T. C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇEŞİTLİ KLİNİK ÖRNEKLERDEN METİSİLİNE DİRENÇLİ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* TÜRLERİNİN İZOLASYONU VE GENOTİPLENDİRİLMESİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. İsmail GÜLER

Danışman

Prof. Dr. Hüseyin KILIÇ

KAYSERİ 2010

TEŞEKKÜR

Tezimin fikir aşamasından sonuçlanmasına kadar olan süreçte değerli vaktini ve bilimsel desteğini sunan tez danışman hocam Prof. Dr. Hüseyin Kılıç'a canı gönülden teşekkür ederim.

Asistanlık eğitimim boyunca sundukları bilimsel, destekleyici ve verimli ortam için Tıbbi Mikrobiyoloji Anabim Dalı'nın değerli öğretim üyesi hocalarıma çok teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim ve tezimi hazırlama sürecinde yardımlarını esirgemeyen, her zaman uyum içinde çalışmalarıyla ve dostluklarıyla huzurlu bir iş ortamı sağlayan araştırma görevlisi arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Merkez laboratuvarı ve anabilim dalımızda çalışan biyolog, teknisyen ve diğer tüm personelimize asistanlık eğitimim boyunca yardımlarını esirgemedikleri için teşekkür edirim.

Bu günlere gelebilmem için hiç bir fedakarlıktan kaçınmayan aileme, tanıdığım günden itibaren hep yanımda ve destek olan canım eşim Zühal Güler'e, hayatıma renk katan biricik oğlum Semih Güler'e en içten duygularımla teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR…… i
KISALTMALAR……... v
TABLO LİSTESİ……. vii
ŞEKİL LİSTESİ……..... viii
ÖZET……..... ix
ABSTRACT……... xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ…….. 1
2. GENEL BİLGİLER……... 3
2.1. STAFİLOKOKLAR……. 3
2.1.1.Tarihçe……... 3
2.1.2. Sınıflandırma…… 4
2.1.3. Morfoloji ve boyanma özellikleri……. 5
2.1.4. Üreme özellikleri ve koloni morfolojileri……. 5
2.1.5. Biyokimyasal özellikleri……... 6
2.1.6. Virülans ve patojenite……... 6
2.1.6.1. Yapısal komponentler……... 7
2.1.6.2. Hemolizinler……. 9
2.1.6.3. Toksinler……. 10
2.1.6.4. Enzimler…….. 11
2.1.7. Epidemiyoloji…….. 12
2.1.8. Stafilokokların neden olduğu enfeksiyonlar……... 14
2.1.8.1. Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları…… 15
2.1.8.2. Organ enfeksiyonları…….. 16
2.1.8.3. Toksin aracılı hastalıklar…… 16
2.1.8.4. Bakteriyemi ve endokardit……. 18
2.1.8.5. Koagülaz negatif stafilokok enfeksiyonları…….……..... 19

2.1.9. Tanımlama……. 20
2.1.9.1. Gram boyama…….. 20
2.1.9.2. Katalaz testi……. 20
2.1.9.3. Lizostafin duyarlılık testi…….. 20
2.1.9.4. Furazolidon duyarlılık testi……. 21
2.1.9.5. Basitrasin duyarlılık testi…… 21
2.1.9.6. Glukoz fermantasyon testi…….. 21
2.1.9.7. Eritromisin varlığında gliserolden asit oluşturma testi……... 21
2.1.9.8. Modifiye oksidaz testi……. 21
2.1.10. *Staphylococcus aureus*'un tanısı……... 22
2.1.10.1. Lam koagülaz testi…… 22
2.1.10.2. Tüp koagülaz testi……. 22
2.1.10.3. Ek doğrulayıcı testler…… 23
2.2. *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*'TA ANTİMİKROBİYAL DİRENÇ…….. 24
2.2.1. Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus* ……..…... 25
2.2.2. Stafilokoklarda metisiline direnç mekanizmaları……... 25
2.2.3.Stafilokoklarda metisilin direncinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler 27
2.2.3.1. Oksasilin disk difüzyon yöntemi……. 27
2.2.3.2. Sefoksitin disk difüzyon yöntemi…… 27
2.2.3.3. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi……. 27
2.2.3.4. Oksasilin tuz tarama agar testi……. 28
2.2.3.5. E-test yöntemi……... 28
2.2.3.6. Lateks aglütinasyon…….……...……. 28
2.2.3.7. Moleküler yöntemler…… 28
2.2.3.8. Kromojenik yöntemler…….…… 28
2.3. MRSA SUŞLARININ EPİDEMİYOLOJİK TİPLENDİRMESİ…….. 28
3. GEREÇ VE YÖNTEM…… 32
3.1. BAKTERİLERİN TANIMLANMASI……... 32
3.1.1. Gram boyama…….. 32
3.1.2. Katalaz testi……. 33
3.1.3. Trehaloz-mannitol testi……... 33
3.1.4. Tüp koagülaz testi……... 33
3.1.5. DNase testi…….. 34

3.2. *S. aureus* suşlarında metisilin direncinin belirlenmesi……... 35
3.2.1. Sefoksitin disk difüzyon testi……. 35
3.2.2. MRSA'ların antibiyotiklere direnç oranlarının saptanması…… 36
3.3. MRSA SUŞLARININ GENOTİPLENDİRİLMESİ…….. 36
3.4. REP-PCR YÖNTEMİNİN UYGULANMASI……... 36
3.4.1. Manuel DNA ekstraksiyonu……... 36
3.4.2. Thermalcycler'da DiversiLab parmakizi kit ile rep-PCR yapılması……. 39
3.4.3. Biyoanalizör kullanılarak otomatik mikroakışkan elektroforez yapılması 40
4. BULGULAR…… 42
4.1. MRSA suşlarının antibiyotik direnç oranları…….. 46
4.2. Diversilab rep-PCR yöntemi ile klonal yakınlıkların araştırılması…… 49
5. TARTIŞMA…….. 62
6. SONUÇLAR…… 69
7. KAYNAKLAR…… 70
8. TEZ ONAY SAYFASI…… 79

KISALTMALAR

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AFLP	: Amplified Fragment Length Polymorphism
BAL	: Bronkoalvoeler Lavaj
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DNase	: Deoksiribonükleaz
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetikasit
ETA	: Endotrakeal Aspirat
HCI	: Hidroklorik Asit
HIV	: Human Immunodeficiency Virus
HlgA	: Hemolizin γ A
HlgB	: Hemolizin γ B
HlgC	: Hemolizin γ C
H_2O_2	: Hidrojen Peroksit
IgG	: İmmünglobulin G
İL-1	: İnterlökin-1
KNS	: Koagülaz Negatif Stafilokoklar
kDa	: Kilodalton
MİK	: Minimal İnhibitör Konsantrasyon

MLS	: Makrolid Linkozamid Streptogramin
MLST	: Multi Locus Sequence Typing
MRSA	: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*
NaCl	: Sodyum Klorür
ORSAB	: Oksasilin Direnç Tarama Agar Besiyeri
PBP	: Penisilin Bağlayan Protein
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PFGE	: Pulsed Field Gel Electroforesis
RAPD	: Randomly Amplified Polymorphic DNA
Rep-PCR	: Repetitive-sequence-based PCR
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	: Ribonükleik Asit
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik Asit
sn	: Saniye
TMP-SXT	: Trimetoprim/sülfametoksazol
TŞS	: Toksik Şok Sendromu
TŞST-1	: Toksik Şok Sendromu Toksini-1
UK	: United Kingdom
VISA	: Vankomisine Orta Düzeyde Dirençli *S. aureus*
VRSA	: Vankomisin Dirençli *S. aureus*

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Stafilokokların neden olduğu hastalıklar…… 15

Tablo 2. Mikrokok ve stafilokokların ayırımında kullanılan fenotipik testler…….. 22

Tablo 3. Epidemiyolojik tiplendirme yöntemleri……... 29

Tablo 4. DNA Fingerprinting Kit master miks hazırlanışı……... 39

Tablo 5. Thermalcycler cihazında uygulanan siklus……. 39

Tablo 6. MRSA suşlarının izole edildiği klinik örnekler…….. 43

Tablo 7. MRSA suşlarının izole edildiği klinik servisler…….. 44

Tablo 8. MRSA suşlarının klinik servislere ve örneklere göre dağılımı……... 45

Tablo 9. İzole edilen MRSA suşlarının antibiyotiklere duyarlılık durumları……... 47

Tablo 10. A ana klonunun servislere göre dağılımı…….. 57

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Trehaloz-mannitol testi…… 33

Şekil 2. Tüp koagülaz testi…… 34

Şekil 3. DNase testi…… 34

Şekil 4. Sefoksitin disk difüzyon testi……... 35

Şekil 5. MRSA izolatlarının jel elektroforezis görüntüsü……. 38

Şekil 6. Diversilab™ DNA LabChip……... 40

Şekil 7. MRSA suşlarında antibiyotik direnç oranları……... 46

Şekil 8. MRSA suşlarının dendrogramı……. 50

Şekil 9. MRSA suşlarının benzerlik matriksi…… 54

Şekil 10. MRSA suşlarına ait noktalama grafiği……... 56

Şekil 11. A klonuna ait dendrogram……. 58

Şekil 12. B klonuna ait dendrogram……. 59

Şekil 13. B klonuna ait benzerlik matriksi…… 60

Şekil 14. C klonuna ait dendrogram…….. 60

Şekil 15. C klonuna ait benzerlik matriksi……. 60

Şekil 16. D, E, F, G, H, İ, J, K klonlarına ait dendrogram…… 61

Şekil 17. D, E, F, G, H, İ, J, K klonlarına ait benzerlik matriksi…….. 61

ÇEŞİTLİ KLİNİK ÖRNEKLERDEN METİSİLİNE DİRENÇLİ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* TÜRLERİNİN İZOLASYONU VE GENOTİPLENDİRİLMESİ

ÖZET

Amaç: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşları, enfekte hastalar ya da bu suşlarla kolonize olan hastane personeli aracılığı ile kolaylıkla yayılarak tedavisi güç enfeksiyonlara neden olmaktadır. MRSA yayılımını önlenemede, enfeksiyon kaynağını saptama ve ortadan kaldırmaya yönelik epidemiyolojik araştırmalar ilk basamağı oluşturmaktadır. Mikrobiyal genotiplendirme teknikleri mikroorganizmaların suşlarının ve klonlarının ayrılmasını sağlar.

Bu çalışmada, çeşitli klinik hasta örneklerinden MRSA türlerinin izole edilmesi, bu suşların son yıllarda hızlı ve kullanım kolaylığı ile ön plana çıkan repetitive-sequence-based Polymerase Chain Reaction (rep-PCR) yöntemiyle klonal yakınlıklarının belirlenmesi ve çoklu direnç probleminin en çok yaşandığı MRSA suşlarının alternatif antibiyotiklere direnç oranları saptanarak direnç sorununun belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod: Eylül 2008 ile Ekim 2009 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri'nde yatmakta olan hastaların klinik örneklerinden izole edilen toplam 100 MRSA suşu çalışmaya alındı. Suşlar Gram boyama, trehaloz-mannitol testi, katalaz reaksiyonu, DNase testi, koagülaz testleri kullanılarak tanımlandı. *S. aureus* olduğu doğrulanan suşların metisilin direncinin belirlenmesi amacıyla Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) önerileri doğrultusunda sefoksitin disk difüzyon testi kullanıldı. Suşların genetik yakınlıklarının belirlenmesi için rep-PCR yöntemi kullanıldı. Klinik örneklerden izole edilen MRSA suşlarının antibiyotik duyarlılıkları Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile CLSI önerileri dikkate alınarak Mueller Hinton Agar (MHA) besiyerinde standartlara uygun olarak yapılmıştır.

Bulgular: Rep-PCR analizi sonucu 3 ana klon (A-C) ve 8 farklı klon (D-K) olmak üzere toplam 11 klon görüldü. Toplam 100 MRSA suşunun %78'inin A klonuna ait olduğu ve A klonun baskın tip olduğu belirlendi. Ayrıca A klonuna ait 4 farklı alt tip belirlendi. B klonuna ait 11 suş, C klonuna ait 3 suş, D, E, F, G, H, İ, J, K klonlarına ait ise birer suş saptandı. Çalışma kapsamına alınan MRSA suşlarının antibiyotiklere direnç oranları sırasıyla; ampisilin-sulbaktam %100, eritromisin %77, metisilin %100, trimetoprim/sülfametoksazol %1, rifampisin %90, klindamisin %63, gentamisin %84, sefazolin %100, teikoplanin ve vankomisin için ise % 0 olarak belirlendi.

Sonuç: İzole edilen MRSA suşlarının çoğunlukla diğer antibiyotiklere de dirençli oldukları belirlenmiştir. Hastanemizde MRSA suşları klonal yayılım göstermiş ve A klonu hakim klon olarak bulunmuştur. Diversilab rep-PCR sistemi yaklaşık 4 saatte sonuçlanan, salgınların tespit edilmesinde hızlı ve kolay uygulanabilir bir yöntemdir. MRSA suşları arasındaki klonal ilişkinin tespiti, hem hastane enfeksiyonlarının kaynağının ortaya çıkmasını sağlayacak hem de hastane enfeksiyonlarına bağlı olarak ortaya çıkan maddi kayıpların en aza indirilmesi açısından son derece faydalı olacaktır.

