleri gibi çeşitli hücre tipleri üzerinde litik etkiye sahiptir (21). Ayrıca bu toksin memeli hücrelerinde por oluşumuna neden olarak inflamatuvar yanıtı indükler. Koyun kanlı agarda üreyen bazı *S. aureus* izolatlarının kolonilerinin etrafındaki, hemolize uğramış kırmızı kan hücrelerinin oluşturduğu zondan bu toksin sorumludur (21,24).

“Sfingomiyelinaz C” olarak adlandırılan **beta hemolizin (beta toksin)**, eritrosit, lökosit, makrofaj ve fibroblastlar gibi hücreler üzerinde toksik etkiye sahiptir. Bu enzim duyarlı hücrelerin membranlarında yer alan fosfolipidleri hidroliz eder. Beta toksin, alfa toksinle birlikte üretildiği zaman doku parçalanmasına ve stafilokokkal hastalıklar için karakteristik olan abse oluşumuna sebep olduğu düşünülmektedir (21, 23).

Gama hemolizin (gama toksin), çeşitli türlerin eritrositlerini parçalama yeteneğindedir (21). Özellikle stafilokoklara bağlı kemik enfeksiyonlarında kanda bu toksine karşı antikor düzeyinin yüksek bulunması, bu toksinin bu hastalıklarda etkili olduğunu düşündürmektedir (23).

Delta hemolizin (delta toksin), Geniş spektrumlu sitolitik aktiviteye sahip olan delta toksin, ısıya dayanıklı, büyük, heterojen ve antijenik özellik taşımayan bir proteindir. Deterjan benzeri aktivitesi sayesinde hücre membranını parçalamaktadır. Bu toksin *S.aureus* izolatlarının %97’si tarafından üretilmektedir (21).

Bu sitolitik toksinlerden alfa ve delta toksin, insanlarda hastalık oluşturan *S. aureus* suşlarında predominant olarak bulunmaktadır. *S. aureus* suşlarının %95’inde bunlardan biri, %82’sinde her ikisi birlikte bulunur (23).

2.2.3.3.2 Panton Valentin Lökosidin (PVL)

Panton Valentin Lökosidin (PVL), ilk defa 1894 yılında Van deVelde tarafından lökositleri parçalama yeteneğinden dolayı ‘substance leukocidine’ olarak tanımlanmıştır (25,26). 1932 yılında ise Panton ve Valentine adlı araştırmacılar bu sitotoksinin deri ve yumuşak doku infeksiyonları ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir.

PVL, beraber transkribe edilen ve Φ SLT, Φ PVL, Φ SA2MW veya Φ Sa2 fajları ile taşınan lukS-PV ve lukF-PV genlerini kodlayan lukPV operonu tarafından kodlanmaktadır (29, 30, 31, 32). PVL’yi oluşturan 38 kDa moleküler ağırlığındaki LukS PV ve 32 kDa moleküler ağırlığındaki LukF PV proteinleri bir araya gelerek polimorfonükleer lökositlerin membranlarında heptamer yapıda por oluştururlar. Bu por polimorfonükleer lökositlerin membranlarının yapısının bozulmasına sebep olur (27, 33, 34, 35). Por oluşumu alfa toksinlerin yapısına benzer olmasına rağmen alfa toksinlerden farklı olarak PVL, nötrofilleri de lizise uğratar. PVL toksinleri tek başlarına oldukça fazla toksik değildir (31).

PVL konsantrasyonuna bağlı olarak PVL ya PMN’ler lizis yolu ile parçalanmasına veya hücrenin apoptoza uğramasına sebep olabilir. Hücrenin apoptoza uğraması, muhtemelen mitokondri membranında PVL aracılı por oluşumundan kaynaklanmaktadır. Yüksek PVL konsantrasyonu PMN’leri lizis ederken düşük PVL konsantrasyonunda PVL doğrudan mitokondri membranına bağlanarak PMN’ler apoptoza yönlendirir (27, 32). Gama hemolizinin bir analogu olan Panton Valentin Lökosidin (PVL) toksini, diğer hemolizinden farklı olarak *S. aureus* suşlarının %2’inde bulunur.

Süper Antijenler

Epidermolitik toksin, enterotoksinler, toksik şok sendrom toksin-1 (TSST-1) gibi pirojenik toksinler süperantijen yapısındadır. Monosit ve makrofajlardaki hücre içi protein hazırlığına (bu antijen sunan hücreler tarafından peptidlerin sunulma aşamalarına) gerek kalmadan, yani MHC sınıf II reseptörlerine klasik antijen bağlanma bölgesinden değil, T hücre reseptörlerinin değişken bölgesine bağlanarak aşırı miktarda IL-1, TNF, ve IFN- γ salınımına neden olurlar. Vücutta küçük bir süperantijen üreten *S. aureus* odağı bulunması bile ciddi sistemik etkilere neden olabilir (21).

2.2.3.3.3 Eksfoliyatif Toksin

Epidermolitik toksin veya eksfoliyatif olarak da bilinen bu toksin, stafilokok enfeksiyonlarının veziküler ve eksfoliyatif deri lezyonlarından sorumludur. Ayrıca eksfoliyatif, epidermisin stratum granulosum katmanını etki ederek ‘Haşlanmış Deri Sendromu’ na neden olmaktadır. Bu toksinin antijenik ve biyokimyasal yapıları bakımından A (ETA) ve B (ETB) olmak üzere iki farklı tipinin bulunduğu saptanmıştır (20). Bu iki molekülün kimyasal ve immunojenik özellikleri farklı olmasına karşın biyolojik aktiviteleri benzerdir (19). Her iki toksin de antijen yapısındadır ve toksinlere karşı oluşan antikorlar koruyucu ve nötralizan etkiye sahiptirler (21, 23, 24).

2.2.3.3.4 Enterotoksinler

Enterotoksinler, mide asiditesine, enzimlere ve 100°C de 30 dakika ısıtılmaya dirençli polipeptit yapısında maddelerdir. Özellikle yüksek CO₂’li atmosfer ortamında karbonhidratlı ve proteinli besiyerlerinde üreyen stafilokoklar tarafından oluşturulurlar. *S. aureus*’un immünolojik olarak birbirinden farklı A, B, C (C1- C3), D, E ve F olarak adlandırılmış sekiz çeşit enterotoksin bulunmaktadır. Tüm enterotoksinler süperantijen niteliğindedir. *S. aureus* kökenlerinin %35-50’sinin bu toksinleri oluşturabildikleri saptanmıştır. Enterotoksin F günümüzde Toksik Şok Sendrom Toksini-1 olarak adlandırılmaktadır. Enterotoksin A ve D besin zehirlenmelerinden sorumlu iken, enterotoksin B hastane enfeksiyonlarında sıklıkla karşılaşılan bir toksindir (20, 21, 22). SE’ler ise gıda zehirlenmelerine neden olurlar. Gıda zehirlenmeleri TSS gibi ölümcül değildir ancak daha yaygın olarak görülür. SE ise bakteriyofaj kökenli olan *ent* genleri tarafından kodlanır (24).

2.2.3.3.5 Toksik Şok Sendromu Toksini-1 (TSST-1)

Bakteriyofaj kaynaklı olan bu toksin, faj-1 grubundaki 29 ve 52 faj tiplerindedir. TSST, bakteriyofaj kökenli olan *tst* geni tarafından kodlanır, toksik şok sendromundan sorumludur. Süperantijenik uyarım sonucu salınan sitokinlerin güçlü etkisi nedeniyle TSST, şok ve ölüme neden olmaktadır (21).

2.2.4. Virulans Genlerinin Düzenlenmesi

S. aureus virulans faktörlerinin üretimini sağlayan genlerin çoğu, özellikle yüzey adezinlerini ve ekzoproteinleri kodlayanlar, bir çevresel algılama ('quorum sensing') sistemi tarafından düzenlenirler. Yüzey adezinlerini kodlayan genler, üremenin erken safhalarında eksprese edilir. Bakteri logaritmik üreme fazına girip bakteri sayısı çok arttığında adezin üretimi azalır ve ekzoprotein üretimi artar. Virulans faktörleri ve hücre yüzey adezinleri iki bileşenli düzenleyici sistem (*agr*, *saeRS*, *srrAB*, *arlSR*, and *lytRS*) ve SarA protein ailesi (*SarA*, *SarR*, *Rot*, *SarS*, *SarT*, and *SarU*) tarafından düzenlenmektedir (36).

Düzenleyici sistemin merkezi ve en önemli lokusu, *agr* dir. Lokus *agr*, sırasıyla, iki promotor tarafından transkribe edilen, P2 ve P3, iki farklı promotor ürünü olan RNAII ve RNAIII içerir. RNA II' yi transkribe eden P2 promotoru 4 gen içerir; *agrA*, *agrB*, *agrC* ve *agrD* (25). *agr* genlerinin ekspresyonu üreme fazına bağlıdır. Logaritmik üreme fazında bakteri Agr proteinlerini düşük düzeyde üretir. Sensör protein olan AgrC ve yanıt düzenleyici AgrA, oto indükleyici peptidi(AIP) uyarıcı iki bileşenli bir sistemden oluşur. Oto indükleyici peptid, tiyolakton adlı bir siklik peptiddir. Bu peptid *agrD* geni tarafından kodlanır. AgrD proteini de, sitoplazmik membran proteini olan AgrB tarafından salgılanır ve 'oto indükleyici' peptidi meydana getirecek şekilde kesilir. Bu oto indükleyicinin yapısı Gram negatif bakteriler tarafından üretilenlerden çok farklıdır ve hücre zarından kolayca difüze olmaz. Zardan geçebilmek için sitoplazmik zarında bulunan reseptörüne bağlanmak zorundadır (25). Tiyolaktonun etki gösterebilmesi için hücre zarında bulunan AgrC'ye bağlanması gereklidir. Konsantrasyonu yeterince arttığında, tiyolakton AgrC'nin fosforile olmasına neden olur. Fosforillenmiş AgrC ise, AgrA'yı fosforiller. Fosforillenmiş AgrA da RNA III adı verilen bir RNA molekülünün yapımını uyarır. RNA III, hücre yüzey adezinlerini kodlayan genlerin ekspresyonunu azaltırken, TSST, hemolizinler ve SEB gibi ekzotoksinleri kodlayan genlerin ekspresyonunu artırır.

Diğer bir düzenleyici gen de *sarA*'dır. *sarA* geni, gen promotorlarının hemen üstündeki dizilere bağlanan SarA proteinini kodlar. SarA, büyüme fazı boyunca SarA-*agr* promotor etkileşimi ile Agr yapımını uyarır. Böylece virulans faktörlerinin sentezini değiştirir. Ayrıca SarA, *agr* sisteminden bağımsız bir şekilde birçok hücre duvarı proteinini ve ekzoproteinini sentezini direk olarak düzenler (36).

2.3. “*Staphylococcus aureus*”un Yaptığı Hastalıklar

S. aureus, doğada sık rastlanan bir bakteridir. İnsanda, burun delikleri, koltuk altı, vagina, farinks, hasarlı deri yüzeyi gibi vücudun değişik bölümlerine kolonize olabilmektedir. İnfeksiyon, deri ve mukoza bütünlüğünün bozulmasının ardından bakterinin dokuya ya da kana geçmesiyle başlar (19, 37). Genel olarak infeksiyon oluşumunu etkileyen faktörler; insan savunma mekanizmaları, bakterinin sayısı ve virulansı, deri ve mukoza bütünlüğüdür (37). *S. aureus*, deri infeksiyonlarında yağ ve ter bezleri ile kıl köklerini giriş için kullanabilir.

Yaşamı tehdit edici boyutta olan stafilokok infeksiyonları içinde, stafilokoksik bakteriyemi, endokardit ve sepsis bulunmaktadır. Bu tablolar infeksiyon için çeşitli risk faktörleri bulunan kişilerde daha sık olarak karşımıza çıkmaktadır. *S. aureus* infeksiyonu gelişme riskini arttıran ve konağa bağlı olan faktörler şunlardır: (23, 37)

- 1 Konjenital ya da kazanılmış lökosit kemotaksis defektleri
- 2 Hücre içi öldürme mekanizmalarındaki sorunlar
- 3 Oponizasyon defektleri
- 4 Deri yaralanmaları
- 5 Yabancı cisim varlığı
- 6 Virüs infeksiyonları
- 7 Kronik hastalıklar
- 8 Tedavi/ profilaktik amaçlı antibiyotik kullanımı

Stafilokok infeksiyonlarında tipik patolojik bulgu, abse oluşumudur. Yalnızca potansiyel bir hedef olması nedeniyle değil aynı zamanda aktivasyonu ile endovasküler hastalığın ilerlemesine katkıda bulunması nedeni ile patojenik süreçte en önemli yapı, endotel hücreleridir. Stafilokoklar endotel hücrelerine kolaylıkla tutunarak adezyon - reseptör etkileşimi ile bağlanır, ardından endotel hücreleri tarafından hücre içine alınırlar (38). Bunun ardından, bakteri komşu dokulara yayılmayı ve kan dolaşımına girmeyi kolaylaştıran proteolitik enzimler salgılar. Enfekte endotel hücrelerinin eksprese ettiği doku faktörü, fibrin birikimi ve vejetasyon oluşumunu kolaylaştırır. Bakteri derin dokulara ulaştığında, abse oluşumuna yol

açan inflamatuvar yanıtı neden olur. Olaylar zinciri kardiyak endotelin etkilendiği endokardit patogeneğinde olduğu gibi metastatik infeksiyon odaklarının oluşmasına da katkıda bulunur. *S. aureus*'un hücre içine girmesiyle, endotel hücreleri, Fc reseptörleriyle beraber çeşitli adezyon moleküllerini (vasküler hücre adezyon molekülleri 'VCAM' ve intersellüler adezyon molekülü 'ICAM') eksprese ederler ve interlökin (IL)-1, IL-6 ve IL-8 salınımını sağlarlar. Fc reseptörlerinin ekspresyonu immünoglobulin (Ig) veya immün kompleksler için bir bağlanma bölgesi oluşturup bakteriyemi sırasında bazen görülen vaskülit gelişimine katkıda bulunabilmektedir. Bakteri kökenli kemotaktik faktörlerin ve IL-8'in etkisiyle, nötrofil lökositler infeksiyon bölgesinde diapedez ile gelip yukarıda belirtilen adezyon moleküllerini eksprese eden endotel hücrelerine tutunurlar. Endotel hücrelerinin yapısındaki değişiklikler plazma proteinlerinin transüstasyonuyla birlikte damar geçirgenliğinin artışına neden olur. Stafilokoklar ile temastan sonra hem doku makrofajları hem de dolaşımdaki monositler IL-1, IL-6, IL-8 ve tümör nekroz faktörü α (TNF- α) salgırlarlar. T hücrelerinden interferon- γ (IFN- γ) salınımından sonra makrofajlar aktive olurlar. Endotel hücreleri gibi monosit veya makrofajlardan kan dolaşımına salınan sitokinler de sepsis sendromunun belirtilerine ve stafilokok hastalığı ile ilişkili vaskülitte katkıda bulunurlar (39, 40).

S. aureus, ürettiği eksfoliyatif toksine bağlı olarak oluşan Haşlanmış Deri Sendromuna, enterotoksinin gastrointestinal sistem üzerine lokal etkisine bağlı olarak ortaya çıkan besin zehirlenmelerine, süperantijenleri yüksek ateş, şok, kapiller kaçak ve çoğul organ yetersizliğiyle karakterize olabilen Toksik Şok Sendromuna da yol açabilmektedir (26).

2.4. Stafilokokların Laboratuvar Tanısı

İzole edilen bir suşun stafilokok olarak tanımlanması, büyük ölçüde mikroskopik ve makroskopik (koloni morfolojisi) morfolojisi ile katalaz etkinliğinin gösterilmesine dayanır.

2.4.1. Gram Boyama ve mikroskopik inceleme

Klinik örneklerden hazırlanan Gram boyalı preparatlarda, stafilokoklar 0.5-1.0 µm çaplı Gram pozitif koklar olarak görülür. Tek tek, çiftler, kısa zincirler ya da kümeler halinde görülebilir. Gram reaksiyonundaki değişimler inflamatuvar hücreler ve onların hidrolitik enzimlerinin etkisi nedeniyledir (41).

2.4.2. Koloni Morfolojisi

Stafilokoklar çoğu besiyerinde rahatlıkla üreyebilmektedirler. Tipik kolonilerin gözlenebilmesi için örnekler kanlı agar plaklarına ekilir. Çoğu stafilokok türleri 24 saatlik inkübasyonda 1-2 mm çaplı koloniler oluştururlar. *S. aureus* kolonileri, sarı-turuncu pigmentli, düzgün yüzeyli, hafif konveksdir. Diğer suşlar ise beyaz gri koloniler oluştururlar. *S. aureus* suşlarında pigment üretimi inkübasyon sonrasında oda sıcaklığında bekletildiğinde daha belirgin hale gelmektedir. Bazı *S. aureus* suşlarında opak koloniler ve şeffaf koloniler veya farklı beta-hemoliz zonları bulunur (41).

2.4.3. Katalaz Testi

Bu test *Micrococcaceae* ailesindeki katalaz enzimlerinin (Sitokrom oksidaz enziminin) varlığını saptar. Stafilokoklar, diğer bir Gram pozitif kok olan streptokoklardan katalaz pozitif olmalarıyla ayrılırlar. Katalaz testi, lam üzerine incelenecek koloni aktarıldıktan sonra üzerine %3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) damlatılarak yapılır. Hidrojen peroksitin su ve oksijen gazına dönüşümünü gösteren kabarcıklar katalaz enzim varlığının göstergesidir (23).

2.4.4. *S. aureus*'u diğer stafilokoklardan ayıran yöntemler

2.4.4.1. Koagülaz Testi

S. aureus'un diğer stafilokoklardan ayrımında koagülaz testi kullanılır. *S. aureus* diğer stafilokoklardan koagülaz pozitif oluşuyla ayrılmaktadır. Bu test lam ve tüp koagülaz testi olmak üzere iki şekilde yapılmaktadır (23, 26).

2.4.4.2. Lam Koagülaz Testi

Bu test için kanlı agar veya diğer selektif olmayan besiyerlerinde üremiş koloniler kullanılır. Lam üzerine bir damla distile su damlatılır. Stafilocok kolonileri su ile karıştırılarak homojen süspansiyon elde edilir. Üzerine bir damla plazma damlatılır ve elde çevrilerek karıştırılır. On saniye içinde *S. aureus*'un birbirine yapışmasından kaynaklanan gözle görülen kümeleşmenin olduğu gözlenirse test pozitifdir. Lam koagülaz testi, *S. aureus* duvarındaki 'clumping factor' ün varlığını gösterir. Eğer lam koagülaz negatif ise mutlaka tüp koagülaz testi uygulanmalıdır. Ayrıca *S. aureus* dışında, *Staphylococcus lugdunensis* ve *Staphylococcus schleiferi* de lam koagülaz testinde pozitif sonuç verebilmektedir (23,25).

2.4.4.3. Tüp Koagülaz Testi

Hücre dışına salınan koagülazı gösterir. Serum fizyolojik ile 1/5 oranında sulandırılmış plazma içinde stafilocok kolonisi ezilip karıştırılır. Saat başı kontrol edilmek suretiyle 35°C'de dört saat pıhtının oluşması için bekletilir. Pıhtının oluşması pozitif sonuç olarak değerlendirilir. Negatif olan testler oda sıcaklığında 18-24 saat bekletilir. *Staphylococcus aureus subsp. anaerobius*, *Staphylococcus schleiferi subsp. coagulans*, *Staphylococcus lutrae*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus delphini* türlerinin de tüp koagülaz testi pozitifdir (25).

2.4.4.4. Mannitol Hidrolizi

Bu test için mannitollü tuzlu agar kullanılır. Farklı bir flora ile kontamine örnekler %7,5 NaCl içeren bir besiyerine ekimleri yapılarak *S.aureus* izole edilebilir. Tuz *S.aureus* hariç diğer organizmaların üremesini engellemektedir. Mannitollü tuz agar veya ticari kromojenik besiyerleri, kistik fibrosisli hastalarda ve *S.aureus*'un nazal taşıyıcılığını belirlemede kullanılan besiyerleridir. Bu besiyerinde üretilen *S. aureus* kolonilerinin etrafında 48 saatte sarı zon, *S.epidermidis* kolonilerinin etrafında kırmızı zon oluştuğu gözlenir. *S. aureus*, mannitolü fermente ederek, besiyerinin içerdiği fenol kırmızısı ayırıcının rengini sarıya çevirir (25).

2.4.4.5. Protein A Saptanması

Protein A saptama yöntemi, lam koagülaz testine bir alternatiftir. Protein A, IgG'nin Fc kolu için spesifik afiniteye sahiptir. Protein A'yı saptamak için ticari olarak bulunan insan fibrinojen ve IgG'si ile kaplı polistren lateks partikülleri içeren ayrıçtan reaksiyon kartına bir damla damlatılır. Stafilocok kolonisi uygulama çubuğu ile karıştırılarak aglütinasyon gözlemlenir. Aglütinasyonun meydana gelmesi pozitif sonuç olarak değerlendirilir. Negatif olan testlerde herhangi bir değişim olmaz. *S. aureus*, protein A testi pozitif, *Staphylococcus epidermidis* ise negatif sonuç verir (25).

2.4.4.6. Hızlı Termonükleaz Testi

Bir mililitre Beyin Kalp İnfüzyon (BKİ) sıvı besiyeri içerisine birkaç stafilocok kolonisi aktarılır. 35°C'de iki saat inkübe edilir. Hazırlanan süspnsiyon su banyosunda 15 dakika kaynatılır, oda sıcaklığına soğutulur. DNase test agarı üzerinde pipet yardımıyla açılan oyuklara iki damla soğutulan organizma süspansiyonu eklenir. Bir-iki saat 35°C'de inkübe edilir. Kuyucuklar etrafında pembe ya da kırmızı hale görülmesi (pozitif reaksiyon) beklenir. *S. aureus*'un termonükleaz testi, pozitifdir (25).

2.5. Stafilokok İnfeksiyonlarının Tedavisinde Kullanılabilen Antibiyotikler

Stafilokok infeksiyonlarının tedavisinde seçilecek uygun antibiyotik, bakteriyi öldürerek yayılımını engellemelidir (23). Bu amaçla kullanılacak antibiyotikler;

- 1 Hücre duvarı sentez inhibitörleri
- 2 Protein sentez inhibitörleri
- 3 Nükleik asit sentezi inhibitörleri olmak üzere üç grupta incelenebilir.

Bu grup antibiyotiklerden en uygun olanı, antibiyotik duyarlılık testleri ile belirlenmeli ardından tedaviye başlanmalıdır. Genellikle kültür ve antibiyogram sonucu beklenmeden, kültür için örnek alınır alınmaz empirik tedaviye başlanır. Empirik tedavide uygulanan antibiyotik, kültür ve antibiyogram sonucuna göre değiştirilir.

Tablo 1: Stafilokok infeksiyonlarının tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin gruplandırılması

Hücre Duvar Sentez İnhibitörleri	Protein Sentez İnhibitörleri	Nükleik Asit Sentez İnhibitörleri
1. Beta-laktam Antibiyotikler a. Penisilinler b. Sefalosporinler c. Karbapenemler	1. Aminoglikozidler 2. Makrolidler 3. Linezolid 4. Streptograminler 5. Linkozamidler	1. Sülfonamidler ve Trimetoprim 2. Kinolonlar 3. Rifampin
2. Glikopeptidler	6. Kloramfenikol	

2.6. Stafilokoklarda Antibiyotik Direnç Mekanizmaları ve Metisilin Direnci:

Direnç, bir mikroorganizmanın antimikrobiyal ajanın öldürücü veya üremeyi engelleyici etkisinden korunabilme kapasitesidir (42).

Antibiyotik çağının başlangıcından beri antibiyotik kullanımının oluşturduğu seçici baskı stafilokoklarda çok kısa sürede direnç gelişmesine yol açmıştır (42, 43). Bu durum 1941'de penisilin G'nin tedaviye girmesi ve beta-laktamaz üretimine bağlı direnç gelişiminin artması ile başlamış, bundan sonra da her kullanıma giren antibiyotiğe karşı direnç gelişimi sürmüştür. Epidemik klonlar, henüz 1950'li yıllarda birbiri ardına penisilin G, streptomisin, kloramfenikol, oksitetrasiklin ve daha sonra da makrolidlere direnç kazanmıştır (43).

2.6.1. Beta Laktam Antibiyotiklere Genel Direnç Mekanizmaları

Beta laktam ajanlara direnç üç temel mekanizmayla ortaya çıkmaktadır (44).

- İlacın hedefine etkin konsantrasyonda ulaşmasının engellenmesi
- Hedef PBP moleküllerinin değişmesi
- İlacı inaktive eden beta laktamazların üretimi

2.6.1.1. *İlacın hedefine etkin konsantrasyonda ulaşmasının engellenmesi:*

Bu direnç mekanizması, ilacın hücre içine alınmasındaki azalmadan yada hedefine ulaşmadan dışarı atılmasını sağlayan aktif pompa sistemlerinden kaynaklanabilmektedir. (42). Antibiyotiğin hücre dışına atılmasını sağlayan aktif pompa sistemleri betalaktamlar da dahil olduğu birçok antibiyotik sınıfına karşı doğal veya kazanılmış dirençte önemli rol oynamaktadır. Hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakterilerde bulunan aktif pompa sistemleri antibiyotiğin hücre içinde etkin konsantrasyona ulaşmasını engellemektedir (44).

2.6.1.2. *Hedef Penisilin Bağlayan Protein (PBP) moleküllerinin değişmesi*

PBP'ler serin proteazlar üst ailesinde yeralan ve yapısal olarak beta laktamlara çok benzeyen ve peptidoglikan sentezinde rol oynayan D,D-transpeptidazlar ve D,D-karboksipeptidazlardır. Bunlardan transpeptidazlar “yüksek molekül ağırlıklı PBP”; D-D karboksipeptidazlar ise “düşük molekül ağırlıklı PBP” olarak adlandırılırlar. Peptidoglikan zincirindeki çapraz bağların oluşumunda görev alırlar (44). Beta-laktam ajanlar, bu enzimlerin bağlandığı D-alanil-D-alanin yapısına benzedikleri için PBP'lerin substrat analoglarıdır. Bu benzerlik nedeniyle, PBP'ler beta-laktam ajanlara kovalan olarak bağlanıp inhibe olurlar.

Beta-laktam afinitesi düşük PBP'ler ile ilgili olarak dört kazanılmış direnç mekanizması bildirilmiştir. Bunlar;

- Bakterinin beta laktam afinitesi düşük yeni bir PBP geni kazanması
- Yakın türlerden gen alınması sonucu mozaik PBP genlerinin ortaya çıkması
- Düşük afiniteli bir PBP'nin aşırı yapımı
- Bakteri hücrelerinde bulunan temel PBP'lerin promotor dizileri veya aktif bölgelerindeki korunmuş alanlarda aminoasit değişimleri sonucunda aşırı yapım veya afinite değişiklikleri olmasıdır (44).

PBP değişimine bağlı direnç, özellikle *S. aureus* türlerinin beta laktam ajanlarla tedavisinde sorun yaratmaktadır (46). Stafilocokların beta laktam direncindeki en önemli mekanizması, tüm beta laktamlara karşı düşük afiniteli PBP2a olarak adlandırılan yeni bir PBP yapımıdır (44).

2.6.1.3. İlacı inaktive eden beta laktamazların üretimi

S. aureus'un beta laktam antibiyotiklere karşı en sık görülen direnç mekanizması genellikle plazmidle taşınan *bla* geni üzerinde kodlanan beta laktamaz enzimi üretimidir (45). Beta laktamazlar, beta laktam halkasındaki siklik amid bağına parçalayan böylece beta laktam ajanların etkinliğini ortadan kaldıran enzimlerdir. Beta laktamazlar moleküler yapılarına göre aktif bölgelerinde serin aminoasiti bulunanlar veya çinko atomu bulunanlar olarak iki gruba ayrılırlar. Bu iki grup Ambler tarafından dört moleküler sınıfa ayrılmıştır. Sınıf A, C ve D serin beta laktamazları, sınıf B ise çinko içeren metallo enzimleri içermektedir. Gram pozitif bakteri türleri arasında beta laktamaz üreten başlıca patojenler stafilocoklardır. Stafilocok beta laktamazı penisilinaz niteliğinde olup işlevsel sınıflandırmaya göre de grup 2a'da yer almaktadır (44, 46).

Stafilocoklarda beta laktamaz üretimini kontrol eden çeşitli kromozomal genler bulunmaktadır. Stafilocoklar beta laktamazı indüklenebilir niteliktedir. Penisilin varlığında *bla* geni üzerindeki represör etki ortadan kalkmakta ve beta-laktamaz üretilmeye başlanmaktadır.

Stafilocoklarda beta laktamaz üretimini saptamada CLSI önerilerine göre 10 ünitelik penisilin diski ile 1µg'lık oksasilin diski beraber kullanılmaktadır. Sadece penisilin ve oksasilin test edilerek beta laktam antibiyotiklere karşı duyarlılık veya direnç belirlenebilir. Penisiline dirençli, oksasiline duyarlı *S. aureus* suşları, beta laktamaz üretmektedir (47). Bu

suşlar ampisilin, amoksisilin, azlosilin, karbenisilin, mezlosilin, piperasilin ve tikarsilin gibi antibiyotiklere dirençlidir. Tedavide bu grup antibiyotiklerin kullanılmaması gerektiği bildirilmektedir. Buna karşın penisilinazlara dirençli penisilinler, beta laktam/beta-laktamaz inhibitör kombinasyonları, sefalosporinlere ve karbapenemlere duyarlıdırlar (47). Beta laktamaz üreten suşlarla gelişen infeksiyonların tedavisinde penisilinaza dirençli semisentetik penisilinler ya da beta laktam/beta-laktamaz inhibitör kombinasyonları kullanılabilir. Penisinle duyarlı bulunan suşlar tüm beta laktam ajanlara duyarlı kabul edilmektedir (47).

Beta laktamaz üretimi ile ilgili metisilin direncinin bir başka tipi, düşük düzey metisilin dirençli BORSA (Borderline resistant *S. aureus*) suşlarında görülmektedir. Bu suşların metisilin ve oksasilin MIK değeri 4-8µg/ml olup, duyarlılık sınırının biraz üstündedir. BORSA izolatlarında direncin mekanizması aşırı beta-laktamaz üretimidir (45).

2.6.2. Glikopeptit Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları

Metisiline dirençli *S.aureus* suşları başta metisilin olmak üzere, tüm beta laktamlara, makrolidlere, tetrasiklinlere, kloramfenikollere karşı dirençli olduğundan MRSA infeksiyonlarının tedavisinde glikopeptit antibiyotikler tek olarak kullanılmaktadır (48). Ancak 1997 yılında Japonya ve ardından Amerika Birleşik Devletleri'nde bir glikopeptit olan vankomisine duyarlılığı azalmış *S.aureus* suşları bildirilmiştir. Vankomisine duyarlılığı azalmış *S. aureus* suşlarında(VISA) hücre duvarının kalınlaştığı ve hücre duvarının vankomisini bağlayarak serbest molekülün hedefine ulaşmasında engel oluşturduğu saptanmıştır. Özellikle PBP2 ve PBP2a'nın aşırı üretiminin vankomisin direnci ile ilişkili olduğu bildirilmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde 2002 yılında enterokoklardan aktarılan vanA geni varlığına bağlı olarak vankomisine dirençli iki *S. aureus* izolatı bildirilmiştir (49).