Anahtar kelimeler: Diversilab**,** Metisilin direnci, rep-PCR, *S. aureus*

ISOLATION FROM VARIOUS CLINICAL SAMPLES AND GENOTYPING OF METHICILLIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* STRAINS

ABSTRACT

Aim: Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains spread easily by means of infected patients or the hospital staff colonized by those strains and cause refractory infections. In preventing the spread of MRSA, epidemiologic researches on the identification and elimination of infection source form the first step. Microbial genotyping techniques discriminate the strains and clones of microorganisms apart from each other.

In this study, the objective was to isolate MRSA types from various clinical patient samples and to determine the clonal relationship of those strains by using repetitive-sequence-based Polymerase Chain Reaction (rep-PCR) method, which has come into prominence thanks to its speed and ease of use in recent years, and to determine the resistance problem rates to alternative antibiotics of MRSA strains, where the multiple resistance problem is encountered the most.

Materials and methods: A total of 100 MRSA strains isolated from the clinical samples of the patients who were treated in Erciyes University Medical Faculty Hospitals were included in the study between the dates of September 2008 and October 2009. The strains were identified by using Gram staining, trehaloz-mannitol test, catalase reaction, DNase test and coagulase tests. For the purpose of determining the methicillin resistance of the strains which had been verified to be *S. aureus*, cefoxitin disc diffusion test was used in line with the suggestions of Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Rep-PCR was used so as to determine the genetic relationship of the strains. The antibiotic susceptibility of the MRSA strains isolated from clinical samples was performed with Kirby-Bauer disc diffusion method on Mueller Hinton Agar (MHA) in accordance with the CLSI standards.

Results: As a result of the rep-PCR analysis, 3 main clones (A-C) and 8 different clones (D-K) in total 11 clones were observed. It was determined that 78% of 100 MRSA strains in total belonged to the clone A and that the clone A was the dominant type. Furthermore, 4 different sub-types belonging to the clone A were identified. 11 strains belonging to the clone B, 3 strains belonging to the clone C and 1 strain belonging to the clones D, E, F, G, H, İ, J, K were identified. The rates of resistance to antibiotics of the MRSA strains included within the study were 100% to ampicillin-sulbactam, 77% to erythromycin, 100% to methicillin, 1% to trimethoprim/sulfamethoxazole, 90% to rifampicine, 63% clindamycin, 84% to gentamycin, 100% to cefazolin and 0% to teicoplanin and vancomycin.

Conclusion: It was determined that the MRSA strains were mostly resistant to other antibiotics as well. MRSA strains had a clonal spread in our hospital and the clone A was found to be the dominant clone. Diversilab rep-PCR system is a quick and easy method to use in identifying epidemics, approximately 4 hours. Identification of the clonal relationships between MRSA strains shall both reveal the source of hospital infections and be very useful in minimizing the material losses resulting from hospital infections.

Key words: Diversilab**,** Methicillin resistant, rep-PCR, *S. aureus*

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Micrococcaceae ailesinin üyesi olan stafilokoklar hareketsiz, aerobik ortamı tercih eden fakat fakültatif anaerob gibi de davranabilen Gram pozitif koklardır. Doğada son derece yaygın olarak bulunurlar. Başlıca kaynağı insanlardır (1). Normalde stafilokoklar insanda en sık deride ve dışarı açılan vücut boşluklarını kaplayan mukozalarda bulunur. Ancak deri bütünlüğünün bozulması ve enfeksiyonu hazırlayıcı durumlarda deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, bakteriyemi, kardiyovasküler sistem enfeksiyonları, solunum sistem enfeksiyonları, kas ve iskelet sistem enfeksiyonları, merkezi sinir sistem enfeksiyonları, üriner sistem enfeksiyonlarına kadar birçok hastalığa sebep olurlar (2). Stafilokokların özellikle *Staphylococcus aureus, S. epidermidis* ve *S. saprophyticus* olmak üzere üç türü insan için patojendir (2). *S. aureus* mikroskobik olarak 0.5-1.7 mikrometre (µm) çapında, Gram pozitif koklar şeklinde görünür. Koklar tek tek, çiftler, tetratlar veya kısa zincirler halinde bulunabilir (3). Birden fazla düzlemde bölündüğü ve birbirinden ayrılmadığından tipik üzüm salkımı görünümlü düzensiz kümeler oluşturur (4-7).

MRSA suşları, enfekte hastalar ya da bu suşlarla kolonize olan hastane personeli aracılığı ile kolaylıkla yayılarak tedavisi güç enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bu nedenle klinik örneklerde MRSA suşlarının saptanması önem taşımaktadır. MRSA yayılımını önlemede, enfeksiyon kaynağını saptama ve ortadan kaldırmaya yönelik epidemiyolojik araştırmalar ilk basamağı oluşturmaktadır (8).

Epidemiyolojik çalışmalar hastanede kaynağı ve salgınları belirlemede yaygınlaşan suşları tiplendirmek için kullanılır. Suşların genotiplendirilmesi hem klinik açıdan hem de ekonomik açıdan önemlidir. Benzer şekilde epidemiyolojik araştırmalarda *S. aureus* genotiplendirilmesi için doğru moleküler tanımlamaların önemi artmaktadır. Deoksiribonükleik asit (DNA) temelli genotip belirleme metodlarının bir çoğu denenmiş fakat bir standart oluşmamıştır (9).

Bu çalışmada, hastaların çeşitli klinik örneklerinden MRSA türlerinin izole edilmesi ve bu suşların son yıllarda hızlı ve kullanım kolaylığı ile ön plana çıkan repetitive-sequence-based (rep-PCR) yöntemiyle genotiplendirilmesi amaçlanmıştır. MRSA suşları arasındaki klonal ilişkinin tespiti, hem hastane enfeksiyonlarının kaynağının ortaya çıkmasını sağlayacak hem de hastane enfeksiyonlarına bağlı olarak ortaya çıkan ekonomik kayıpların en aza indirilmesi açısından son derece faydalı olacaktır. Ayrıca çoklu direnç probleminin en çok yaşandığı MRSA suşlarının alternatif antibiyotiklere direnç oranları saptanarak direnç sorununun belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. STAFİLOKOKLAR

2.1.1.Tarihçe

Stafilokoklar yüz yıldan daha uzun bir süredir önemli enfeksiyon sebeplerinden biri olarak tıp dünyasını meşgul etmektedir. Stafilokoklar ilk olarak 1878'de Robert Koch tarafından insan cerahatinde tanımlanmıştır. 1880 yılında Alexander Ogston bu mikroorganizmaların yüzeyel süpüratif enflamasyona ve septisemiye yol açabileceğini açıklayarak patojenitelerini vurgulamış ve aynı yıl Pasteur tarafından sıvı besi yerinde üretilmiştir (10,11).

Staphylococcus terimi Grekçe staphyle (üzüm salkımı) kelimesinden türetilmiştir ve karakteristik kümelenmeler yaptıklarından dolayı 1882 yılında Ogston tarafından bu mikroorganizmalar "*Staphylococcus*" olarak isimlendirilmiştir. Rosenbach 1884'te stafilokoların ilk kez saf kültürünü yapmış ve karakteristik özelliklerini laboratuvarda inceleyerek, katı besi yerinde beyaz ve sarı renkli koloniler oluşturan iki farklı stafilokok tespit etmiştir. Beyaz renkli kolonileri *S. albus*, sarı-portakal rengi kolonileri ise *S. aureus* olarak isimlendirmiştir. Winslow ve arkadaşları 1920 yılında stafilokok cinsini *Micrococcaceae* familyasına dahil etmiştir (11,13). Stafilokoklar, o dönemlerde insanlar üzerinde tedavisi güç, çok ağır seyreden ve ölümcül enfeksiyonlara neden olmaktaydı. Alexander Fleming'in 1928 yılında penisilini bulmasını takiben 1940 yılında bu antibiyotiğin kullanımına başlanması ile birlikte stofilokokal enfeksiyonların tedavisinde önemli başarılar sağlanmıştır. Bununla birlikte, penisilinin çok yaygın kullanımı sonucunda, penisilini parçalayan stafilokok türleri ortaya çıkmıştır. Stafilokoklarda penisilin direnci 1940'lı yılların

ortalarından itibaren gittikçe artmıştır ve 1950'li yıllarda penisilinin yanı sıra tetrasiklin, eritromisin ve streptomisin gibi antibiyotiklere de direnç gelişimi gözlenmiştir (13-15).

Bin dokuz yüz altmış yılında stafilokoklar tarafından üretilen penisilini parçalayan enzimlere (penisilinaz) dayanıklı semisentetik bir penisilin olan metisilin geliştirilmiştir. Bu sayede, stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde ikinci büyük başarı kazanılmıştır. Ancak bu başarının üzerinden henüz bir yıl geçmişken, stafilokoklarda metisilin direnci tanımlanmış ve 1970'li yılların sonu ile 1980'li yılların başlarından itibaren de MRSA suşlarında çoklu antibiyotik direnci ortaya çıkmaya başlamıştır. Günümüzde direnç sorununun giderek yaygınlaşması ile birlikte MRSA tüm dünyada hastane enfeksiyonu salgınlarına yol açan çok ciddi bir sorun haline gelmiştir. Başlangıçta MRSA enfeksiyonlarının yalnızca tedavisine yönelik çalışmalar yapılmış, kısıtlı kontrol önlemleri dışında, korunma yöntemlerine çok az başvurulmuş, etkenin eradikasyonu (tamamen ortadan kaldırılması) ise hiç düşünülmemiştir. Bunda biraz da küçük çaplı hastanelerde MRSA enfeksiyonu görülmemesinin rolü olmuştur. Bindokuzyüz doksanlı yılların başlarından itibaren MRSA enfeksiyonlarının hastane ortamında yayılmasının önlenmesindeki zorluklar fark edilmeye başlanmıştır. Bunun üzerine; söz konusu enfeksiyonların kontrol altında tutulması ve hastane ortamında yayılmasının en aza indirilmesine yönelik olarak yoğun çalışmalar başlatılmıştır ve halen sürdürülmektedir. Bugün bir çok hastanede bu amaçla; hastanenin işlev ve özelliklerine uygun olarak, hastaların kesin izolasyonu da dahil olmak üzere her türlü önleme başvurulmakta ve özgün korunma politikaları geliştirilmeye çalışılmaktadır (13-16).

2.1.2. Sınıflandırma

Stafilokoklar Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'nin 1986 yılındaki baskısında *Planococcus, Micrococcus, Stomatococcus* cinsleri ile birlikte "*Micrococcaceae*" ailesi içinde sınıflandırılmıştır (18,19). Moleküler tekniklerin gelişmesiyle birlikte daha sonra yapılan DNA-ribozomal RNA hibridizasyonları, 16S rRNA sekans analizleri gibi genetik çalışmalar ve kemotaksonomik analizler (hücre duvarı kompozisyonu, hücresel yağ asitleri gibi) aslında bu mikroorganizmaların birbirlerinden farklı olduklarını göstermiş ve tek bir aile içinde toplanmaması gerektiğini ortaya koymuştur. Bu çalışmalar planokoklar ve

stafilokokların *Bacillus/Lactobacillus/Streptococcus* grubu üyeleri ile mikrokok ve stomatokokların ise amycelial actinomycetes'ler ile yakın filogenetik ilişki içinde odluklarını göstermiştir (17). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'nin yeni baskısında stafilokoklar *Firmicutes* şubesi, *Bacilli* sınıfında, *Bacillales* takımındaki *Staphylococcaceae* ailesi içinde Genus I olarak sınıflandırılmıştır (18).

Günümüzde *Staphylococcus* genusunda 35 tür ve 17 alt tür saptanmıştır (19). Otuz beş tür saptanmış olmasına karşın insanlardaki stafilokok enfeksiyonlarından birinci sırada *S. aureus* izole edilmektedir. Fırsatçı patojenler olan *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus* da sıklıkla enfeksiyona sebep olurlar . Daha nadiren *S. haemolyticus, S. hominis, S. warneri*, *S. saccharolyticus* ve *S. simulans* da fırsatçı enfeksiyonlara neden olmaktadır (16,20).

2.1.3. Morfoloji ve boyanma özellikleri

Stafilokoklar yuvarlak, 0.5-1.7 µm çapında, katalaz pozitif, hareketsiz, sporsuz, Gram pozitif koklardır (17).

Bu mikroorganizmalar çoğu kez özellikle katı besiyerinde ürediklerinde bölündükten sonra birbirlerinden ayrılmaz ve Gram boyalı prepartalarda üzüm salkımı gibi düzensiz kümeler şeklinde görülürken bazen tetrat, ikişerli kok ya da tek tek koklar şeklinde görülebilirler (16).

Klinik örneklerden hazırlanan gram boyalı preparatlarda 0.5-1.5 µm çapında Gram pozitif kok olarak tekli, ikili, kısa zincirli veya kümeler şeklinde polimorfonükleer lökositlerin içinde veya dışında görülebilirler. Bakterilerin büyüklüğünde ve şeklinde olabilen bu farklılıklar muhtemelen konaktaki enflamatuvar hücrelerin ve bunların hidrolitik enzimlerinin etkisine bağlıdır. Direkt yayma preparatlarda görülen ikili ve kısa zincirli organizmaları görünüm olarak streptokok, mikrokok ve peptostreptokoklardan ayırt etmek olanaksızdır (17).

2.1.4. Üreme özellikleri ve koloni morfolojileri

Stafilokoklar sadece anaeorobik şartlarda üreyebilen *S. aureus* subsp. *anaerobius* ve *S. saccharolyticus* hariç fakültatif anaeorop bakterilerdir. Katı besi yerlerinde 18-24 saat içinde beyaz ya da altın sarısı pigmentli, 1-3 milimetre (mm) çapında, yuvarlak kenarlı, kabarık parlak yüzeyli, tereyağı kıvamında, S tipi, beta hemolitik veya non hemolitik koloniler yaparlar. Alfa hemoliz yapan stafilokok türü tespit edilmemiştir.

Bazı *S. aureus* ve Koagülaz Negatif Stafilokoklar (KNS) tarafından üretilen ve kolonilere altın sarısı rengini veren karotenoid yapısındaki pigmentler hücre zarında yer almaktadır. Pigmentasyon oda ısısında 2-3 günlük ek inkübasyonla veya direkt gün ışığına maruz kalma ile artarken anaeorop koşullardaki inkübasyon ile ortadan kalkabilir. Basit besiyerleri dahil birçok besi yerinde kolaylıkla ürerler. Besiyerine kan, serum, glikoz gibi maddeler konularak zenginleştirilirse üreme daha çabuk ve kolay olur. Optimal 37°C'de ve pH 7.4'de üremelerine karşın 18-40°C gibi geniş bir ısı aralığında ve pH 4.2-9.3 arası üreyebilirler. Yüzde on daha az NaCl içeren ortamlarda iyi, %15 NaCl'lü ortamda zayıf ürerler. Aerop şartlarda sentetik besiyerinde üremeleri için bir çok aminoasit, adenin ve tiamin gerekirken, anaerop şartlarda üremeleri için bunlara ilave olarak urasil ve piruvata da (veya asetat) ihtiyaç duyarlar (11,16,17).

2.1.5. Biyokimyasal özellikleri

Stafilokoklar başta glukoz olmak üzere maltoz, laktoz, fruktoz gibi karbonhidratların çoğunu asit oluşturarak parçalar fakat gaz oluşturmazlar. Karbonhidratlardan mannitol üzerine etkileri özellik taşımakta olup bu karbonhidratı *S. aureus* parçaladığı halde koagülaz negatif olanlar parçalamaz. Bu özellik bir patojenlik deneyi olarak kullanılmaktadır. *S. aureus* subsp. *anaerobius, S. sachcorolyticus* türleri dışında tümü katalaz pozitiftir. *S. sciuri*, *S. caseolyticus*, *S. lentus* ve *S. vitulus* hariç diğer stafilkoklar modifiye oksidaz negatiftir. *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. hyicus* ve *S. schleferi* subsp. *coagulans* tüp koagülaz, *S. aureus*, *S. lugdunensis* ve *S. schleferi* subsp. *schleferi* ise lam koagülaz pozitif olup diğer stafilokoklar koagülaz negatiftir. Nitratları nitritlere indirgerler (16,18).

2.1.6. Virülans ve patojenite

Organizmaya giren stafilokoklar yoğun ve karışık bir savunma mekanizması ile karşılaşırlar. Bu mekanizmada olabilecek herhangi eksiklik ve mikroorganizmanın virülansı stafilokokların enfeksiyon riskini ve ağırlığını artırabilir. Bu mikroorganizmaların konağa tutunması, anatomik bariyerlerden girişi, fagositik hücrelerin inaktivasyonu, konağın humoral savunmasının bozulmasında, bakterinin hücre duvar yapıları, kapsül yüzey proteinleri, toksinleri ve enzimleri rol oynar (5).

Yapısal komponentler

- Kapsül
- Peptidoglikan
- Teikoik asit
- Protein A

Hemolizinler

- Alfa hemolizin, Beta hemolizin, Delta hemolizin, Gama hemolizin, Panton Valentine lökosidin

Toksinler

- Eksfoliyatif toksin
- Enterotoksinler (A-E, G-I)
- Toksik şok sendromu toksini-1 (TŞST-1)

Enzimler

- Koagülaz, katalaz, hyalüronidaz, fibrinolizin, lipaz, nükleaz, penisilinaz

2.1.6.1. Yapısal komponentler

Kapsül Polisakkarit: Bazı *S. aureus* kökenlerinde polimorfonükleer lökositler tarafından organizmanın fagositozunu önleyen aynı zamanda prostatik yüzeylere ve konak hücrelere tutunmasını sağlayan polisakkarit yapıda kapsül bulunur. Kapsüler polisakkaritin immünolojik olarak tiplendirilmesiyle 11 serotip tanımlanmıştır. Önemli enfeksiyonlara yol açan klinik izolatların %70-80'ni serotip 5 ve 8 tarafından oluşturulur. Yaygın olarak kullanılan ve antistafilokakal bir antibiyotik olan oksasiline dirençli *S. aureus* suşlarının önemli bir kısmı serotip 5 kapsüler polisakkarit üretir. Ayrıca toksik şok sendromu toksini üretimi ile serotip 8'in yakın ilişkide oldukları gösterilmiştir (17).

Peptidoglikan Tabaka: Bakteri hücre duvarı; mikroorganizmaya şeklini veren, yapısal sertlik sağlayan ve dış çevre şartlarına karşı fiziksel bariyer oluşturan bir yapıdır. Hücre duvarına sertlik veren kısım peptidoglikan tabakasıdır. Bu tabaka N-asetilglikozamin ve N-asetilmüramikasitin β-1,4 bağı ile bağlanmasıyla oluşan tekrarlayan disakkarit birimlerden oluşur. Polimerdeki N-asetilmüramikasit rezidülerinin C3 karbonuna L-alanin, D-glutamin, L-lizin ve D-alanin amioasitlerinden oluşan kısa bir tetrapeptid zinciri bağlıdır. Bu zincirdeki D-alanin rezidüsü diğer peptidoglikan zincirindeki N-asetilmüramik asite bağlı tetrapeptidin

L-lizin rezüdüsüne, 5 glisin aminoasitinden oluşan bir pentapeptid ile bağlanır. Böylece peptidoglikan zincirleri birbirlerine bağlanmış olur (11,17).

Stafilokokların peptidoglikan tabakası; makrofajlardan sitokin salınımını uyarır, komplemanın aktivasyonuna yol açar ve trombosit agregasyonuna neden olur. Ayrıca monositlerden İnterlökin-1 (İL-1) salınımını uyararak polimorfonükleer lökositlerin enfeksiyon bölgesine toplanmalarına ve sonuçta apse oluşumuna da yol açar (21,22).

Teikoik Asit: Teikoik asit, suda eriyebilen, fosfodiester bağları ile bağlanarak uzun zincirler oluşturan şeker-alkol-fosfat polimerleridir. Peptidoglikan tabakasındaki N-asetilmuramikasit molekülüne fosfodiester bağlarıyla kovalent olarak bağlanmıştır. Hücre duvarı kuru ağırlığının yaklaşık olarak %30-50'sini oluşturur. Kalınlığının yaklaşık 10-12 nanometre arasında olduğu belirlenmiştir. İki tiptir; bunlar ribitol teikoik asit ve gliserol teikoik asittir. Teikoik asit; *S. aureus*'da özgün ribitol (5-karbon monosakkarid) fosfat polimeri yapısında iken, *S. epidermidis*'de gliserol fosfat yapısındadır. Sadece Gram pozitif bakterilerin hücre duvarında bulunan bu yapı hücre yüzeyine negatif yük vererek, çeşitli metal iyonlarının, katyonların lokalizasyonunda ve otolitik enzimlerin aktivasyonunda rol oynar. Stafilokokların türe özgü antijenleri teikoik asitlerdir. Mukozalarda bulunan özgül reseptörleri (fibronektin, fibrinojen, laminin) hücre dışına salgılanır (24). Monomerler hedef hücre membranı üzerinde merkezinde bir por bulunan silindirik heptamerler oluşturmak üzere etkileşir. Bu silindirik heptamerik proteinlerin açtığı porlardan hücre dışına hızla potasyum ve diğer küçük moleküller çıkarken, sodyum ve kalsiyum iyonları hücre içine girer. Bunun sonucunda osmotik dengesi bozulan hücre parçalanır (5,10,23).

Protein A: *S. aureus*'un hücre duvarında bulunur. Kovalent olarak peptidoglikan tabakaya bağlanmıştır. Bu madde kemotaktik, antikomplemanter ve antifagositik etki gösterir (19). İmmünglobulin G1 (IgG1), IgG2 ve IgG4'ün Fc reseptörlerine bağlanarak organizmayı antikor aracılı immün temizlenmeden korur. Ekstraselüler Protein A'nın antikora bağlanması aynı zamanda immün kompleks oluşumu ve sonrasında da komplemanın tüketimine neden olur (22). Protein A immünojeniktir ve *S. aureus* enfeksiyonlarında protein A'ya karşı antikor tespit edilir (17). *S. aureus*'ta Protein A'nın varlığı koaglütinasyon test temelini oluşturur. Bu teknik farklı

antijenlere yönelik olan antikorların nonspesifik taşıyıcısı olarak laboratuvarda organizmaların tanımlanması için kullanılır (17, 22).

2.1.6.2. Hemolizinler

Alfa Hemolizin: Eritrosit, polimorfonükleer lökosit, trombosit ve fibroblastları içeren çok değişik hücre tipi üzerine letal etkiye sahip olan en önemli hemolizindir. Alfa hemolizin yedi monomerden oluşan ve toplam moleküler ağırlığı 33 kilodalton (kDa) olan heptamerik bir proteindir. Geç logaritmik üreme safhasında zamanda dermonekrotik etkiye sahiptir. Ayrıca miyelin kılıflarının demiyelizasyonuna yol açarak nörotoksik etki oluşturur. Kanlı agarda üreyen *S. aureus* kolonilerinin çevresindeki beta hemolizden de bu toksin sorumludur (11,17).

Beta Hemolizin: Değişik hücreler üzerine etkili olan bir sfingomyelinazdır. Dermonekrotik etkisi bulunmaz. Beta hemolizin, logaritmik üreme fazının sonunda hücre dışı ortama salınan ve moleküler ağırlığı 35 kDa olan bir proteindir. Hemolitik aktivitesi için magnezyum iyonları gerekir ve substrat profili sifingomiyelin ve lizofosfotidilkolin ile sınırlıdır. Bu toksin sıcak-soğuk hemolizin olarakta bilinir. Eritrositler soğuğa maruz kaldığında beta toksinin hemoliz etkisinde artış görülür (17). Alfa hemolizin ile birlikte beta hemolizin, invaziv stafilokok enfeksiyonları için tipik olan doku hasarı ve abse oluşumundan sorumlu en önemli toksindir. Beta hemolizin aynı zamanda B grubu streptokoklar ve *Listeria monocytogenes* tarafından üretilen ve *S. aureus*'un hemolizini artırıcı etkiye sahip olan CAMP faktörle etkileşen ve sinerjik hemolize sebep olan yapıdır (11).

Delta Hemolizin: Moleküler ağırlığı 3 kDa olan hücre dışı bir proteindir. Delta hemolizin *S. aureus* türlerinin %97'sinde ve koagülaz negatif stafilokokların %50-70'inde bulunur (17). Delta hemolizin, hücre membanını detarjan benzeri etkiyle tahrip ederek hücre içeriğinin dışarı çıkmasına yol açan yüzey aktif bir proteindir (17). İnsan, tavşan, koyun ve maymun eritrositlerini eritir. Biyoloji etkinliği geniş olup, eritrosit, lökosit, makrofaj, lenfosit ve trombositleri hasara uğratan bir proteindir (4,19).

Gama Hemolizin ve Panton-Valentine Lökosidin: Gama hemolizin proteinleri molekül ağırlığı 32-35 kDa aralığında olan hemolizin γ A (HlgA), hemolizin γ B (HlgB) ve hemolizin γ C (HlgC), olmak üzere üç farklı proteindir. Panton-Valentine lökosidin proteinleri ise molekül ağırlığı 32 ve 34 kDa olan LukS-P-V ve LukF-P-V

olmak üzere iki farklı proteindir. HlgA, HlgC ve LukS-P-V proteinlerine, kimyasal olarak çözücü içinde yavaş ayrıştıklarından S (slow-eluting protein) proteinleri adı verilir. HlgB ve LukF-P-V proteinlerine ise çözücü içinde hızlı ayrıştıklarından F (fast-eluting protein) proteinleri adı verilir (17).