2.6.3. Aminoglikozid Direnci

Stafilokoklarda aminoglikozid direncinin en sık görülme nedeni, aminoglikozidleri modifiye eden enzim varlığıdır. Bu enzimler periplazmik aralıkta yer alan veya sitoplazma zarına bağlı olarak bulunan, plazmid ya da transpozon kökenli enzimlerdir. Aminoglikozid yapısını değiştiren bu enzimler asetil transferazlar (AAC), adenil transferazlar (ANT) ve fosfotransferazlar (APH) olmak üzere üç gruba ayrılmaktadırlar (50). Bu enzimlerin antibiyotik yapısına asetil, adenil ve fosforil grupları eklenmesi, antibiyotiğin etkinliğini

yitirmesine sebep olur (46). Özellikle metisilin dirençli stafilokoklarda aminoglikozid direnç oranları günümüzde oldukça yüksektir. Stafilokoklarda gentamisin direnci, asetiltransferaz enziminin varlığını göstermektedir. Rutin laboratuarlarda stafilokoklarda görülen aminoglikozid direncini saptamak amacıyla 10 µg'lık gentamisin diski kullanılmaktadır. Bu diske streptomisin hariç tüm aminoglikozid antibiyotiklere karşı olan direnç saptanabilmektedir.

2.6.4. Makrolid, Linkozamid, Streptogramin(MLS_B) Direnci

Eritromisin gibi makrolid grubundaki antibiyotikler, linkomisin ve klindamisin üyesi olduğu linkozamidler ve tip A-B streptogramin MLS grubu olarak adlandırılan antibiyotiklerdir (45). Bu antibiyotikler kimyasal olarak birbirlerinden farklı olmalarına rağmen etki mekanizmaları benzerdir (46). *S. aureus*'ta MLS_B direnci, 23S rRNA'da spesifik bir adenin molekülünün metilasyonundan sorumlu olan enzimleri kodlayan *erm* (eritromisin rezistans metilaz) genlerinin kazanımına bağlı olarak ortaya çıkar. Plazmid veya transpozonlarca taşınan *ermA*, *ermB* ve *ermC* genlerinin kodladığı enzimler, antibiyotiğin hedefini değiştirir. Bunun sonucunda, eritromisine ve onunla aynı hedefi paylaşan makrolid, linkozamid ve streptogramin B grubu antibiyotiklere karşı yüksek düzeyde direnç gelişir (46). MRSA'larda kromozomal *ermA* geni, MSSA'larda ise plazmid kaynaklı *ermC* geni ile daha sık karşılaşılmaktadır (49,51). Stafilokoklarda MLS_B tipi direnç yüksek düzeyde veya indüklenebilir düşük düzeyde direnç olarak görülebilir. Bunun dışında *S. aureus* ve KNS'lerde saptanan *msr* genleri indüklenebilir pompa(efflux) proteininin sentezine yol açmakta ve bu şekilde makrolislere karşı direnç gelişmesine neden olmaktadır. *msrA* geni tarafından kodlanan aktif pompaya bağlı direnç ile indüklenebilir MLS_B tipi direnç, eritromisin diski (15 µg) ve klindamisin diskinin (2µg) kullanıldığı D testi ile ayrılabilir (47). Her iki tipinde de disk difüzyon testinde izolatin eritromisine dirençli, klindamisine duyarlı olduğu gözlenir. İndüklenebilir MLS_B tipi dirençte D testinde klindamisin zonu eritromisin diskine bakan tarafta düzleşirken aktif pompaya bağlı eritromisin direncinde klindamisin zonunda değişiklik olmaz. İndüklenebilir MLS_B tipi direnç saptanan izolatlar klindamisine de dirençli olarak bildirilir (47).

2.6.5. Kloramfenikol Direnci

Kloramfenikole karşı direnç, antibiyotiğin etkinliğini kaybetmesine neden olan kloramfenikol asetil transferaz (KAT) enziminin üretimine bağlı olarak ortaya çıkar. Plazmid veya transpozon aracılığı ile aktarılabilen bu enzim Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler arasında yaygın olarak bulunmaktadır (45, 46).

2.6.6. Sulfonamid ve Trimetoprime Direnç

Sulfonamid direnci, plazmidlerle taşınan genler aracılığıyla veya nokta mutasyonu sonucunda afinitesi düşük yeni bir dihidropteroat sentetaz enziminin oluşmasıyla ortaya çıkabilmektedir. Ayrıca *S. aureus*'da kromozomal mutasyon sonucu düşük düzey PABA üretimi de dirence yol açabilmektedir.

Trimetoprim(TMP) direnci ise, transpozon tarafından kodlanan plazmid veya kromozom üzerinde yer alan *dfrA* ve *dfrB* genlerine bağlı olarak gelişir. Bu genlerin kodladığı dihidrofolat enziminin TMP'nin aktif bölgesine bağlanarak dirence yol açtığı bildirilmiştir(45, 46, 52).

2.6.7. Kinolon Direnci

Kinolon direnci, DNA giraz enzimini kodlayan *gyrA* ve *gyrB* genleri ile topoizomeraz IV enzimini kodlayan *grlA* ve *grlB* genlerinden herhangi birinde meydana gelen nokta mutasyon nedeniyle gelişebilmektedir. Ayrıca bazı *S.aureus* suşlarında bulunan *norA* geninde meydana gelen nokta mutasyonu bu grup antibiyotiklerin hücre içinde birikimini azaltan aktif pompa sisteminin yapımını sağlamaktadır. Sadece *grl* gen lokusunda meydana gelen mutasyon, düşük seviyede direnç oluştururken, *grlA* ve *gyrA*'da meydana gelen mutasyon, yüksek seviyede dirence sebep olmaktadır (45).

2.6.8. Rifampin Direnci

DNA bağımlı RNA polimerazın beta altbirimini kodlayan *rpoB* geninde meydana gelen kromozomal mutasyonlar sonucunda antibiyotiğin afinitesi azalır ve rifampin direnci ortaya çıkar (45).

2.6.9. Metisilin Direnci

S. aureus'un penisiline direnç kazanması ile birlikte penisiline dirençli *S. aureus*'un neden olduğu infeksiyonların tedavisinde kullanılmak üzere yeni antibiyotikler ortaya çıkmıştır. Metisilin ve diğer penisilina dirençli penisilinlerin kullanıma girmesiyle önceleri tedavi başarısı elde edilmiş, ancak metisilin tedavisi girmesinden yaklaşık iki yıl sonra metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) suşları tespit edildi. Bu suşlar önce hastane infeksiyonlarında, son zamanlarda da toplum kökenli infeksiyonlarda etken olarak görülmeye başlamıştır (53).

2.6.9.1. Penisilin Bağlayan Protein 2a (PBP 2a)

Stafilokoklarda beta-laktam antibiyotiklere direnci sağlayan başlıca direnç mekanizması *mecA* geninin taşınması ile ilgilidir. Kromozomunda *mecA* geni taşıyan suşlar, PBP 2a (veya PBP') olarak adlandırılan beta laktam yapısındaki antibiyotiklere düşük afiniteli 78 kDa molekül ağırlığındaki alternatif bir proteinin sentezini yapar (42). Beta laktam antibiyotikler duyarlı suşlarda hücre duvarında yer alan PBPlere (transpeptidaz ve karboksipeptidaz enzimleri) bağlanarak çapraz bağların oluşumunu engeller. Ancak PBP2a beta laktamlara düşük afiniteli olduğu için, beta laktam antibiyotiklerin varlığında MRSAlar peptidoglikan sentezine devam eder ve tüm beta laktam ajanlara karşı direnç görülür (3).

2.6.9.2. Heterojen – Homojen Direnç

mecA genine bağlı olarak gelişen metisilin direnci, iki farklı şekilde ortaya çıkabilir(23,43).

1. Homojen direnç: Bakteri kolonisini oluşturan tüm bakteriler *mecA* genini taşırlar ve hepsinde bu gen aktif olduğundan yüksek düzeyde dirence sebep olur (42).

2. Heterojen direnç: Heterojen dirençli suşlarda *mecA* geni tüm hücreler tarafından taşınmasına rağmen, hücre topluluğunun 10^3 - 10^6 sından birinde yüksek düzeyde metisilin direnci görülür. Bunun *mecA* geninin fonksiyonunu kontrol ettiği sanılan “Factor essential for methicillin resistan” *fem A* veya *factor X* gibi kontrol genlerinin fonksiyonları ile meydana geldiği düşünülmektedir (42, 45).

Aslında MRSA popülasyonunun küçük bir kısmı heterojen direnç özelliğine sahiptir (45). Ancak heterojen direnç homojen dirençten daha sık olarak görülmektedir. Heterojen

direnç fenotipini saptamak ise daha güç olabilir. Standart deney koşullarında heterojen suşların belirlenmesi için besiyerine otolizinleri inhibe eden %4 NaCl eklenebilir. Ayrıca heterojen direnç ekspresyon düzeyi düşük ısıda 30-35 °C de daha yüksektir. Ozmolarite, sıcaklık, besiyeri içeriği, inkübasyon süresi gibi faktörler de metisilin direncinin düzeyini etkilemektedir. PBP2a aracılı metisilin direncini, *fem* veya *aux* olarak tanımlanan diğer genetik lokuslar ile otolizinlerin aktivitesi etkiler. Bu genler *S. aureus* genomunun bir parçasıdır ve peptidoglikan sentezinde rol oynarlar. Örneğin; pentaglisin köprüsünün sentezini sağlayan *femABX* operonunun inaktivasyonu, PBP 2a üretimini etkilemeksizin metisiline direnci azaltır (3,55).

2.6.9.3. *mecA* Gen Ekspresyonu

S. aureus' da PBP2a'yı kodlayan *mecA* geninin ekspresyonu, baskılayıcı bir gen olan *MecI* ve membranda yer alan, beta laktam varlığını saptayan bir sinyal iletilici olan *mecR1* tarafından kontrol edilmektedir (6, 45). Beta laktam antibiyotik yokluğunda, *mecI* hem *mecA* hem de *mecR1-mecI*'nin transkripsiyonunu engeller. Ancak, beta laktam antibiyotik varlığında *mecR1* otokatalitik olarak kesilir, böylece sitoplazmik kısmında yer alan metalloproteaz bölümü aktif hale gelir. Aktif olan metalloproteaz enzimi *mecA*'nın promotor bölgesine bağlanmış olan *mecI*'yi keser. Bunun sonucunda *mecA* transkripsiyonu ve PBP2a üretimi gerçekleşir (6, 55) *mecI* ve *mecR1* düzenleyici genlerin dışında, *mecA* ekspresyonu, yapısal ve işlevsel açıdan *mecI* ve *mecR1* sistemine benzer olan, *BlaI* ve *BlaR1* sistemi tarafından da kontrol edilmektedir. Ancak, *mecA* ekspresyonunun *mecR1-mecI* sistemi ile gerçekleşmesi, *BlaI* ve *BlaR1* sistemine göre daha yavaştır. Bu durum düşük düzeyde *mecA* transkripsiyonunun gerçekleşmesine neden olur (25).

2.6.9.4. “*Staphylococcal chromosome cassette mec*” (*SCCmec*)

SCCmec elemanı birçok açık okuma bölgesi içerir. Bu bölgeler, atipik kodon kullanımı sergileyerek 3. kodon pozisyonlarında G+C içeriği açısından zengindir. Bu durum, *S. aureus* türlerinin *SCCmec* elemanını diğer türlerden kazandığını göstermektedir (25).

SCCmec elemanının ve transfer mekanizmasının kökeni tam olarak bilinmemektedir. Ancak, *S. sciuri*'nin PBP2a ile % 87.8 aminoasit sekans benzerliği olan bir PBP taşıdığı bulunmuştur. *S. sciuri* suşlarının metisiline duyarlı oldukları saptanmıştır, fakat metisilin varlığında *mecA* homoloğunun transkripsiyon hızının artmasıyla birlikte bu suşlar, metisiline

dirençli hale gelir. Ayrıca *mecA* homologunun MSSA da ortaya çıkmasıyla metisiline dirençli hale gelmişti ve bu suş MRSA olarak sınıflandırıldı (56). Bunun yanında epidemik MSSA suşu izole edildikten sonra daha önce MRSA suşu ile karşılaşmamış yeni doğmuş bir bebekten izogenik MRSA suşu izole edildi. Yeni doğmuş bebekten izole edilen *S. epidermidis* suşunun *mecA* geni ile MRSA'nın *mecA* geni benzer çıkmıştır. Bu bilgi MRSA'nın invivo şartlarda *mecA* geninin iki stafilokok türü arasındaki horizontal aktarımdan dolayı ortaya çıktığını desteklemektedir (6, 57).

2.1 kb uzunluğundaki *mecA* geni, kromozomda Stafilokok Kaset Kromozom *mec* (*SCCmec*) olarak adlandırılan 21-67 kb büyüklüğündeki hareketli bir genetik eleman üzerinde yer alır (24). SCC elemanları, değişik KNS türlerinde ve metisiline duyarlı *S. aureus* izolatlarında da bulunmaktadır. *SCCmec*, bakteriyofajlar, transpozonlar, konjugatif transpozonlar veya integre olabilen plazmidler gibi bilinen diğer hareketli genetik elemanlardan farklıdır. Genomik bir ada olarak görülebilse de *S. aureus*' un virulansı ile ilişkili hiçbir gen içermediği için patojenite adalarından farklıdır (58).

SCC, aslında stafilokok türleri arasında genetik değişim için aracılık eden genomik adalardır. *SCCmec*, SCC'lerin metisilin direnci taşıyan özel bir tipidir (59). *SCCmec* elemanı, *S. aureus* kromozomunda replikasyon orijininin yanında yer alan ve spesifik bir bölge olan *attB_{sc}* bölgesine entegre olur. *attB_{sc}* bölgesi, *orfX* olarak adlandırılan ve işlevi tam olarak bilinmeyen, *S. aureus* suşları arasında oldukça iyi korunmuş açık okuma çerçevesinin 3' ucunda yer almaktadır (6, 43). *SCCmec* elemanının entegrasyon bölgesi olan *attB_{sc}*, kromozom ve *SCCmec* bağlantı bölgelerinde (*attL* ve *attR*) bulunur. Ancak iki tekrar sekansından biri *SCCmec* elemanının sağ ucunda yer alır. Dejenere olmuş ters tekrarlar, *SCCmec* elemanının her iki ucunda da yer alır (60). Bu tamamlanmamış ters tekrarların, *SCCmec* elemanının kromozoma entegrasyonu ve kromozomdan kesip çıkarılması esnasında *SCCmec* rekombinazları tarafından tanındığı düşünülmektedir (58).

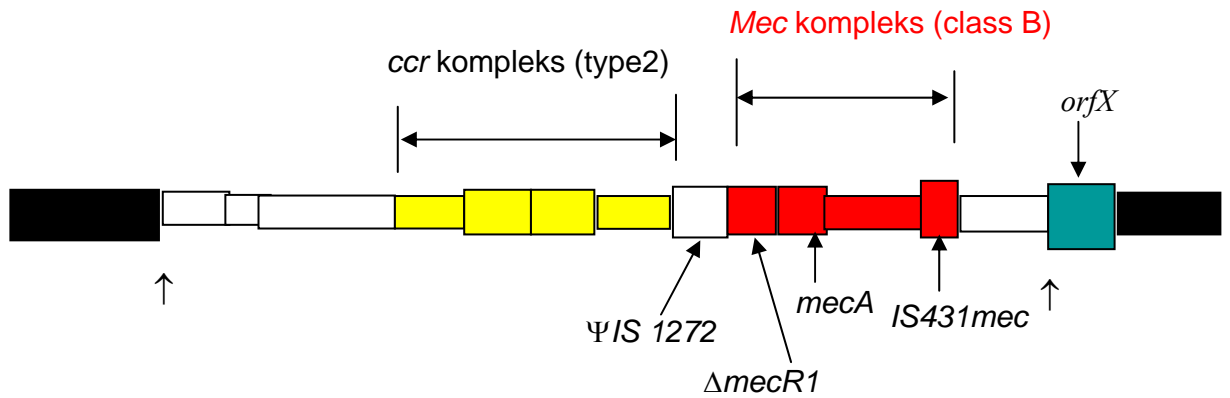
SCCmec içerisinde insersiyon dizileri ve *mecA* transkripsiyonunu düzenleyen genler (Δ *mecR1* veya *mecR1* ve *mecI*) bulunmaktadır (43). Bu genler *mec* geni ile birlikte *mec* gen kompleksi içinde yer alır. *mec* gen kompleksi, farklı *SCCmec* elemanlarında değişik şekillerde bulunur. Bu değişiklik farklı *mec* gen kompleksi sınıflarını ortaya çıkarır. Günümüze kadar *mec* gen kompleksleri ile ilgili 5 temel sınıf tanımlanmıştır. Bu sınıflar, 2 gruba ayrılır:

1. *mecI* ve *mecR1* düzenleyici genlerinin her ikisi de tam olanlar.

2. *mecI* ve *mecR1* düzenleyici genlerinin birinin veya her ikisinin bazı kısımları eksik olanlar. Birinci grup *mec* kompleksi, sınıf A olarak bilinirken, ikinci grup *mec* kompleksi sınıf B, C, D olarak kategorilere ayrılmaktadır. Tüm *mec* gen kompleksi sınıfları, *mecA* geni ile ilişkilendirilmiş IS431 insersiyon sekansının kopyasını içerir (25).

SCC*mec* elemanında ayrıca kromozomdaki spesifik bir bölgeye integrasyon ve bu bölgeden kesilip ayrılma için gerekli olan kaset kromozom rekombinazları kodlayan genler (*ccr*) bulunmaktadır (25). SCC*mec*'in hareketinden sorumlu *ccr* gen kompleksinde *ccrA*, *ccrB* ve *ccrC* olmak üzere üç farklı rekombinaz bulunmaktadır. *ccr* gen kompleksinin nükleotid sekanslarındaki farklılıklara göre rekombinazların dörder allotipleri tanımlanmıştır. Bunlar *ccrA* için; *ccrA1*, *ccrA2*, *ccrA3*, *ccrA4* ve *ccrB* için; *ccrB1*, *ccrB2*, *ccrB3*, *ccrB4*'tür (7, 25,58, 61). Bu allotiplerin kombinasyonlarına göre de *ccr* gen kompleks tipleri (tip 1-5) belirlenmiştir. Tip 1; *ccrA1* ve *ccrB1* genlerini, Tip 2; *ccrA2* ve *ccrB2* genlerini, Tip 3; *ccrA3* ve *ccrB3* genlerini, Tip 4; *ccrA4* ve *ccrB4* genlerini ve Tip 5; *ccrC* genini içerir (7, 61,62).

SCC*mec* elemanında yer alan *mec* ve *ccr* komplekslerinin etrafındaki değişken dizilere de J "Junkyard" bölgeleri adı verilmektedir. J bölgeleri, plazmidler (pT181, pUB110 ve p1258), transpozonlar(Tn554) ve insersiyon sekansları (IS431, IS1272 ve IS256) gibi kromozoma entegre olabilen, ek antimikrobiyal genetik determinantlarını taşıyan genetik elemanları içerirler (25, 36, 63). SCC*mec* elemanına entegre olan transpozonlarda makrolidler ve tetrasiklinler gibi antibiyotiklerle, kadmiyum ve civa gibi ağır metallerle karşı gelişen direnç genleri bulunur. Tüm SCC*mec* elemanları üç bölgeye ayrılır: J₁ bölgesi kromozomun sağ ucundan *ccr* genlerine kadar, J₂ bölgesi *ccr* geninden *mec* kompleksine kadar uzanır. J₃ bölgesi ise *mec* kompleksi ile SCC*mec* elemanının sol ucu arasında yer alır (6).



Şekil 1: SCC*mec* elemanında yer alan genlerin SCC*mec* üzerindeki konumları.

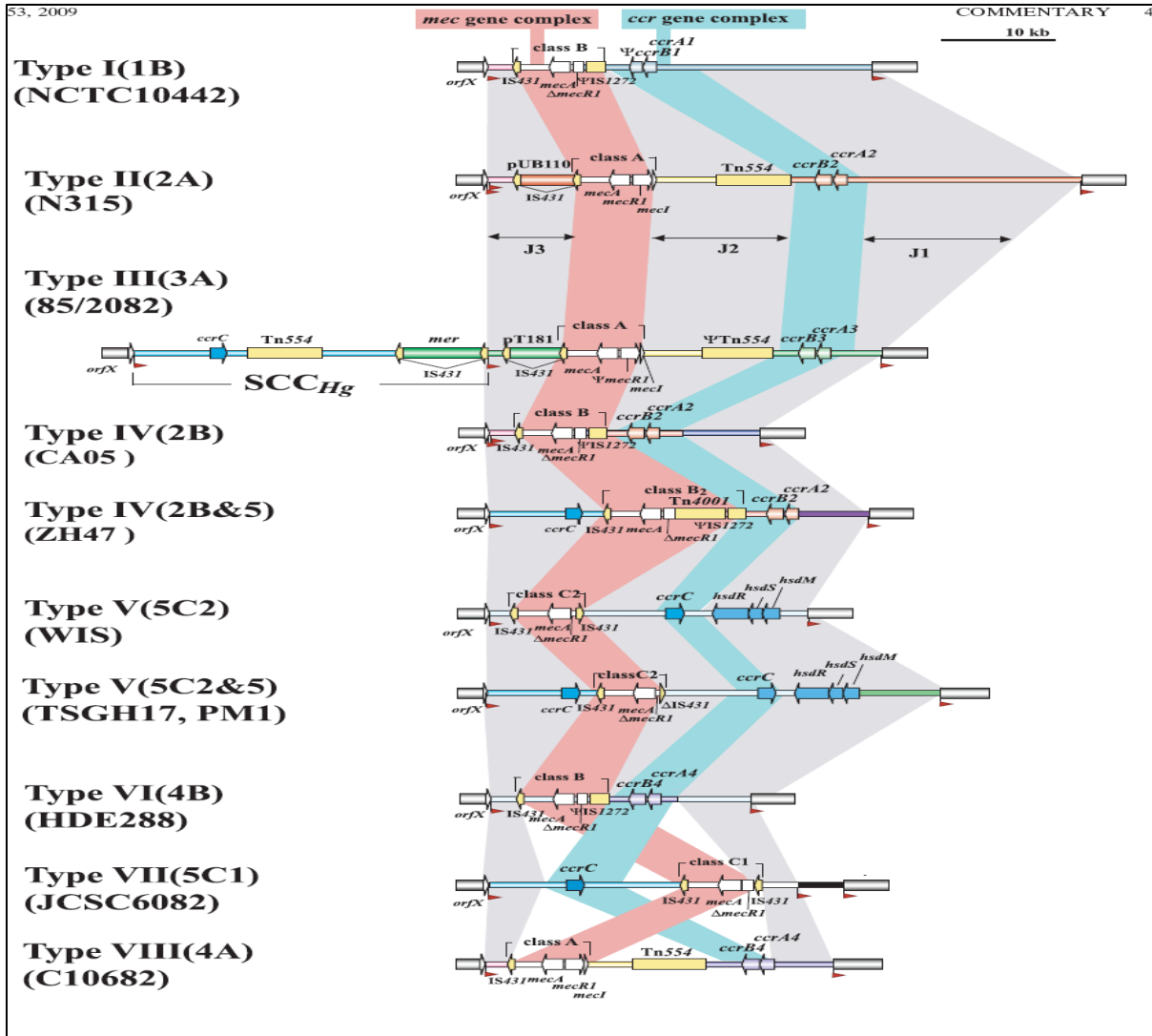
SCC*mec* elemanları, *ccr* gen kompleks allotiplerine ve *mec* gen sınıfının farklı kombinasyonlarına göre sınıflandırılmaktadır (58, 61). 1999'da ilk SCC*mec* elemanının bildirilmesinden günümüze kadar sekiz farklı SCC*mec* tipi bildirilmiştir. Farklı tiplerdeki SCC*mec* elemanlarının büyüklüğü 20.9 kb'dan 66.9 kb'ye kadar değişiklik göstermektedir. Tip I SCC*mec*, sınıf B *mec* gen kompleksi ve tip 1 *ccr* gen kompleksi; Tip II SCC*mec*, sınıf A *mec* kompleksi ve tip 2 *ccr* gen kompleksi; Tip III SCC*mec*, sınıf A *mec* gen kompleksi ve tip 3 *ccr* gen kompleksi; Tip IV SCC*mec*, sınıf B *mec* gen kompleksi ve tip 2 *ccr* gen kompleksi; Tip V SCC*mec*, sınıf C *mec* ve *ccrC*; Tip VI SCC*mec*, sınıf B *mec* kompleksi ve tip IV *ccr* gen kompleksi; Tip VII SCC*mec*, sınıf C *mec* kompleksi ve *ccrC*; Tip VIII SCC*mec*, sınıf A *mec* kompleksi ve tip 4 *ccr* gen kompleksi içermektedir (Tablo 2) (7, 9, 25, 64). SCC*mec* tiplerine ek olarak birçok varyant tanımlanmıştır. Örneğin, I A, II (A- G), III (A ve B), IV (a/b, c,d,E, F, g). Bu varyantlar J bölgelerindeki farklılıklara göre ortaya çıkmıştır. SCC*mec* tiplendirmesi, hastane kökenli MRSA'larla (HA-MRSA) toplum kökenli MRSA'ların (CA-MRSA) birbirlerinden farklı olduklarını kanıtlar. Tüm dünyada, SCC*mec* tiplerinden Tip I, II, III ve VIII hastane kökenli, tip IV, V, VI ve VII toplum kökenli MRSA izolatlarında bulunmaktadır (7, 9, 25, 64).

Tablo 2: SCC*mec* tiplerinin içerdikleri *ccr* gen kompleks tipleri ve *mec* gen kompleks sınıfları.

SCC <i>mec</i> tipi	<i>ccr</i> gen kompleks tipi	<i>mec</i> gen kompleks sınıfı
I	1 (A1 B1)	B
II	2 (A2 B2)	A
III	3 (A3 B3)	A
IV	2 (A2B2)	B
V	5 (C)	C2
VI	4 (A4B4)	B
VII	5 (C)	C1
VIII	4 (A4B4)	A

SCC*mec* Tip I, IV ve V sadece beta-laktam direnci kodlarken, SCC*mec* tip II ve III çoklu dirence yol açar. Bunun nedeni, *S.aureus*'un SCC*mec* dışında kromozomun değişik

bölmelerinde veya plazmidler üzerinde direnç elemanları içerirler. Tip II ve III elemanları, kaset içine entegre olmuş plazmidler (pUB110, pI258 ve pT181) ve bir transpozon (Tn 554) aracılığıyla taşınan ek direnç genlerini, taşımaktadır. Plazmid pUB110, kanamisin, tobramisin, bleomisin direncinden sorumlu ant(4') genini; pI258 penisilin ve ağır metal direncini, pT181 tetrasiklin direncini taşırken, Tn 554 ise indüklenebilir makrolid, linkozamid ve streptogramin (MLS) tipi dirence yol açan *ermA* genini taşımaktadır (6). (Şekil 2)



Şekil 2: SCCmec tiplerinin (tip I-VIII) ve varyantlarının genetik yapılarını gösteren diyagram (5).

SCCmec tip II ve SCCmec tip IV taşıyan izolatların üretildikleri klinik örnekler, önemli derecede farklılık gösterir. Genel olarak SCCmec tip II izolatları solunum yolu örneklerinden izole edilirken SCCmec tip IV izolatları deri, yumuşak doku, apseler ve

ameliyat sonrası yaralarından izole edilmektedir. SCCmec tip IV izolatları genellikle, deri ve yumuşak doku infeksiyonları, abseler ve ameliyat sonrası infeksiyonlardan izole edilirken SCCmec tip II suşları daha sıklıkla çocuk ve yetişkinlerin solunum yolu infeksiyonlarından izole edilmiştir (1).

2.7. Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus*'un Tiplendirme Yöntemleri

Bakteriyel suşların tiplendirilmesi salgınların ve nozokomiyal yayılımın araştırılmasında ve suşlar arası evrimsel ilişkilerin incelenmesinde önem taşımaktadır. MRSA izolatlarını birbirinden ayırt etmede kullanılan birçok tiplendirme yöntemi geliştirilmiştir (65). Tiplendirme yöntemleri temel olarak fenotipik ve genotipik tiplendirme olmak üzere iki kategoriye ayrılır (66,67).

2.7.1. Fenotipik yöntemler

Geleneksel veya konvansiyonel yöntemler olarak da bilinen fenotipik yöntemler, genetik bilginin ekspresyonu ile ortaya çıkan özelliklere göre mikroorganizmaların birbirleriyle ilişkili olup olmadıklarını ortaya koymaktadır. Mikroorganizmaların metabolik aktivitelerini ortaya koyan biyotipik profillerine, antibiyotik duyarlılıklarına, duyarlı oldukları faj tiplerine, protein içerikleri gibi birçok özelliklerine dayalı fenotipik yöntemler mevcuttur. Fenotipik farklılıkları ortaya koyan tiplendirme yöntemlerinin başlıca dezavantajı mikroorganizmaların, fenotipik özelliklerini değiştirme eğiliminde olmalarıdır. Bu değişiklikleri önceden bilmek imkansızdır, çünkü fenotipte meydana gelen değişiklikler, değişen çevre koşullarına bir yanıt olarak ortaya çıkmış olabilirler. Buna ilaveten serotiplendirme ve faj tiplendirme gibi pek çok fenotipik yöntem, çeşitli özgül reaktanlara gereksinim duyarlar. Ayrıca bir tek nükleotide meydana gelen nokta mutasyonları herhangi bir fenotipten sorumlu genin fonksiyonunu veya regülasyonunu bozabilir. Böylece fenotipik olarak farklı, ancak genotipik olarak benzer veya hemen hemen aynı olan izolatlar da ortaya çıkabilmektedir (67). Tam tersi olarak genetik olarak birbirleriyle ilişkisiz izolatların antibiyogramları birbiriyle aynı olabilmektedir. Bir başka fenotipik tiplendirme yöntemi olan faj tiplendirmesiyle ise birçok *S. aureus* izolatı tiplendirilememektedir (65).

Metisiline Dirençli *S. aureus* tiplendirmesinde kullanılan 5 fenotipik yöntem bulunmaktadır;(67)

- 1 Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri
- 2 Biyotiplendirme
- 3 Faj tipi
- 4 MLEE (Multilokus Enzim Elektroforezi)
- 5 Zimotiplendirme

2.7.1.1. Antimikrobial Duyarlılık Testleri

Antimikrobiyal duyarlılık testleri, uygulanması kolay, hızlı sonuç veren, maliyeti düşük ve rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılmak için uygun bir fenotipik yöntemdir. Bu test, sıklıkla bir salgının ilk göstergesi olabilecek yeni veya daha önce görülmeyen bir antibiyotik direnç paterninin tanımlanması açısından önem taşımaktadır. Ancak antibiyotik direnç fenotiplerindeki değişkenlikler nedeniyle antibiyotiplendirmenin epidemiyolojik olarak değeri oldukça kısıtlıdır. Bu yöntemin en önemli dezavantajı, düşük ayırt etme gücüne sahip olmasıdır. Farklı izolatlar aynı antibiyogram profiline sahip olabilecekleri gibi aynı klona ait iki izolatan antibiyogram profillerinin farklı olması mümkündür. Bu durum plazmid veya transpozonlar aracılığıyla taşınan direnç genlerinin yokluğu veya varlığı ile ilişkilidir (67).