Üç S proteininden her birisi, iki F proteininden biri ile bağlanır. Böylece biyolojik aktiviteye sahip altı farklı çeşitte ikili kompleksler oluşur. Bu beş proteinden hiçbiri tek başına hemolitik veya lökosidal aktiviteye sahip değildir. İkili kompleksler oluşturduklarında tümü lökositleri etkili bir şekilde eritirken hemolitik aktiviteleri değişkenlik gösterir. Bu toksinler hedef hücrelerde porlar oluşturarak hücre membranının başta potasyum olmak üzere katyonlara geçirgenliğini artırır ve lökosit sitoplazmasında degranülasyona yol açarak erimelerine neden olurlar (17).

2.1.6.3. Toksinler

Eksfoliyatif Toksinler: Stafilokokal haşlanmış deri sendromuna yol açan toksinlerdir. *S. aureus* türlerindeki toksin üretiminin prevelansı coğrafi olarak değişkenlik göstermesine karşın genellikle %5-10'dan daha azdır (22). Eksfoliyatif toksin A ve Eksfoliyatif toksin B olmak üzere iki proteinden oluşur. Eksfoliyatif toksin A ısıya dayanıklıdır ve kromozomal kökenlidir. Buna karşın Eksfoliyatif toksin B ısıya duyarlı bir proteindir ve plazmid kökenlidir. İki toksinde biyokimyasal ve immünolojik olarak farklıdır. Bu toksinlerin ortak özellikleri süperantijen özelliğinde olmaları ve proteolitik (serin proteazlar) aktiviteye sahip olmalarıdır. Tek başlarına bulunduklarında da hastalığa yol açabilirler (11,17). Her iki toksinde epidermisdeki *stratum granulosum* tabakasını oluşturan hücrelerin interselüler bağlarının kopmasına ve *stratum granulosum*'un ayrılmasına neden olurlar (17). Epidermisin toksine maruz kalmasından sonra koruyucu nötralizan antikorlar gelişir (11).

Enterotoksinler: Isıya dirençli, 100°C'ye 30 dakika dayanabilen, gastrik ve jejunal enzim hidrolizine dirençli, polipeptit yapısında maddelerdir. Bu sebeple besinler üzerinde hazır üretilmiş bulunan toksinler yiyecek maddeleri ısıtılsa ve bu toksini üreten stafilokoklar öldürülse bile etkinliklerini kaybetmezler. Bu maddeler aynı zamanda süperantijendirler. *S. aureus* kökenlerinin %30-50'sinin bu toksinleri oluşturabildikleri saptanmıştır (11,22). Sekiz farklı serolojik stafilokokal enterotoksin (A-E,G-I) ve enterotoksin C'nin üç alt tipi tanımlanmıştır. En sık besin zehirlenmesine yol açan toksin enterotoksin A'dır. B ise hastane enfeksiyonlarında

çok karşılaşılan bir toksindir ve pseudomembranöz enterokolite neden olur (20). Entreotoksin B ve nadiren enterotoksin C mensturasyon dışı Toksik Şok Sendromu (TŞS) vakalarının yaklaşık yarısından sorumludur. Diğer enterotoksinlerin prevalansı daha düşüktür (22).

Toksik şok sendromu toksini-1 (TŞST-1): TŞS; ateş, diyare, deride yaygın kırmızı döküntüler, mental konfüzyon, ciddi hipotansiyon, böbrek yetmezliği ile karakterize klinik bir tablodur (4,25). Eskiden TŞS ekzotoksin C ve enterotoksin F olarak isimlendirilen iki proteinin yol açtığı düşünülmekteydi ancak daha sonra yapılan araştırmalarda bu iki toksinin aynı olduğu anlaşılmış ve TŞST-1 olarak yeniden isimlendirilmiştir (4,25).

TŞST-1 moleküler ağırlığı 22 kDa olan küçük bir protein olup ısıya ve proteolitik enzimlere dirençlidir ve süperantijen yapısındadır (17). Süperantijenler, antijen sunan hücreler tarafından antijenik peptidlerin hücre içinde işlenip sunulma aşamalarına gerek duymadan MHC sınıf II reseptörlerine antijen bağlanma bölgesinin dışında, başka bir yerden bağlandıktan sonra T-hücre reseptörlerinin değişken bölgelerine bağlanarak bu hücrelerden aşırı miktarda IL-1, tümör nekroz faktör ve interferon-γ salınımına yol açarlar ve ciddi sistemik etkilere neden olurlar (11,17). Koagülaz negatif stafilokoklarında TŞST-1 üretebildikleri yapılan çalışmalarla gösterilmiş ve bu organizmalar tarafından oluşturulan TŞS vakaları bildirilmiştir (26).

2.1.6.4. Enzimler

Koagülaz: *S. aureus* suşlarında koagülaz enzimi iki farklı şekilde olabilir. Bu enzimlerden biri hücre duvarına bağlı ("clumping" faktör) olarak bulunur ve plazmadaki fibrinojene direkt etki göstererek fibrine dönüştürür. Ayrıca bu enzim stafilokokların birbirine bağlanmasını da sağlar. Diğer koagülaz ise bakteriden dışarı salgılanır ve plazmada globulin yapısındaki ("coagulaz-reakting faktör") bir proteinle birleşerek trombine benzer yapıdaki stafilotrombini oluşturur. Stafilotrombinde fibrinojeni fibrine dönüştürerek plazmayı pıhtılaştırır. Koagülaz enziminin stafilokokların virülansındaki rolü henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak stafilokokların üzerinde kalın bir fibrin tabakası oluşturarak mikroorganizmayı fagositoza karşı koruduğu ve patojeniteye katkı sağladığı ileri sürülmektedir (11,17).

Katalaz: Bütün stafilokoklar miyeloperoksidaz sistemince düzenlenen toksik hidrojen peroksit (H_2O_2)'in, su ve oksijene dönüşümünü katalize eden katalaz enzimi üretirler. H_2O_2 bakteriyel metabolizma sırasında veya fagositoz sonrası birikebilir. Katalaz fagosite edilmiş bakterinin oksijen radikalleri ile öldürülmesini engelleyerek konak savunma mekanizmalarını bozar (19).

Hyalüronidaz: Bağ dokusunun hücresiz matriksinde bulunan hyaluronik asiti hidrolize eder. Bu enzim *S. aureus*'un dokuda yayılımını kolaylaştırır. *S. aureus* suşlarının %90'dan fazlası bu enzimi üretirler (27).

Fibrinolizin: Aynı zamanda stafilokinaz olarak da isimlendirilir. Hemen hemen tüm *S. aureus* türlerince üretilen fibrinolizin, fibrin kılıfını eriterek enfeksiyonun yayılımını kolaylaştırır (16).

Lipaz: Tüm *S. aureus* suşları ve KNS'lerin yaklaşık 1/3'ü birkaç farklı lipaz üretir. Lipazlar yağları hidrolize ederek vücudun yağ bezlerinden zengin bölgelerinde stafilokokların yaşaması için zorunlu olan enzimlerdir. Stafilokokların yüzeyel dokuları invaze ederek fronkül ve karbonkül gibi enfeksiyonların oluşmasında rol oynadığı düşünülmektedir (19,27).

Nükleaz: *S. aureus*'u diğer stafilokoklardan ayırt etmede kullanılan diğer bir faktördür. *S. aureus* suşlarının %90-96'sında bulunur. Enfeksiyonun patogenezinde bu enzimin rolü bilinmemektedir (4).

Penisilinaz: Klinik kullanıma girdiği dönemlerde hemen hemen hiçbir stafilokok kökeninde penisiline direnç gözlenmezken günümüzde özellikle hastane kaynaklı izolatlarda bu oran %5'in altına düşmüştür. Stafilokoklarda penisilin direncine neden olan mekanizma penisilinaz üretimidir. Bu enzimleri kodlayan genler aktarılabilir pilazmidler üzerinde bulunduğundan diğer suşlara da hızlı yayılım gösterir (11).

2.1.7. Epidemiyoloji

Hastaneye yatırılan hastalara tanı ve tedavi amacıyla uygulanan endoskopi, kateterizasyon, biopsi, mekanik ventilasyon, trakeostomi gibi girişimler konak savunma mekanizmasının bozulmasına ve konağın özgül florasının yerine, hastane ortamında yaygın olan mikroorganizmalarla kolonizasyonuna yol açar. Bu mikroorganizmaların başında MRSA gelmektedir. MRSA özellikle 1980'lerin başından itibaren önemli bir epidemiyolojik sorun olarak ortaya çıkmıştır (28-30).

Doğumdan itibaren *S. aureus* göbek, perine ve deriye kolonize olur. Çocukluk döneminde başlıca yerleşim yeri nazofarenksler iken, erişkin dönemde burundur. Erişkinlerde burun taşıyıcılığı oranının %20-40 arasında olduğu tahmin edilmektedir. TŞS için risk altında olan doğurganlık çağındaki kadınların %10'nunun vajeninde *S. aureus* taşıyıcılığı bildirilmiş, ayrıca rektal, faringeal, aksillar ve perineal taşıyıcılıktan da söz edilmiştir (28-30).

Sağlık çalışanları, insülin kullanan diyabetikler, kronik hemodiyaliz hastaları, intravenöz ilaç alışkanlığı olanlar, ayaktan periton diyalizi uygulanan hastalar, kronik dermatolojik hastalığı olanlar ve Human Immunodeficiency Virus (HIV) pozitif hastalarda taşıyıcılık oranı daha fazladır. Bununla birlikte hastanede uzun süreli yatış öyküsü, yoğun antibiyotik kullanma, yanık ünitesinde tedavi görme, yoğun bakım servislerinde kalma, intravasküler kateter varlığı, cerrahi girişim geçirme öyküsü, MRSA ile kolonize veya enfekte hasta ile temas ve aynı ailede sağlık alanında çalışan kişi varlığı MRSA enfeksiyonu için başlıca risk faktörlerini oluşturmaktadır (28-30).

Nozokomiyal enfeksiyonların en sık etkenlerinden biri olan MRSA suşlarının esas kaynağı enfekte veya kolonize hastalar ile birlikte sağlık personelleridir. MRSA suşları özellikle sağlık personellerinin elleri ile diğer hastalara yayılmaktadır. Hastaların başka nedenlerle antibiyotik almaları kolonizasyon riskini çok fazla artırmaktadır. Hava yoluyla bulaş, yoğun bakım servislerinde pnömoni olgularında ve yanık ünitesi birimlerinde önem kazanmaktadır (29-31).

MRSA kolonizasyonu ve enfeksiyonunu önlemek amacıyla el yıkama eğitimi ve antibiyotik kullanımının kısıtlanması hastanelerde daha etkin ve maliyeti düşük yöntemlerdir. Burun taşıyıcılığının önlenmesinde seçilmiş olgularda mupirosin kullanımı ile birlikte vücudun klorheksidinli sabunlarla yıkanması etkili olabilmektedir (30).

MRSA enfeksiyonlarının sıklığı ülkeden ülkeye, hastaneden hastaneye ve hatta hastane içinde değişik servisler arasında bile büyük farklılık göstermektedir. Bu bakteri ile görülen enfeksiyonların sıklığı İskandinav ülkelerinde %1'den, Yunanistan, İtalya, İspanya ve Fransa da olduğu gibi %80'lere kadar değişmektedir (32). Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'de yoğun bakım ünitelerinden izole edilen *S. aureus* suşlarının %52'sinde, yoğun bakım dışı ünitelerden izole edilenlerin ise %42'sinde metisiline direnç saptanmıştır (33). İspanya'da 143 hastaneyi içeren

geniş bir çalışmada stafilokok suşlarının metisilin direnci *S. aureus*'ta %31.7, KNS'de %67 olarak bulunmuştur. KNS içinde en sık %56 oranında *S. epidermidis* izlenmiştir (32,34). Avrupa da Bouza ve ark. (35) kateterlerden izole edilen metisiline dirençli stafilokok suşlarından; *S. aureus* suşlarının %40'ının, KNS suşlarının %63.7'sinin dirençli olduğunu görmüşlerdir. KNS açısından bakıldığında ABD'de bakteriyemilerden izole edilen suşların %65'inin metisiline dirençli olduğu görülmüştür (36).

Türkiye'de 1996-1999 yılları arasında yapılan dokuz ayrı çalışmada bildirilen metisilin direncinin ortalama %47.5 olduğu hesaplanmış, 2000-2003 yıllarında ise sekiz ayrı çalışma sonuçlarının ortalaması da bu orana çok yakın (%46.6) bulunmuştur. Ancak son yıllarda hastanede yatan hastalardan izole edilen *S. aureus* suşlarına ilişkin verileri içeren yayınlar, metisilin direncinin %52'ye yükseldiğini göstermiştir (36). Türkiye geneline bakıldığında KNS'lerde 2003-2004 yıllarında belirlenen metisiline direnç oranının (%50), *S. aureus* suşlarındakine benzer olduğu gözlenmiştir (37).

2.1.8. Stafilokokların neden olduğu enfeksiyonlar

Stafilokoklar basit deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarından, sepsis gibi ağır tablolara uzanan çok geniş bir hastalık spektrumunu içerirler. *S. aureus* diğer stafilokoklar arasında en önemli patojendir (17,27). *S. aureus* enfeksiyonlarının oluşmasında çeşitli predispozan faktörler bulunmaktadır. Bunların başında fagositer sistem yetersizlikleri gelmektedir. Hastaneye yatış, tanı ya da tedavi amaçlı kullanılan yabancı cisimler, deri yaralanmaları ve başta influenza olmak üzere viral enfksiyonlar *S. aureus* enfeksiyon sıklığını artırır. Diabetik hastalarda *S. aureus* enfeksiyonları için önemli bir risk grubudur (38).

S. aureus'un oluşturduğu enfeksiyonlar;

- Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları
- Bakteriyemi ve endokarditler
- Organ enfeksiyonları
- Toksinleriyle oluşan hastalıklar olmak üzere dört grupta incelemek mümkündür. Stafilokokların neden olduğu enfeksiyonlar Tablo1'de gösterilmektedir.

Tablo 1. Stafilokokların neden olduğu hastalıklar

***S. aureus*'un neden olduğu enfeksiyonlar**	**Koagülaz negatif stafilokok enfeksiyonları**
Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları • İmpetigo • Follikülit • Fronkül • Karbonkül Organ enfeksiyonları • Pnömoni • Ampiyem • Osteomiyelit • Septik artrit Toksin aracılı hastalıklar • Haşlanmış deri sendromu • Besin zehirlenmesi • Toksik şok sendromu Bakteriyemi ve endokardit	Endokardit Katater ve şant enfeksiyonları Üriner sistem enfeksiyonları

Son yıllara kadar izole edildiğinde kültür kontaminan olarak kabul edilen KNS'lerin birçok çalışma ile ciddi oranda enfeksiyonlara neden olduğu gösterilmiştir. KNS'ler hastane kaynaklı enfeksiyonlarda önemli oranlarda izole edilirken, toplumdan edinilmiş enfeksiyonlarda da sık karşılaşılır hale gelmiştir (39). KNS'lerin etken olduğu enfeksiyonların çoğu kateter veya yabancı cisim ile ilişkilidir. Doğal kapak endokarditi ve peritoneal diyaliz kateter enfeksiyonları dışında *S. epidermidis* enfeksiyonlarının büyük kısmı hastane kökenli iken *S. saprophyticus* enfeksiyonları ise genellikle toplum kaynaklıdır (40).

2.1.8.1. Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları

İmpetigo: Dermisi tutan yüzeyel deri enfeksiyonudur. En sık yaz aylarında ve çocuklarda görülür. Stafilokoklar en sık rastlanan etkenlerdir. Ancak %10 oranında

Streptococcus pyogenes'de etken olabilmektedir. Yüz ve bacaklar gibi vücudun açıkta kalan kısımlarında, deri ya da mukoza bütünlüğünün bozulması sonucunda meydana gelir. Son derece bulaşıcıdır ve yayılımı direkt temas yoluyla olmaktadır. Lezyon kırmızı bir makülle başlar, eritemli veziküle dönüşür. Vezikül yırtılarak, etrafı eritemli, deriden 1 cm kabarık, sarı, ıslak krut ortaya çıkar. Skar bırakmadan iyleşir. Sistemik semptom bulunmaz tedavi vermeden kendiliğinden iyileşebilir. Ancak yayılımını ve nüksü engellemek için antibiyotik tedavisi verilmelidir (38).

Folikülit: Kıl folikülü ve apokrin bölgeyi içine alan iyi seyirli piyodermilerdir. Ortası endüre çevresi ağrılı ve hiperemik lezyonla karekterizedir. Sistemik semptom bulnmaz. Tedavide lokal antiseptikler yeterlidir (38).

Fronkül: Folikülitin daha derin enflamatuvar nodüle dönüşümüyle fronkül meydana gelir. Yaygın bir enfeksiyondur. Vücüdun kıl dokusundan zengin olan yüz, boyun, koltuk altı ve kalça bölgesi gibi bölgelerinde oluşur. Ağrılı kırmızı bir nodülle başlar ve hızla genişleyerek, 1-2 cm çapında, ortası endüre lezyona döner. Spontan rüptür sonucunda ya da cerrahi insizyon ile drene olur. Özgül tedavisi yoktur, spontan apse drenajı veya cerrahi eksizyon ile iyileşir (38).

Karbonkül: Birçok kıl folikülünü bir arada tutan özellikle boyunda deri altı dokulara ilerleyen, daha sonra birden fazla sinüsle dışarı açılan, ağrılı, daha büyük lezyonlardır (40). Hipertrofik skar dokusu bırakarak iyileşir. Genellikle sistemik semptomlar ve bakteriyemiyle birlikte bulunur. Tedavide oral antibiyotikle beraber intranazal antistafilokokal pomadlar kullanılmalıdır (38).

2.1.8.2. Organ enfeksiyonları

Pnömoni: Toplumdan kazanılmış *S. aureus* pnömonisi en sık viral alt solunun yolu enfeksiyonlarından sonra görülür. Genellikle influenza enfeksiyonundan birkaç gün sonra başlar. İnfluenza epidemilerinin olduğu dönemlerde sıklığı artar. Hastane kökenli *S. aureus* pnömonisi entübasyon ya da aspirasyon sonucu meydana gelir ve %10 oranında ampiyem gelişir. Enfekte trombotik emboli ya da triküspiddeki vejetasyonlara bağlı olarak hematojen yolla *S. aureus* pnömonisi gelişebilir. Tedavide semisentetik penisilinler veya glikopeptitler iki hafta süreyle kullanılmalıdır (38).

Ampiyem: *S. aureus* pnömonisi ya da apsesine sekonder olarak meydana gelebilir. Başlangıçtaki hastalık (pnömoni, apse vb.) bulgularına ek olarak göğüs ağrısı, ateş, nefes almada zorluk, taşikardi ve plevral efüzyon bulunur. Tanı plevral sıvısının bakteriyolojik muayenesi ile konulur. Akciğer grafisi, tomografi ve ultrasonografi tanıda yardımcı olur. Tedavide ampiyem drene edilmeli ve antistafilokokal antibiyotikler kullanılmalıdır (38).

Osteomiyelit: Akut osteomiyelitin en sık rastlanan nedenidir. En sık 12 yaşın altındaki çocukarda görülür. Yenidoğanda daha çok umblikal enfeksiyon sonrası hematojen yayılımla özellikle alt ekstremitelerde gelişir. Yüksek ateş ve uzun kemiklerin metafiz bölgesinde ağrı ile ortaya çıkar. Erişkinlerde *S. aureus*'un hematojen yolla yayılımı sonucunda vertabralarda osteomiyelit sıktır. Ortopedik cerrahi ya da travmaya sekonder olarakta *S. aureus* osteomiyeliti gelişebilmektedir. *S. aureus* osteomiyelitlerinde prognoz iyi olup tam iyileşme %90 civarındadır. Beta lakamazlara dirençli semisentetik penisilin ya da vankomisin ile 4 hafta tedavi edilmelidir (38).

Septik Artrit: Puberte öncesinde gelişen septik artritlerde en sık rastlanılan etken *S. aureus*'tur. Erişkinlerde ise septisemi komplikasyonu olarak ya da romatoid artrite sekonder gelişir. Tutulan eklem şiş, sıcak ve ağrılıdır. Kalça, diz, omuz, el bileği ve parmak eklemlerinde görülür. Tanı eklem aspirasyonu ile konulur. Yaymada polimorfonükleer lökositler ve Gram pozitif koklar görülür. Tedavi osteomiyelitte olduğu gibidir (38).

2.1.8.3. Toksin aracılı hastalıklar

Stafilokokal Haşlanmış Deri Sendromu: Çoğunlukla yeni doğan ve bir yaşın altındaki çocuklarda görülür. Eksfolyatif toksin salgılayan *S. aureus* tarafından oluşturulur. Hastalık büyük büller ve epidermiste geniş katlar halinde ayrılmayla karakterizedir. Büllerden mikroorganizma izole edilebilir. Mukozal tutulum yoktur. Sağlam görünen deri hafif bir sürtünme ile soyulur. Buna Nikolsky belirtisi denir. Ciddi sıvı ve elektrolit kaybı sonucu hipovolemi ve sepsis oluşabilir. Tedavide beta-laktamazlara dirençli beta-laktam antibiyotikler parenteral olarak kullanılmalı ve sıvı-elektrolit kaybı yerine konmalıdır (38,40).

Stafilokokal Besin Zehirlenmesi: Genellikle salgınlar şeklinde görülür. *S. aureus* ile kontamine gıdalarda bakteri tarafından salgılanan enterotoksinlere bağlı olarak

ortaya çıkar. Toksinler ısıya dirençli olup kaynatmakla ya da pişirmekle inaktive olmaz. Besin zehirlenmelerinin en sık rastlanılan nedenlerinden olup sıklığı %30 civarındadır. Etken yemeği hazırlayan kişiden izole edilir. Sütlü tatlılar, etli yiyecekler, patates salataları ve dondurma en sık rastlanılan besinlerdir. Besinler görünüş ve koku olarak normaldir. İnkübasyon süresi 2-6 saattir. Akut sekresyon artışı, bulantı, kusmayla başlar ve kramp tarzında karın ağrısı, ishalle devam eder. Ateş ve nörolojik bulgu yoktur. Prognoz iyi olup tüm semptomlar 8 saatte düzelir. Tedavide sıvı-elektrolit kaybının yerine konulması esastır. Antibiyotik tedavisi gerekmez (38,40).

Toksik Şok Sendromu: Bin dokuz yüz seksenli yıllarda yüksek emicilik özelliği olan tampon kullanan kadınlarda menstrüasyon sırasında oluşan bir hastalık olarak dikkati çekmiştir. Daha sonraları tampon dışında vajinal enfeksiyonlar, kontraseptif araç kullanımı, düşükler, cerrahi yara enfeksiyonları ve ostemiyelitler sonrasında da görülebildiği fark edilmiştir. Olguların %50'sinde TŞST-1 üreten *S. aureus* suşları sorumlu iken diğer %50'sinde enterotoksin B ve C'nin sorumlu olduğu anlaşılmıştır. Şiddetli miyalji, ateş, kusma ve ishal en belirgin semptomlardır. Tedavide hızlı sıvı-elektrolit ve kolloid replasmanı çok önemlidir. Penisilinaza dirençli antistafilokokal penisilinlerle 8-10 günlük intravenöz tedavi yapılmalıdır (40).

2.1.8.4. Bakteriyemi ve endokardit

Toplumdan kazanılmış stafilokokal bakteriyemi genellikle sellülit, osteomiyelit, endokardit ve pnömoni gibi bir odaktan kaynaklanırken, hastane kökenli stafilokokal bakteriyemi daha çok kateterlerden ve diğer invaziv girişimlerden kaynaklanmaktadır. Stafilokokal bakteriyemilerin %86'dan fazlası nozokomiyal kökenlidir (40). Mortalite özellikle hastane kökenli enfeksiyonlarda yüksek olup %80'lerin üzerine çıkabilmektedir. Diyabetik hastalar stafilokokal enfeksiyonlar için önemli risk grubudur (38). Değişik vücut bölgelerine yayılarak osteomiyelit, septik artrit, menenjit, enfektif endokardit, septik şok, dissemine intravasküler koagülasyon ve diğer tüm visseral organlarda stafilokokal enfeksiyonlar ortaya çıkabilir (11,27). *S. aureus*'un etken olduğu endokarditler akut başlar ve hızlı ilerler. En çok mitral kapağı tutar. Aort kapağı tutulumunda prognoz daha kötüdür. Hastaların çoğunda altta yatan başka bir kapak hastalığı yoktur. Mitral veya aort kapak tutulumlarında metastatik enfeksiyonlar çok yaygındır ve mortalite %40'lara

ulaşır. İntravenöz ilaç alışkanlığı olanlar, yaşlılar, protez kapağı olanlar ve hastanede yatan hastalarda *S. aureus* endokarditi görülme olasılığı daha fazladır (19,27,40).

2.1.8.5. Koagülaz negatif stafilokok enfeksiyonları

Endokardit: KNS'lere bağlı doğal kapak endokarditi çok nadirdir (endokarditlerin %5'i). Protez kapak endokarditlerin ise en sık nedenidirler. Cerrahiden sonraki 2-12 ay arasında görülen protez kapak endokarditlerinin %60-80'inden *S. epidermidis* sorumludur. Diğer KNS'ler ve özellikle *S. lugdunensis*'in etken olduğu endokarditlerde bildirilmektedir. *S. lugdunensis* kapak destruksiyonuna yol açarak normal kapakta da endokardit yapabilmektedir. *S. lugdunensis*'in neden olduğu endokarditler diğer KNS endokarditlerinden daha ağır seyreder. Doğal kapak endokarditleri genellikle toplum kaynaklı olup antibiyotiklerle daha kolay tedavi edilebilirken, protez kapak enfeksiyonları çoğunlukla hastane kaynaklıdır ve birçok antibiyotiğe dirençlidir. Tedavide hem cerrahi olarak protez kapağın değiştirilmesi hem de antibiyotikler kullanılır (41).