Kalitatif antibiyotik duyarlılıklarına göre (duyarlı-dirençli) yapılan basit sınıflandırmalar sıklıkla ilişkisiz suşları ayırt etmede yetersizdir. Bunun yerine, kantitatif antibiyogram yani antibiyotik duyarlılık zon çaplarına göre değerlendirme yapmak, antibiyogramın tiplendirme gücünü artırır(65, 67).Yapılan epidemiyolojik çalışmalardan birinde kantitatif antibiyogramın ribotiplendirme kadar kullanışlı olduğu gösterilmiştir. Ancak, antibiyotik duyarlılık testleri MRSA tiplendirilmesinde tek başına kullanılamaz. Sadece bazı durumlarda, endemik veya epidemik bir klonun ayırt edilmesinde kullanışlı bir tarama yöntemi olabilir (68).

2.7.1.2. Faj tiplendirme

Stafilokokların tiplendirilmesinde, bakteriyofajların kullanımı, ilk kez 1940 yılında geliştirilmiştir. Bakteriyofajlar, bakteri hücrelerini enfekte ederek çoğu kez bakteri hücrelerinin

erimesine neden olan viruslar olarak tanımlanmaktadır. Faj tiplendirme, epidemiyolojik çalışmalarda bakterilerin değişik bakteriyofajlara olan duyarlılık ve dirençlerine göre tiplendirilmesinde kullanılan bir yöntemdir. Birçok salgının tanımlanmasında bu yöntem kullanılmıştır. Faj tiplendirme yöntemi, zaman alıcı ve teknik olarak oldukça fazla dikkat gerektiren bir prosedüre sahiptir. Bunun yanı sıra stok fajların ve kontrol suşlarının ancak referans laboratuvarlarında bulunması yöntemin dezavantajlarından biridir. Ancak yöntemin başlıca dezavantajı, tiplendirilemeyen izolat oranının yüksek olmasıdır. Ayrıca faj tiplendirme yönteminin önemi, zayıf tekrarlanabilirliği ve ayırım gücünden dolayı azalmıştır. Aynı izolat farklı zamanlarda ve koşullarda test edildiğinde farklı sonuçlar elde edilebilir (67).

2.7.1.3. Multilokus Enzim Elektrofrezisi (MLEE)

MLEE, enzimler iyi seçildiği zaman birçok lokus için farklı allellere sahip gen ürünleri arasında ayırıcı özelliğe sahip bir yöntemdir. Bu özellik, sık tercih edilen bazı DNA parmak izi yöntemlerinde bulunmayan ve evrimsel gelişimi inceleyen araştırmacılar tarafından gereksinim duyulan bir özelliktir.

MLEE yöntemi direkt uygulanan bir yöntemdir. Hücre ekstratları, jel elektrofrezisi, poliakrilamid jel elektrofrezisi veya normal koşullarda izoelektrik odaklama ile ayrılır ve enzimler spesifik boyama prosedürleri ile jellerde görünür hale getirilir.

MLEE yönteminde, enzimler buldukları genetik lokustaki farklılıkları yansıtan belirteçler olarak kullanılmaktadır. Enzimler arasındaki farklılıklara bağlı olarak elektroforetik tipler oluşur. İki izolat arasındaki benzerlik katsayısı farklılık gösteren lokus oranı ile belirlenmektedir. MLEE yöntemi ile oluşan profillerin okunması ve yorumlanması oldukça kolaydır. Ancak bu profillerin karşılaştırılması zor olduğundan değerlendirilmesinin bilgisayar programı aracılığıyla (MLST gibi) yapılması gerekmektedir. Bu yöntem yoğun çalışma gerektirdiğinden kullanımını sadece araştırma laboratuvarlarında sınırlandırılmaktadır (67).

2.7.1.4. Zimotiplendirme

MLEE yönteminin bir varyasyonu olan zimotiplendirme, bakteriyal esteraz enzimlerinin elektroforetik özelliklerindeki farklılıklara bağlı olarak ayırım yapmaktadır. Bu yöntemle esteraz enzimleri arasındaki benzerliklerin gerçekten ortak kalıtımı yansıtır

yansıtmadığını anlamak oldukça zordur. Birçok genotip tek zimotip içerisinde saptanmasına rağmen bu durumun tersi söz konusu değildir. Antibiyotik duyarlılık paternleri ile zimotiplendirme sonuçları arasında uyum olmaması bu yöntemin kullanımını azaltmıştır (67).

2.7.2. Genotipik yöntemler

2.7.2.1. Plazmid Analizi

MRSA'nın epidemiyolojik olarak incelenmesinde kullanılan ilk moleküler teknik plazmid analizidir. Plazmidlerin büyüklüğüne ve sayısına göre izolatlar arasındaki farklılıkların elektroforez yöntemi ile belirlenmesi prensibine dayanmaktadır. Plazmid analizi, uygulaması kolay ve yorumlanması basit bir yöntemdir. Ancak tekrarlanabilirliğinin ve kararlılığının olmaması plazmid analizi ile ilgili başlıca sorundur (67,69).

Plazmidler hareketli, ekstra kromozomal elemanlar olduğundan plazmid profilleri oldukça sık değişiklik göstermektedir. Bu durum salgın analizlerinde yapılan testin duyarlılığını azaltmaktadır. Sadece plazmid analizi yöntemi kullanılarak yapılan çalışmalarda birbirlerinden farklı izolatlar arasında DNA transferinden kaynaklanan yanlış klonal salgının ortaya çıkması söz konusu olabilir (67,69).

2.7.2.2. Kromozomal DNA'nın Makrorestriksiyon Analizi ve [("Pulsed-Field Gel Electrophoresis" (PFGE))]

Schwarz ve Cantor tarafından geliştirilen Pulsed-Field Jel Elektroforezi (PFGE) yöntemi, *S.aureus* ve diğer birçok patojen bakterinin genetik farklılıklarını araştırmak için moleküler epidemiyolojide kullanılan önemli bir genetik tiplendirme metodudur (69). 1990 yılından beri PFGE, birçok bakterinin incelenmesinde etkili ve çok yönlü bir yöntem haline gelmiştir. Tekrarlanabilirliğinin yüksek olması nedeniyle, bu yöntem bir çok araştırmacı tarafından moleküler yöntemler içerisinde "altın standart" olarak kabul edilmiştir.

Bu yöntem, farklı yönlerden belli sürelerde verilen elektriksel akım yani "pulse" ile megabaz büyüklüklerindeki moleküller de dahil olmak üzere DNA molekülünün restriksiyon endonükleazlarla kesimi prensibine dayanmaktadır (66). DNA'nın parçalanmasının engellenmesi için bakteri hücresi agaroz içerisindeyken DNA elde edilir ve ardından uygun restriksiyon endonükleaz enzimleri ile muamele edilir (69). Suşların çeşidine göre farklı olan restriksiyon bölgelerine bağlı olarak, restriksiyon endonükleaz DNA'yı parçalara ayırır. Restriksiyon endonükleazlar kromozom boyunca az sayıda bulunan spesifik bölgeleri tanır ve

kesim sonucu oluşan 10-800 kb'lık DNA parçaları bakterinin kromozomal restriksiyon profilini verir (66,67,69).

Makrorestriksiyon analizinde kullanılan enzimler DNA'yı seyrek olarak keserler. Bu nedenle ortaya çıkan parçalar, klasik elektroforetik şartlarda yürütülmek için çok büyük olduğundan etkili bir şekilde ayırt etmek mümkün değildir. Bu DNA parçalarının göçünü sağlamak için elektrik akımının yönünün sık olarak değiştiği bir elektriksel alan sağlanır. Bu değişim, megabaz büyüklüğündeki DNA'nın belirli boyutlara ayrılmasını sağlar. Böylelikle DNA jel içinde ilerleyebilir (69). DNA parçaları anoda göç etmeden önce kendilerini elektrik akımının yönü ile uyumlu hale getirirler. Bu hizalamanın meydana gelmesi DNA parçalarının molekül ağırlığına bağlıdır. Elektroforez işlemi boyunca elektrik akımı bir sıra takip eder. Bu da DNA parçalarının çözünürlüğünün iyi olmasını sağlar. Küçük moleküller hızlı bir şekilde yer değiştirip hareket ederken büyük moleküller yeni elektrik alana geçiş yapabilmek için çok fazla zamana ihtiyaç duyarlar. Bu durum büyük parçaların başlama noktasına daha yakın olduğunu gösterir (70). Belli büyüklükteki DNA molekülünün reoryantasyonunun başlamadığı bir minimum "switching time" aralığı vardır, yani küçükten büyüğe moleküllerin ayrışabilmesi için, ilk PFGE zamanları, elektroforez sırasında ardışık olarak daha yüksek bir değere çıkartılır. Bu prensip ile kısa ve/veya daha uzun "switch" zamanları kullanılarak küçük ve/veya büyük moleküllerin ayrımı sağlanmaktadır (66). Elektroforez sıcaklığı ve süre, elektrik akımının şiddeti, geliş açısı ve sıklık derecesine göre ayarlanmaktadır.

Pulsed-field prensibine dayanan çeşitli elektroforetik teknikler tanımlanmıştır. Günümüzde bu teknikler arasından en yaygın olarak kullanılanları, FIGE "field-inversion gel electrophoresis" ve CHEF "contour-clamped homogenous electric field" gibi elektrik alan açısının değişimine bağlı olan tekniklerdir. FIGE, kolay ve ucuz bir yöntem olduğu gibi 0.1-200 kb büyüklüğündeki parçaları ayırmak için kullanılabilir en iyi tekniktir. Bu sistemde elektrik akımı kolayca ileri ve geri yönlerde yer değiştirebilmektedir. İleri yönde uygulanan akımın süresi, geriye uygulanandan 3 kat daha uzundur. CHEF ise 3 Mb büyüklüğünden fazla olan parçaların ayrışması için kullanılan en iyi sistemdir. Bu sistem altıgen şeklinde yerleştirilmiş elektrodlardan meydana gelir. Bu elektrodlar, 120 derecelik açılarda sabit hızda elektrik akımının oluşması için kullanılmaktadır. Böylece parçalar bozulmadan düz bir şekilde hareket eder (69).

Bu yöntemin ideal tiplendirme yöntemi olarak nitelendirilmesini sağlayan basit ve standart bir teknik olması gibi birçok özelliği vardır. Bu yüzden MRSA tiplendirmesinde

kullanılan moleküler yöntemler içerisinde altın standart olarak kabul edilmiştir. Bu özelliklerinin yanı sıra PFGE kullanımı sınırlandıran bir takım problemler vardır (66). Örneğin; uzun süreli bir işlem olduğu için sonucun çıkması oldukça fazla zaman almaktadır. Ayrıca, pahalı malzemeler ve özel ekipman kullanmak gerekmektedir. Oluşan toplam bant sayısı az olmasına rağmen sonuçların yorumlanmasında sorunlar çıkmaktadır. Elektroforez şartlarındaki küçük farklılıklar her bir bandın hareket ettiği mesafeyi değiştirebilir. Bu durum farklı jellerdeki izolatlar arasında karşılaştırma yapmayı zorlaştırmaktadır (67,69). Her jele ilave edilen kontrol grubu ve standart molekül ağırlığı karşılaştırma yapmaya yardımcı olur (67). Ancak bu sınırlamalar PFGE tekniğinin salgınların karakterini belirlemede oldukça kullanışlı bir yöntem olmasını engellememektedir.

PFGE, epidemik ve pandemik MRSA suşlarının epidemiyolojisini belirlemek amacıyla epidemiyolojik çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Bunun için çok sayıda restriksiyon endonükleaz test edilmesine rağmen test edilenlerin hiçbiri *SmaI* kadar iyi performans gösterememiştir. *SmaI* enzimi, AT açısından zengin *S. aureus* kromozomunu az sıklıkla kesebilen özelliğine sahiptir. PFGE değerlendirmesi Tenover ve arkadaşlarının kriterlerine göre yapılmaktadır. Bu yöntemle PFGE protokolleri arasında bir uyum yaratmış ve bu standart bir terminoloji haline gelmiştir. Standart uygulama ve değerlendirme kriterlerinin bulunması, PFGE ile elde edilen sonuçların değişik laboratuvarlar arasında paylaşımını sağlamaktadır (65).

2.7.2.3. Restriksiyon Enzim Analizi (REA)

Restriksiyon enzimleri, stafilokokkal kromozom üzerindeki spesifik sekanslara bağlanarak o bölgeyi keser. Bu yöntem kromozomal DNA'nın restriksiyon enzimleri ile spesifik bölgelerden kesilerek küçük parçaların oluşması ve elektroforez ile ayırım yapılması prensibine dayanmaktadır. Bu amaçla, Bg/II ve EcoR1 gibi sıklıkla stafilokokkal kromozom üzerinde bulunan bölgelere bağlanabilen restriksiyon enzimleri kullanılır. Tüm MRSA izolatlarının tiplendirilmesini sağlayan yöntem, epidemik izolatların sporadik olanlardan başarılı bir şekilde ayırtdilmesinde kullanılmaktadır (67).

2.7.2.4. Ribotiplendirme

Genotiplendirme teknikleri epidemiyolojik çalışmalar için çok kıymetli veriler elde edilmesini sağlamaktadır. Genotiplendirme amacıyla kullanılan PFGE yöntemi altın standart

olmasına karşın pahalı ekipman ihtiyacı ve tecrübeli laboratuvar çalışanlarının olmasını gerektirdiğinden, aynı amaca hizmet eden daha ucuz ekipman ve tecrübeli laboratuvar çalışanlarının olmasına ihtiyaç duymayan ve de otomatize sistemlerle entegre edilebilen bir moleküler yöntem bulundu. Bu yöntem, ilk olarak Grimont ve Grimont tarafından tarif edilmiştir. Daha sonra Stull ve arkadaşları yöntemi geliştirmişler ve epidemiyolojik araştırmalardaki yerini ortaya koymuşlar (69). Ribotiplendirme yöntemi ribozomal gen bölgeleri içerisindeki DNA dizilerinin değişkenliklerinin saptanması prensibine dayalı bir yöntemdir. Bu amaçla PZT tabanlı ribotiplendirme yöntemlerinde elde edilen amplifikasyon ürünlerinin sekansının incelenmesi ya da restriksiyon enzimler ile işlenmeleri sonrası elde edilen bant farklılıklarının saptanmasına dayalı olabilmektedir (71).

Farklı ribotiplendirme yöntemlerinde ribozomal RNA'ların proplar yardımıyla saptandığı hibridizasyon teknikleri de kullanılabilir. Bakterilerde birçok gen tek kopya halinde bulunmaktadır, ribozomal gen bölgeleri birçok kopya halinde bulunduğundan incelenecek suşların DNA'sının izole edilmesi ve restriksiyon enzimleri ile kesilmesinin ardından elektroforez ile DNA parçalarının ayrılmasını sağlanarak seçilmiş prob (rRNA'a özgül) ile hibridize edilebilmektedir. Ribozomal genlerin bir tür içerisinde genellikle korunmuş olması, yöntemin ayırım gücünü azaltsa da, bu yöntemin bazı bakterilerin alt tiplerinin belirlenmesinde başarılı olduğu gösterilmiştir (67, 71). Ancak minor bant farklılıklarının yorumlanmasındaki kriterlerin standardize edilememiş olması, yöntemin karmaşık ve zaman alıcı olması bu tip yöntemlerin uygulama alanlarını kısıtlamaktadır. Daha çok salgın suşlarının tanımlanmasında ve bu suşların farklı izolatlardan ayrılmasında kullanılır (67).

2.7.2.5. “Randomly Amplified Polymorphic DNA” (RAPD) (Arbitrarily Primed (AP PCR))

DNA parmak izi analizleri için çeşitli PZT bazlı yöntemler tanımlanmıştır. Bu yöntemlerden biri arbitrarily primed (AP PCR) olarak bilinen “Random amplified polymorphic DNA” (RAPD PZT)'dir. Bu yöntemde yaklaşık 10 bazlık kısa primerlerin tutunabileceği genom boyunca rastgele yerleşmiş diziler hedef alınarak amplifiye edilmektedir. Çoğaltılan ürünler agaroz jelde ayrıldıktan sonra etidyum bromür ile boyanmaktadır. Böylece amplifiye bölgelerin sayısına ve büyüklüğüne bağlı olarak parmak izi oluşur. Tepkimede tek bir rasgele oligonükleotid primeri kullanıldığında, genomdaki homolog sekanslar ile hibridize olmaktadır. Eğer primer alternatif DNA ipilikçikleri üzerindeki dizilerle hibridize olursa, iki hibridizasyon bölgesi arasındaki DNA alanı amplifiye

edilmektedir (67).

Ayırım gücü, kullanılan primerlerin sekansına ve sayısına bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Ayırım gücünün artırılması için birden fazla primerin kullanılması gerekmektedir. Ancak yöntemin değerlendirme kriterlerinin standart olmayışı ve tekrarlanabilirliğinin düşük olması farklı laboratuvarlar arasında değil aynı zamanda aynı laboratuvar içerisinde bile sorun oluşturmaktadır. Bu nedenlerle ortak bir veri tabanının oluşturulması güçtür (67).RAPD, PFGE'e ve diğer yöntemlere göre uygulaması basit ve hızlı olduğu için sıkça başvurulan bir yöntemdir. Avantaj ve dezavantajları değerlendirildiğinde RAPD, salgın araştırmasında çabuk bir ön değerlendirme yapılmak istendiğinde, daha sonra kullanılacak PFGE gibi referans yöntemler için yararlı bir ön çalışma olarak kullanılabilir (67,69).

2.7.2.6. *coa* (Koagülaz) Tiplendirme Yöntemi

S.aureus suşlarının karakteristik özelliklerinden biri olan koagülaz üretimi, tiplendirmede kullanılabilen önemli kriterlerdendir. *coa* tiplendirme yöntemi, koagülaz genindeki spesifik segmentlerdeki çeşitliliğe bağlı olarak geliştirilmiştir. 3' bölgesinde sayısı 4 ile 8 arasında değişen 8'li baz çiftlerinden oluşan tekrarlar serisi yer alır. Koagülaz enzimine ait *coa* gen bölgesinin PZT ile amplifiye edilmesi sonucu oluşan amplifiye ürünü *AluI* gibi restriksiyon enzimleri ile kesilir. Elde edilen kesim ürünlerinin jel elektroforezi ile ayrılması sonucu var olan restriksiyon bölgelerinin sayısına bağlı olarak çeşitli büyüklükte 4'ten fazla bant oluşur. Ortaya çıkan restriksiyon parçalarının büyüklük polimorfizmindeki farklara bağlı olarak değerlendirilme yapılır (69). Ancak bu yöntemde, restriksiyon enzimleri ile PZT ürünlerinin kesimi için uygun inkübasyon süreleri ve sıcaklık koşullarının optimizasyonu, ayrıca elektroforez sırasında kullanılacak akım ve sürelerinin optimizasyonu gibi ön çalışmalar gereklidir (72). *coa* tiplendirme yönteminin, epidemik ve sporadik MRSA izolatlarını birbirlerinden ayırmak amacıyla kullanılması önerilmektedir.

2.7.2.7. “Multi Locus Sequence Typing” (MLST)

MLST, son yıllarda bakterilerin tiplendirilmesinde kullanılan dizi analizi bazlı bir yöntem olup epidemiyolojik çalışmalara küresel bir yaklaşım getirmektedir. MLST analizi, hastalık etkeni ve antibiyotiklere dirençli bakterilerin karakterize edilmesi ve izlenmesinde kullanışlı bir yöntemdir. Bu yöntemle, yedi yapısal (house-keeping) gene ait kısa internal

fragmanların (450-500bp uzunluğunda) dizi analizi yapılmaktadır. Bu amaçla *S. aureus* için *arcC*, karbamat kinaz; *aroE*, shikimate dehydrogenase; *glp*, gliserol kinaz; *gmk*, guanilat kinaz; *pta*, fosfat asetiltransferaz; *tpi*, triosephosphate isomerase; ve *yqiL*, asetil koenzim A asetiltransferaz proteinlerini kodlayan genlere ait dizi analizleri yapılmaktadır (69).

Her bir hedef gen dizisi için o diziye özgü bir allel numarası verilmekte ve yedi lokusta bulunan allel numaralarının birleştirilmesi ile bir “allelık profil” oluşturulmaktadır. (6, 73). Bu numaralar “dizi tipi (sequence type, ST)” olarak adlandırılmaktadır. Tek bir nükleotid farklılığı bile suşun yeni bir allel numarası almasını gerektirir. İlişkisiz iki izolatın şans eseri aynı allelik profile sahip olması ise çok düşük bir ihtimaldir.

Belirlenen allelik profiller, MLST veri bankasındaki (<http://www.mlst.net>) bilinen allellerle kıyaslanarak, tespit edilen allel profilinin diğer ülkelerdeki yaygınlık derecesi hakkında bilgi edinmek mümkün olabilmektedir. Elde edilen verilerin, merkezi bir veri tabanında toplanması ve birbirleri ile bir program aracılığıyla karşılaştırılması MLST'nin diğer yöntemlere göre daha standardize olduğunu göstermektedir. Elektronik ortamda saklanabilir verilerin oluşturulabilmesi MLST'nin en önemli avantajlarından birisidir. Bu sayede yeni izolatlar daha öncekilerle kolay bir şekilde karşılaştırılabilmektedir ve verilerin daha kolay paylaşımı mümkün olabilmektedir. Klinik uygulamalarda araştırmacılar için bu veriler, önemi giderek artan kullanım alanlarına sahiptir.

ST (sequence type) bilgileri nümerik karakterlerden veriler olduklarından matematiksel olarak bu sekans tiplerini www.mlst.net web adresinden ulaşılabilen farklı yaklaşım yöntemleri ile, BURST (Based Upon Related Sequence Types), NRDB (NON-REDUNDANT DATABASES - allele assignment), LINKAGE DISEQUILIBRIUM ve SPLITS-TREE gibi on-line olarak analiz yapabilen alt filo-genetik analiz modülleri ile izolatlar arasındaki filogenetik ilişkileri incelemek mümkündür (6).

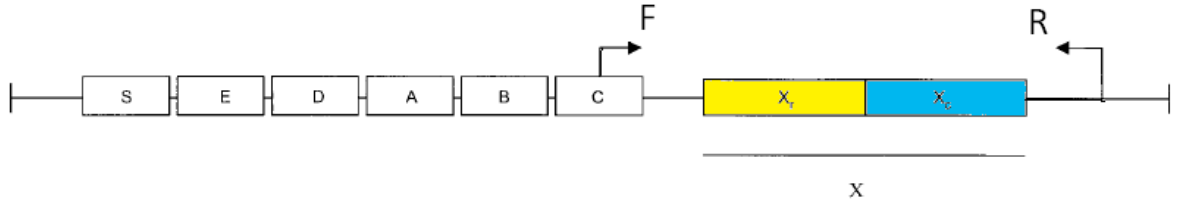
MLST, infeksiyöz hastalıkların izlenmesinde uluslararası paylaşımın ve iletişimin sağlanması için oldukça kullanışlı bir yöntemdir (69). Web sitesinde araştırmacılar bulgularını karşılaştırabilmekte ve ortak bir veri tabanı geliştirebilmektedirler. MLST çok fazla avantaja sahip olmasına rağmen çeşitli zorluklara da sahiptir. Bu zorlukların başında 7 allel üzerinde çok düşük hata oranına sahip dizi analizi yapmak gelmektedir. Çoğu laboratuvar için bunları sağlayabilmek oldukça pahalı ve zaman alan bir süreçtir. Bu yöntemin yaygın olarak

kullanılabilirliği, laboratuvarların dizi analizlerini ekonomik olarak uygulayabilecek teknik ekipmana sahip olmasına bağlıdır (6,69)

2.7.2.8. *spa* Tiplendirme

Fréney ve arkadaşları (74) tarafından geliştirilen bir yöntemdir. Bu yöntem, *S. aureus*'un protein A (*spa*) geninin kısa tekrar bölgesi (short sequence repeat, SSR) veya protein A'yı kodlayan *spa* geninin değişken bölgesi olan polimorfik X bölgesinin dizi analizine dayanır. Bu bölgeler yüksek polimorfizme sahiptir. Polimorfik X bölgesi değişken 24 baz çiftlik tekrarları içermektedir ve C terminal hücre duvarı bağlanma dizisinin kodladığı bölgeye yerleşmektedir. SSR bölgesinin çeşitliliği, tekrarlayan dizilerin duplikasyonu ve delesyonu ile meydana gelmektedir. Ayrıca bu durumdan nokta mutasyonları da sorumlu tutulmaktadır.

spa tiplendirmesinin MLST'ye göre başlıca üstünlüğü daha kolay uygulanabilir oluşu ve sadece tek bir bölgenin dizi analizini gerektirmesidir. *spa* tiplendirmesinin ayırtedici gücü PFGE ve MLST'nin arasında bir değerdedir. MLST'den farklı olarak, *spa* tiplendirmesi MRSA'ların hem moleküler evriminin hem de hastane salgınlarının araştırılması için uygundur. *spa* tiplendirmesinin avantajı araştırmacıların "in-house" sekanslama platformlarını kullanarak hazırlanmış yazılım programlarıyla sonuçlarını değerlendirilebilmesidir.



Şekil 3: Protein A gen haritası. Kutulardaki gen kodları; S:sinyal dizisi, A-D: immüoglobulin bağlayan bölgeler, E: A-D ile homoloji gösteren bölge, X: polimorfik bölge, COOH terminal bölge, Xr: kısa dizi tekrarları (SSR, 24bp) , Xc: hücre duvarına bağlama dizisi.(75)

Koreen ve arkadaşları (76) ve Harmsen ve arkadaşları (77) tarafından *spa* tiplendirme için tüm dünyada kullanılan iki farklı terminoloji sistemi tanımlanmıştır. Maalesef her iki çalışmacının terminoloji sistemindeki farklılıklar yayınlanan *spa* tiplendirmesi verilerinin karşılaştırmasını güçleştirmektedir. Bugüne kadar Ridom StaphType software (Ridom GmbH, Wurzburg, Germany) Avrupa'da *spa* sekanslarının analizinde geniş ölçüde kullanılmaktadır.

Laboratuardaki tiplendirme sonuçları internet yolu ile merkezi *spa* server ile senkronize bir şekilde karşılaştırılmaktadır (<http://www.spaserver.ridom.de>). Bu web sitesi European SeqNet.org tarafından başlatılan evrensel bir terminolojiye sahip olmak üzere geliştirilmiş bir veritabanıdır. Bu veritabanı Avrupa'nın 36 farklı ülkesinde izole edilmiş 13000'den fazla izolata ait 100 farklı *spa* tekrarının kombinasyonundan oluşan 1200'den fazla *spa* tipi içermektedir. Bu yüzden *S. aureus*'la ilgili en geniş sekans bazlı veritabanıdır. *spa* tiplerine ait bilgilerin bir arada toplanmasının enfeksiyon kontrolünün devamlılığını sağlamak ve elektronik ortamda erken uyarı sistemi oluşturarak MRSA suşlarının hastane düzeyinde yaygınlığını belirlemek gibi avantajları vardır (6).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Yapılan çalışma deneysel nitelikte bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Çalışma, 2010-2011 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesinden çalışmaya her yıl (2006-2009) için 25'er izolat dahil edilmiştir. Bu isolatlar seçilirken antibiyotik duyarlılık paternleri göz önüne alınmıştır. Bu kritere uygun isolatlar arasından kura ile çalışma suşları seçilmiştir. Diğer merkezlerden gönderilen MRSA suşlarının tümü çalışmaya alınmıştır.

3.4. Çalışma Materyali

Çalışma materyali olarak, 2006-2009 yıllarında dört farklı merkezde (Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Hacettepe Üniversitesi Çocuk Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı), yatan hastalar ve poliklinik hastalarının, kan, idrar, yara yeri ve solunum yolu örneklerinden soyutulan metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) isolatları kullanıldı.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Yöntemlerin anlatıldığı kısımda, her yöntemde kullanılan kontrol değişkenleri belirtilmiştir.

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Kullanılan cihazlar ve sarf malzemeleri

Sıra No		Marka	Lot No, Model, Seri No, Katalog No	Kullanıldığı Analiz
1.	Kanlı Agar	OXOID		İzolatların pasajlanması
2.	Mueller Hinton Agar	OXOID		Antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi
	Brain Heart Infusion Broth	OXOID		
3.	Antibiyotik diskleri (penisilin, oksasilin, sefoksitin, vankomisin, eritromisin, klindamisin, gentamisin, siprofloksasin, trimethoprim-sulfometaksazol)	OXOID		Antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi
4.	Petri kutusu	IsoLab		İzolatların pasajlanması, Antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi
5.	Agaroz (Low-melting) (25g)	Prona Reducta	081570PR	PFGE
6.	Agaroz (100g)	Prona Plus	111740PR	PFGE
7.	Agaroz (moleküler biyolojik çalışmalar için) (100g)	AppliChem	8W003273	PZT
8.	TE tamponu(Tris-EDTA Buffer) (100ml)	AppliChem	7M002249	DNA ekstraksiyonu, PFGE
9.	TBE tamponu (x10 konst.) (1000ml)	Fermentas	00068683	PZT, PFGE
10.	<i>Sma</i> I (10U/μl)	Fermentas	# ER0661	PFGE

11.	Taq polimeraz (500U)	Fermentas	# EP0402	PZT
12.	dNTP set (Herbir setten 100mM 'lık)	Fermentas		PZT
13.	Primerler	Fermentas		PZT
14.	Steril plastik öze	IsoLab	ILPSB0015	Tüm analizler
15.	Filtreli pipet ucu (0,5-10, 10-100, 100-1000µl)			Tüm analizler
16.	Kaynatılabilir mikrotüp (1,5 ml) (500 adet/poşet)	UltraCruz	SC-200271	Tüm analizler
17.	İnce duvarlı PCR tüpü(düz kapaklı) (10x100 adet/poşet)	MedSanTek		PZT
18.	100 bp DNA Ladder	Fermentas	# SM 0241	PZT
19.	<i>Lambda</i> Ladder + <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Ladder	BioRad+Fermentas	170-3605 + 170- 3635	PFGE
20.	Loading dye (X6 konsantre) 5x1 ml	Fermentas	# R0611	PZT
21.	Akromopeptidaz(500 KU)	Sigma	A 3547	DNA ekstraksiyonu, PFGE
22.	Etidyum bromür	AppliChem		PZT, PFGE
23.	Thermal Cyler	Techne Model: FTC41H2D	5C00098	PZT
24.	Pulsed Field Gel Electrophoresis cihazı- CHEF-DR III sistemi	Bio-Rad Laboratories Nazareth, Belgium		PFGE
25.	Su banyosu	Memmet	SV1422	PFGE, DNA ekstraksiyonu
26.	Çalkalamalı Su Banyosu	Nüve- SHAKINS water bath	ST402	PFGE
27.	Jel Elektroforez Sistemi	Thermo	13590ECA-LVD	PZT

28.	Jel görüntüleme sistemi	Vilber Lourmat		PZT
29.	Mikrodalga	Roda	RD-7017P-A	PZT, PFGE
30.	-80 ultra derin dondurucu	Thermo	705 REL#2 805797-117	İzolat stoklarının saklanması
31.	-20 derin dondurucu	Uğur Derin Dondurucu	UDD200BK	Malzemelerin saklanması
32.	Buzdolabı	Vestel No-Frost	RINA 465HG	Malzemelerin saklanması
33.	Etüv	Electro-mag Incubator	M 420B	Tüm analizler
34.	Tartı	Adam Equipment Co. Ltd.	AE 326611770	PZT, PFGE
35.	Otoklav	HICLAVE Hirayama	HV-85 000685748	Tüm analizler

3.6.2. İzolatlar

Çalışmaya, 2006-2009 yıllarında dört farklı merkezde (Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Hacettepe Üniversitesi Çocuk Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı), yatan hastalar ve poliklinik hastalarının, kan, idrar, yara yeri ve solunum yolu örneklerinden soyutulan, toplam 207 metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) suşu alındı.