Katater ve Şant Enfeksiyonları: Katater ve şant enfeksiyonlarının %50'sinden fazlasına KNS'ler neden olur. En sık etken *S. epidermidis'*dir. *S. epidermidis*'in özellikle katater, şant, plastik protez gibi yabancı cisimlerin bulunduğu ortama ilgileri büyüktür. Bu cisimlerin etrafına organizma tarafından kaplanan fibronektin, fibrinojen, vitronektin gibi proteinler stafilokokların kolayca yapıştığı konak proteinleridir. Bu şekilde yabancı cisimlerin etrafına yayılarak bir biyofilm oluşturan *S. epidermidis*'ler oluşturdukları glikokaliks kapsül niteliğindeki bir maddenin içerisinde kalarak antibiyotiklerden ve organizmanın bağışıklık sisteminden korunurlar (17,19).

Üriner Sistem Enfeksiyonları: *S. saprophyticus* özellikle sağlıklı kadınlarda komplike olmayan akut üriner sistem enfeksiyonu etkenleri arasında *Escherichia coli*'den sonra ikinci sırayı almaktadır (20). Hastanede yatan hastalarda idrardan izole edilen tüm bakteriler içinde KNS'ler %5'ten daha düşük oranlardadır ve en sık etken *S. epidermidis*'dir. Tedavi organizmanın antibiyotik duyarlılıklarına göre yapılmalıdır (41).

2.1.9. Tanımlama

2.1.9.1. Gram boyama

Stafilokoklar, klinik örneklerin direkt Gram boyamasında 0.5-1.5 µm çapında, Gram pozitif koklar şeklinde görülürler. Daha büyük hücreler makrokok cinsinde görülür fakat bu türler insanda enfeksiyona neden olmazlar. Organizmalar tekli, ikili, kısa zincirler halinde veya küme yapmış formda polimorfonüveli lökositlerin içinde veya dışında görülebilirler (17,19). Stafilokoklar besiyerinden hazırlanan preparatta, küme-üzüm salkımı yapmış gram pozitif koklar şeklinde görülür. Fakat klinik örnekte tek hücre veya küçük gruplar halinde görünüm daha yaygındır (21,22).

2.1.9.2. Katalaz testi

Stafilokok ve mikrokoklar katalaz testi ile streptokok, enterokok ve streptokok benzeri bakterilerden ayrılırlar. Bu test sitokrom oksidaz enzimlerinin varlığını tespit eder. Katalaz testi lam üzerinde %3 hidrojen peroksit (H_2O_2) ile uygulanır. Hızlı ve kuvvetli balonlanma H_2O_2'in su ve oksijene dönüşümünün göstergesidir. İdeal olanı kan içermeyen besiyerinden katalaz testi yapmaktır. Çünkü kırmızı kan hücreleri zayıf pozitif katalaz reaksiyonuna neden olabilirler. Stafilokokların nadir suşları katalaz negatif olabilir ve bazı enterokoklar pseudokatalaz üreterek H_2O_2 ile zayıf tepkimeye girebilirler (17).

2.1.9.3. Lizostafin duyarlılık testi

Lizostafin stafilokok hücre duvarı peptidoglikanında, glisinden zengin pentapeptid çapraz bağlarına bağlanan bir endopeptidazdır. Bu etki hücrenin osmotik lizise duyarlılığını sağlar. Bazı stafilokok türleri (*S. aureus, S. simulans, S. cohnii ve S. xylosus*), diğerlerine göre (*S. hominis, S. saprophyticus ve S. haemolyticus*) lizostafine daha fazla duyarlılık gösterir. Bundan dolayı bu testin standardizasyonu ve yorumlaması zordur (17). Lizostafin tüp testi için 0.2 ml steril tuzlu suda organizmanın süspansiyonu hazırlanır, sonra 0.2 ml ticari lizostafin solüsyonu eklenir. Hazırlanan süspansiyon 35°C'de iki saat inkübe edilir. Süspansiyonun berraklaşması lizostafine duyarlılığı gösterir. Lizostafin duyarlılığı için disk difüzyon metodu da kullanılabilir. MHA besiyerine test edilecek bakteri inoküle edilir ve lizostafin diski yerleştirilerek 35°C'de 24 saat inkübe edilir. Stafilokok

suşlarında genellikle 10-16 mm çapında inhibisyon zonu görülürken mikrokok ve ilişkili türlerde zon görülmez (17).

2.1.9.4. Furazolidon duyarlılık testi

Bu test 100 µg furazolidon içeren disklerle disk difüzyon yöntemiyle yapılır. 0.5 McFarland bulanıklılığında hazırlanmış bakteri süspansiyonundan kanlı agar yüzeyine ekim yapılır. Ortasına 100 µg furazolidon içeren disk konur ve 35°C'de 24 saat inkübe edilir. Stafilokoklar furazolidona duyarlıdır ve 15 mm'lik inhibisyon zonu oluşturur. Mikrokoklar da ise inhibisyon çapı 6-9 mm arasında değişmektedir (17).

2.1.9.5. Basitrasin duyarlılık testi

Bu testte A grubu β hemolitik streptokokların identifikasyonunda kullanılan 0.04 U basitrasin içeren diskler kullanılır. Stafilokoklar basitrasine dirençlidir. Mikrokoklar ise bir gecelik inkübasyonun ardından 10 mm veya daha geniş inhibisyon zonu oluşturur (17).

2.1.9.6. Glukoz fermantasyon testi

Stafilokokların glikoz fermentasyonu nonfermentatif Gram negatif basiller için yapılan testlerle belirlenebilir. Bu test *Micrococcaceae* familyasını ayırımda referans bir yöntem olarak kabul edilse de henüz rutin laboratuvarlara adapte edilebilecek bir test geliştirilememiştir (11,17).

2.1.9.7. Eritromisin varlığında gliserolden asit oluşturma testi

Bu testte %1 gliserol, 0.4 µg/ml eritromisin ve indikatör olarak bromkresol mavisi içeren agar bazlı besiyerine birkaç koloni çizgi şeklinde ekilerek 3 gün 35°C'de inkübe edilir. Stafilokoklar asit oluşumuna bağlı olarak ekim çizgisi boyunca sarı renk oluşumuna sebep olurken mikrokoklar asit oluşturmadığından ekim çizgisi boyunca mor renkli olarak kalırlar (17). Mikrokok ve stafilokokların ayırımında kullanılan fenotipik testler Tablo 2'de gösterilmiştir.

2.1.9.8. Modifiye oksidaz testi

Bu test ticari olarak temin edilebilen dimetilsülfoksit ve tetrametil parafenilendiamin dihidroklorid emdirilmiş filtre kağıtları kullanılarak yapılabilir. Besiyerinden alınan bir koloni filtre kağıdı üzerine sürülür ve 30 saniye içinde mavi renk oluşması testin

pozitif olduğunu gösterir. Mikrokok türleri modifiye oksidaz testi pozitif iken *S. lentus, S. sciuri, S. vitulinus* hariç tüm stafilokoklar negatiftir (17).

Tablo 2. Mikrokok ve stafilokokların ayırımında kullanılan fenotipik testler (17).

Testler	**Mikrokoklar**	**Stafilokoklar**
Lizostafin	R	S
Furazolidon (100 µg) disk	R	S
Basitrasin (0.04 U) disk	S	R
0.4 µg/ml Eritromisin varlığında gliserolden asit oluşturma	(-)	(+)
Anaeorobik şartlarda glikozdan asit oluşturma	(-)	(+)
Modifiye oksidaz testi	(+)	(-)

R: Dirençli S: Duyarlı

2.1.10. *Staphylococcus aureus*'un tanısı

S. aureus'un tanısı için en güvenilir özellik koagülaz testidir. Geleneksel koagülaz testi lam ve tüpte olmak üzere iki şekilde yapılabilir.

2.1.10.1. Lam koagülaz testi

S. aureus'un birçok suşunun hücre duvarı yüzeyinde, bağlı koagülaz veya "clumping faktör" bulunur. Bu faktör plazmada direkt fibrinojen ile reaksiyona girerek hızla hücre aglütinasyonuna neden olur. Bu test kanlı agar, kolombiya nalidiksik asit agar veya diğer nonselektif besiyerlerinde üremeden sonra uygulanabilir. Fakat "Mannitol Salts Agar" gibi yüksek tuz içeriği olan besiyerlerinde üremeden sonra uygulanmamalıdır. Çünkü yüksek tuz içeriği *S. aureus*'un bazı suşlarında otoaglütinasyona neden olmaktadır. Clumping faktör eksik olan suşlar genellikle serbest koagülaz ürettiklerinden dolayı, lamda koagülaz testi negatif çıkan suşlar tüp koagülaz yöntemiyle doğrulanmalıdır. *S. lugdunensis* ve *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* gibi koagülaz negatif bazı stafilokoklar da clumping faktör üretirler ve lam testi pozitif çıkabilir (17,42).

2.1.10.2. Tüp koagülaz testi

Bu yöntem ile tespit edilen salgılanmış ekstraselüler koagülaz, plazmada koagülaz reacting faktör olarak isimlendirilen bir madde ile kompleks yapar ve

fibrinojen ile reaksiyona girerek fibrin oluşturur. 35°C'de 4 saat inkübasyondan sonra test negatif ise, oda ısısında tutularak 18-24 saat sonra tekrar okunmalıdır. Çünkü bazı suşlar 35°C'de uzun inkübasyon periyodunda fibrinolizin üreterek pıhtının çözülmesine neden olabilir. Nadir *S. aureus* suşları koagülaz negatif olabilir ve bazı hayvan izolatları (*S. intermedius, S. hyicus, S. delphini* ve *S. schleiferi* subsp. *coagulans*) tüp koagülaz pozitif olabilirler (17,42).

Hem lam hem de tüp koagülaz yöntemi için etilen diamin tetra asetikasit (EDTA)'li tavşan plazmasının kullanımı önerilmektedir. Sitratlı plazma kullanılmamalıdır. Çünkü enterokoklar gibi bazı bakteriler sitratı kullanarak testin pozitif sonuçlanmasına ve stafilokok olarak tanımlanmasına neden olabilir. Bu hata her zaman önce katalaz testi uygulanarak önlenebilir. İnsan plazması antistafilokokal antikorlar içerebileceğinden koagülaz testi için kullanılmamalıdır. Tüp koagülaz testi, *S. aureus*'un tanımlanması için halen kullanılan referans yöntemdir (17,42).

2.1.10.3. Ek doğrulayıcı testler

Tüp koagülaz reaksiyonu bazı *S. aureus* suşlarında zayıf veya şüpheli olabilir ve nadir de olsa gerçekten koagülaz negatif olabilir. Bu nedenle diğer testlerle doğrulamak yararlı olabilir (17,42).

• Deoksiribonükleaz (DNase) Test

S. aureus'un ürettiği DNase ve termostabil nükleaz, endonükleolitik ve egzonükleolitik aktiviteye sahiptir. Her iki enzim de DNA'yı hidrolize ederler. DNase testi için, metakromatik toluidin blue içeren DNase test besiyerine organizmanın nokta inokülasyonu yapılır ve 35°C'de 24 saat inkübasyondan sonra besiyerinin altında ve inokulum etrafında gök mavisinden pembe renge dönüşüm DNA'nın hidrolize olduğunu gösterir. Bu test *S. aureus*'un identifikasyonuna yardımcı olmakla birlikte diğer bazı KNS'ler de pozitif DNase reaksiyonu verebilirler (17,42).

• Termostabil Endonükleaz Testi

Bu testte DNase besi yeri kullanılır ve 3 mm steril bir cam boru besiyerine batırılıp kesilerek besiyeri içinde kuyucuklar açılır. Beyin kalp buyyonda 24 saat üremiş organizmalar 15 dakika kaynar su banyosuna tutulur. Oda ısısında soğutulduktan sonra pipetle besiyerindeki kuyucuklara doldurulur ve 35°C'de bir gece inkübe edilir.

S. aureus türleri kuyucukların etrafında pembe bir zon oluştururken diğer stafilokoklar renk değişikliği oluşturmaz (17,42).

• **Mannitol Fermentasyonu**

S. aureus, *S. epidermidis* ve bir takım diğer koagülaz negatif suşlar mannitolü fermente ederler. Bu özellikten epidemiyolojik çalışmalarda *S. aureus*'un toprak ve feçesten tespitinde ve *S. aureus* nazal taşıyıcılarının taranmasında faydalanılır. Kullanılan besiyeri "Mannitol Salts Agar"dır. Bu besiyeri %1 mannitol, %7.5 NaCl, fenol kırmızısı ve pepton içerir. Yüksek tuz konsantrasyonu diğer organizmaların üremesini engeller (enterokoklar dışında). İzole edilen kolonilerin etrafında sarı renkli zonun varlığı ile *S. aureus* tespit edilir ki bu renk mannitolden asit üretiminin göstergesidir. Bununla birlikte diğer nadir görülen stafilokok suşları da mannitolden asit ürettikler için, besiyerinde tespit edilen mannitol pozitif organizmaların, kanlı agara subkültürü yapılarak koagülaz üretimi kontrol edilmelidir (17,42).