Diğer üç merkezden stok gönderilen izolatlar ile Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarında izole edilen izolatlar kanlı agar besiyerine pasajlandı. Kontamine olan kültürlerden *S. aureus* kolonilerinin izolasyonu amacıyla tekrar pasaj yapıldı. Üreyen kolonilerden *S. aureus* tanımının doğrulanması amacıyla Gram boyama, katalaz ve koagülaz testleri uygulandı.

3.6.3 Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Çalışmaya alınan izolatların penisilin, oksasilin, vankomisin, eritromisin, gentamisin, siprofloksasin, ko-trimoksazol, klindamisin, sefoksitin duyarlılıkları Mueller-Hinton agar kullanılarak disk difüzyon yöntemiyle incelendi. Zon çapları CLSI (Clinical and Laboratory Standarts Institute) (47) önerilerine göre değerlendirilerek direnç durumları belirlendi. İzolatların metisilin duyarlılığı oksasilin ve sefoksitin diskleri ile elde edilen sonuçlara göre değerlendirildi.

Tablo 3: Oksasilin ve sefoksitin disk difüzyon yönteminde kullanılan zon çap değerleri.

Disk içeriği	Zon Çapı (yaklaşık mm)		
	R	I	S
Oksasilin	≤10	11-12	≥13
Sefoksitin	≤19	-	≥20

3.6.4. Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) kolonilerinden DNA eldesi

Multipleks PZT yöntemlerinde kullanılmak üzere, MRSA suşlarından herbirinden akromopeptidaz yöntemi ile bakteri DNA'sı elde edildi (78).

3.6.4.1. Akromopeptidaz Yöntemi ile DNA Eldesi

Kullanılan Çözeltiler

Akromopeptidaz (Sigma A 3547): 10 U/ μ l olacak şekilde steril deiyonize su ile sulandırıldı. Çözelti -20°C'de saklandı.

NET tamponu: 10 mM NaCl + 1 mM EDTA +10 mM Tris. Oda sıcaklığında saklandı.

Yöntem

100 μ l NET tamponu, 10 μ l akromopeptidaz çözeltisi (10 U/ μ l) ile mikrosantrifüj tüpünde karıştırıldı. Steril plastik öze ile alınan iki-üç stafilocok kolonisi çözelti içine konularak süspense edildi. Tüpler 50°C'ye ayarlanmış su banyosunda 15 dakika bekletildi. Oda sıcaklığına gelen karışım PZT için kullanıldı.

3.6.5. Multipleks Polimeraz Zincir Tepkimesi(PZT) için Kullanılan Malzemeler

Tamponlar:

0.5 M Na₂EDTA (pH 8.0): 186.12 g disodyum etilen di amin tetra asetat (-2H₂O) 800 ml su içinde karıştırılarak eritildi. NaOH pelletleri kullanılarak pH 8.0'e ayarlandı. Hacim bir litreye su ile tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

10X TBE: 108 g Tris, 55g borik asit, 900 ml su içinde çözüldü. 40 ml 0.5 M Na₂EDTA (pH 8.0) eklendi ve hacim su ile bir litreye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

TE Buffer (pH 8.0): 2.5ml hacimde 10mM Tris, 0.25 ml hacimde 1mM EDTA (pH 8.0), 247.25 ml su ile karıştırılarak pH 8.0'e ayarlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

Jel Yükleme Tamponu(6X):

% 0.25 bromfenol mavisi	0.75 ml
% 0.25 xylene cyanol FF	1.5 ml

%30 gliserol (su içindeki karışım)	9 ml
Distile su	18.75 ml

Etidyum Bromid (1000X, 5mg/ml):

Etidyum Bromid	0.5 g
Distile su	100ml

3.6.6. Stafilokokkal Kaset Kromozom *mec* (*SCCmec*) Tiplerinin Multipleks PZT ile Belirlenmesi:

Bu amaçla Milherico ve ark. (8) tarafından geliştirilen multipleks PZT yöntemi uygulandı. Bu yöntemle, internal kontrol olarak kullanılan metisilin direnç geni *mecA*'nın ve *SCCmec* tip I, II, III, IV, IV alttiplerinin ve tip VI varlığını belirleyen genlerin saptanması amaçlanmıştır. *SCCmec* tayininde kontrol suşları olarak COL (tip I) , N315 (tip II), ANS46 (tip III), HC825 (tip IV), HDE288 (tip VI) kullanıldı.

3.6.6.1. *SCCmec* Multipleks PZT için Kullanılan Öncüller

Çalışmada 10 çift (forward-reverse) olmak üzere toplam 20 adet öncül kullanıldı. Her öncül, farklı *SCCmec* tipleri üzerindeki bölgeleri simgelemektedir. Kullanılan öncüller, öncül dizileri, her öncüle özgü *SCCmec* tipi ile öncülün saptadığı bölge ve elde edilen ürün büyüklükleri Tablo 4'de görülmektedir.

Tablo 4: *SCCmec* tayininde kullanılan multipleks PZT öncülleri, öncül dizileri, elde edilen ürün büyüklükleri ve karşılık gelen *SCCmec* tipleri.

Öncül No	Öncül Adı	Öncül dizileri (5' - 3')	Öncül Özgüllüğü (<i>SCCmec</i> tipi, bölge)	Ürün büyük lüğü (bp)
P1	C1F2 F2	TTCGAGTTGCTGATGAAGAAGG	I, J1 bölgesi	495
P2	C1F2 R2	ATTTACCACAAGGACTACCAGC		
P3	ccrC F2	GTACTCGTTACAATGTTTGG	V, ccr kompleksi	449
P4	ccrC R2	ATAATGGCTTCATGCTTACC		

P5	RIF5 F10	TTCTTAAGTACACGCTGAATCG	III, J3 bölgesi	414
P6	RIF5 R13	ATGGAGATGAATTACAAGGG		
P7	SCCmecV J1F	TTCTCCATTCTTGTTTCATCC	V, J1 bölgesi	377
P8	SCCmecV J1R	AGAGACTACTGACTTAAGTGG		
P9	des F2	CATCCTATGATAGCTTGGTC	I, II, IV ve VI, J3 bölgesi	342
P10	des R1	CTAAATCATAGCCATGACCG		
P11	ccrB2 F2	AGTTTCTCAGAATTCGAACG	II ve IV, ccr kompleksi	311
P12	ccrB2 R2	CCGATATAGAAWGGGTTAGC		
P13	kdp F1	AATCATCTGCCATTGGTGATGC	II, J1 bölgesi	284
P14	kdp R1	CGAATGAAGTGAAAGAAAGTGG		
P15	SCCmecIIIJ1 F	CATTTGTGAAACACAGTACG	III, J1 bölgesi	243
P16	SCCmecIIIJ1R	GTTATTGAGACTCCTAAAGC		
P17	mecI P2	ATCAAGACTTGCATTCAGGC	II ve III, mec kompleksi	209
P18	mecI P3	GCGGTTTCAATTCACCTTGTC		
P19	mecA P4	TCCAGATTACAACCTCACCAGG	İnternal pozitif kontrol	162
P20	mecA P7	CCACTTCATATCTTGTAACG		

3.6.6.2. Öncül karışımının hazırlanması

Öncüllerin (20 adet) herbirinden 50 pmol/μl olacak şekilde stok solüsyon hazırlandı. Öncüller aşağıdaki tabloda verilen miktarlara göre karıştırılarak öncül kullanım karışımı elde edildi. Hazırlanan öncül çözeltileri steril mikrosantrifüj tüplere aktarılıp -20°C’de saklandı.

Tablo 5: Öncül karışımı için kullanılan öncül konsantrasyonları ve hacimleri

Öncül No	Öncül	100 μM/ μl	Konsantrasyon	Primer karışıma eklenecek hacim
P1	C1F2 F2:	732 μl	0,4μM	2 μl
P2	C1F2 R2:	737 μl	0,4μM	2 μl
P3	ccrC F2:	994 μl	0,8μM	4 μl
P4	ccrC R2:	702 μl	0,8μM	4 μl
P5	RIF5 F10:	743 μl	0,4μM	2 μl
P6	RIF5 R13:	750 μl	0,4μM	2 μl
P7	SCCmecV J1F:	739 μl	0,4μM	2 μl
P8	SCCmecV J1R:	743 μl	0,4μM	2 μl
P9	des F2:	868 μl	0,8μM	4 μl
P10	des R1:	579 μl	0,8μM	4 μl

P11	ccrB2 F2:	766 µl	0,8µM	4 µl
P12	ccrB2 R2:	567 µl	0,8µM	4 µl
P13	kdp F1:	521 µl	0,2µM	1 µl
P14	kdp R1:	458 µl	0,2µM	1 µl
P15	SCCmecIIIJ1 F:	750 µl	0,4µM	2 µl
P16	SCCmecIIIJ1R:	657 µl	0,4µM	2 µl
P17	mecI P2:	692 µl	0,8µM	4 µl
P18	mecI P3:	510 µl	0,8µM	4 µl
P19	mecA P4:	777 µl	0,8µM	5 µl
P20	mecA P7:	668 µl	0,8µM	5 µl

3.6.6.3. SCCmec Multipleks PZT Reaksiyon Karışımının Hazırlanması

Reaksiyon için 3 mM MgCl₂'den 3µl, her birinden (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) 40 µM olacak şekilde hazırlanan dNTP karışımından 2.5 µl, 2.5 ünite *Taq* polimeraz enziminden 0.5µl, hazırlanan öncül kullanım karışımından 4 µl, 10X *Taq* tamponundan (konsantrasyonu 1X'e düşecek şekilde) 2.5 µl, test edilecek DNA örneklerinden 2 µl ilave edilerek toplam hacim 25 µl olacak şekilde reaksiyon karışımı elde edildi. Reaksiyon karışımı 0.5ml'lik mikrosantrifüj tüplerinde buz üzerinde hazırlandı.

3.6.6.4. SCCmec Multipleks PZT – Amplifikasyon Programı

94°C	4dk	ön denatürasyon	} 30 siklus
94°C	30sn	denatürasyon	
54°C	30sn	birleşme	
72°C	1dk	uzama	
72°C	4dk	son uzama	
4 °C	∞		

3.6.6.5. Sonuçların Değerlendirilmesi

TBE tamponu (1X) içinde % 2 lik 50 ml agaroz jel hazırlandı. İçerisine 5 mg/ml konsantrasyondaki etidyum bromid çözeltisinden 2.5 µl eklendi. Karışım jel kalıbına döküldü. Jel donduktan sonra PZT ürünü (10µl) ile 6X yükleme tamponu (2µl) 1X'e dilüe edilerek her bir kuyucuğa yüklendi. DNA ladder (100bç) (5 µl) da jel kuyucuğuna aktarıldı. Elektroforez tankı 1X TBE tamponu ile dolduruldu. Jel bu tank içinde 120V'da 70 dakika

elektroforeze tabi tutuldu. Ardından jel ultraviyole aydınlatıcıda görüntülendi ve sonuçlar incelendi.

Tüm SCC*mec* tiplerinde internal kontrol olarak kullanılan 162 baz çiftlik (bç) *mecA* ürünün varlığı pozitif olarak değerlendirildi. 495 bç ve 342 bç ürün varlığı SCC*mec* tip I, 342, 311, 284 ve 209 bç ürün varlığı SCC*mec* tip II, 414, 243 ve 209 bç ürün varlığı SCC*mec* tip III, 342 ve 311 bç bantların varlığı SCC*mec* tip IV alttip a-d ve g, 311 bç bandın gözlenmesi SCC*mec* tip IV alttip E ve F, 449 ve 377 bç bantların varlığı SCC*mec* tip V, 342 bç ürün varlığı ise SCC*mec* tip VI olarak tanımlandı.

Tablo 6: SCC*mec* tiplerinin belirlenmesinde kullanılan gen bölgeleri ve onları simgeyen ürün büyüklükleri.

SCC <i>mec</i> tipi		Ürün büyüklüğü (bç)
Tip I	C1F2, dcs, <i>mecA</i>	495, 342,162
Tip II	dcs, kdp, ccrB2, <i>mecI</i>, <i>mecA</i>	342, 311, 284, 209,162
Tip III	RIF5, SCC<i>mec</i> III J1, <i>mecI</i>, <i>mecA</i>	414, 243, 209,162
Tip IV alttip a-d,g	<i>mecA</i>, dcs, ccrB2	342, 311,162
Tip IV E,F	ccrB2, <i>mecA</i>	311,162
Tip V	ccrC, SCC<i>mec</i>V J1, <i>mecA</i>	449, 377,162
Tip VI	dcs, <i>mecA</i>	342, 162

3.6.7. Ito Yöntemi ile SCCmec PZT Uygulaması

Milherico ve arkadaşlarının önerdiği multipleks PZT yöntemi kullanılarak incelenen SCCmec tiplerinin doğrulanması amacıyla Ito ve arkadaşları (60) tarafından önerilen PZT yöntemi uygulandı. Bu yöntem, sınıf A ve B *mec* gen kompleksi ve tip 1-3 *ccr*'yi saptamak için kullanılmaktadır. Farklı tiplerin temsilcisi olarak N315 (Tip II), ANS46 (Tip III) ve HC825 (Tip IV) suşları kullanılmıştır.

3.6.7.1. SCCmec PZT için Kullanılan Öncüller

Çalışmada kullanılan öncüller ve öncül dizileri Tablo'te gösterilmiştir. Tablo' da gösterilen öncüller sadece tip 1-3 *ccr* tipini saptamak için kullanılan öncüllerdir. Farklı SCCmec tipleri için uygun öncül çiftleri kullanılarak üç farklı PZT uygulandı (Tablo). Kullanılan öncül çiftlerini simgeleyen *ccr* gen kompleksi ile elde edilen ürün büyüklükleri Tablo'da gösterilmiştir. Öncül çözeltileri steril mikrosantrifüj tüplerine aktarılıp -20°C'de saklandı.

Tablo 7: Ito yöntemi-SCCmec PZT için kullanılan öncüller

Öncüller	Öncül dizileri(5' - 3')
$\beta 2$	5'-ATTGCCTTGATAATAGCCITCT-3'
$\alpha 2$	5'-AACCTATATCATCAATCAGTACGT-3'
$\alpha 3$	5'-TAAAGGCATCAATGCACAAACACT-3'
$\alpha 4$	5'-AGCTCAAAAGCAAGCAATAGAAT-3'

Tablo 8: Ito yönteminde kullanılan öncül kombinasyonları, öncül çiftlerinin simgelediği *ccr* gen kompleks tipleri ve elde edilen ürün büyüklükleri

Kullanılan öncül kombinasyonları	SCCmec tipi	<i>ccr</i> gen kompleks tipi	Ürün büyüklüğü
$\beta 2 + \alpha 2$	I	tip 1 <i>ccr</i>	700 bp
$\beta 2 + \alpha 3$	II, IV	tip 2 <i>ccr</i>	900-950 bp
$\beta 2 + \alpha 4$	III	tip 3 <i>ccr</i>	1.6 – 1.8 kb

3.6.7.2. SCCmec PZT Karışımının Hazırlanması

SCCmec tip III reaksiyonu için 25 mM MgCl₂'den 5µl, 100 µM dNTP'den 5µl, 2.5 ünite Taq polimeraz enziminden 0.5µl, öncüllerin herbirinden 1'er µl, 10X Taq tamponundan 5 µl (konsantrasyonu 1X'e düşecek şekilde), test edilecek DNA örneklerinden 2 µl, toplam hacim 50 µl olacak şekilde karışım hazırlanırken SCCmec tip II ve tip IV reaksiyonu için 25 mM MgCl₂'den 2.5µl, 100 µM dNTP'den 2.5µl, 2.5 ünite Taq polimeraz enziminden 0.5µl, öncüllerin herbirinden 1'er µl, 10X Taq tamponundan 2.5 µl (konsantrasyonu 1X'e düşecek şekilde), test edilecek DNA örneklerinden 2 µl, toplam hacim 25 µl olacak şekilde karışım 0.5ml'lik mikrosantrifüj tüplerinde buz üzerinde hazırlandı.

3.6.7.3. SCCmec PZT – Amplifikasyon Programı

94°C	4dk	ön denatürasyon	
94°C	1dk	denatürasyon	} 30 siklus
55°C	1dk	birleşme	
72°C	2dk	uzama	
72°C	6dk	son uzama	
4 °C	∞		

3.6.7.4. Sonuçların değerlendirilmesi

TBE tamponuna (1X) 1 gram agaroz eklenerek % 2 lik 50 ml agaroz jel hazırlandı. İçine 5 mg/ml konsantrasyondaki etidyum bromid çözeltisinden 3 µl eklendi. Karışım tarakları hazırlanmış jel kalıbına döküldü. Jel katıldıktan sonra taraklar çıkarılarak jel tankına yerleştirildi. İki µl 6x jel yükleme tamponu ve 10 µl PZT ürünü karıştırılarak her bir kuyucuğa 10 µl yüklendi. Jel, 1X TBE tamponu içerisinde 120 V uygulanarak 45 dakika yürütüldü ve sonuçlar ultraviyole aydınlatıcıda incelenerek görüntüldü.

3.6.8. *pvl/nuc* Multipleks PZT Uygulaması

Bu amaçla Lina ve ark. (79) tarafından önerilen multipleks PZT yöntemi uygulandı. Bu yöntemle *S. aureus*' a özgü *nucA* ve Panton Valentin Lökosidin toksinini kodlayan *pvl* gen (*luk-PV*) varlığı saptandı.

3.6.8.1. *pvl/nuc* Multipleks PZT için Kullanılan Öncüller

Çalışmada kullanılan öncül dizileri ve stok konsantrasyonları Tablo'te gösterilmiştir. Öncül konsantrasyonları *nuc* ve *pvl* için 50 pmol/μl olacak şekilde hazırlandı. Öncül çözeltileri steril mikrosantrifüj tüplerine aktarılıp -20°C'de saklandı.

Tablo 9: *pvl/nuc* multipleks PZT için kullanılan öncüller

Öncüller	Öncül dizileri(5' - 3')	Öncül Konsantrasyonu (stok)
<i>nuc</i> -1	GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT	50 pmol/μl
<i>nuc</i> -2	AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC	50 pmol/μl
<i>luk-PV</i> -1	ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA	50 pmol/μl
<i>luk-PV</i> -2	GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAAGC (S=G,C)	50 pmol/μl

3.6.8.2. *pvl/nuc* Multipleks PZT Karışımının Hazırlanması

Reaksiyon için 25 mM MgCl₂'den 5μl, 100 μM dNTP'den 5μl, 2.5 ünite *Taq* polimeraz enziminden 0.55μl, 50 pmol *nuc1* öncülünden 1 μl, 50 pmol *nuc2* öncülünden 1 μl, 50 pmol *luk-PV*-1 öncülünden 1 μl, 50 pmol *luk-PV*-2 öncülünden 1 μl, 10X *Taq* tamponundan 5 μl (konsantrasyonu 1X'e düşecek şekilde), test edilecek DNA örneklerinden 5 μl, toplam hacim 50 μl olacak şekilde karışım 0.5ml'lik mikrosantrifüj tüplerinde buz üzerinde hazırlandı.

3.6.8.3. *pvl/nuc* Multipleks PZT – Amplifikasyon Programı

94°C	4dk	ön denatürasyon	
94°C	30sn	denatürasyon	} 30 siklus
55°C	30sn	birleşme	
72°C	1dk	uzama	
72°C	5dk	son uzama	
4 °C	∞		

3.6.8.4. *Sonuçların değerlendirilmesi*

TBE tamponuna (1X) 1 gram agaroz eklenerek % 2 lik 50 ml agaroz jel hazırlandı. İçine 5 mg/ml konsantrasyondaki etidyum bromid çözeltisinden 3 µl eklendi. Karışım tarakları hazırlanmış jel kalıbına döküldü. Jel katılaştıktan sonra taraklar çıkarılarak jel tankına yerleştirildi. İki µl 6x jel yükleme tamponu ve 10 µl PZT ürünü karıştırılarak her bir kuyucuğa 10 µl yüklendi. Jel, 1X TBE tamponu içerisinde 120 V uygulanarak 45 dakika yürütüldü ve sonuçlar ultraviyole aydınlatıcıda incelenerek görüntüldü.

luk-PV için, 433 bç; *nuc* için 280 bç ürün varlığı pozitif olarak değerlendirildi.

3.6.9. Makrorestriksiyon Analizi “Pulsed Field” Jel Elektroforezi (PFGE) Uygulaması

Makrorestriksiyon analizi, Bannerman ve ark. (8)’ nın önerdiği, İskoç MRSA Referans Laboratuvarı tarafından hazırlanmış protokole göre uygulandı.

3.6.9.1. *Kullanılan tamponlar ve karışımlar*

NET Tamponu: 10 mM NaCl + 1 mM EDTA +10 mM Tris. Oda sıcaklığında saklandı.

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 de oksikolat, 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), 247.25 ml su ile karıştırılarak pH 8.0’e ayarlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

Restriksiyon Enzimi Karışımı: Kullanımdan hemen önce her izolat için 87 µl deiyonize su,

10 µl 10X reaksiyon tamponu, 3 µl (10 U/ µl) *SmaI* restriksiyon enzimi ilave edilerek restriksiyon enzim karışımı hazırlandı.

3.6.9.2. Protokol kısaca aşağıdaki basamaklardan oluşmaktadır:

1. Kullanılacak lizis tamponu buzdolabından ve akromopeptidaz (10 U/ml) derin dondurucudan çıkartıldı.

2. **Agaroz blokların hazırlanması için kullanılacak low melting temperature agarozun hazırlanması:**

2.1. 0.1 g düşük erime ısılı agaroz (Prona Reducta, Spain) tartıldı ve 20 ml'lik balon jojeye aktarıldı.

2.2. 5 ml TE tamponu ilave edilerek homojenize edildi. Mikrodalga fırında 30 saniye bekletildi ve çıkartılıp hafifçe karıştırılarak agarozun tamamen çözülmesi sağlandı.

2.3. Daha sonra steril tüpe aktarılıp ağzı kapatıldı. Kullanıma kadar 50°C'lik su banyosunda bekletildi.

3. **Agaroz blokların hazırlanması:**

3.1. PFGE çalışılacak suş sayısına göre 1.5ml'lik steril mikrosantrifüj tüpleri numaralandırıldı.

3.2. Her tüpe 250µl NET tamponu konuldu. Steril plastik bir öze ile, kanlı agara tek koloni ekimi yapılan bakteri kolonisinden bir öze dolusu alınarak uygun mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve NET tamponu içerisinde homojenize edildi.

3.3. Blok kalıplarının alt kısmı yapışkan bantlarla kapatıldı, böylece kullanıma hazır hale getirildi.

3.4. Mikrosantrifüj tüplerine 20 µl akromopeptidaz ve 250 µl düşük erime ısılı agaroz ilave edilerek, içerik yavaşça karıştırıldı.(Bu işlemler her örnek için tek tek yapıldı.)

3.5. Her suştan 2 adet olacak şekilde agaroz kalıplarında bloklar hazırlandı.

3.6. Agaroz oda ısısında 10-15 dakika katılaşmaya bırakıldı.

4. Agaroz içerisindeki hücrelerin parçalanması ve agaroz bloklarının yıkanması:

- 4.1. Steril cam test tüplerine 2 ml önceden ısıtılmış (50°C) lizis tamponu karıştırıldı ve her suş için bir tüpte iki blok olacak şekilde bloklar lizis tamponu içerisine aktarıldı.
- 4.2. Tüpler 50°C'lik su banyosunda 1 saat tutuldu.
- 4.3. Süre sonunda lizis tamponu plastik pastör pipetleri ile uzaklaştırıldı.
- 4.4. Her seferinde her tüpe 2'şer ml TE tamponu ekleyerek ve tampon eklendikten sonra 10 dakika bekleyerek bloklar 3'er kez yıkandı.

5. Agaroz blokları içerisindeki DNA'nın Restriksiyon enzimi ile kesilmesi:

- 5.1. Yeni 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpleri suş başına bir tüp olacak şekilde numaralandırıldı.
- 5.2. Restriksiyon işlemi için kapaklı steril tüpte steril malzeme ve filtreli pipet uçları kullanılarak restriksiyon enzim karışımı hazırlandı. [1305µl su (deiyonize); 150µl 10x enzim tamponu, 45µl *SmaI* enzimi (100U/µl'lik stoktan) şeklinde hazırlanan karışım 15 suşun çalışılması için gereken miktardır.]
- 5.3. Hazırlanan restriksiyon enzim karışımından her mikrosantrifüj tüpüne 100' er µl eklendi.
- 5.4. Yıkama işleminden geçirilmiş bloklardan uygun büyüklükte parçalar kesilerek karışım içerisine aktarıldı. Arta kalan bloklar 1ml TE tamponu içerisine konularak 4°C'de saklandı.
- 5.5. Tüpler 30°C'de 3 saat su banyosunda tutuldu.

6. Agaroz jelin hazırlanması ve blokların jele yüklenmesi:

- 6.1. Restriksiyon işlemi bitmeden yaklaşık 1 saat önce agaroz jel hazırlandı.
- 6.2. Bu amaçla 2185 ml distile suya 115 ml 10x TBE tmponu eklenerek 2300 ml 0.5x TBE tamponu elde edildi.
- 6.3. Hazırlanan 0.5x TBE' den 100ml alınarak 500 ml'lik erlene aktarıldı. Üzerine 1 gr agaroz (Prona Plus,Spain) ilave ettikten sonra tartılıp (tartım sonucu not edildi),

erlenin ağzı parafilm ile kapatıldı. Mikrodalga fırında minimum ayarda 15 saniyelik zaman aralıkları ile 60 saniye bekletildi. Çözünen agaroz tekrar tartılarak distile su ilavesi ile önceki ağırlığına getirildi.

6.4. Agaroz, 55°C'lik su banyosunda 30 dakika bekletildikten sonra kalıba dökülüp katılaşması için 30-45 dakika bekletildi.

6.5. Bu arada, PFGE elektroforez tankına 2200ml 0.5x TBE tamponu boşaltıldı ve cihaz çalıştırılarak tamponun 14°C'ye soğuması sağlandı.

6.6. Hazırlanan agaroz donduktan sonra taraklar çıkartılıp *SmaI* ile kesilmiş blok parçaları jele yüklendi. Daha sonra bu kuyucukların ağzı, blokların kuyucuklardan çıkmasını engellemek amacıyla %2'lik düşük erime ısıly agaroz ile kapatıldı.

6.7. Agarozun donması için oda ısısında beş dakika bekletildi.

7. **Elektroforez işlemi:** Süre sonunda jel cihaza yerleştirilerek yürütme şartlarına göre ayarlanan program çalıştırıldı.

CHEF-DR III 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

Volt/cm- 6.0

8. **Jelin boyanması ve görüntülenmesi:**

8.1. Etidyum bromür stok solüsyonundan (10mg/ml) 40 µl alınarak 400 ml distile su içerisine ilave edilerek son hacim 1 µl/ml olacak şekilde jelin boyanmasını sağlayan solüsyon hazırlandı.

8.2. Hazırlanan solüsyon etidyum bromür kabına dökülerek, elektroforez işlemi biten jel boyama solüsyonu içine dikkatlice yerleştirildi. Jel oda ısısında 30 dakika boyamaya bırakıldı.

8.3. Boyama işlemi tamamlandıktan sonra jel etidyum bromürden alınarak distile su ile yıkandı.

8.4. Süre sonunda boyanan jel görüntüleme sisteminde (Infinity, Vilber Lourmat, France) görüntüledi. Görüntüleme işlemi Infinity Capt (Vilber Lourmat, France) yazılım programı kullanılarak yapıldı.

9. **PFGE paternlerinin değerlendirilmesi:** Elde edilen makrorestriksiyon analizi sonuçlarının değerlendirilmesinde Tenover kriterleri kullanıldı (65). Bu kriterlere göre bant profillerine bakılarak izolatların birbirleriyle ilişkileri derecelendirilmektedir (Tablo 8).

Tablo 10: PFGE profillerinin Tenover kriterlerine göre yorumlanması.

Kategori	Genetik farklılık (n)	Farklı bant (n)	Epidemiyolojik yorum
Aynı suş	0	0	Salgının bir parçası
Yakın ilişkili	1	1-3	Büyük olasılıkla salgının bir parçasıdır
Olasılıkla ilişkili	2	4-6	Salgınla ilişkili olabilir
Farklı klon	≥ 3	≥ 7	Salgına ait değil

Aynı suş: Aynı sayıda ve boyutlarda bant içeren izolatlar için kullanılır. Bu izolatlar genetik olarak farfsız kabul edilir. Aynı profili gösteren izolatlar epidemiyolojik olarak ilişkilidir.

Yakın ilişkili suş: 2-3 bant farklılığı olan izolatlar için kullanılır. Bu farklılık, bir nokta mutasyon veya bir insersiyon ya da bir delesyon gibi tek bir genetik olayla ilişkilidir.

Olasılıkla ilişkili suş: Aralarında 4-6 bant farkı olan izolatlar için kullanılır. Bu farklılık ise iki bağımsız genetik değişikliğin sonucu olarak ortaya çıkmıştır. Bu tip izolatlar, epidemiyolojik yönden salgın suşu ile olası ilişkili değerlendirilir.

İlişkisiz suşlar: Bu izolatlarda üç ya da daha fazla genetik değişiklik meydana gelmektedir. Buna bağlı olarak da salgın suşundan yedi ya da daha fazla bant farkı gözlenir. Epidemiyolojik olarak salgın suşu ile ilişkisi olmadığı kabul edilir.

- Buna ek olarak her izolat için bant sayı ve büyüklükleri belirlendikten sonra Jacards katsayısı ($J_{ij} = \frac{n_{AB}}{n_{AB}+a+b}$ (n_{AB} : Hem A hem B sırasında ortak olan bantların sayısı; a: A sırasında olup B'de bulunmayan bant sayısı; b: B sırasında olup A'da bulunmayan bant sayısı) hesaplandı. Jacards katsayısı 1 olan suşlar birbirinin aynı, 0.8-1.0 olan suşlar birbiriyle ilişkili, <0.8' en küçük olan suşlar birbirinden farklı olarak değerlendirildi. Bu sonuçlar Mega 4 bilgisayar programı kullanılarak UPGMA yöntemiyle analiz edildi ve izolatlar arası ilişkiyi gösteren dendogramlar çizildi.

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi

	İşin Tanımı	2010										2011							
		O	Ş	M	N	M	H	T	A	E	E	K	A	O	Ş	M	N	M	H
1.	Literatür Taraması	X	X	X	X	X					X	X	X	X	X	X			
2.	Çalışmaya alınacak suşların seçimi ve farklı merkezlerden suşların toplanması		X	X															
3.	Varolan malzemelerle çalışmaların başlaması. Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi suşlarının SCCmec tiplerinin belirlenmesi ve <i>pvl</i> gen varlığının araştırılması tamamlandı.				X														
4.	Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi suşlarının DNA makrorestriksiyon analizi yapıldı. Hacettepe Üniversitesi Hastanesi ve Marmara Üniversitesi Hastanesi suşlarının SCCmec tiplerinin belirlenmesi ve <i>pvl</i> gen varlığının araştırılması tamamlandı.					X	X	X											
5.	Hacettepe Üniversitesi Hastanesi ve Marmara Üniversitesi Hastanesi suşlarının DNA makrorestriksiyon analizi yapıldı.							X	X										
6.	İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi suşlarının tümü çalışılıp SCCmec tipleri belirlendi, <i>pvl</i> gen varlığı saptandı ve DNA makrorestriksiyon analizi yapıldı.									X	X								
7.	Elde edilen verilerin değerlendirilmesi ve taranan literatürle karşılaştırılması. Tezin yazılması.											X	X	X	X	X	X		

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Çalışma sonucunda elde edilen veriler bulgular kısmında açıklanmıştır.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Çalışma ile ilgili sınırlamalara tartışma kısmında değinilmiştir.

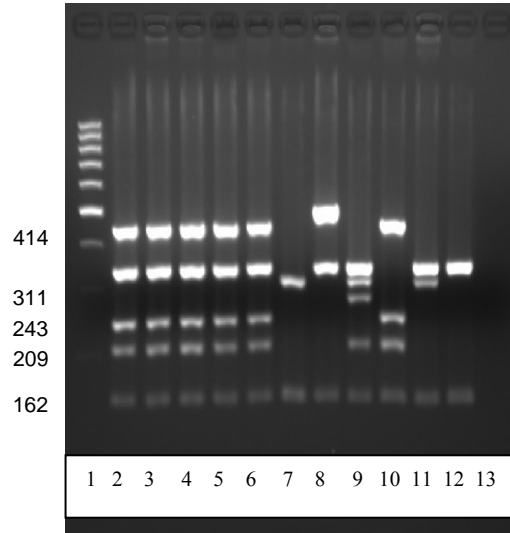
3.10. Etik Kurul Onayı

245/2009 nolu protokol numaralı proje, 30/Temmuz/2009 tarihinde ve 11/18/2009 nolu etik kurul toplantısında etik kurul tarafından onaylanmıştır.

4. BULGULAR

SCCmec Multipleks PZT Sonuçları:

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi, İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi Hastanesi'nde ve Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde izole edilen 207 metisiline dirençli *S. aureus* suşunun SCCmec tipleri uygun primerler kullanılarak multipleks PZT yöntemi ile (SCCmec I, SCCmec II, SCCmec III, SCCmec IV, SCCmec VI) olacak şekilde tiplendirildi (Şekil 4).



Şekil 4: SCCmec multipleks PZT yöntemi ile MRSA izolatlarının SCCmec tiplendirilmesi. 8.-12. sıralar Tip I-IV ve VI SCCmec (+) kontrol suşları; 2-6. sıralar SCCmec Tip III; 7.sıra SCCmec Tip IVE.

Çalışmaya alınan 207 MRSA izolatınının 179'u SCCmec Tip III varyantı, 14'ü SCCmec Tip IV, 7'si SCCmec Tip III, 6'sı SCCmec Tip IVE ve 1'i SCCmec Tip II olarak saptandı.

Farklı merkezlerin suş sayılarına göre SCCmec tiplerinin oranları; Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde SCCmec Tip III varyantı % 93 (93/100), SCCmec Tip III % 1 (1/100) SCCmec Tip IV % 4 (4/100) ve SCCmec Tip IVE % 2 (2/100), Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi'nde SCCmec Tip III varyantı % 82.7 (43/52), SCCmec Tip IV % 11.5 (6/52), SCCmec Tip III % 3.9 (2/52) ve SCCmec Tip II % 1.9 (1/52), İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi Hastanesi'nde SCCmec Tip III varyantı % 85.7 (18/21), SCCmec Tip III % 9.5 (2/21), SCCmec Tip IV için % 4.8 (1/21) ve Marmara Üniversitesi Tıp

Fakültesi Hastanesin’de SCCmec Tip III varyantı % 73.5 (25/34), SCCmec Tip IVE % 11.8 (4/34), SCCmec Tip IV % 8.8 (3/34) ve SCCmec Tip III için % 5.9 (2/34) olarak belirlenmiştir (Tablo 9).

Tablo 11: Merkezlere göre SCCmec dağılımları

	DEÜ n(%)	Hacettepe n(%)	Çapa n(%)	Marmara n(%)	Toplam n(%)
Tip I-IA	-	-	-	-	-
Tip II	-	1 (% 1.9)	-	-	1 (%0.5)
Tip III	1(%1)	2 (% 3.9)	2 (%9.5)	2 (%5.9)	7 (%3.4)
Tip III varyantı	93 (%93)	43 (% 82.7)	18 (%85.7)	25 (%73.5)	179 (%86.5)
Tip IV	4 (%4)	6 (% 11.5)	1 (%4.8)	3 (%8.8)	14 (% 6.7)
Tip IV E	2 (%2)	-	-	4 (%11.8)	6 (% 2.9)
Toplam	100	52	21	34	207

Şehirlere göre SCCmec dağılımları

Şehirlere göre değerlendirildiğinde SCCmec tiplerinin dağılımı; İzmir için SCCmec Tip III varyantı oranı %93 (93/100), SCCmec Tip III oranı %1 (1/100), SCCmec Tip IV oranı %4 (4/100) ve SCCmec Tip IVE oranı %2 (2/100); Ankara için SCCmec Tip III varyantı oranı % 82.7 (43/52), SCCmec Tip IV oranı %11.5 (6/52), SCCmec Tip III oranı %3.9 (2/52) ve SCCmec Tip II oranı %1.9 (1/52), İstanbul için SCCmec Tip III varyantı oranı %78.2 (43/55), SCCmec Tip III oranı %7.3(4/55), SCCmec Tip IV oranı %7.3(4/55) ve SCCmec Tip IVE oranı %7.3 (4/55) şeklindedir (Tablo 10).

Tablo 12: Şehirlere göre SCCmec tiplerinin dağılımları

	İzmir n(%)	Ankara n(%)	İstanbul n(%)	Toplam n(%)
Tip I-IA	-	-	-	-
Tip II	-	1 (%1.9)	-	1 (%0.5)
Tip III	1 (%1)	2 (%3.9)	4 (% 7.3)	7 (%3.4)
Tip III varyantı	94 (%93)	43 (%82.7)	43 (% 78.2)	179 (%86.5)
Tip IV	4 (%4)	6 (%11.5)	4 (% 7.3)	14 (% 6.7)
Tip IV E	2 (%2)	-	4 (% 7.3)	6 (% 2.9)
Toplam	100	52	55	207

Yıllara ve merkezlere göre SCCmec dağılımları

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nden alınan suşların yıllara göre SCCmec dağılımı değerlendirildiğinde; SCCmec Tip III varyantının her yıl için baskın tip olarak ortaya çıktığı görülmüştür. SCCmec Tip III varyantının yıllara göre oranları (2006-2009) sırasıyla, %100 , %96 , %84 ve % 92 şeklindedir. SCCmec Tip IV/IVE ise ilk olarak 2007 yılında tespit edilmiştir. Prevalansı 2008 yılında artış göstererek %4'den %16'a yükselmiştir. Ardından 2009 yılında bu oran azalarak %4'e düşmüştür (Tablo 11).

Tablo 13: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nden alınan suşların yıllara göre SCCmec dağılımı

	2006 n(%)	2007 n(%)	2008 n(%)	2009 n(%)	Toplam n(%)
Tip III	-	-	-	1(%4)	1(%1)
Tip III varyantı	25 (%100)	24 (%96)	21 (%84)	23 (%92)	93 (%93)
Tip IV	-	-	3 (%12)	1 (%4)	4 (%4)
Tip IV E	-	1 (%4)	1 (%4)	-	2 (%2)
Toplam	25	25	25	25	100

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nden alınan suşların yıllara göre SCCmec dağılımı değerlendirildiğinde; SCCmec tip III varyantı prevalansı 2007 yılında %100'den % 62.5'e düşmüş, ardından 2008 yılında bu oran artış göstererek %70'e yükselmiştir. 2009 yılında ise SCCmec Tip III varyantı oranı tekrardan %57.1'e düşmüştür. 2007 yılında ortaya çıkan SCCmec Tip IV/IVE, 2008 ve 2009 yıllarında da görülmeye devam etmiştir. SCCmec Tip III varyantı ve SCCmec Tip IV/IVE dışında sadece 2007 yılında Tip III SCCmec görülmüştür (Tablo 12).

Tablo 14: Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nden alınan suşların yıllara göre SCCmec dağılımı

	2006 n(%)	2007 n(%)	2008 n(%)	2009 n(%)	Toplam n(%)
Tip III	-	2 (%25)	-	-	2 (%5.9)
Tip III varyantı	9 (%100)	5 (%62.5)	7 (%70)	4 (%57.1)	25 (%73.5)
Tip IV	-	-	1 (%10)	2 (%28.6)	4 (%8.8)
Tip IV E	-	1 (% 12.5)	2 (%20)	1 (%14.3)	4 (%11.8)
Toplam	9	8	10	7	34

Çalışmaya alınan ve 2006 yılında izole edilen Hacettepe Üniversitesi MRSA suşlarının, %5.6' sını ve %94.4'ü mecA geni sırasıyla SCCmec Tip IV ve SCCmec Tip III varyantı üzerinde taşınmaktadır. SCCmec Tip III varyantı oranı 2007 yılında % 89.5'e, 2008 yılında daha da azalma göstererek %44.5'e düşmüştür. 2009 yılında ise % 85.7' ye yükselmiştir. 2008 yılı için çalışmaya alınan suşlardan, Tip IV SCCmec elemanı taşıyanlarla SCCmec Tip III varyantı olarak tiplendirilen suşların oranları aynıdır. 2009 yılında tip IV SCCmec taşıyanların oranı azalarak %14.3 olmuştur. Ayrıca 2008 yılında farklı bir SCCmec tipi olarak 1 suşta SCCmec tip II elemanı tespit edilmiştir (Tablo 13).

Tablo 15: Hacettepe Üniversitesi Çocuk Hastanesi'nden alınan suşların yıllara göre SCCmec dağılımı

	2006 n(%)	2007 n(%)	2008 n(%)	2009 n(%)	Toplam n(%)
Tip II	-	-	1 (%11)	-	1 (%1.9)
Tip III	-	2 (%10.5)	-	-	2 (%3.8)
Tip III varyantı	17 (%94.4)	17 (%89.5)	4 (%44.5)	6 (%85.7)	44 (%84)
Tip IV	1 (%5.6)	-	4 (%44.5)	1 (%14.3)	5 (%11.3)
Tip IV E	-	-	-	-	-
Toplam	18	19	8	7	52

İstanbul Üniversitesi'nden alınan MRSA suşları için SCCmec Tip III varyantının her yıl baskın tip olduğu görülmüştür. SCCmec tip III varyantı dışında farklı olarak 2007 yılında %10 oranında tip IV SCCmec taşıyan suşlar ve 2008-2009 yılında %40 oranında SCCmec tip III saptanmıştır (Tablo 14).

Tablo 16: İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi'nden alınan suşların yıllara göre SCCmec dağılımı

	2006 n(%)	2007 n(%)	2008 n(%)	2009 n(%)	Toplam n(%)
Tip III	-	-	2 (%40)	-	2 (%9.5)
Tip III varyantı	6 (%100)	9 (%90)	3 (%60)	-	18 (%85.7)
Tip IV	-	1 (%10)	-	-	1 (%4.8)
Tip IV E	-	-	-	-	-
Toplam	6	10	5	-	21

Kısacası izolat sayısı az olmasına rağmen İstanbul Üniversitesi dışında tüm merkezlerde 2008 yılında tip IV/IVE prevalansında bir artış olduğu gözlenmektedir.

Çalışmaya dahil edilen 207 MRSA izolatından, 20'si Tip IV/IVE SCCmec elemanı taşımaktadır. Bunların; 14'ünde tip IV ve geriye kalan 6 izolatta tip IVE bulunmuştur. Tip IV/IVE SCCmec elemanı taşıyan suşların izole edildikleri örnek tiplerine göre dağılımları Tablo 15'de gösterilmiştir. SCCmec type IV/IVE prevalansının yıllara göre dağılımı değerlendirildiğinde; 2006 yılında %5 (1/20) olan oran 2007 yılında %15'e (3/20) ve 2008'de de %55'e (11/20) yükselmiştir. Ardından 2009 yılında azalma göstererek %25'e (5/20) düşmüştür.

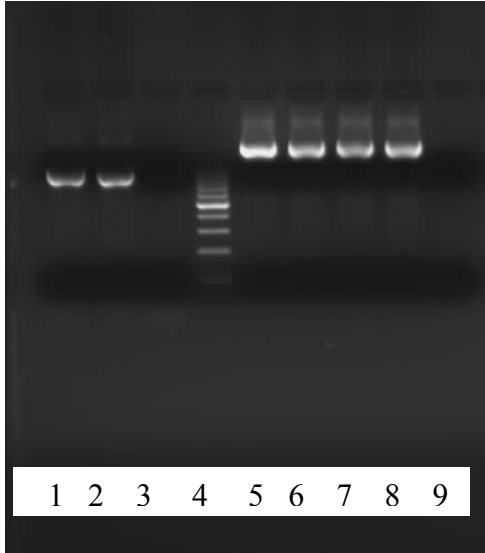
SCCmec tip IV/IVE taşıyan izolatlardan sadece Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nden izole edilen izolatların (n:6) izole edildiği hasta bilgilerine ulaşılmıştır. Bu bilgiler ışığında 6 izolat arasından sadece ikisinin TK-MRSA kriterlerine uyduğu belirlenmiştir. Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi'nin ("Center of Disease Control and Prevention"(CDC)) kriterlerine göre TK-MRSA, ayaktan tedavi gören veya 48 saat içinde hastaneye giriş yapmış hastalardan izole edilen MRSA suşları olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca bu hastaların, son bir yıl içinde herhangi bir cerrahi müdahale gibi hastanede bulunmasını gerektirecek bir durum, diyaliz veya huzurevine giriş gibi hiçbir tıbbi geçmişi olmamakla birlikte hasta kateter veya deri yoluyla geçen diğer tıbbi cihazlar gibi kalıcı aletlere sahip olmamalıdır (6). TK-MRSA olarak belirlenen izolatlardan biri, 2008 yılında izole edilen bir idrar örneğinden, diğeri ise 2009 yılında kan kültüründen üretilmiştir.

Tablo 17: SCCmec tip IV/IVE kaset tipine sahip MRSA izolatlarının izole edildikleri örnek türüne göre dağılımları

	Tip IV (n)	Tip IVE (n)	TOPLAM n(%)
Yara	8	3	11 (% 55)
Kan	3	3	6 (% 30)
BOS	1	-	1 (% 5)
İdrar	2	-	2 (% 10)
TOPLAM	14	6	20

SCCmec tiplerinin “Ito yöntemi” ile doğrulanması

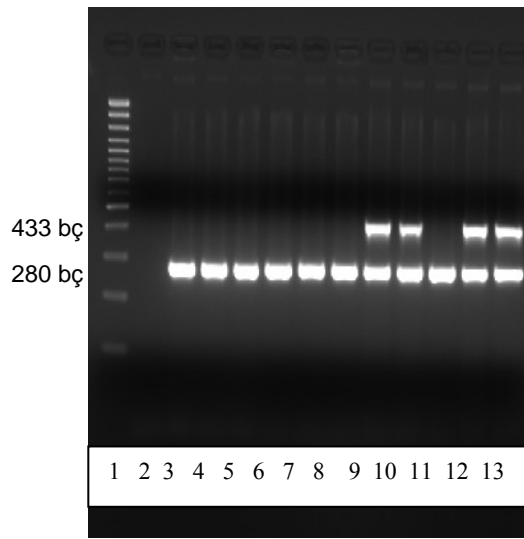
Milherico ve ark. önerdiği multipleks PZT yöntemi kullanılarak *SCCmec* tipleri incelendiğinde, Tip III varyantı olarak saptanan *SCCmec* tipi, Tip II ve Tip III’ün her ikisine de ait olan bantlar içerdiği belirlendi. “Ito yöntemi” ile *SCCmec* tip III varyantı olarak belirlenen, hakim klonal grubu temsil eden izolatlar seçildi. *SCCmec* tip II olarak saptanan izolat ile *SCCmec* tip IV/IVE izolatlarını temsil eden izolatlardan seçilerek “Ito yöntemi” ile doğrulamaya gidildi. *SCCmec* tip III varyantı izolatların, tip III *SCCmec* elemanı gibi tip 3 *ccr* taşıdığı, *SCCmec* tip II izolatının ve *SCCmec* tip IV/IVE taşıyan izolatların ise kontrol suş ile aynı *ccr* tipini (tip 2) taşıdığı saptandı.



Şekil 5: Çalışmamızdaki bazı izolatlara ait *SCCmec* tiplerini doğrulamak amacıyla yapılan Ito yöntemine ait sonuçlar. Sıra 1: N315 (*SCCmec* tip II kontrol); sıra 2: *SCCmec* tip II taşıyan çalışma izolatı; sıra 4: 100 bp DNA ladder; sıra 5: ANS46 (*SCCmec* tip III kontrol); sıra 6,7: *SCCmec* tip III varyantı taşıyan izolatlar; sıra 8: *SCCmec* tip III varyantı taşıyan izolatlar.

***pvl/nuc* Multipleks PZT Sonuçları:**

Çalışmaya alınan 207 MRSA izolatında *pvl* gen varlığı *nuc* ve *pvl* genlerini tespit etmeye yönelik bir multipleks PZT yöntemi ile incelendi. Çalışmamızda PVL pozitiflik oranı % 2.4 (5/207) olarak saptandı (Şekil 5). PVL pozitif olarak saptanan izolatların tümü Tip IV SCCmec elemanı taşımakta idi. Bu veri, Tip IV/IVE SCCmec elemanı taşıyan 20 izolattan sadece 5 tanesinin PVL pozitif olduğunu göstermektedir (%25) (Tablo 16). Diğer SCCmec tiplerinde *pvl* gen varlığı belirlenmedi.



Şekil 6: Çalışmamızdaki bazı izolatlara ait *pvl/nuc* multipleks PZT sonuçları. 433 bp büyüklüğünde bant görülmesi *pvl* pozitif olarak kabul edildi. Sıra:1.100 bp DNA ladder; 2. Boş; 3-8 ve 11. PVL negatif MRSA; 9,10. PVL pozitif MRSA; 12,13.Pozitif kontrol (*S. aureus* ATCC 49775)

Tablo 18: SCCmec Tip IV/IVE izolatları arasında *pvl* gen varlığının dağılımı

	PVL(+) (%)	PVL(-) (%)
SCCmec tip IV (n= 14)	5 (% 35.7)	9 (% 64.3)
SCCmec tip IVE (n= 6)	-	6 (% 100)
Toplam SCCmec tip IV/IVE (n=20)	5 (% 25)	15 (% 75)

PVL pozitif izolatların 2'si Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesin'den, geriye kalan 3'ü de Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesin'den izole

edilmiştir. PVL-pozitif MRSA suşlarının izole edildiği hastaların bilgileri Tablo 17’de açıklanmıştır. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesin’de saptanan PVL pozitif izolatlarının biri Enfeksiyon Hastalıkları servisinde diğeri Ortopedi servisinde yatan hastalardan izole edilmiştir. Bu izolatlar HK-MRSA olarak sınıflandırılmaktadır. Hacettepe Üniversitesi Çocuk Hastanesi’nden izole edilen PVL pozitif izolatlar çocuk hastalarda saptanırken, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi’nden izole edilenler erişkin hastalarda saptandı.

Tablo 19: PVL-pozitif MRSA suşlarının izole edildiği hasta ve suş özellikleri

	Hasta No	Üreme Tarihi	Örnek türü	Şehir	SCC <i>mec</i> tipi
1.	<i>DE 21/8</i>	2008	Doku	İzmir	IV
2.	<i>DE 25/8</i>	2008	Abse	İzmir	IV
3.	<i>HC 42</i>	2008	Püy	Ankara	IV
4.	<i>HC 43</i>	2008	Göbek bağı	Ankara	IV
5.	<i>HC 33</i>	2006	Kan	Ankara	IV

DNA’nın Makrorestriksiyon Analizi Sonuçları:

Çalışmaya alınan 207 MRSA izolatı, epidemiyolojik olarak Değişim Alan Jel Elektroforezi (PFGE) ile değerlendirildi. Bant paternleri görsel olarak Tenover kriterlerine göre her merkez için hem ayrı ayrı değerlendirildi, hem de merkezler arasındaki klonal ilişki araştırıldı.

Buna göre; PFGE analizi ile tiplendirmede, 13 farklı pulso tip ayırt edilmiştir. Tüm tipler arasında tip A’ nin baskın tip olduğu, çalışmaya dahil edilen izolatların %87.4’ünün (n:181) bu tipe ait olduğu saptandı. Bu baskın tipin dışında daha az sayıda izolatla temsil edilen 12 tip daha saptandı (Tip B, C, D, E, F, G, K, L, M, N, O, P). Tip A’nın 50, tip K’ nin 4, tip P’ nin 2, tip O’ nun 1 alttipi belirlendi. PFGE analizi ile elde edilen tiplerin ve bu tiplerin alttiplerinin merkezlere göre dağılımı Tablo 18’ de gösterilmiştir.

PFGE analizi, SCC*mec* tip III varyantlarının ve SCC*mec* tip IV/IVE izolatlarının kendi içlerinde, büyük ölçüde klonal olduğunu ortaya koymuştur (Tablo 19). SCC*mec* tip III ve tip

III varyantı elemanı taşıyan izolatların A, B, C, D, E, F ve G pulsotip içerisinde yer aldığı belirlendi. İzolatların % 96.8 'inin (180 /186) pulso tip A nın üyesi olduğu saptandı. Ayrıca tip II SCCmec elemanı taşıyan izolatın da baskın tip olan pulsotip A nın içerisinde yer aldığı belirlendi.

Tablo 20: PFGE tipleri ve içerdikleri izolat sayılarının merkezlere göre dağılımı

Merkez	Pulso tip (İzolat Sayısı)	Alt tip
İstanbul Üniversitesi	A (20)	A, A ₂ , A ₃ , A ₈ , A ₂₀ , A ₂₁ , A ₂₂ , A ₂₃ , A ₃₃ , A ₄₅
	O (1)	
Marmara Üniversitesi	A (27)	A, A ₁ , A ₂ , A ₄ , A ₈ , A ₁₁ , A ₁₂ , A ₁₃ , A ₁₄ , A ₁₉ , A ₂₃ , A ₂₅ , A ₂₆ , A ₃₃ , A ₃₄ , A ₃₉ , A ₄₀ , A ₄₆
	N (1)	
	L (1)	
	K (5)	K ₁ , K ₂
Hacettepe Üniversitesi	A (43)	A, A ₃ , A ₅ , A ₈ , A ₉ , A ₁₅ , A ₁₆ , A ₂₀ , A ₂₆ , A ₂₉ , A ₃₀ , A ₃₁ , A ₃₆ , A ₃₇ , A ₄₂ , A ₄₉ , A ₅₀
	E (1)	
	F (1)	
	G (1)	
	K (3)	K, K ₄
	M (1)	
	P (1)	P ₁
	O (1)	O ₁
Dokuz Eylül Üniversitesi	A (91)	A, A ₁ , A ₄ , A ₆ , A ₇ , A ₁₀ , A ₁₅ , A ₂₄ , A ₂₇ , A ₂₈ , A ₂₉ , A ₃₂ , A ₃₄ , A ₃₅ , A ₃₈ , A ₄₁ , A ₄₃ , A ₄₄ , A ₄₇ , A ₄₈
	B (1)	
	C (1)	
	D (1)	
	K (3)	K, K ₂ , K ₄
	P (3)	P, P ₁

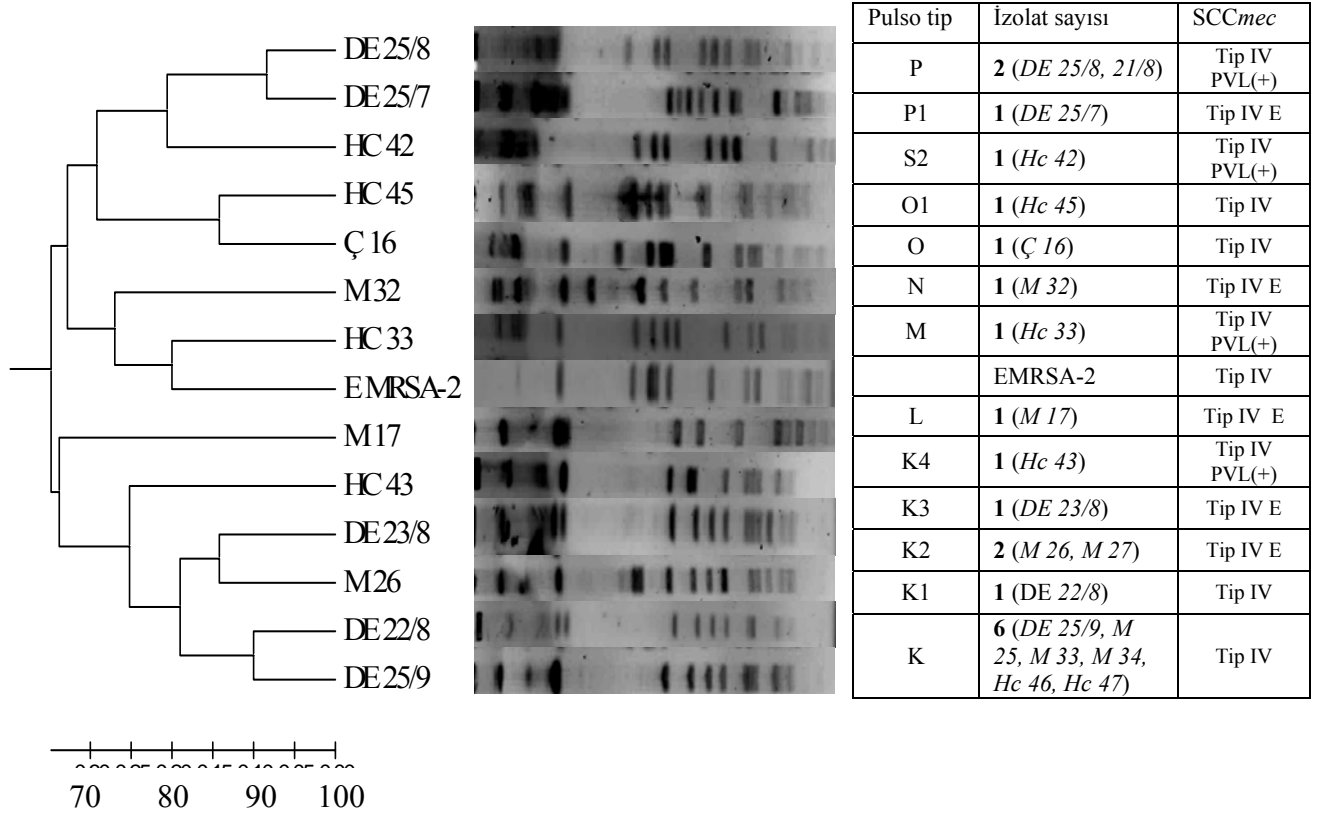
SCCmec Tip IV/IVE elemanı taşıyan izolatlar ise SCCmec Tip III varyantı içeren izolatlardan farklı, spesifik klonlara sahiptirler. Ayrıca Tip IV/IVE SCCmec elemanı taşıyan izolatların kendi aralarında genetik çeşitlilik olduğunu görülmektedir (Şekil 6). Pulso tip K, L, M, N, O ve P, SCCmec tip IV/IVE elemanına sahip izolatları içermektedir. Bunlar arasında pulso tip K, 11 izolatı bünyesinde barındıran en baskın tip olarak saptandı.

Tablo 21: PFGE analizi ile saptanan 13 farklı pulsotipin SCC*mec* tiplerine göre dağılımı

Pulso tip	SCC <i>mec</i> Tipi					Toplam
	Tip II	Tip III	Tip III varyantı	Tip IV	Tip IVE	
A	<i>1</i>	<i>6</i>	<i>174</i>			<i>181</i>
B			<i>1</i>			<i>1</i>
C			<i>1</i>			<i>1</i>
D			<i>1</i>			<i>1</i>
E			<i>1</i>			<i>1</i>
F		<i>1</i>				<i>1</i>
G			<i>1</i>			<i>1</i>
K				<i>8</i>	<i>3</i>	<i>11</i>
L					<i>1</i>	<i>1</i>
M				<i>1</i>		<i>1</i>
N					<i>1</i>	<i>1</i>
O				<i>2</i>		<i>2</i>
P				<i>3</i>	<i>1</i>	<i>4</i>

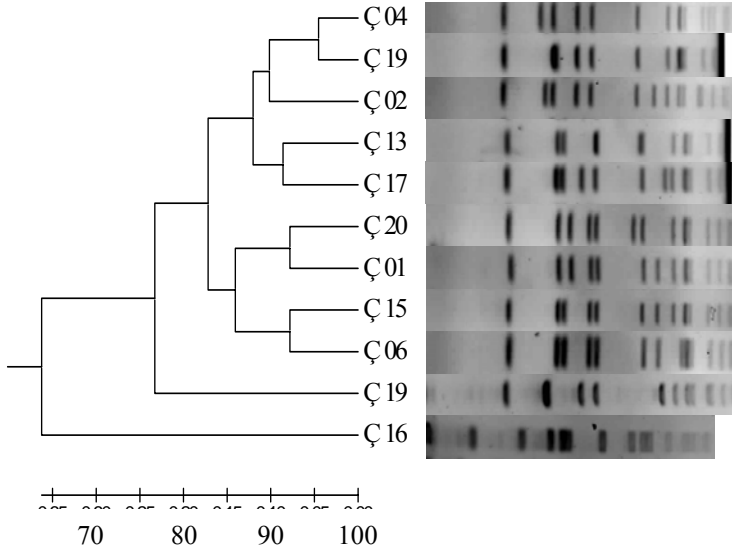
PVL pozitif MRSA suşları (n:5) PFGE paterni açısından incelendiğinde, 2 suşun tip P, 1 suşun P₂, 1 suşun M ve 1 suşun da K₄ klonu içerisinde yer aldığı belirlendi. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesin’de saptanan PVL pozitif izolatların aynı klona (P) ait oldukları, Hacettepe Üniversitesi izolatlarından birinin de bu klonla yakın ilişkili olduğu (P₂) saptandı.

Çalışmaya dahil edilen izolatların özellikleri, antibiyotik duyarlılıkları, SCC*mec* ve PFGE analiz sonuçları Tablo 20’de gösterilmiştir.