2.2. *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*'TA ANTİMİKROBİYAL DİRENÇ

Penisilin 1928 yılında Alexander Fleming tarafından keşfedilmiş, 1940 yılında klinik kullanıma girmesiyle, stafilokoksik enfeksiyonların tedavisinde başarıyla kullanılmaya başlanmıştır. *S. aureus*'ların %94'ü 1940'lı yıllarda penisiline karşı duyarlıyken, penisilinaz genlerinin bakteriler arasında yayılması sonucu 1950'li yıllarda hızla direnç gelişmeye başlamıştır. Penisilinaza dirençli penisilinler (oksasilin, nafsilin, metisilin, dikloksasilin ve kloksasilin) 1960'da kullanılmaya başlanmış ve direnç sorunu geçici olarak ortadan kaldırılmıştır. Ancak bir yıl sonra MRSA suşları ortaya çıkmıştır. Bu suşlar çoğu zaman çoklu antibiyotik direnci göstermektedir. MRSA suşları 1970'li yıllardan itibaren, yaygın olarak kullanılan birçok antimikrobiyal ajanlara (kinolonlar, klindamisin, makrolid grubu antibiyotikler, kloramfenikol, aminoglikozidler, trimetoprim/sülfametoksazol, rifampisin, tetrasiklinler) karşı dirençli hale gelmeye başlamıştır (43-48).

Glikopeptitlerin ilk temsilcisi olan vankomisin 1956 yılında kullanıma girmiş ve uzun yıllar dirençli suşların neden olduğu enfeksiyonlarının tedavisinde başarıyla kullanılmıştır. Ancak, ilk kez 1997 yılında Japonya'dan, vankomisine orta düzeyde dirençli *S. aureus* (VISA) suşu bildirilmiştir. CLSI, VISA için vankomisin minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerini litrede 8-16 mg olarak tanımlamıştır.

VISA suşlarının standart disk diffüzyon, broth mikrodilüsyon, agar dilüsyon ve E-test yöntemiyle tespit edilebileceği kabul edilmiştir. ABD'de, *vanA* geni içeren ilk vankomisin dirençli *S. aureus* (VRSA) suşu 2002 yılında bildirilmiştir. Makrolid, linkozamid, streptogramin (MLS) türevi antimikrobiyaller, makrosiklik lakton halkasından ibaret ortak bir yapıya ve benzer etki mekanizmalarına sahip oldukları için, aynı grupta incelenirler ve MLS grubu olarak isimlendirilirler. Bu grup antimikrobiyaller bakteri ribozomunun 50 S alt birimine bağlanarak, protein sentezinin elangasyon safhasında peptidil tRNA molekülünün ribozomdan ayrılmasını indükler ve bakteriyel protein sentezini inhibe ederler. Eritromisinin klinik kullanıma girmesinden bir yıl sonra ABD, Japonya ve Avrupa'dan eritromisine karşı direnç bildirilmiştir (43-48).

2.2.1. Metisiline Dirençli *S. aureus*

Stafilokoklarda metisiline direnç ilk kez 1961'de, metisilinin klinik kullanıma girmesinden kısa süre sonra İngiltere'de bildirilmiştir. Hemen ardından Japonya, Avrupa, Avustralya'ya yayılmış ve ABD'de ilk dirençli olgu 1968'de bildirilmiştir. MRSA suşları 1970'lerin sonunda klindamisin, makrolidler, kloramfenikol, tetrasiklin, rifampisin, aminoglikozidler gibi çok sayıda antibakteriyel ajana karşı direnç kazanmaya başlamıştır. MRSA suşları 1980'li yıllardan sonra tüm dünyada hastane enfeksiyonu etkenleri arasında ilk sıralardaki yerini almıştır. MRSA'lar önceleri önemli bir nozokomiyal patojen olarak kabul edilmekteyken, takip eden yıllarda, toplumda MRSA enfeksiyonlarının görülme sıklığındaki artış dikkat çekmiştir. Bugün, hastane kaynaklı *S. aureus*'ların yaklaşık %40'ında, toplum kaynaklı *S. aureus*'ların ise yaklaşık %8-20'sinde metisilin direnci saptanmaktadır (49).

2.2.2. Stafilokoklarda metisiline direnç mekanizmaları

S. aureus suşlarında metisiline karşı direnç gelişimi üç şekilde olmaktadır:

1) İntrensek (kromozomal) direnç: Bu tip direnç en sık rastlanan dirençtir ve yeni bir penisilin bağlayan protein (PBP2a) sentezi ile oluşur. PBP'ler bakteri hücre membranında bulunan beta-laktam antibiyotiklerin bağlandığı hedef proteinlerdir. Bu proteinler bakteriyel hücre duvarının sentezi sırasında peptidoglikan ağın birleşmesinde terminal çapraz bağlanma reaksiyonunu katalizleyen enzimlerdir. Hücre duvarı inhibitörleri de bu proteinlere bağlanarak bakteriyel hücre duvarı

sentezini bozarlar. PBP2a'nın beta-laktam antibiyotiklere afınitesi diğer PBP'lerden (PBP1, PBP2, PBP3, PBP4) daha düşüktür. Bu nedenle antibiyotik bakteriye yeteri kadar bağlanamaz ve etkinliği azalır (9,45,50).

Molekül ağırlığı 78 kDa olan PBP2a, 2,1 kilobazlık DNA segmentine lokalize olan *mecA* geni tarafından kodlanmaktadır. Bu gen indüklenebilir bir gendir ve transdüksiyon yoluyla dirençli suşlardan duyarlı suşlara aktarılabilir. Bakteride metisilin direncinin ortaya çıkabilmesi için *mecA* geninin eksprese olması gerekir. Ancak bu ekspresyon her bakteride aynı şekilde olmamaktadır. Bu nedenle *mecA* geni taşıdığı halde metisiline değişik düzeylerde dirençli, hatta duyarlı *S. aureus* suşları bildirilmektedir. Metisilin direnci için *mecA* geninin varlığı mutlaka gereklidir, ancak yeterli değildir. MRSA'larda *mecA* geninin ekspresyonunu etkileyerek fenotipi belirleyen bazı regülasyon mekanizmalan vardır. İntrensek metisilin direnci fenotipik olarak homojen veya heterojen direnç olmak üzere iki şekilde görülebilir (9,45,50).

• **Homojen direnç;** koloniyi oluşturan tüm bakteriler *mecA* genini taşırlar. Hepsinde *mecA* geni eksprese olmuştur ve yüksek düzeyde direnç gelişimine yol açar. Direnç gelişimi, ortamın pH'sı, sıcaklığı, tuz konsantrasyonu, inkübasyon süresi gibi çevresel faktörlerden etkilenmez. Ancak klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında izole edilen stafilokokların az bir kısmında homojen metisilin direnci görülmektedir (9,45,50).

• **Heterojen direnç;** klinik uygulamada daha sık görülen, ancak çevre koşullarından etkilenmesi nedeniyle tespit edilmesi güç olan direnç tipidir. Bu tip dirençte, koloni oluşturan tüm bakteriler *mecA* geni taşımalarına rağmen, direnç ancak 10^6 ya da 10^8 bakteriden birinde tespit edilebilmektedir. Bu durum muhtemelen *mecA* geninin fonksiyonunu kontrol ettiği düşünülen "metisilin direncinin ekspresyonu için esansiyel faktör *(femA)",* faktör X veya *mecR, mecl* gibi kontrol genlerine bağlı olarak ortaya çıkmaktadır (9,45,50).

2) Beta laktamaz üretimi: Beta laktamaz üretimi metisilin molekülündeki beta laktam halkasını kısmen parçalayarak metisilin direncine yol açar. Beta laktam antibiyotiklerin beta laktamaz inhibitörleri ile kombine edilmesi, bu tür direnç gelişimini engeller (45,50).

3) Mevcut PBP'lerde beta laktam antibiyotik afinitesinde azalma: Son yıllarda beta laktamaz sentezlemeyen, ayrıca *mecA* geni de taşımadıkları halde metisiline dirençli stafilokoklar tespit edilmiştir. Çok az sayıdaki bu izolatlar incelendiğinde, bu bakterilerin mevcut PBP'lerinin beta-laktam antibiyotiklere karşı düşük afinite gösterdikleri tespit edilmiştir (9,45,50).

2.2.3. Stafilokoklarda metisilin direncinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler

Günümüzde metisilin direncinin ortaya konmasında *mecA* geninin moleküler yöntemlerle saptanması altın standart olarak kabul edilmektedir. Ancak, özel yetişmiş personel gerektirmesi ve yüksek maliyeti nedeniyle, uygulama genellikle referans laboratuvarlar ile sınırlı kalmaktadır. Bu nedenle klinik laboratuvarlarda *S. aureus* izolatlarında metisilin direncinin saptanması amacıyla çeşitli yöntemler kullanılmaktadır (47,52).

2.2.3.1. Oksasilin disk difüzyon yöntemi

Kimyasal yapısı itibarı ile penisilinazlara dirençli penisilinler içerisinde yüksek dayanıklılığa sahip olması nedeniyle, indikatör antibiyotik olarak sıklıkla oksasilin kullanılır. Bu yöntemde MRSA izolatlarının saptanması amacıyla 1 µg oksasilin içeren antibiyotik diskleri kullanılmaktadır. CLSI tarafından belirlenen direnç sınır değerlerine göre inhibisyon zonunun çapı <10 mm olan izolatlar dirençli, 11-12 mm olan izolatlar orta düzeyde duyarlı, >13 mm olan izolatlar ise duyarlı olarak kabul edilmektedir (47,52).

2.2.3.2. Sefoksitin disk difüzyon yöntemi

Sefoksitin diskleri kullanılarak yapılan disk difüzyon testleri, MRSA ayırımında oldukça yüksek duyarlılığa ve özgüllüğe sahiptir. Ayrıca, sefoksitin disk difüzyon yönteminin değerlendirilmesinin, oksasilin disk difüzyon yöntemine göre daha kolay olduğu bildirilmiştir. Bu yöntemde 30 µg sefoksitin içeren antibiyotik diskleri kullanılmaktadır. CLSI tarafindan belirlenen direnç sınır değerlerine göre inhibisyon zon çapı ≤21 mm olan izolatlar dirençli, ≥22 mm olan izolatlar ise duyarlı olarak kabul edilmektedir (47).

2.2.3.3. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi

Bu yöntemde %2 NaCl içeren Mueller Hinton sıvı besiyeri kullanılmaktadır. Antibiyotik olarak oksasilin tercih edilmektedir. CLSI tarafindan belirlenen direnç

sınır değerlerine göre MİK değeri <2 µg/ml olan izolatlar duyarlı, >4 µg/ml olan izolatlar ise dirençli olarak kabul edilmektedir (47).

2.2.3.4. Oksasilin tuz tarama agar testi

CLSI tarafından tanımlanan "oksasilin tuz tarama agar test", *S. aureus* izolatlarında metisiline karşı direncin belirlenmesinde özgüllüğü ve duyarlılığı oldukça yüksek bir testtir. Bu amaçla, 6 µg/ml oksasilin ve %4 oranında NaCl içeren MHA besiyeri kullanılmaktadır. Bu besiyerine mannitol eklenerek, doğrudan klinik örneklerden MRSA selektif olarak izole edilebilir (47).

2.2.3.5. E-test yöntemi

E-test yöntemi de, mikrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemlerine benzer şekilde test koşullarından etkilenmektedir. %2 NaCl içeren MHA besiyerine 0,5 McFarland bulanıklığa ayarlanmış olan bakteri süspansiyonundan ekim yapılması önerilmektedir (47,52).

2.2.3.6. Lateks aglütinasyon

Metisilin direncinin erken dönemde saptanması amacıyla pek çok farklı test yöntemi de geliştirilmiştir. Kolay uygulanması ve düşük maliyeti nedeniyle lateks aglütinasyon testleri bu amaçla yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu testte *mecA* geni kontrolünde sentezlenen PBP2a'nın, monoklonal antikorlarla kaplı lateks partikülleri ile verdiği aglütinasyon reaksiyonu incelenir (52).

2.2.3.7. Moleküler yöntemler

PCR ile *mecA* geninin saptanması, metisilin direncinin tespitinde altın standart olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte, *mecA* geninin bulunduğu, ancak eksprese olmadığı, duyarlı suşların da bulunabileceği unutulmamalıdır (52).

2.2.3.8. Kromojenik yöntemler

Son yıllarda MRSA'ların saptanmasında enzimatik substratlar içeren kromojenik besiyerleri denenmektedir. Bunlar arasında "oksasilin direnç tarama agar besiyeri" (ORSAB) gibi değişik kromojenik besiyerleri yer almaktadır (52).