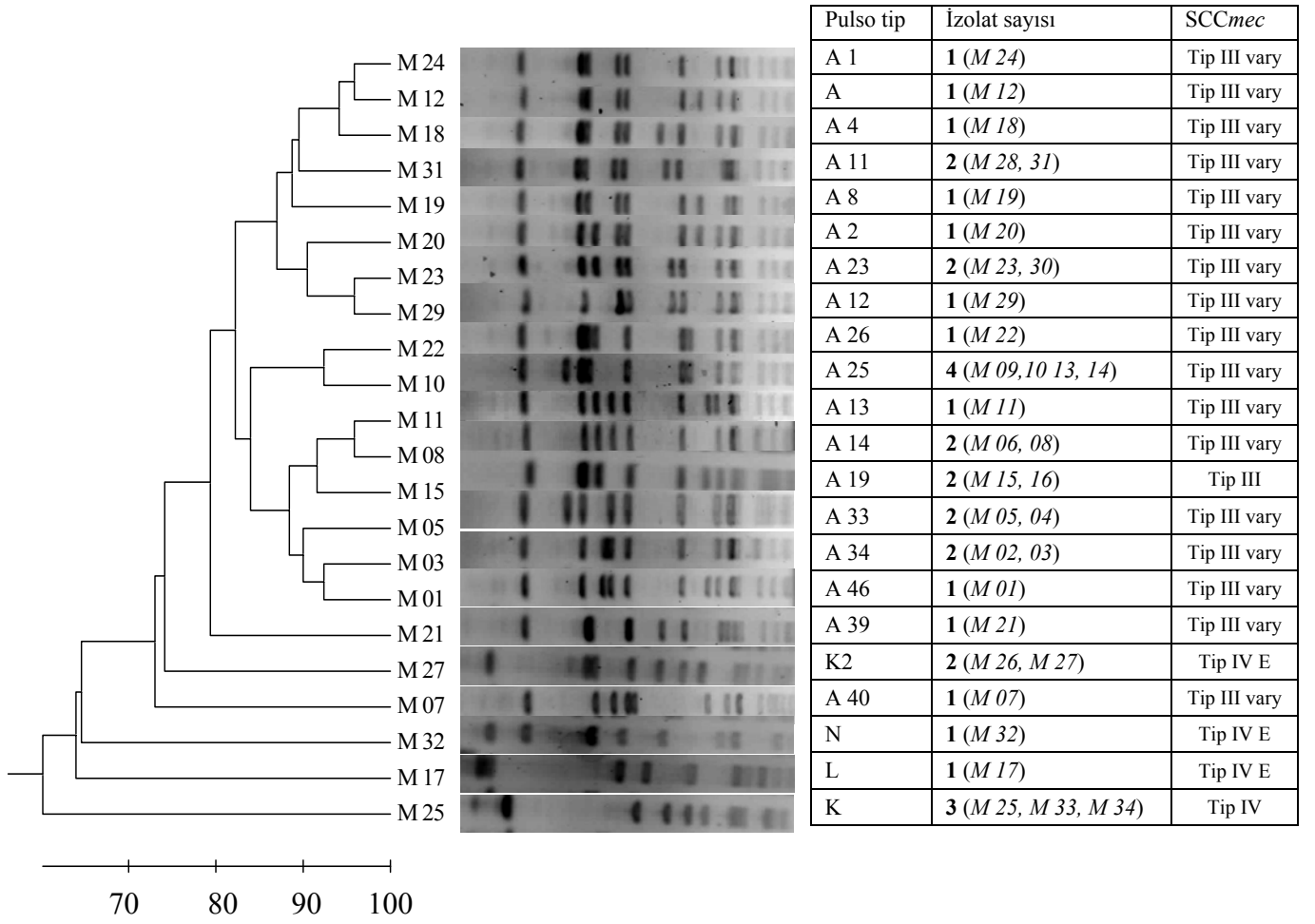
Şekil 7: SCCmec tip IV/IVE taşıyan MRSA izolatlarının PFGE paternlerinin filogenetik analizi ve dendogram görüntüsü.

*Sma*I enzimi ile kesilerek elde edilmiş PFGE paternleri ile bu paternlerin temsil ettiği tipler ve alttıplerin her merkez için dendogram gösterimleri **Şekil 7-10** da gösterilmiştir.

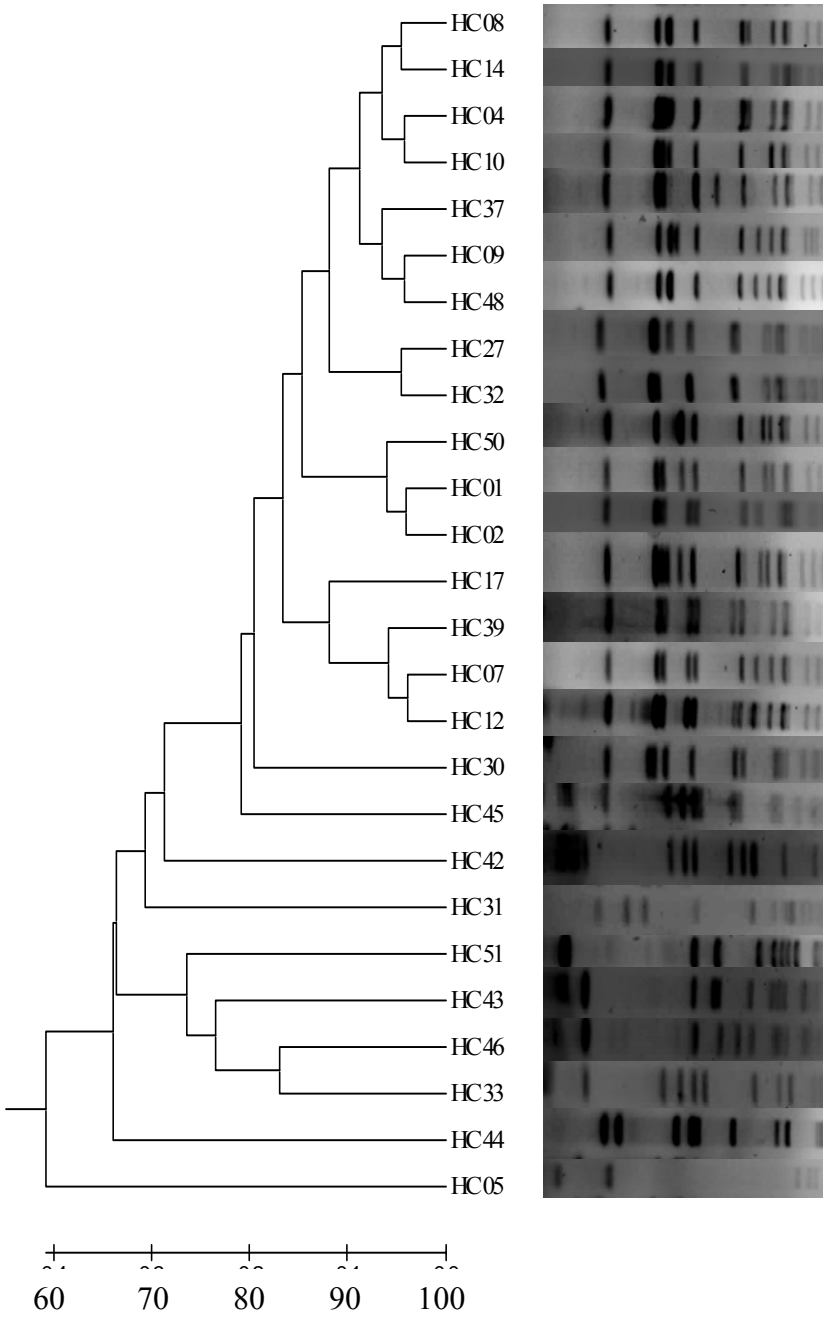


Pulso tip	İzolat sayısı	SCC <i>mec</i>
A 33	2 (Ç 04, 05)	Tip III vary
A 21	1 (Ç 10)	Tip III vary
A 22	4 (Ç 02, 03, 09, 11)	Tip III vary
A 3	2 (Ç 13, 12)	Tip III vary
A 20	1 (Ç 17)	Tip III vary
A 23	2 (Ç 20, 18)	Tip III vary
A 2	1 (Ç 01)	Tip III vary
A	4 (Ç 07, 08, 14, 15)	Tip III vary
A 8	1 (Ç 06)	Tip III vary
A 45	2 (Ç 19, 21)	Tip III
O	1 (Ç 16)	Tip IV

Şekil 8: İstanbul Üniversitesi MRSA izolatlarının PFGE paternlerinin filogenetik analizi ve dendogram görüntüsü



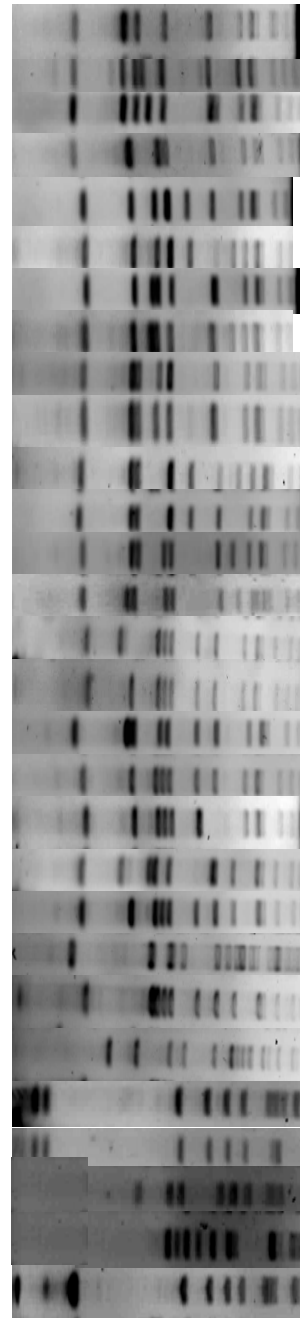
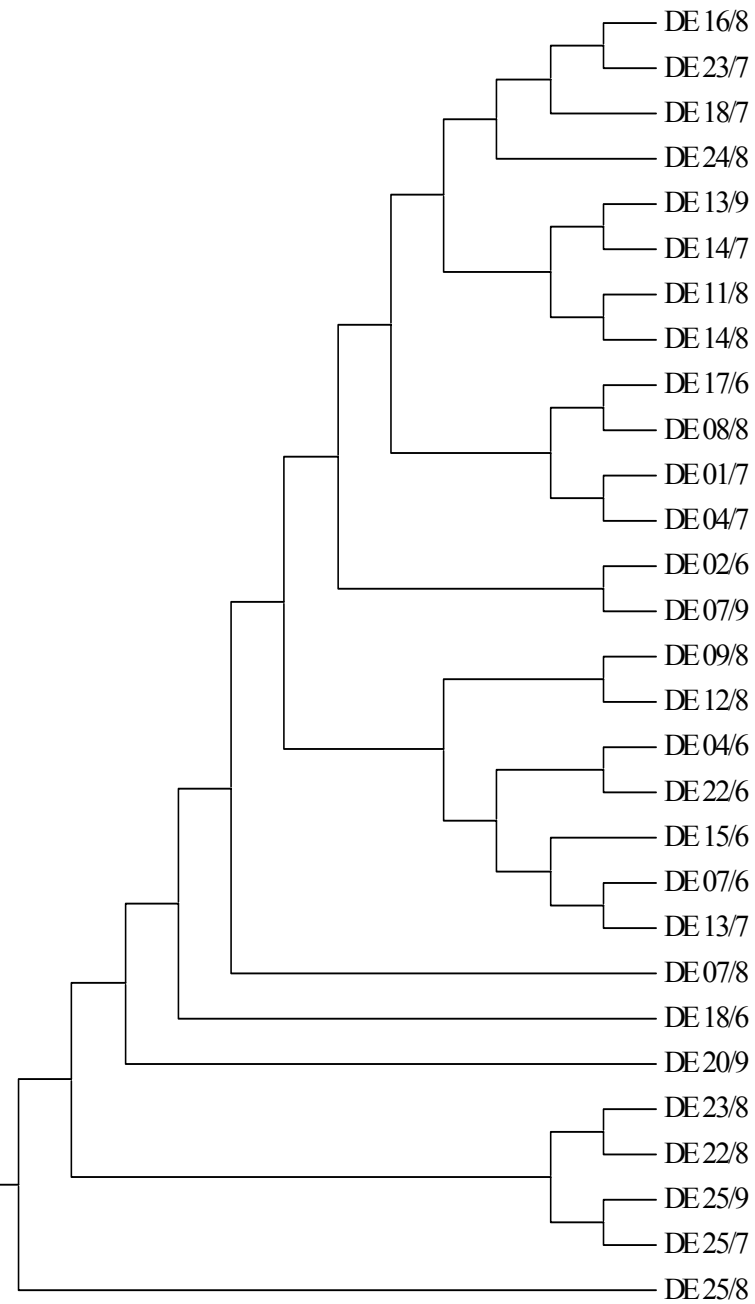
Şekil 9: Marmara Üniversitesi MRSA izolatlarının PFGE paternlerinin filogenetik analizi ve dendrogram görüntüsü.



Pulso tip	İzolot sayısı	SCCmec
A 29	3 (Hc 08, 11 15)	Tip III vary
A 30	1 (Hc 14)	Tip III vary
A 26	11 (Hc 04, 06, 18, 21, 22, 23, 25, 26, 28, 34, 35)	Tip III vary
A 16	1 (Hc 10)	Tip III vary
A 42	1 (Hc 37)	Tip III vary
A 31	1 (Hc 09)	Tip III vary
A18	1 (Hc 48)	Tip III vary
A 15	1 (Hc 27)	Tip III vary
A 3	2 (Hc 32, 36)	Tip III vary
A 36	2 (Hc 50, 52)	Tip III vary
A 20	3 (Hc 01, 03, 41)	Tip III vary
A 37	1 (Hc 02)	Tip III vary
A 8	1 (Hc 17)	Tip III vary
A 5	1 (Hc 39)	Tip III vary
A	10 (Hc 07, 13, 16, 19, 20, 24, 29, 38, 40, 49)	Tip III vary
A 9	1 (Hc 12)	Tip III vary
A 49	1 (Hc 30)	Tip III
O1	1 (Hc 45)	Tip IV
P2	1 (Hc 42)	Tip IV
F	1 (Hc 31)	Tip III
G	1 (Hc 51)	Tip III vary
K4	1 (Hc 43)	Tip IV
K	2 (Hc 46,47)	Tip IV
M	1 (Hc 33)	Tip IV
A50	1 (Hc 44)	Tip II
E	1 (Hc 05)	Tip III vary

Şekil 10: Hacettepe Üniversitesi MRSA izolatlarının PFGE paternlerinin filogenetik analizi ve dendrogram görüntüsü.

Şekil 11: Dokuz Eylül Üniversitesi MRSA izolatlarının PFGE paternlerinin filogenetik analizi ve dendrogram görüntüsü.



Pulso tip	İzolot sayısı	SCCmec
A 29	4 (DE 16/6, 16/8, 17/8, 20/8)	Tip III vary
A 38	1 (DE 23/7)	Tip III vary
A 32	4 (DE 16/7, 18/7, 21/7, 23/9)	Tip III vary
A 10	1 (DE 24/8)	Tip III vary
A 34	17 (DE 18/9, 18/8, 01/8, 06/7, 08/7, 05/7, 02/7, 14/9, 15/9, 17/7, 11/9, 12/9, 13/9, 19/9, 10/9, 02/8, 09/9)	Tip III vary
A 28	1 (DE 14/7)	Tip III vary
A 35	14 (DE 04/8, 17/9, 06/8, 15/8, 04/9, 19/7, 09/7, 11/8, 05/8, 11/7, 03/8, 10/8, 22/9, 24/9)	Tip III vary
A 43	1 (DE 14/8)	Tip III vary
A 1	4 (DE 14/6, 17/6, 19/6, 21/6)	Tip III vary
A17	2 (DE 08/8, DE 20/6)	Tip III vary
A 7	2 (DE 05/6, 01/7)	Tip III vary
A 15	4 (DE 25/6, 03/7, 04/7, 13/8)	Tip III vary
A	2 (DE 02/6, 02/9)	Tip III vary
A 6	1 (DE 07/9)	Tip III vary
A 27	2 (DE 09/6, 09/8)	Tip III vary
D	1 (DE 12/8)	Tip III vary
A 47	1 (DE 04/6)	Tip III vary
A 44	1 (DE 22/6)	Tip III vary
A 4	5 (DE 01/6, 13/6, 15/6, 07/7, 22/7)	Tip III vary
A 24	22 (DE 01/9, 03/9, 08/9, 06/9, 16/9, 21/9, 05/9, 19/8, 15/7, 12/7, 10/6, 20/7, 24/7, 10/7, 08/6, 06/6, 12/6, 07/6, 23/6, 03/6, 24/6, 11/6)	Tip III vary
A 41	1 (DE 13/7)	Tip III vary
C	1 (DE 07/8)	Tip III vary
B	1 (DE 18/6)	Tip III vary
A 48	1 (DE 20/9)	Tip III
K3	1 (DE 23/8)	Tip IVE
K1	1 (DE 22/8)	Tip IV
K	1 (DE 25/9)	Tip IV
P1	1 (DE 25/7)	Tip IVE
P	2 (DE 25/8, 21/8)	Tip IV

Tablo 22: Çalışmaya dahil edilen izolatların özellikleri, antibiyotik duyarlılıkları, SCCmec ve PFGE analiz sonuçları

İzolat No	Örnek No	Üreme Tarihi	Örnek Türü	Merkez	Organizma	VA	SXT	GN	CIP	E	CC	FOX	OX	SCCmec	PFGE
Ç 01	13865	02.05.2006	Kan	İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A2
Ç 02	168093	15.11.2006	Kan	İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A22
Ç 03	167995	17.11.2006	Kan	İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A22
Ç 04	163900	01.11.2006	Balgam	İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A32
Ç 05	134480	09.08.2006	İdrar(S. ucu)	İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	S	R	R	Tip III varyantı	A32
Ç 06	174164	23.11.2006	Kan	İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A8
Ç 07	207277	04.03.2007	Kateter ucu	İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A
Ç 08	221976	13.04.2007	Kan	İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A
Ç 09	215825	28.03.2007	Burun S.	İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A22
Ç 10	210595	16.03.2007	Kan	İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A21
Ç 11	228146	29.04.2007	Kan	İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A22
Ç 12	238672	29.05.2007	Abse	İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A3
Ç 13	238645	28.05.2007	Abse	İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A3
Ç 14	231412	09.05.2007	Balgam	İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A
Ç 15	230873	09.05.2007	Transtrakeal asp. sıvısı	İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A
Ç 16	296663	05.03.2007	İdrar	İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	S	S	S	S	R	R	Tip IV	O
Ç 17	30257	2008/2009		İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A20
Ç 18	45035	2008/2009		İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	S	R	R	S	R	R	Tip III varyantı	A23
Ç 19	191	2008/2009		İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III	A44
Ç 20	43818	2008/2009		İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A23

İzolat No	Örnek No	Üreme Tarihi	Örnek Türü	Merkez	Organizma	VA	SXT	GN	CIP	E	CC	FOX	OX	SCCmec	PFGE
Ç 21	193	2008/2009		İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III	A44
DE 01/6	60231481	26.02.2006 11:35	Kan	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A4
DE 02/6	61024427	25.10.2006 12:29	Kan	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A
DE 03/6	61030489	03.11.2006 14:15	Apse	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A24
DE 04/6	61107469	08.11.2006 12:59	Katater ucu	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A46
DE 05/6	60801394	05.08.2006 12:26	Kan	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	S	R	R	Tip III varyantı	A7
DE 06/6	60207446	14.02.2006 13:16	Periton sıvısı	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A24
DE 07/6	60402683	05.04.2006 14:57	Kan	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A24
DE 08/6	60422817	20.04.2006 13:53	Yara	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A24
DE 09/6	61134501	01.12.2006 17:23	Yara	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A27
DE 10/6	61202669	08.12.2006 14:14	Kan	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A24
DE 11/6	60932314	01.10.2006 12:17	Kan	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A24
DE 12/6	61023875	22.10.2006 12:19	Vajinal	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A24
DE 13/6	60327805	23.03.2006 14:42	Kan	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A4
DE 14/6	60328217	24.03.2006 13:03	Katater ucu	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A1
DE 15/6	60703933	07.07.2006 13:40	Yara	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A4
DE 16/6	60342187	02.04.2006 12:32	Bronş lavaj	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	S	R	R	R	R	Tip III varyantı	A29
DE 17/6	60205001	06.02.2006 11:50	Trakeal sekret	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A1
DE 18/6	60718198	19.07.2006 11:12	Trakeal sekret	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	B
DE 19/6	60305479	07.03.2006 13:38	Balgam	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A1
DE 20/6	60603633	07.06.2006 13:26	Kan	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A17

İzolat No	Örnek No	Üreme Tarihi	Örnek Türü	Merkez	Organizma	VA	SXT	GN	CIP	E	CC	FOX	OX	SCCmec	PFGE
DE 21/6	60914678	16.09.2006 11:51	Kan	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A1
DE 22/6	61204139	06.12.2006 15:49	Trakeal sekret	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	S	R	R	Tip III varyantı	A43
DE 23/6	60304210	05.03.2006 11:16	Yara	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A24
DE 24/6	60514096	13.05.2006 12:39	Aspirasyon	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	S	R	R	Tip III varyantı	A24
DE 25/6	60133474	01.02.2006 14:43	Diğer	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	S	R	R	Tip III varyantı	A15
DE 01/7	70721220	19.07.2007 14:49	Kan	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A7
DE 02/7	70429461	22.04.2007 11:18	Yara	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A33
DE 03/7	70511254	11.05.2007 13:34	Trakeal sekret	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A15
DE 04/7	70530601	24.05.2007 14:00	Kan	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A15
DE 05/7	70425548	21.04.2007 12:02	Plevral mayi	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A33
DE 06/7	70540300	30.05.2007 14:13	Kan	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A33
DE 07/7	70601271	04.06.2007 13:35	Trakeal sekret	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A4
DE 08/7	70611364	11.06.2007 13:45	Katater ucu	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A33
DE 09/7	71114982	13.11.2007 13:58	Katater ucu	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A34
DE 10/7	70411233	11.04.2007 13:25	Trakeal sekret	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A24
DE 11/7	70921891	20.09.2007 13:23	Kan	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A34
DE 12/7	70313955	13.03.2007 12:45	Kan	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A24
DE 13/7	70306121	07.03.2007 13:56	Kan	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A40
DE 14/7	70907811	03.10.2007 14:06	Diğer	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A28
DE 15/7	70511827	12.05.2007 11:44	Aspirasyon	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A24
DE 16/7	70306542	08.03.2007 12:16	Katater ucu	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A31

İzolat No	Örnek No	Üreme Tarihi	Örnek Türü	Merkez	Organizma	VA	SXT	GN	CIP	E	CC	FOX	OX	SCCmec	PFGE
DE 17/7	70513412	12.05.2007 11:42	Yara	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A33
DE 18/7	70525670	20.05.2007 11:48	Katater ucu	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A31
DE 19/7	70416462	13.04.2007 12:46	Yara	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A34
DE 20/7	70107664	12.01.2007 14:04	Kan	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A24
DE 21/7	70140014	09.02.2007 16:30	Plevral mayı	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A31
DE 22/7	70133598	30.01.2007 12:32	Kan	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A4
DE 23/7	70602227	06.06.2007 13:48	Diğer	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A37
DE 24/7	70504740	06.05.2007 11:16	Kan	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A24
DE 25/7	70338993	29.03.2007 13:43	Aspirasyon	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	S	S	R	R	R	R	Tip IVE	P1
DE 01/8	80118239	13.01.2008 12:49	Katater ucu	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A33
DE 02/8	80131425	21.01.2008 12:36	Yara	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A33
DE 03/8	80205176	06.02.2008 12:32	İdrar	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	S	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A34
DE 04/8	80230303	21.02.2008 11:43	Kan	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A34
DE 05/8	80232680	22.02.2008 11:51	Kan	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A34
DE 06/8	80305475	08.03.2008 12:24	Aspirasyon	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A34
DE 07/8	80324773	20.03.2008 13:46	Kan	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	C
DE 08/8	80232498	23.02.2008 10:49	Yara	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A17
DE 09/8	80405788	05.04.2008 12:16	Bronş lavaj	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A27
DE 10/8	80413762	12.04.2008 10:54	Katater ucu	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A34
DE 11/8	80549318	03.06.2008 13:51	Kan	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A34
DE 12/8	80612144	12.06.2008 13:02	Kan	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	D

İzolat No	Örnek No	Üreme Tarihi	Örnek Türü	Merkez	Organizma	VA	SXT	GN	CIP	E	CC	FOX	OX	SCCmec	PFGE
DE 13/8	80623270	18.06.2008 13:28	Kan	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A15
DE 14/8	80708085	08.07.2008 11:30	Kan	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A42
DE 15/8	80729663	23.07.2008 12:15	Kan	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A34
DE 16/8	80732481	24.07.2008 12:22	Diğer	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A29
DE 17/8	80832845	26.08.2008 11:33	Diğer	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A29
DE 18/8	81216031	19.12.2008 16:51	Diğer	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A33
DE 19/8	81216326	20.12.2008 13:14	Kan	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	S	R	R	Tip III varyantı	A24
DE 20/8	81134732	25.11.2008 12:49	Yara	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A29
DE 21/8	80244625	01.03.2008 12:34	Diğer	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	S	S	S	R	R	Tip IV	P
DE 22/8	80943890	02.10.2008 12:39	İdrar	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	S	R	R	R	R	R	Tip IV	K1
DE 23/8	81104792	07.11.2008 12:07	Yara	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	S	S	S	S	R	R	Tip IVE	K3
DE 24/8	80339950	27.03.2008 13:23	Bronş lavaj	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	S	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A10
DE 25/8	80504411	07.05.2008 14:06	Apse	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	S	R	R	R	R	R	Tip IV	P
DE 01/9	90118581	14.01.2009 11:41	Bronş lavaj	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A24
DE 02/9	90133059	28.01.2009 14:35	Apse	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A
DE 03/9	90136949	27.01.2009 11:29	Katater ucu	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A24
DE 04/9	90249756	03.03.2009 11:15	Kan	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A34
DE 05/9	90300530	05.03.2009 11:28	Kan	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A24
DE 06/9	90106990	08.01.2009 11:40	Balgam	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A24
DE 07/9	90110597	16.01.2009 11:09	Aspirasyon	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A6
DE 08/9	90139720	27.01.2009 11:32	Katater ucu	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A24

İzolat No	Örnek No	Üreme Tarihi	Örnek Türü	Merkez	Organizma	VA	SXT	GN	CIP	E	CC	FOX	OX	SCCmec	PFGE
DE 09/9	90206992	08.02.2009 13:01	Kan	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A33
DE 10/9	90212349	11.02.2009 16:29	Aspirasyon	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A33
DE 11/9	90212601	10.02.2009 12:37	Kan	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A33
DE 12/9	90350303	02.04.2009 11:53	Kan	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A33
DE 13/9	90405943	07.04.2009 11:50	Bronş lavaj	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A33
DE 14/9	90421602	16.04.2009 10:53	Yara	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A33
DE 15/9	90307976	12.03.2009 10:57	Diğer	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A33
DE 16/9	90446811	13.05.2009 16:10	Aspirasyon	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A24
DE 17/9	90514608	12.05.2009 11:15	Periton sıvısı	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	S	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A34
DE 18/9	90537436	26.05.2009 10:56	Kan	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A33
DE 19/9	90611319	11.06.2009 12:16	Aspirasyon	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A33
DE 20/9	90629260	19.06.2009 13:10	Balgam	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	S	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A47
DE 21/9	90520157	22.05.2009 00:18	Diğer	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A24
DE 22/9	90922116	19.09.2009 13:08	Apse	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A34
DE 23/9	90941482	29.09.2009 13:05	Katater ucu	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A31
DE 24/9	90925635	17.09.2009 13:31	Kan	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A34
DE 25/9	90610836	11.06.2009 12:22	Kan	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İzmir	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	S	S	S	S	R	R	Tip IV	K
HC 01	20040564	12.09.2006	Kan	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi, Ankara	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A20
HC 02	20304827	18.08.2006	Kateter	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi, Ankara	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A36
HC 03	20461236	15.05.2006	DTA	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi, Ankara	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A20
HC 04	20226389	05.05.2006	BAL	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi, Ankara	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A26

İzolat No	Örnek No	Üreme Tarihi	Örnek Türü	Merkez	Organizma	VA	SXT	GN	CIP	E	CC	FOX	OX	SCCmec	PFGE
HC 05	2876481	05.06.2006	Kan	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi, Ankara	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	S	S	R	R	R	R	Tip III varyantı	E
HC 06	20348717	15.05.2006	BAL	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi, Ankara	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A26
HC 07	20311430	27.02.2006	Kateter	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi, Ankara	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A
HC 08	20169255	17.03.2006	Kateter	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi, Ankara	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A29
HC 09	8090320	17.01.2006	Püy	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi, Ankara	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A30
HC 10	2136371	04.12.2006	Püy	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi, Ankara	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A16
HC 11	20302668	06.06.2006	Kan	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi, Ankara	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A29
HC 12	2876477	02.06.2006	Püy	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi, Ankara	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A9
HC 13	9710775	15.06.2006	DTA	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi, Ankara	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A
HC 14	20040648	25.09.2006	Balgam	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi, Ankara	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A29
HC 15	20456793	24.08.2006	Kateter	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi, Ankara	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A29
HC 16	20350811	25.08.2006	DTA	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi, Ankara	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A
HC 17	20536212	25.12.2006	Kan	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi, Ankara	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A8
HC 18	20225641	02.07.2007	Kan	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi, Ankara	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A26
HC 19	20213160	22.08.2007	Kan	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi, Ankara	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	R	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A
HC 20	20543887	08.03.2007	Kan	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi, Ankara	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A
HC 21	20523494	21.05.2007	Kateter	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi, Ankara	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A26
HC 22	20536210	31.12.2007	Püy	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi, Ankara	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	R	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A26
HC 23	20647864	31.05.2007	Kateter	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi, Ankara	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	R	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A26
HC 24	20636007	07.02.2007	Kan	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi, Ankara	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A
HC 25	20536300	12.01.2007	Kateter	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi, Ankara	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	R	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A26

İzolat No	Örnek No	Üreme Tarihi	Örnek Türü	Merkez	Organizma	VA	SXT	GN	CIP	E	CC	FOX	OX	SCCmec	PFGE
HC 26	8595326	26.02.2007	BOS	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi, Ankara	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A26
HC 27	20225882	26.07.2007	Kateter	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi, Ankara	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	S	S	R	S	R	R	Tip III varyantı	A15
HC 28	81122923	06.08.2007	Kan	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi, Ankara	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A26
HC 29	20543930	04.04.2007	Karaciğer kist	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi, Ankara	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A
HC 30	20592533	18.06.2007	Püy	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi, Ankara	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III	A48
HC 31	20592532	18.06.2007	Periton m.	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi, Ankara	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	R	R	R	R	S	R	R	Tip III	F
HC 32	9787300	11.06.2007	Beyin absesi	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi, Ankara	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A3
HC 33	HC 825	2006		Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi, Ankara	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	S	R	S	R	R	R	Tip IV	M
HC 34	8595337	27.02.2007	BOS	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi, Ankara	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A26
HC 35	20523140	13.07.2007	Kateter	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi, Ankara	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A26
HC 36	8443351	23.05.2007	Beyin absesi	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi, Ankara	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A3
HC 37	20657249	03.10.2007	DTA	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi, Ankara	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A41
HC 38	21506293	22.10.2008	DTA	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi, Ankara	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A
HC 39	2314774	17.11.2008	Ameliyat materyali	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi, Ankara	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A5
HC 40	81148239	03.06.2008	BOS	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi, Ankara	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A
HC 41	20558398	04.02.2008	Yara yeri	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi, Ankara	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	S	R	R	S	R	R	Tip III varyantı	A20
HC 42	81376425	29.08.2008	Püy	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi, Ankara	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	S	S	R	S	R	R	Tip IV	P2
HC 43	81095686	24.09.2008	Göbek bağı	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi, Ankara	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	S	S	R	S	R	R	Tip IV	K4
HC 44	81369280	15.10.2008	Yanık yarası	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi, Ankara	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	S	R	S	S	R	R	Tip II	A49
HC 45	81300305	01.04.2008	BOS	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi, Ankara	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	S	S	S	S	R	R	Tip IV	O1
HC 46	21534778	30.07.2008	Püy	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi, Ankara	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	S	S	S	S	R	R	Tip IV	K

İzolat No	Örnek No	Üreme Tarihi	Örnek Türü	Merkez	Organizma	VA	SXT	GN	CIP	E	CC	FOX	OX	SCCmec	PFGE
HC 47	81269525	18.03.2009	Yara yeri	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi, Ankara	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	S	S	S	S	R	R	Tip IV	K
HC 48	21462014	06.01.2009	Püy	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi, Ankara	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A18
HC 49	2136400	17.04.2009	BOS	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi, Ankara	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A
HC 50	81269852	17.04.2009	Kan	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi, Ankara	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A35
HC 51	36137462	01.06.2009	Püy	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi, Ankara	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	S	S	S	S	R	R	Tip III varyantı	G
HC 52	81269608	22.05.2009	Kan	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi, Ankara	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A35
M 01	SA-57/6	2006	KAN	Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A45
M 02	SA-321/6	2006	KAN	Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A34
M 03	SA-67/6	2006	KAN	Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A34
M 04	SA-231/6	2006	ABSE	Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A32
M 05	SA-534/6	2006	ABSE	Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A32
M 06	SA-440/6	2006	ABSE	Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	S	R	R	R	R	Tip III varyantı	A14
M 07	SA-74/6	2006	ABSE	Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A39
M 08	SA-190/6	2006	ABSE	Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	S	R	R	Tip III varyantı	A14
M 09	SA-201/6	2006	YARA	Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A25
M 10	SA-433/7	2007	KAN	Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A25
M 11	SA-116/7	2007	KAN	Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A13
M 12	SA-374/7	2007	YARA	Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A
M 13	SA-536/7	2007	ABSE	Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A25
M 14	SA-581/7	2007	ABSE	Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A25
M 15	SA-164/7	2007	YARA	Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A19

İzolot No	Örnek No	Üreme Tarihi	Örnek Türü	Merkez	Organizma	VA	SXT	GN	CIP	E	CC	FOX	OX	SCCmec	PFGE
M 16	SA-298/7	2007	ABSE	Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III	A19
M 17	SA 713/7	2007	KAN	Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	S	S	S	S	R	R	Tip IVE	L
M 18	SA-197/8	2008	KAN	Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A4
M 19	SA-82/8	2008	KAN	Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A8
M 20	SA-484/8	2008	YARA	Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A2
M 21	SA-4/8	2008	ABSE	Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	S	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A38
M 22	SA-149/8	2008	YARA	Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A26
M 23	SA-473/8	2008	KAN	Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A23
M 24	SA-356/8	2008	KAN	Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A1
M 25	SA 150/8	2008	YARA	Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	S	S	S	S	R	R	Tip IV	K
M 26	SA 38/8	2008	KAN	Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	S	S	R	R	R	R	Tip IVE	K2
M 27	SA 313/8	2008	KAN	Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	S	S	R	R	R	R	Tip IVE	K2
M 28	SA-146/9	2009	KAN	Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A11
M 29	SA-364/9	2009	KAN	Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A12
M 30	SA-67/9	2009	KAN	Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	S	S	R	R	Tip III varyantı	A23
M 31	SA-195/9	2009	KAN	Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	Tip III varyantı	A11
M 32	SA 374/9	2009	YARA	Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	S	S	R	S	R	R	Tip IVE	N
M 33	SA 14/9	2009	KAN	Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	S	S	S	S	R	R	Tip IV	K
M 34	SA 308/9	2009	YARA	Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, İstanbul	<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	S	S	S	S	R	R	Tip IV	K

5. TARTIŞMA

S. aureus'un antibiyotiklere karşı direnç oranlarının ve çeşitliliğinin giderek artması, MRSA ile ilgili epidemiyolojik çalışmaların önem kazanmasını sağlamıştır. MRSA izolatlarının bir hastanede, şehirde ülkede veya uluslar arası düzeyde yayılımını saptayabilmek için suşların özelliklerinin bilinmesi gerekmektedir (80). Epidemiyolojik amaçlı MRSA çalışmalarında, tiplendirme amacı ile kullanılan genotipik yöntemler, MRSA yayılımını hızlı bir şekilde önlemek için gerekli bilginin elde edilmesini sağlamaktadır. Bu amaç için birçok moleküler yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemlerin başında özellikle salgın analizi için altın standart olarak kabul edilen makrorestriksiyon analizi ve uzun süreli genetik ilişkilerin incelenmesi için kullanılan MLST, SCC*mec* tiplendirilmesi ve *S.aureus* Protein A genine ait tekrarlayan bölgelerin tiplendirilmesi (*spa* tiplendirme) gelmektedir (81).

Bu tez çalışmasında, farklı şehirlerde (İzmir, Ankara, İstanbul) üretilmiş metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) izolatlarının, SCC*mec* tiplerinin ve *pvl* gen varlığının multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (PZT) ile saptanması, ayrıca PFGE yöntemi ile klonal ilişkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

SCC*mec* tiplerinin belirlenmesi, klinik ortamda MRSA suşlarının yayılımını izlemek ve SCC*mec* tiplerinin prevalansı ile ilgili bilgi edinmek için kullanılan bir yöntemdir (82). SCC*mec* elemanın tiplendirilmesi, ülke genelindeki MRSA klonlarının takibini sağlamakla birlikte SCC*mec* çeşitliliği ile ilgili elde edilen verilerin genetik değişimi son derece iyi gelişmiş SCC elemanının, doğal floranın değişen insan ekolojik ortamına daha uygun olacak şekilde gelişiminin nasıl ve ne yönde ilerlediğinin anlaşılmasını mümkün kılmaktadır (61). Genellikle hastane kökenli MRSA (HK-MRSA) suşların SCC*mec* tip I, II, III, toplum kökenli MRSA (TK-MRSA) suşların ise SCC*mec* tip IV ile ilişkili olduğu belirtilir (17). Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi'nin ("Center of Disease Control and Prevention"(CDC)) kriterlerine göre TK-MRSA, ayaktan tedavi gören veya 48 saat içinde hastaneye giriş yapmış hastalardan izole edilen MRSA suşları olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca bu hastaların, son bir yıl içinde herhangi bir cerrahi müdahale gibi hastanede bulunmasını gerektirecek bir durum, diyaliz veya huzurevine giriş gibi hiçbir tıbbi geçmişi olmamakla birlikte hasta kateter veya deri yoluyla geçen diğer tıbbi cihazlar gibi kalıcı aletlere sahip olmamalıdır (6). Kültür alımından önce, 72 saatten fazla hastanede yatış, MRSA izolatın hastane kökenli olduğu söylemek için gerekli asıl kriterdir. Bunun yanı sıra, hastaneye yatıştan önce bir yıl içerisinde

hastada, hastaneye yatış, cerrahi müdahale, bakımevinde veya huzurevinde uzun süreli kalma, diyaliz veya kalıcı bir internal kateter ya da perkütan cihazların varlığı gibi risk faktörlerinden herhangi birinin bulunması MRSA izolatının hastane kökenli olarak tanımlamak için kullanılan kriterlerdir (83).

Çalışmamıza alınan izolatlarda baskın tip olarak saptanan SCC*mec* Tip III, hastane kökenli MRSA (HK-MRSA) izolatlarında en sık tespit edilen kromozomal kaset tiplerindedir. SCC*mec* Tip III elemanı, *mec* geni yanı sıra tetrasiklin ve civa direncinden sorumlu pT181 plazmidini, *ermA* geninin taşıdığı MLS direncinden sorumlu Tn 554 ve kadmiyum direncinden sorumlu ΨTn 554 transpozonlarını taşımaktadır. Bu direnç genlerine sahip izolatlar, sıklıkla antibiyotiklere karşı çoklu direnç göstermektedir (6).

Ülkemizde MRSA suşlarının SCC*mec* tipinin saptanmasına yönelik yapılan çalışmalar kısıtlı olduğundan SCC*mec* tipleri ile ilgili çok fazla veri bulunmamaktadır. Kılıç ve arkadaşları 2003-2006 yılları arasında Ankara'da izole ettikleri MRSA izolatlarının %82.1'inin tip III SCC*mec* elemanı taşıdıklarını rapor etmişlerdir (15).

Karahan ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmaya göre; Aralık 2003-Temmuz 2005 tarihleri arasında izole edilen toplum kökenli ve hastane kökenli MRSA izolatlarının %83.9'i (219/261) tip III olarak bildirilmiştir. HK-MRSA suşları arasında en sık görülen tip SCC*mec* tip III (%96.4) olarak saptanırken TK-MRSA suşlarının %50'sinin tip III SCC*mec* elemanı taşıdığını saptamışlardır. Araştırmacılar, hastanelerin çeşitli kliniklerinde yatan hastaların çeşitli enfeksiyon bölgelerinden izole edilen izolatları hastane kökenli olarak kabul etmişlerdir. Bu hastaların, hastane enfeksiyon komitesi tarafından hastane kökenli olarak belirlendiği ve hastaların tümünün, hastaneye yatmadan önce sağlıklı bireyler olup, enfeksiyonun kuluçka döneminde olmadıkları saptanmıştır. Hastanenin çeşitli polikliniklerine başvuran ve hastaneye yatmadan ayakta tedavi gören hastalardan izole edilen MRSA izolatlarını toplum kökenli olarak kabul etmişlerdir. Bu hastaların MRSA edinimine sebep olan, önceden bilinen risk faktörlerini (intravenöz ilaç kullanımı, diabetes mellitus, malignite ve kronik deri hastalığı gibi altta yatan hastalığın olması, antibiyotik kullanımı) taşımadıkları belirlenmiştir. Ayrıca hem hastaların hem de yakın çevrelerinin hiçbirinin son altı ay içerisinde hastaneye yatış veya antibiyotik kullanımı öyküsü olmamasının da dikkate alındığı belirtilmiştir (17). Ancak çalışma sonuçlarına göre, tip III'lerin hem TK hem de HK MRSA izolatlarında saptanması TK ve HK MRSA ayırımının kriterlere uygun olarak değerlendirilemediğini göstermektedir. Diğer bir çalışmada ise Alp ve arkadaşları 2005-2006

yılları arasında ülkemizdeki altı farklı coğrafik bölgeki sekiz üniversite hastanesinden izole ettikleri 54 MRSA izolatının tümünün SCCmec Tip III elemanı taşıdığını göstermişlerdir (18). Gülay ve arkadaşlarının Dokuz Eylül Üniversitesi izolatları ile yaptıkları bir çalışmada, 2002-2003 yıllarında DEÜ hastanesinde yatan hastaların kan kültürlerinden izole edilen dokuz MRSA izolatının daha önce bildirilen Tip III A ve B'den farklı bir Tip III varyantı taşıdığı saptanmıştır (14). Bu araştırmacılar, Tip III SCCmec'in taşıdığı direnç mekanizmaları ile konağa seçici bir avantaj sağlamasının, bu klonunun hastanedeki hakimiyetinin nedeni olabileceğini belirtmişlerdir. Yapılan çalışma sonuçlarına benzer olarak bizim çalışmamızda da kromozomal kaset tipleri (SCCmec) değerlendirildiğinde, 207 MRSA suşunun %86.5' inin tip III varyantı SCCmec elemanı taşıdığı bulunmuştur. Bu eleman, multipleks PZT ile daha önce belirtilen varyant ile aynı bantları içermektedir. Ancak çalışmamızda, Tip III varyantının yanı sıra Tip II, III, IV ve IVE SCCmec tipleri de saptanmıştır.

Son yıllarda, hastane kökenli MRSA suşlarının yanı sıra, ağır nekrotik enfeksiyonlar yapan toplum kökenli MRSA'lar da insan sağlığı için tehdit oluşturmaya başlamıştır (84). HK-MRSA izolatlarından farklı olarak TK-MRSA izolatları, tip IV, V SCCmec elemanlarını taşımaları ile karakterize edilmektedirler. Az sayıda direnç genine sahip olmaları çoğu antibiyotiğe duyarlı olmalarını sağlamaktadır. Ancak, SCCmec IV MRSA suşlarının genetik elemanının küçük olması aynı zamanda diğer *S. aureus* suşlarına aktarılmasını da kolaylaştırmaktadır (15).

Çalışmamızda değerlendirilen MRSA suşlarının % 6.8'i (14/207) SCCmec tip IV ve %2.9' u (6/207) SCCmec tip IVE olarak saptanmıştır. PFGE analizi ile; SCCmec Tip IV/IVE elemanı taşıyan izolatların SCCmec Tip III varyantı içeren izolatlardan farklı, spesifik klonlara ait olduğu belirlenmiştir. Ayrıca Tip IV/IVE SCCmec elemanı taşıyan izolatların kendi aralarında da genetik çeşitlilik olduğu görülmektedir. Bu izolatlardan sadece Dokuz Eylül Üniversitesi'nde izole edilenlerin hasta bilgilerine ve hastane öykülerine ulaşılabilmiş, diğer merkezlerden izole edilen tip IV/ IVE kromozomal kaset tipi taşıyan izolatların toplum kökenli veya hastane kökenli olup olmadıkları belirlenememiştir. Hasta özgeçmişleri incelendiğinde, Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi'nden izole edilen SCCmec Tip IV/IVE MRSA izolatlarından sadece iki izolatın toplum kökenli olabileceği düşünülmüştür. SCCmec tip IV, toplum kökenli MRSA izolatlarında saptanan kromozomal kaset tipi olmasına rağmen, elde edilen veriler, SCCmec tip IV kaset tipinin hastane kökenli MRSA izolatlarında da tespit edilebileceğini göstermektedir.

Uluslar arası literatürdeki diğer çalışmalara benzer şekilde, elde ettiğimiz bulgular Tip IV *SCCmec* elemanına sahip izolatların, HK-MRSA izolatları arasında artış gösterdiği yönündedir (11,12). Huang ve arkadaşlarının Tayvan'da 382 HK-MRSA ve 26 TK-MRSA izolatı ile yaptıkları çalışmaya göre; 1999-2004 yılları arasında izole edilen *SCCmec* Tip IV HK-MRSA oranının %3 ila %20 arasında değişiklik gösterdiği saptanırken, 2005 yılında bu oranin %43'e yükseldiği tespit edilmiştir. 2004 yılının başlarında HK-MRSA izolatları arasında baskın tip olan *SCCmec* tip III oranının, 2005 yılında *SCCmec* tip IV'ün artış göstermesi ile azaldığı ve tip IV oranı ile aynı olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar, *SCCmec* tip IV HK-MRSA izolatlarının prevalansındaki artışın, bu izolatların büyüme hızlarındaki farklılıklara ve bazılarının *SCCmec* tip III HK-MRSA izolatlarından daha hızlı çoğalabilmelerine bağlı olabileceğini öne sürmüşlerdir (12). Buna benzer olarak, Okuma ve arkadaşları ise *SCCmec* tip IV taşıyan TK-MRSA izolatlarının, HK-MRSA izolatlarına kıyasla daha hızlı replike olduğunu saptamışlardır. Ayrıca, *SCCmec* tip II veya III taşıyan suşlarla karşılaştırıldığında TK-MRSA'nın gelişmiş çevresel uygunluğu olabileceği kanısına varmışlardır (85).

Moon ve arkadaşları, 2003-2005 tarihleri arasında MRSA bakteriyemi enfeksiyonu hastalarından izole edilen 78 izolatı incelemiştir (86). Bu izolatların dokuzunun *SCCmec* tip IVa elemanına sahip olduğunu saptamışlardır. Ancak bu izolatların ikisinin toplum kökenli, altısının hastane kökenli ve birinin de sağlık hizmetleri kaynaklı MRSA olduğunu bulmuşlardır. Araştırmacılar elde ettikleri sonuçlara göre, *SCCmec* tip IVa'nın TK-MRSA için belirteç olmadığını ve *SCCmec* tip IVa MRSA'nın klonal olarak hastane ile toplum arasında yayıldığını ileri sürmektedirler. Stranden ve arkadaşları ise, 2000-2004 yılları arasında izole ettikleri 66 hastane kökenli ve 11 toplum kökenli MRSA izolatı arasından HK-MRSA izolatlarının % 43.9'unun, TK-MRSA izolatlarının ise %36.4'ünün tip IV/IVa *SCCmec* elemanı taşıdığını saptamışlardır. Bu çalışma, tip IV *SCCmec* elemanının hem TK-MRSA hem de HK-MRSA izolatları tarafından taşınabileceğini göstermekle birlikte bu *SCCmec* elemanının aslında TK-MRSA için kesin bir gösterge olmadığını göstermektedir (11).

Nekrotizan enfeksiyonlara neden olan TK-MRSA lar PVL toksinini HK-MRSA suşlarına göre daha sık oranda taşımaktadır (84). *pvl* geni özellikle MSSA enfeksiyonlarında saptanmasına rağmen nadiren de olsa MRSA'larda da tespit edilebilmektedir (27). PVL üreten MRSA izolatları, özellikle çocuklarda nekrotizan pnömoni ve *S.aureus*'a bağlı ağır cilt

ve yumuşak doku infeksiyonlarına sebep olmaktadır. *pvl* geninin virulans ile ilişkili olduğu anlaşıldıktan sonra, ciddi MRSA infeksiyonlarının erken ve doğru bir şekilde tedavi edilmesinde *pvl* gen varlığının saptanması önem kazanmıştır (15). *pvl* geni sıklıkla tip IV SCCmec elemanı taşıyan TK-MRSA izolatlarında bulunmaktadır (87, 88). Türkiye’de MRSA izolatları arasında *pvl* gen taşıyıcılığının görülme sıklığı düşüktür (15). Bunun nedeni de, daha önce de belirtildiği gibi yapılan çalışmalarda daha çok HK-MRSA ların incelenmesi ve bunlar arasında tip III SCCmec elemanı taşıyan izolatların hakim olmasıdır. Çalışmamızda *pvl* gen varlığı oranı % 2.4 olarak saptanmıştır. Bunların tümü SCCmec tip IV taşıyan izolatlardır. Ancak, Tip IV/ IVE SCCmec elemanı taşıyan MRSA izolatlarından sadece % 25’i *pvl* geni taşımaktadır. SCCmec tip IV dışındaki SCCmec tiplerinin hiçbirinde *pvl* geni tespit edilmemiştir. PVL pozitif izolatların üçü Ankara’dan, diğer ikisi ise İzmir’den izole edilmiştir. Ankara’dan izole edilen PVL pozitif izolatların Çocuk Hastanesi’nden izole edilmesi, *pvl* geni taşıyan MRSA suşlarının çocuklarda yara ve invaziv infeksiyonlar gibi ciddi infeksiyonlara sebep olduğu bilgisini doğrulamaktadır (1, 89). PFGE analizine göre DEÜ Hastanesi’ndeki PVL pozitif izolatlar birbirleriyle identik bulunurken, Ankara’dan izole edilen PVL pozitif izolatlardan birinin DEÜ izolatları ile klonal olduğu saptanmıştır. DEÜ Hastanesi’nde saptanan PVL pozitif izolatların her ikisi de hastane kökenli MRSA izolatıdır. Bu iki izolat iki aylık bir süre içerisinde farklı servislerden izole edilmiştir. Ancak Hacettepe Üniversitesi’nden gönderilen izolatların hasta bilgilerine ulaşamadığından PVL pozitif izolatların toplum kökenli veya hastane kökenli olup olmadığı bilinmemektedir. PVL pozitif izolatların hastanelerde yayılmaya başlaması, ileri safhalarda salgınlara sebep olması ile birlikte daha çok antibiyotik direnç geni kazanmaları bu izolatların daha virülan hale gelme olasılığını artırmaktadır. DEÜ izolatlarından Tip IV SCCmec elemanı taşıyan ve dosya bilgilerine göre toplum kökenli olduğu düşünülen DEÜ izolatlarının hiçbirinde *pvl* gen varlığının tespit edilmemesi de dikkat çekicidir. Bu durum *pvl* gen varlığının, toplum kökenli MRSA için iyi bir belirteç olmadığını göstermektedir.

Ülkemizde yapılan çalışmalar incelendiğinde, HK-MRSA lar arasında *pvl* gen varlığı nadir olarak bildirilmiştir (17, 84, 90). Gülay ve arkadaşları kan, yara ve solunum örneklerinden izole edilen 79 MSSA izolatının %7.6’sının *pvl* geni pozitif bulurken, 75 MRSA izolatının hiçbirinde *pvl* genini saptamamışlardır (90). Kırdar ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, 2006-2009 yılları arasında Selçuk Üniversitesi Meram Tıp

Fakültesi Hastanesi'nde yatan hastalardan izole edilen 37 MRSA izolattının hiçbirinde *pvl* geni tespit edilmemiştir (84).

Karahan ve arkadaşları ise Aralık 2003-Temmuz 2005 tarihleri arasında izole edilen 70 TK-MRSA izolatından 7'sinin PVL pozitif olduğunu bunların ikisinin tip IV, birinin tip I, birinin tip V ve üçünün tip III SCCmec elemanı taşıdığını bildirmiştir. Bizim çalışmamızdan farklı olarak, 230 HK-MRSA izolatlarda SCCmec tip III elemanı taşıyan bir izolat PVL pozitif olarak saptanmıştır. Araştırmacılar yapılan çalışmada SCCmec tip III elemanı taşıyan PVL pozitif TK-MRSA izolatlarının ortaya çıkmasının sebebi olarak, bu suşların tip III SCCmec elemanı taşıyan HK-MRSA izolatlarının makrolidlere ve tetrasiklinlere karşı direnci sağlayan determinantların kaybolmasından ileri gelebileceğini, ayrıca bu suşların *pvl* geni ve SCCmec determinantlarının TK-MSSA suşları tarafından kazanılması ile gelişebileceğini düşünmüşlerdir (17). Wannet ve arkadaşlarının Hollanda'da yapmış oldukları bir çalışmada 1987-1995 yıllarında izole edilmiş 216 MRSA izolatının sadece ikisinde, 2000 yılında izole edilmiş 99 MRSA izolatının beşinde ve 2002 yılında izole edilmiş 98 MRSA izolatının 15'inde *pvl* geni saptanmıştır. PVL pozitif olarak belirlenen 22 izolatın 18'inin tip IV SCCmec taşıdığı, geriye kalan izolatların ise SCCmec tip I ve tip III elemanı taşıdığı tespit edilmiştir (91). Araştırmacılar SCCmec tip III ve SCCmec tip I'in hastane kökenli suşları temsil etmeleri nedeniyle HK MRSA suşlarının da *pvl* geni bulundurabileceğini savunmuşlardır. Çalışmamızda ise HK MRSA suşlarını temsil eden SCCmec tiplerini taşıyan hiçbir izolatta PVL pozitifliği saptanmamıştır. Ancak, çalışmamızda PVL pozitif olarak saptanan izolatlardan SCCmec tip IV elemanı taşıyanların bazılarının hastane kökenli olmaları ayrıca dikkat çekici bulunmuştur.

Bu çalışmada incelenen MRSA izolatlarında PVL prevalansı yüksek olmasa da, bu toksini taşıyan suşların ek direnç ve virülans faktörlerini kazanmadan önce hastane ortamlarında yayılımını önlemek amacıyla, hastane kaynaklı MRSA suşlarında *pvl* varlığının sürekli araştırılması gerekmektedir (84).

Yine bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçlardan farklı olarak, Vidal ve arkadaşları kan kültürlerinden soyutulan tip IV SCCmec elemanı taşıyan 29 MRSA izolatının hiçbirinde *pvl* gen varlığı saptamamışlardır. Bunun sebebi olarak, çalışmaya alınan SCCmec tip IV MRSA klonlarının toplum kökenli olması, bu klonların karakteristik (virülans faktörlerinin eksikliği gibi) özelliklerinin olması ve bu klonların kritik hastalara adapte olmuş hastane patojenleri olması öne sürülmüştür. Araştırmacılar, çalışmanın yapıldığı enstitüde SCCmec tip IV

MRSA'nın çapraz bulaş yolu ile aktarılan bir patojen olduğunu belirterek, (çalışma izolatları için) SCCmec tip IV MRSA suşlarının toplumdan kazanılmadığını ve çalışmaları için PVL'nin hastanedeki SCCmec tip IV MRSA için iyi bir gösterge olmadığını vurgulamışlardır. Bu çalışmaya göre Vidal ve arkadaşları, klonların toplumdan hastaneye başarılı bir şekilde geçiş yapmasını yeni bir gelişme olarak görmektedirler. SCCmec tip IV MRSA suşlarının, çoklu direnç gösteren MRSA suşlarına göre, replikasyonun hızlı olması, altta yatan hastalığı ağır olmayan hastalarda etkili olması gibi kolay yayılıma ilişkin bazı avantajları olduğunu düşünmektedirler (92).

Udo ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada ise Ocak 2005-Temmuz 2005 tarihleri arasında izole ettikleri 53 MRSA izolatının 46'sı SCCmec tip III olarak bulunurken geriye kalan yedi izolat ise SCCmec tip IV olarak saptanmıştır. Çalışma sonuçlarımıza benzer olarak tip III SCCmec elemanı taşıyan izolatların hiçbirinde *pvl* gen varlığı saptanmamıştır. SCCmec tip IV taşıyan MRSA izolatlarından sadece beşinde *pvl* geni bulmuşlardır. Geriye kalan iki izolatta *pvl* gen varlığının saptanmaması, SCCmec tip IV ile PVL arasındaki bağlantının sorgulanmasının gerekli olduğunu göstermektedir (93).

TK-MRSA'ların, vakaların çoğunda sıklıkla deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarından sorumlu olduğu ve SCCmec tip IV veya V taşımakla birlikte *pvl* genine sahip oldukları bilinmektedir. Liu ve arkadaşları, 14 şehirdeki 18 hastaneden topladıkları 702 MRSA izolatının SCCmec tiplerini, *spa* tiplerini, *pvl* gen varlığını ve PFGE profillerini araştırmışlardır. Bu izolatların 102'sine MLST çalışmıştır. *pvl* gen varlığı oranı %2.3 olarak saptanmıştır. *pvl* geni taşıyan izolatların, SCCmec tip IVa dışında, SCCmec tip II ve III elemanı taşıdığı bildirilmiştir. Hastaların tıbbi kayıtları incelendiğinde, iki izolatın TK-MRSA olduğu saptanmıştır (94). Çalışmamızda elde ettiğimiz verilere benzer olarak, araştırmacılar TK-MRSA izolatlarının her ikisinin de SCCmec tip IVa taşıdığını, ancak bu izolatlarda *pvl* gen varlığının tespit edilmediğini göstermişlerdir. Buna göre TK-MRSA suşlarının hastanede yayılabildiği ve hastane enfeksiyonuna sebep olabildiği kaydedilmiştir. Ancak bu çalışmanın sadece Çin'deki 18 hastaneyi içererek yapılmış olması nedeniyle, bu görüşün genellenemeyeceğini vurgulamışlardır (94).

Bir klon, belirli bir serviste, hastanede, şehirde, ülkede ve hatta dünyada varlığını sürdürebilmek için gerekli virülans ve direnç faktörlerini elde etmeyi başardığı zaman yaygın hale gelebilmektedir. Bu nedenle MRSA izolatlarının yayılımının epidemiyolojik yöntemlerle izlenmesi önemlidir (84). Epidemiyolojik çalışmalarda, izolatların genetik ve epidemiyolojik

ilişkilerini belirlemek amacıyla; salgın, hastane enfeksiyonları gibi kısa süreli olaylarda PFGE yöntemi tercih edilirken (6, 95), bu yöntemlerle saptanan her genotipten seçilen temsilci izolatların evrimsel ilişkilerinin incelenmesi için de *spa* tiplendirme, MLST/SCC*mec* tiplendirme yöntemleri önerilmektedir (95). MLST/SCC*mec* tiplendirmesi MRSA klonlarının tanımlanmasında referans yöntem olarak kabul edilmektedir (15, 95). MRSA klonlarının uluslar arası sınıflandırılmasında, MLST ve SCC*mec* tiplerinin kullanılması, Uluslar arası Mikrobiyoloji Dernekleri Birliği'nin ("International Union of Microbiological Societies") *S. aureus* tiplendirilmesi üzerinde çalışan alt komitesi tarafından kabul edilmiştir (95).

PFGE yönteminin, *S. aureus*'un epidemiyolojini belirlemek amacıyla yapılan kısa süreli veya bölgesel çalışmalarda, izolatların birbirleri olan ilişkilerini belirlemek ve hastanelerdeki yayılımı araştırmak için en sık kullanılan yöntem olduğu bilinmektedir (15, 84, 95, 96). Hastaların hastaneden hastaneye naklinin artması, çoklu dirence sahip MRSA suşlarının hastaneler arasında yayılımının artmasına da sebep olmaktadır. Hastanelerdeki endemik MRSA izolatlarının DNA parmak izlerinin belirlenmesi ile hem hastane içi hem de hastaneler arasındaki MRSA yayılımı izlenebilmektedir (96).

Çalışmamızda, MRSA izolatları arasındaki genetik ilişki PFGE yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Çalışmaya alınan MRSA izolatlarının PFGE paternlerine göre 13 farklı klon (Tip A, B, C, D, E, F, G, K, L, M, N, O, P) ayırt edilmiştir. Tüm MRSA suşlarının % 87.4'ünün A klonuna ait olduğu belirlenirken, tip IV/IVE SCC*mec* elemanı taşıyan izolatların hiçbirinin bu klona ait olmadığı saptanmıştır. Tip IV/IVE SCC*mec* elemanı taşıyan izolatların, pulstip K, L, M, N, O ve P' ye ait olduğu belirlenmiştir. Elde edilen pulstiplerden A, K, O ve P'nin alttipleri olduğu belirlenmiştir. Alttiplerin oluşmasına, restriksiyon bölgelerinin kaybedilmesi veya kazanılması ve DNA'da oluşan ekleme / çıkarma olayları sonucunda *SmaI* makrorestriksiyon paternlerinde meydana gelen değişikliklerin neden olduğu bilinmektedir (96).

Çalışmaya dahil edilen merkezler ve merkezlerin bulunduğu şehirlerdeki izolatların klonal ilişkileri değerlendirildiğinde; İstanbul'daki hastanelerden gelen izolatlar arasında pulstip A'nın yaygın olduğu ve alttiplerden bazılarının her iki merkezde de mevcut olduğu saptanmıştır. Bu merkezlerde saptanan tip IV/IVE SCC*mec* tiplerinin ait olduğu pulstipler arasında yakınlık görülmemiştir. Ancak Marmara Üniversitesi Hastanesi'nden izole edilen SCC*mec* tip IV MRSA izolatlarının, Hacettepe Üniversitesi Çocuk Hastanesi'nden ve Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi'nden izole edilen SCC*mec* tip IV MRSA izolatları ile aynı klona

ait olduğu belirlenmiştir. Ayrıca İstanbul Üniversitesi Hastanesi'nden izole edilen SCCmec tip IV MRSA izolatu ile Hacettepe Üniversitesi Çocuk Hastanesi'nden izole edilen *pvl* pozitif SCCmec tip IV MRSA izolatının yakın ilişkili olduğu saptanmıştır. Aynı klonların veya yakın ilişkili klonların farklı şehirlerdeki merkezlerde görülmesi, hastaneler ve şehirler arasında meydana gelen geçişi göstermektedir. İstanbul Üniversitesi Hastanesi'nde görülen pulsotip A alttiplerinin hiçbirine Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi'nde rastlanmamıştır. Ankara'da saptanan pulsotiplerin çoğu diğer şehirlerde görülmemiştir. İzmir'de SCCmec tip III varyantı MRSA izolatlarının üyesi olduğu B, C ve D pulsotipleri de çalışmaya dahil edilen diğer şehirlerde saptanmamıştır. Farklı şehirlerde farklı klonların bulunması, klonal çeşitliliği ve klonal yayılımdaki kontrolü yansıtmaktadır. Ancak, çalışmaya dahil edilen şehirlerde MRSA izolatlarının büyük çoğunluğuna A klonunun hakim olması hastanelerin infeksiyon kontrolünde alınması gereken önlemlere dikkat çekmektedir.

Norazah ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, iki merkezden toplanan 56 MRSA suşu PFGE analizi ile moleküler olarak tiplendirilmiştir. Merkezlerin birinden toplanan suşların diğer merkezinkilere göre daha heterojen klonaliteye sahip olduğu tespit edilmiştir, Bu çalışmada, çalışmamızda da gözlemlediğimiz gibi, aynı pulsotiplerin farklı merkezlerde görülebileceği saptanmıştır (96).

Çalışmamızda elde ettiğimiz verilere göre, Hacettepe Üniversitesi Hastanesi'nden gönderilen izolatların diğer merkezlere göre daha heterojen klonaliteye sahip olduğu belirlenmiştir. Baskın tip olarak belirlenen pulsotip A'nın yanı sıra diğer pulsotiplerin bazıları da farklı merkezlerde ortak patern olarak gözlemlenmiştir. Çalışmaya dahil edilen hastanelerde aynı PFGE patenlerinin saptanması, belirli MRSA klonlarının farklı coğrafik bölgelere yayılabilme yeteneğine sahip olduğunu göstermektedir (95). Bazı MRSA klonlarının yayılımı sadece tek bir ülke, şehir veya hastane ile sınırlı iken, belirli MRSA klonlarının mesafelere rağmen yayılımının gerçekleşmesini anlamak için epidemik klonların coğrafik yayılımını göstermek önemli olduğu bilinmektedir (95). Yayılımı ülke, şehir veya hastane ile sınırlı olan suşların virulans özelliklerinin saptanması, bu suşların hastane çevresindeki yayılımını devam ettirmesinin nedenini daha iyi anlamak açısından önem taşımaktadır (95).

Gülây ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada yer alan Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi'ne ait MRSA izolatları arasında hakim olarak saptanan tek klonal tipin ST239-MRSA-III (Brezilya) klonunun üyesi olduğu bildirilmiştir. Çalışmada yer alan suşlar tam

olarak Türkiye'deki izolatları temsil etmemekle birlikte çalışmaya dahil edilen MRSA izolatlarının, makrorestriksiyon paternlerine, RS-PZT ve SCC*mec* tiplerine göre EMRSA 1, 15 and 16 suşlarından farklı olduğu bulunmuştur. Hakim MRSA klonunun MLST sekans tipinin ST239 olduğu, *spa* tipinin ise t030 olduğu sonucuna varılmıştır (6).

Ülkemizde yapılan çok merkezli bir çalışmada, altı coğrafik bölgeden elde edilmiş olan MRSA izolatlarının klonal ilişkisi PFGE, *spa* tiplendirme ve MLST ile araştırılmıştır Bu çalışmada 54 MRSA izolatının 53'ü yakın ilişkili bulunmuş ve hakim olan klonun *spa* tipi t030 olarak belirlenmiştir. Sık gözlenen PFGE paternlerinden yapılan MLST incelemesinde, tüm paternler ST239 olarak saptanmıştır (18).

Onbir Avrupa ülkesine ait hastane kökenli MRSA izolatlarının moleküler epidemiyolojisinin araştırıldığı çalışmada en sık *spa* t051 ve ST247 klonu belirlenmiştir (96). Ülkemizde saptanan *spa* t030 ve ST239 ise bu çalışmada daha az gözlenmiştir. Bu durumun nedeni olarak bölgesel özellikler ve hastane infeksiyonlarına karşı alınan önlemlerdeki farklılıklar olabileceği düşünülmüştür (97).

Yine ülkemizde yapılan bir çalışmada Karahan ve arkadaşları, Aralık 2003-Temmuz 2005 tarihleri arasında izole edilen 70 TK-MRSA izolatından 7'sinin PVL pozitif olduğunu ve bu izolatların farklı klonal kökenlere sahip olduklarını saptamışlardır. PFGE paternlerinden birinin çalışmamızda elde ettiğimiz SCC*mec* tip IVE elemanı taşıyan Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi'nden izole edilen izolatın PFGE paterni ile aynı olduğu ve PVL pozitif SCC*mec* tip IV elemanı taşıyan Hacettepe Üniversitesi Hastanesi'nden gönderilen izolat ile yakın ilişkili olduğu görülmüştür. Araştırmacılar hastane ortamındaki güçlü antibiyotik baskısının direnç genlerinin kazanılmasına buna bağlı olarak artan daha ağır ve inatçı infeksiyonlar nedeniyle PVL pozitif suşların hastanelerde yayılımının endişe verici bir durum olduğunu belirtmişlerdir (17).

Onyedi ülkeye ait toplumda kazanılmış PVL pozitif MRSA izolatlarının klonal incelemesinde, *spa* tip t044, ST80 ve SCC*mec* Tip IV en sık saptanan genetik belirteçler olmuştur (97). Asya, Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri klonu olan ST1, Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri klonu olan ST8, Avrupa, Avustralya ve Güney Amerika klonu olan ST30, Amerika Birleşik Devletleri ve Asya klonu olan ST59, Orta Doğu ülkeleri, Asya ve Avrupa klonu olan ST80 kıtalar arası yayılımının gerçekleştiği bildirilmektedir (6).

Danimarka'da yapılan bir çalışmada, toplumda kazanılmış MRSA izolatlarının çoğunluğunun bir klona ait olduğu gözlenmiş ve hakim klonun *spa* tipinin t070 (UJGBBPB),

SCC*mec* tipinin Tip IV ve sekans tipinin de ST 80 olduğu belirlenmiştir. Hastane kökenli MRSA izolatlarında ise sekiz farklı PFGE paterni saptanmış ve klonlardaki bu çeşitlilik hastane enfeksiyonlarının kontrolündeki başarıya bağlanmıştır (99).

Çalışma genelinde, yaygın olarak tek bir MRSA klonunun gösterilmiş olması hastane enfeksiyonlarının yayılımında alınması gereken önlemlere dikkat çekmektedir. MRSA ile gelişen hastane enfeksiyonlarının yayılımının araştırılmasında ve klonal ilişkiyi belirlemede moleküler yöntemler önem taşımaktadır. Endemik MRSA klonlarının tiplendirilmesi ile elde edilen veriler, hastanelerdeki enfeksiyon kontrol gruplarının MRSA epidemiyolojini daha iyi anlamasına yardımcı olmakla birlikte hastane enfeksiyonlarının önlenmesinde de yol gösterici olacağı düşünülmektedir (6, 84, 96).

Elde edilen verilerin yanı sıra, çalışmamızın bazı kısıtlılıkları bulunmaktadır. Öncelikle yapılan çalışma alınan izolatlar yıllar içerisinde farklı hastanelerden gönderildiğinden, diğer hastanelerdeki hastaların tıbbi kayıtlarına ulaşmakta zorluk yaşanmıştır. Elde edilen verilerin bazıları, izolatları TK-MRSA olarak sınıflandırmak açısından yeterli bilgi sağlayamamıştır. Ayrıca izolatların epidemiyolojik ilişkilerini belirlemek amacıyla kullanılan PFGE yöntemi, filogenetik ilişkiler hakkında bilgi vermediğinden dört yıllık periyodu yansıtan çalışma izolatlarının evrimsel ilişkileri incelenememiştir. Bunun yanı sıra yaygın olarak saptadığımız pulstip A ve alttiplerinin ülkemizin diğer bölgelerindeki yaygın diğer suşlarla karşılaştırılması, ülkemizde PFGE ile saptanan paternleri içeren bir arşiv bulunmadığı için yapılamamıştır.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

2006-2009 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastanesi'nde, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi'nde ve Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde izole edilen MRSA izolatlarının % 86.5'nin tip III varyantı SCCmec elemanı, %9.4' ünün de tip IV/IVE SCCmec elemanı taşıdığı saptanmıştır. Çalışmaya dahil edilen izolatların % 2.4 *pvl* pozitif bulunmuş ve *pvl* geninin sadece SCCmec tip IV/IVE MRSA izolatlarında bulunduğu belirlenmiştir. Çalışmaya alınan MRSA izolatlarının PFGE paternlerine göre 13 farklı klon ayırt edildi. Tüm MRSA suşlarının % 87.4' ünün A klonuna ait olduğu belirlenirken, tip IV/IVE SCCmec elemanı taşıyan suşların hiçbirinin bu klona ait olmadığı ve K, L, M, N, O,P pulsotiplerinde yer aldığı saptanmıştır.

Elde edilen sonuçlar ve literatürdeki bulgular, MRSA'nın hastanelerdeki epidemiyolojisinin hızla değişmekle birlikte SCCmec tip IV taşıyan MRSA suşlarının belki de yakın zamanda en yaygın tip haline gelebileceğini göstermektedir. Bu yeni SCCmec tip IV klonunun, geniş çaplı prospektif bir çalışma ile değerlendirilmesi gerekmektedir. Ayrıca ülkemizdeki MRSA klonlarının ve dağılımlarının epidemiyolojinin belirlenmesi ve yine ülkemizdeki MRSA suşlarında *pvl* gen varlığının SCCmec tipleri ile ilişkisinin saptanabilmesi için her bölgeden birden fazla merkezi kapsayan ulusal çaplı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bunun yanı sıra, çalışmamızda kullandığımız salgın analizlerinde altın standart metod olarak kullanılan PFGE analizi verilerine ek olarak evrimsel ilişkinin belirlenmesi açısından MLST ve *spa* sekanslama yöntemlerinin kullanımı, çalışmaya daha geniş bir yelpazeden bakma imkanı tanıyabilecektir.

7. KAYNAKLAR

1. Kılıc A, Li H, Stratton C.W. and Tang Y.W. Antimicrobial Susceptibility Patterns and Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* types of, as well as Panton-Valentine Leukocidin occurrence among, methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Children and Adults in middle Tennessee. J. Clin. Microbiol. 2006; 44(12): 4436-4440.
2. Chambers H.F. Methicillin Resistance in Staphylococci: Molecular and Biochemical Basis and Clinical Implications. Clinical Microbiology Reviews. 1997;10(4): 781-791.
3. 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.
4. www.ecdc.europa.eu/en/.../EARS.../2008_EARSS_Annual_Report.pdf
5. www.hpsc.ie/.../EuropeanAntimicrobialResistanceSurveillanceSystemEARSS/EARSSurveillanceReports/.../File,3999,en.pdf.
6. Deurenberg R H, Stobberingh E E. The evolution of *Staphylococcus aureus*. Infection, Genetics and Evolution 8. 2008; 747-763.
7. International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*): Guidelines for Reporting Novel SCC*mec* Elements. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2009; 53(12): 4961-4967.
8. Milheirico C, Oliveira D C, de Lencastre H. Update to the Multiplex PCR Strategy for Assignment of *mec* Element Types in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 2007; 51(9): 3374–3377.
9. Zhang K, McClure JA, Elsayed S, and Conly J M. Novel Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Type, Tentatively Designated Type VIII, Harboring Class A *mec* and Type 4 *ccr* Gene Complexes in a Canadian Epidemic Strain of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 531–540.
10. Berglund C, Ito T, Ikeda M, Ma XX, Söderquist B, and Hiramatsu K. Novel Type of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* in a Methicillin-

Resistant *Staphylococcus aureus* Strain Isolated in Sweden. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52(10): 3512–3516.

11. Strandén A.M., Frei R., Adler H., Flückiger U., Widmer A.F.. Emergence of SCCmec Type IV as the Most Common Type of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a University Hospital. *Infection* 2009; 37: 44–48.
12. Huang Y. H., Tseng S. P., Hu1 J. M., Tsai J. C., Hsueh P. R. and Teng L. J.. Clonal spread of SCCmec type IV methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between community and hospital. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 717–724.
13. Davis S.L., Rybak M.J., Amjad M., Kaatz G.W., McKinnon P.S. Characteristics of patients with health care associated infection due to SCCmec type IV methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2006; 27(10): 1025-1031.
14. Ergon C, Biçmen M, Gülay Z. Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi’ndeki dominant metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşunun moleküler yöntemlerle tiplendirilmesi. *ANKEM.* 2010; 24(4): 65-70.
15. Kılıç A, Guclu U. A, Senses Z, Bedir O. and et all. Staphylococcal cassette chromosome *mec*(SCCmec) characterization and panton-valentine leukocidin gene occurrence for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Turkey, from 2003 to 2006. *Antonie van Leeuwenhoek.* 2008; 94: 607-614.
16. Akoğlu H. Hacettepe üniversitesi erişkin hastanesinde 2004-2005 yıllarında hastane kaynaklı infeksiyonlardan izole edilen metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşlarının moleküler tiplendirilmesi. Uzmanlık tezi. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim dalı, Ankara, 2007.
17. Karahan Z.C, Tekeli A, Adaleti R, Koyuncu E and et al. Investigation of Pantone-Valentine Leukocidin genes and SCCmec types in clinical *Staphylococcus aureus* isolates from Turkey. *Microbial drug resistance.* 2008; 14(3): 203-210.
18. Alp E, Klaassen CHW, Doğanay M, Altoparlak, Aydın K and et al. MRSA genotypes in Turkey: Persistence over 10 years of a single clone of ST239. *Journal of Infection.* 2009; 58; 433-438.
19. Walvogel FA, Mandell GL, Bennet JE, Dolin R (eds). *Staphylococcus aureus, Principles and Practice of Infectious Diseases.* Newyork

20. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology 11th edition 2002 by Mosby, Inc.
21. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. The Gram Positive Cocci. The Color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology. 6th ed. Philadelphia: JB Lippincott Co. 2006:623-671.
22. Bilgehan H, Klinik Mikrobiyolojik Tanı: Bornova: Barış Yayınları 2002,495-504
23. Cengiz AT. *Staphylococcus*. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ustaçelebi Ş. Güneş kitabevi. Ankara. 1999: 339-347.
24. 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.
25. 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.
26. Langevelde P, Dissel JT, Ravensbergen E, Appelmelk BJ et al. Antibiotic-Induced Release of Lipoteicoic Acid and Peptidoglycan from *Staphylococcus aureus*; Quantitative Measurements and Biological Reactivities. Antimicrob Agents and Chemother 1998; 42: 3073-3078.
27. Boyle-Vavra S and Daum R B. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Pantón–Valentine leukocidin. Laboratory Investigation. 2007; 87: 3–9.
28. Dissemmond J. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA): Diagnostic, clinical relevance and therapy. JDDG. 2009; 7: 544-553.
29. Van Duijkeren E, Wolfhagen MJ, Heck ME, Wannet WJ. Transmission of a Pantón-Valentine Leucocidin positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain between humans and a dog. J Clin Microbiol. 2005 Dec; 43(12): 6209-6211.
30. McClure JA, Conly JM, Lau V, Elsayed S, Louie T, Hutchins W, Zhang K. Novel multiplex PCR assay for detection of the staphylococcal virulence marker Pantón-Valentine leukocidin genes and simultaneous discrimination of methicillin-susceptible from -resistant staphylococci. J Clin Microbiol. 2006 Mar;44(3):1141-1144.

31. Diep B.A. and Otto M. The role of virulence determinants in community-associated MRSA pathogenesis. *Trends Microbiol.* 2008; 16(8): 361-369.
32. Gordon R.J. and Lowy F.D. Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *Clin Infect Dis.* 2008; 46: 350-359.
33. Garnier F, Tristan A, François B, Etienne J, Delage-Corre M, Martin C, Liassine N, Wannet W, Denis F, Ploy MC. Pneumonia and new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone. *Emerg Infect Dis.* 2006 Mar;12(3):498-500.
34. Prévost G, Cribier B, Couppié P, Petiau P, Supersac G, Finck-Barbançon V, Monteil H, Piémont Y. Panton-Valentine leucocidin and gamma-hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. *Infect Immun.* 1995 Oct;63(10):4121-4129.
35. Hensler T, Köller M, Prévost G, Piémont Y, König W. GTP-binding proteins are involved in the modulated activity of human neutrophils treated with the Panton-Valentine leukocidin from *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 1994;62(12):5281-5289.
36. Feng Y. , Chen C.J., Su L.H., Hu S. and et all. Evolution and pathogenesis of *Staphylococcus aureus*: lessons learned from genotyping and comparative genomics. *FEMS Microbiol Rev.* 2008; 32: 23-37.
37. Sheagren JN, Schaberg DR. Staphylococci. Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR. *Infectious Diseases.* 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1998;1693-1703.
38. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med.* 1998 Aug 20;339(8):520-532.
39. Söderquist B, Sundqvist K-G, Vikerfors T. Adhesion molecules (E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)) in sera from patients with *Staphylococcus aureus* bacteraemia with or without endocarditis: *Clin Exp Immunol.* 1999 December; 118(3): 408–411
40. Holtfreter S, Bröker BM. Staphylococcal superantigens: do they play a role in sepsis? *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2005 Jan-Feb;53(1):13-27. Review.
41. Kim SH, Park WB. Outcome Of Inappropriate Initial Antimicrobial Treatment in Patients With Methicillin-Resistant *S. aureus* Bacteremia. *JAC.*2004; 15: 458-464.

42. Derbentli Ş. Stafilkoklarda Antibiyotik Direnci: 2003-2004 Türkiye Haritası. ANKEM Derg. 2005; 19(Ek 2): 54-60.
43. Gülay Z. Gram pozitif bakteri infeksiyonları: direnç ve epidemiyoloji. Aknem Dergisi, Cilt 22, Sayı Ek-2, s 276-286, 2008
44. Gülay Z. Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları ve Çözüm Önerileri: Betalaktamazlara Ve Karbapenemlere Direnç. Hastane İnfeksiyonları Dergisi 2001; 5: 2110-229.
45. 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.
46. Gülay Z. Antimikrobiyal İlaçlara Direnç. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ustaçelebi Ş. Güneş kitabevi. Ankara. 1999: 91-108.
47. Clinical and Laboratory Standarts Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 16th Informational Supplement (M100- S16) CLSI, Wayne, Pennsylvania 2006.
48. Lundstrom TS, Sobel JD. Vancomycin, Trimetprim-Sulfomethoxazole and Rifampin. Infect Dis Clin Nort Am 1995; 9: 747-767.
49. Projan SJ. Antibiotic Resistance in the Staphylococci. Fischetti VA et all. Gram Positive Pathogens. American Society for Microbiology, Washington. DC.2000: 463-470.
50. Yamazhan T. Sulfonamidler ve Aminoglikozidler. ANKEM Derg. 2007; 21(Ek 2):52-56.
51. Lina G, Quaglia A, Reverdy ME, Leclerq R et all. Distrubition of Genes Encoding Resistance to Macrolides, Lincosamids and Streptogramins Among Staphylococci. Antimicrob Agents Chemother 1999: 43; 1062-1066.
52. Lyon BR, Skurray R. Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus aureus*: Genetic Basis. Microbiol Rev 1987; 51: 88-134.
53. Ünal S. MRSA problemi. 24. ANKEM Antibiyotik ve Kemoterapi Kongresi, Ölüdeniz-Fethiye, 29 Nisan-03 Mayıs 2009. ANKEM Derg. 2009; 23(Ek 2): 1-12.
54. Resende CA, Figueiredo MS. Discrimination of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* from Borderline-Resistant and Susceptible Isolates by Different Methods. J Med Microbiol 1997; 46: 145-149.

55. Berger-Bachi B. and Rohrer S. Factors influencing methicillin resistance in staphylococci.2002; 178:165-171.
56. Wu S.W., Lencastre H., Tomasz A. Recruitment of the *mecA* gene homologue of *Staphylococcus sciuri* into a resistance determinant and expression of the resistant phenotype in *Staphylococcus aureus*. Journal of Clinical Microbiology.2001; 183(8): 2417-2424.
57. Wielders C.L.C., Vriens M.R., Brisse S., Graaf-Miltenburg L. A. M. et all. Evidence for in-vivo transfer of *mecA* DNA between strains of *Staphylococcus aureus*. The LANCET. 2001; 357.
58. Hiramatsu K., Cui L., Kuroda M. and Ito Teruyo. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Trends in Microbiology. 2001; 9(10): 486-493.
59. Lindsay J.A. and Holden T.G. *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? Trends in Microbiology. 2004; 12(8): 378-385.
60. Ito T., Katayama Y., Asada K., Mori N. And et all. Structural Comparison of Three Types of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Integrated in the Chromosome in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*.2001; 45(5): 1323-1336.
61. Hiramatsu K, Katayama Y, Yuzawa H, Ito T. Molecular genetics of Methicillin Resistant *S. aureus*. Int J Med Microbiol 2002; 292: 67-74.
62. Ito T., Ma X.X., Takeuchi F., Okuma K., Yuzawa H. and et all. Novel Type V Staphylococcal Cassette Chromosome Recombinase, *ccrC*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2004; 48(7): 2637-2651.
63. Anne-Merethe Hanssen & Johanna U. Ericson Sollid. *SCCmec* in staphylococci: genes on the move. FEMS Immunol Med Microbiol. 2005 Federation of European Microbiological Societies 46 (2006) 8–20.
64. Zhang K, McClure J, Elsayed S, Conly M. J. Novel Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Type, Tentatively Designated Type VIII, Harboring ClassA *mec* and Type 4 *ccr* Gene Complexes in a Canadian Epidemic Strain of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy,2009; 53(2):531-540.

65. 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.
66. 2004 ASM Pres. Washington DC.-2006 Palme Yayıncılık, Ankara. Moleküler Mikrobiyoloji: Tanı Prensipleri ve Uygulamalar. Editör: David H. Persing ve diğerleri. Bölümü yazan Richard V. Goering. Çeviri Alper Tekeli. Bölüm 15, sayfa 185-196.
67. Weller T.M.A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* typing methods: which should be the international standart? *Journal of Hospital Infection.* 2000; 44: 160-172.
68. Blanc DS, Petignat C, Moreillion P, Wenger A, Bile J, Francioli P. Quantitative antibiogram as a typing method for the prospective epidemiological surveillance and control of MRSA: Comparison with molecular typing, *Infect. Cont. Hosp. Epidemiol.*, 17:654-659, 1996.
69. Trindade P. A. , McCulloch J. A. , Oliveira G. A. and Mamizuka E. M. Molecular Techniques for MRSA Typing: Current Issues and Perspectives. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2003;7(1):32-43.
70. Mitani N, Koizumi A, Sano R, Masutani T et al. Molecular typing of MRSA by PCR-RFLP and its usefulness in epidemiological study of a outbreak. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2005; 58: 250-252.
71. Oliveira A.M. and Ramos M.C. PCR-based ribotyping of *Staphylococcus aureus*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2005; 35: 175-180.
72. Watanabe S, Ito T, Takeuchi F, Endo M, Okuno E, Hiramatsu K. Structural comparison of ten serotypes of staphylocoagulases in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 2005 Jun;187(11):3698-3707.
73. Chan M, Maiden MC, Spratt BG. Database-driven multi-locus sequence typing (MLST) of bacterial pathogens. *Bioinformatics* 2001; 17(11): 1077-1083.
74. Frénay HM, Bunschoten AE, Schouls LM, van Leeuwen WJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Verhoef J, Mooi FR. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1996 Jan;15(1):60-64.

75. Shopsin B, Gomez M, Montgomery S O, Smith D H, Waddington M et al. Evaluation of Protein A Gene Polymorphic Region DNA Sequencing for Typing of *Staphylococcus aureus* Strains. *Journal of Clinical Microbiology*. Nov. 1999: 3556–3563.
76. Koreen L., Ramaswamy S.V., Graviss E.A., Naidich S. and et al. Spa typing method for Discriminating among *Staphylococcus aureus* Isolates: Implications for Use of a Single Marker to detect genetic micro- and macrovariation. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004; 42(2): 792-799.
77. Harmsen D., Claus H., Witte W., Rothganger J and et al. Typing of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in a University Hospital Setting by Using Novel Software for a spa Repeat Determination and Database Management. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003; 41(12): 5442-5448.
78. Kobayashi N, Wu H, Kojima K, Taniguchi K, Urasawa S et al. Detection of *mecA*, *femA*, and *femB* genes in clinical strains of staphylococci using polymerase chain reaction. *Epidemiol Infect*. 1994 Oct;113(2):259-266.
79. Lina G, Pie'mont Y., Godail-Gamot F., Bes M., Peter M.O. et al. Involvement of Panton-Valentine Leukocidin–Producing *Staphylococcus aureus* in Primary Skin Infections and Pneumonia. *Clinical Infectious Diseases* 1999;29: 1128–32.
80. Bannerman T.L, Hancock GA, Tenover FC, Miller JM. Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 1995 Mar;33(3):551-555.
81. Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA and Stobberingh EE. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect*, 2007; 13: 222–235.
82. Makgotlho P.E, Kock M.M, Hoosen A, Lekalakala R, Omar S et al. Molecular identification and genotyping of MRSA isolates. *FEMS Immunol Med Microbiol* 57 (2009) 104–115.
83. Marea C.L, Daum R.S, Boyle-Vavra S, Matayoshi K et al. Community associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates causing healthcare associated infections. *Emerging Infectious Diseases*. 2007; 13(2): 236-242.

84. Kırdar S, Arslan U, Tuncer İ, Fındık D, Bozdoğan B. Hastane kaynaklı metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşları arasında klonalitenin ve Panton-Valentin lökositidin toksininin araştırılması. *Microbiyol Bul.* 2009; 43: 529-533.
85. Okuma K., Iwaka K., Turnidge J.D., Grubb W. B., Bell J. M et al. Dissemination of new methicillin resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(11): 4289-4294.
86. Moon S.Y. , Lee H.J. and Lee M.S. Molecular characteristics of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* blood isolates: clonal spread of staphylococcal cassette chromosome *mec* type IVA between the community and the hospital. *Microbial Drug Resistance.* 2010; 16(3): 217-222.
87. Mimica MJ, Berezin EN, Carvalho RB. Healthcare associated PVL negative methicillin resistant *Staphylococcus aureus* with SCC*mec* type IV. *The Pediatric Infectious Disease Journal.* 2009; 28 (10); 934.
88. Chheng Kheng, Tarquinio Sarah, Wuthiekanun Vanaporn, Sin Lina et all. Emergence of Community Associated Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Associated with Pediatric Infection in Cambodia. *PLoS ONE*; 4(8): e6630.
89. Vindel A, Cuevas O, Castellares C, Cercenado E et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Spain: Molecular Epidemiology and Utility of Different Typing Methods. *Journal of Clinical Microbiology.* 2009;47(6): 1620-1627.
90. Özkul H, Öktem MA, Gülay Z. Investigation of the presence of Panton Valentin leucocidin(PVL) in *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical samples. *Mikrobiyol Bul.* 2007; 41: 357-62.
91. Wannet W.J.B., Spalburg E., Heck M.E.O.C., Pluister G.N. and et all. Emergence of Virulent Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* strains carrying panton-valentine leucocidin genes in the Netherlands. *Journal of Clinical Microbiology.* 2005; 43(7): 3341-3345.
92. Vidal PM, Trindade PA, Garcia TO, Pacheco RL et al. Differences between classical risk factors for Infections caused by methicillin resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA) and risk factors for nosocomial bloodstream infections caused by multiple clones of the SCC*mec* type IV MRSA strain. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2009; 30:139-145.

93. Udo E.E., Panigrahi D. And Jamsheer A.E. Molecular typing of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in a Bahrain Hospital. Med. Princ. Pract. 2008;17: 308-314.
94. Liu Y, Wang H, Du N, Shen E, Chen H, Niu J et al. Molecular evidence for spread of two major methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones with a unique geographic distribution in Chinese hospitals. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2009; 53(2): 512-518.
95. Cookson BD, Robinson DA, Monk AB et al: Evaluation of molecular typing methods in characterizing a European collection of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains: the HARMONY collection, J Clin Microbiol 2007;45(6):1830-7.
96. Norazah A, Liew SM, Kamel AGM, Koh YT, Lim VKE. DNA fingerprinting of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis(PFGE): Comparison of strains from 2 Malaysian hospitals. Singapore Med J. 2001; 42(1): 015-019.
97. Tristan A, Bes M, Meugnier H et al: Global distribution of Panton-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, 2006, Emerg Infect Dis 2007;13(4):594-600.
98. Liu C, Graber CJ, Karr M et al: A population-based study of the incidence and molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in San Francisco, 2004-2005, Clin Infect Dis 2008;46(11):1637-46.
99. Faria NA, Oliveira DC, Westh H et al: Epidemiology of emerging methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Denmark: a nationwide study in a country with low prevalence of MRSA infection, J Clin Microbiol 2005;43(4):1836-42.

8. EKLER

8.1. Etik Kurul Onayı



T.C. ...
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI

Tel. : 0 232 - 259 87 73 - 259 87 74

Fax : 0 232 - 259 06 41

İnciraltı 35340-İzmir


Sayı : B.30.2.DEÜ.0.01.00.00 / 15496

31 TEMMUZ 2009

MİKROBİYOLOJİ ve KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

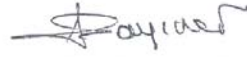
Fakültemiz Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulu Başkanlığı yazısıyla Dekanlığımıza iletilen; 245/2009 Protokol numaralı Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Prof.Dr.Zeynep Gülay'ın proje yöneticisi ve Yüksek Lisans Öğrencisi Meryem Bağsever'in sorumlusu olduğu, "Metiline Dirençli Staphylococcus aureus İzolatlarının SCCmec Analizi ile Moleküler Tiplendirilmesi" isimli proje ile ilgili Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulu Kararı ve sonuç ek'te sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve ilgiliye iletilmesi hususunda gereğini rica ederim.


Prof.Dr. Hakan ABACIOĞLU
Dekan

Ek: Etik Kurul Kararı

**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK VE LABORATUVAR ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU**

<p>Etik Kurul Üyeleri Prof.Dr.A.Arzu SAYINER Prof.Dr.Tunç ALKIN Prof.Dr.Mustafa SEÇİL Doç.Dr.M.Hakan ÖZDEMİR Doç.Dr.Vesile ÖZTÜRK Doç.Dr.Murat DUMAN Doç.Dr.Güven ASLAN Doç.Dr.Servet AKAR Yard.Doç.Dr.Murat ÖRMEN Öğr.Gör.Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN Yunus KARSLI</p> <p>Etik Kurul Sekreteri Hatice İĞCI</p>	<p style="text-align: center;">DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,</p> <p>Etik Kurulumuzun 30 Temmuz 2009 tarih ve 11/18/2009 no.lu toplantısında 245/2009 Protokol numaralı Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Prof.Dr.Zeynep GÜLAY'ın proje yöneticisi ve Yüksek Lisans Öğrencisi Meryem BAĞSEVER'in sorumlusu olduğu, "Metiline Direnç Staphylococcus aureus İzolatlarının SCCmec Analizi ile Moleküler Tiplendirilmesi" isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.</p> <p>Katılanların oy birliği ile karar verilmiştir.</p> <p>Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.</p> <p style="text-align: center;"> Prof. Dr.A.Arzu SAYINER Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurul Başkanı</p>
---	--

Tel: 0232 412 22 54

8.2. Özgeçmiş

ÖZGEÇMİŞ

TC Kimlik No / Pasaport No: 99649286036
Doğum Yılı: 1987
Yazışma Adresi : 154 Sok. Annem Apt. No:5 Bornova/İzmir Mareşal Fevzi Çakmak Caddesi No:182 Lapta/Girne KKTC
Telefon : 0232-4124501/ 0232-3423563/ 0392-8252580
e-posta : meryem_bagsever@hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Ege Üniversitesi	Fen Fakültesi	Biyoloji	Lisans	2008
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Mikrobiyoloji	Yüksek Lisans	

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Biyoloji
Tıbbi Mikrobiyoloji, Bakteriyoloji, Moleküler yöntemler

YAYINLARI

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

1. BAĞSEVER M, GÜR D, KAYACAN Ç, SÖYLETİR G, GÜLAY Z. SCCmec III taşıyan MRSA suşlarında ST239 klonu varlığının araştırılması. XXXIV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi: P 096, 7-11 Kasım 2010, Kıbrıs.
2. BAĞSEVER M, BİÇMEN M, GÜLAY Z. Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi'nde 2006-2009 yılları arasında klinik örneklerden izole edilen MRSA izolatlarının moleküler özelliklerinin araştırılması. Gülhane Mikrobiyoloji Günleri: P-48, 20-22 Nisan 2010, İstanbul.

3. GULAY Z, **BAGSEVER M**, GUR D, KAYACAN C, SOYLETIR G. Panton-Valentine leukocidin production and association with *SCCmec* types in MRSA in Turkey: Is PVL still the marker of *SCCmec* type IV?. 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: P 1027, 10-13 April 2010, Vienna,Austria.

Düzenleme Tarihi : 20.04.2011