2.4. MRSA SUŞLARININ EPİDEMİYOLOJİK TİPLENDİRMESİ

Endemik bir nozokomiyal patojen haline geldikten sonra MRSA'nın eradikasyonunun çok güç olması ve epidemilerin getirdiği mali yük nedeniyle MRSA enfeksiyonlarının epidemiyolojik incelemesi oldukça önemlidir (53). Hastane

enfeksiyonlarının epidemiyolojisi, hastane enfeksiyonlarının özellikle kişi, yer ve zaman açısından dağılımını, nedenlerini belirlemeyi ve önlenmeleri için uygun yöntemleri ortaya koymayı amaçlar. MRSA enfeksiyonlarının epidemiyolojik incelemesinin yapılabilmesi için şuşları birbirinden ayırt edebilecek ya da aralarındaki benzerliği kanıtlayabilecek yöntemlerin kullanılması gerekir. Suşlar arasındaki söz konusu benzerlik ya da farklılıklar epidemiyolojik tiplendirme yöntemleri ile ortaya konmaktadır. Bu yöntemler fenotipik ve genotip yöntemler olarak iki gruba ayrılır (Tablo 3) (54) .

Tablo 3. Epidemiyolojik tiplendirme yöntemleri (54)

Fenotipik Yöntemler	Antibiyotik duyarlılık testi Biyotipleme Serotipleme Bakteriyosin tipleme Faj tipleme Protein bazlı yöntemler • Multilokus enzim elektroforezi • Hücresel proteinlerin poliakrilamit jel elektroforezi • İmmünoblot fingerprinting
Genotipik Yöntemler	Plazmit fingerprinting RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) PFGE (Pulsed Field Gel Electroforesis) RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) Rep-PCR (Repetitive-sequence-based PCR) MLST (Multi Locus Sequence Typing)

Epidemiyolojik tiplendirme yöntemleri başlıca şu amaçlar için kullanılmaktadır (54):

1) Salgın araştırmalarında, salgının kaynağı ve yayılma yolları hakkında hipotezlerin test edilmesi.
2) Hastaların epidemiyolojik olarak birbirleriyle olan ilişkilerinin belirlenmesi.
3) Re-aktivasyonun yeni bulaştan ayırt edilmesi.

4) Hastane enfeksiyonları ve toplumsal kaynaklı enfeksiyonların izlenmesi.

5) Laboratuvar kontaminasyonlarının saptanması.

6) Antibiyotik direncinden sorumlu genler hedef alınarak yapılan tipleme ile dirençli suşların tanımı ve yaygınlıklarının belirlenmesi.

7) Yüksek riskli birimlerdeki immün yetmezliği olan hastalarda belirli bir tip organizmanın kolonizasyonunun olup olmadığının araştırılması ve tehlikeli olabilecek bir suşun yayılımının önlenmesi.

8) Enfekte popülasyondaki epidemi klonlarının sirkülasyonu ve zaman içindeki prevelansını izleyerek, epidemiyolojik sürveyans ve kontrol yöntemlerinin değerlendirilmesine katkıda bulunulması.

MRSA nedenli hastane epidemilerinde izole edilen suşların birbiriyle klonal ilişkisinin olup olmadığın belirlemek için tür içinde farklılık gösterebilen varyantların saptanması gerekir. Ancak epidemiyolojik tiplendirmede kullanılan fenotipik yöntemler iş yükü fazla, uzun zaman alan, çoğunlukla değişken sonuçlar veren yöntemlerdir. Bu durum araştırmacıları genotipleme yöntemlerine itmiştir. Genotipleme ile tür içinde değişken ancak suşlarda stabil olan belirli bir genetik gösterge kullanılarak salgın esnasında toplanan, epidemiyolojik olarak ilişkili, aynı tür içerisindeki izolatların genetik olarak da ilişkili olup olmadıkları araştırılmaktadır. Yani izolatların aynı ya da farklı olup olmadığı sorusuna yanıt aranmaktadır. Böylece enfeksiyonun kaynağı belirlenmektedir (54).

Bir tipleme yöntemlerinin yaygın olarak kullanılabilmesi için bazı kriterleri yerine getirmesi gerekir (54):

Tiplendirebilirlik; kullanılan tiplendirme yönteminin tür içindeki tüm mikroorganizmaları tiplendirme yeteneğidir. Yöntem tür içindeki izolatların yalnızca % 50-60'ını tiplendirebiliyorsa epidemiyolojik araştırmalarda kullanımı sınırlıdır.

Ayırım gücü; tipleme yönteminin bir türün farklı suşları arasında etkin ayırım yapabilme yeteneğidir. Kullanılan yöntemin ayırım gücü yüksek olmalıdır. Ortak kaynaktan izole edilen izolatlar arasındaki bağlantıyı, epidemiyolojik olarak ilişkisiz izolatları arasındaki farkı açık olarak ortaya koyabilmelidir.

Tekrarlanabilirlik; belirli bir şuş ile yapılan tekrarlarda aynı sonucun alınabilmesidir. Özellikle güvenilir bir veri tabanı oluşturmak için gerekli bir kriterdir.

Stabilite; aynı klondan gelen izolatların zaman içinde hep aynı tipi gösterebilme olasılığıdır.

Tekniğin kullanım kolaylığı, maliyeti, hızı ve yorumlama kolaylığı; tiplendirme yöntemi kolay ve ekonomik olmalıdır. Ayrıca çok sayıda organizma ile çalışabilmeye imkan vermelidir.

Sonuç olarak tiplendirmede kullanılacak ideal yöntem, tekrarlanabilir olmalı, ayırt etme kapasitesi yüksek olmalı, kolay uygulanabilir ve kolay yorumlanabilir olmalıdır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Eylül 2008 ile Ekim 2009 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Gevher Nesibe Araştırma ve Uygulama Hastanesi klinik servislerinde yatan hastalara ait yara, apse, kan, plevral mayi, kateter ucu, endotrakeal aspirat (ETA), balgam, nazotrakeal aspirat (NTA), bronkoalvoeler lavaj (BAL) ve operasyon materyali içeren örneklerden izole edilen toplam 100 MRSA suşu çalışmada kullanılmak üzere -70°C'de Microbank®'lerde saklandı.

3.1. BAKTERİLERİN TANIMLANMASI

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri'nden Bakteriyoloji laboratuvarına gönderilen örneklerin kültürlerinden izole edilip -70°C'de saklanan MRSA suşlarının kanlı agara tek koloni ekimleri yapıldı ve 35°C'de etüvde 24 saat inkübe edildi. Ekimlerde kontaminasyon olup olmadığı gözle incelendi. Kontaminasyon şüphesi olan petrilerden tekrar tek koloni pasajlar yapıldı ve suşlar Gram boyama, katalaz, trehaloz-mannitol, tüp koagülaz ve DNase testleriyle *S. aureus* olduğu doğrulandı.

3.1.1. Gram boyama

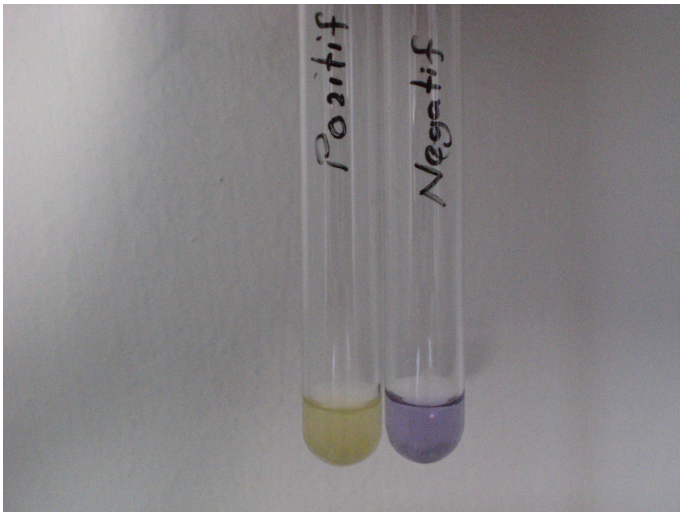
Kanlı agarda üremiş kolonilerden temiz bir lam üzerine bir damla serum fizyolojik ile preparat hazırlandı. Preparat oda ısısında kuruduktan sonra alevden geçirilerek bakteriler tespit edildi. Preparat daha sonra 1 dk. kristal viyole ile, 1 dk. lugol ile 5-10 sn. aseton alkol ile ve son olarak 30 sn. sulu fuksin ile boyanıp yıkandı ve kurumaya bırakıldı. Daha sonra ışık mikroskobunun x100'lük objektifinde immersiyon yağı kullanılarak incelendi. Gram boyama sonucunda mor renkli salkım görünümünde koklardan oluşan koloniler Gram pozitif kabul edilmiştir (55).

3.1.2. Katalaz testi

Katalaz, hidrojen peroksid (H_2O_2)'i parçalayarak su ve oksijene dönüştüren bir enzimdir. İzole edilen *S. aureus* suşlarında katalaz aktivitesini araştırmak için, bakteri kolonisinden öze ile alınan bir parça, temiz bir lam üzerinde bir damla serum fizyolojik içerisinde süspanse edilmiş ve üzerine 1-2 damla taze hazırlanmış %3'lük H_2O_2 damlatılmıştır. Oksijen kabarcıklarının oluşması testing pozitif olduğunu göstermiştir. *Staphylococcus* türleri katalaz pozitif, *Streptococcus* türleri katalaz negatiftir (56). Pozitif kontrol olarak *S. aureus* ATCC 25923 standart suşu kullanılmıştır.

3.1.3. Trehaloz-mannitol testi

S. aureus suşları *S. epidermis* suşlarından trehaloz ve mannitolden asit oluşturma özelliklerine göre ayrılır. Kanlı agarda üremiş kolonilerden öze ile alınarak 1 ml trehaloz-mannitol broth içerisinde ezildi ve emülsiyon haline getirildi. Daha sonra tüpler 35°C'de etüve kaldırıldı ve 18-24 saat sonra trehaloz ve mannitolden asit oluşumu sonucu mor renkten sarıya dönen suşlar trehaloz-mannitol testi pozitif olarak kabul edildi (Şekil 1).

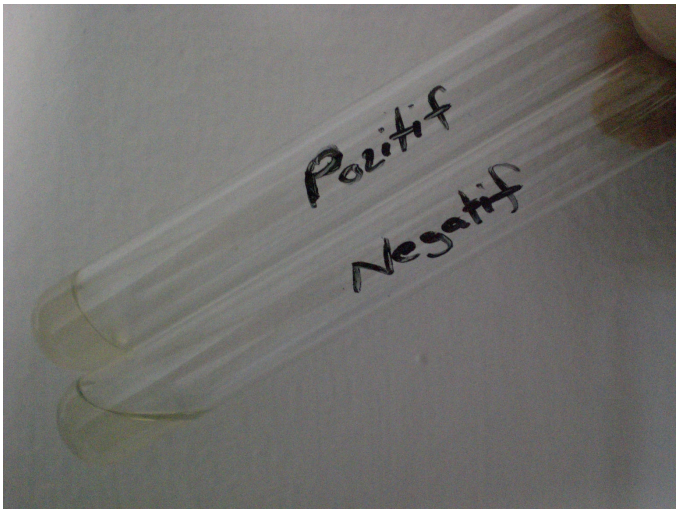


Şekil 1. Trehaloz-mannitol testi

3.1.4. Tüp koagülaz testi

Çalışmada tüp koagülaz testi, Gram pozitif boyanan ve katalaz testi pozitif olan tüm suşlara uygulandı. Tüp koagülaz testi için EDTA'lı tavşan plazması kullanıldı. Besiyerinden öze ile alınan birkaç koloni, 1 ml tavşan plazması içinde ezildi ve emülsiyon haline getirildi. Daha sonra tüpler 35°C'de etüve kaldırıldı. Tüplerde pıhtı oluşup oluşmadığı 1., 2. ve 4. saatlerde kontrol edildi. Bu süre içerisinde pıhtı

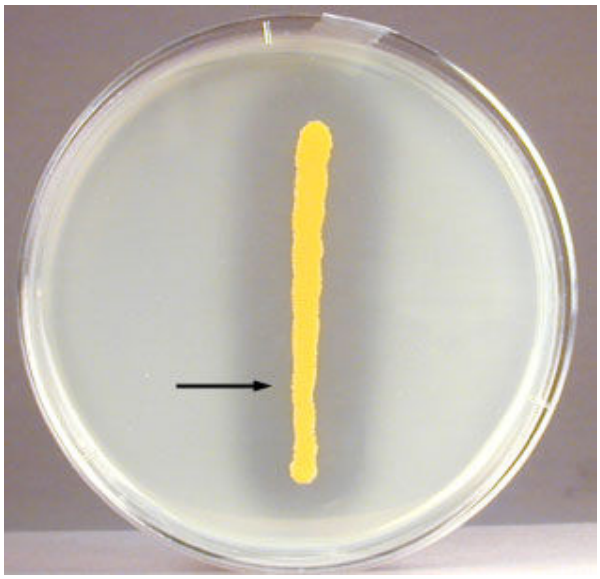
oluşturmayan suşlar 24. saatte tekrar kontrol edildi ve pıhtı oluşturan suşlar tüp koagülaz testi pozitif olarak kabul edildi (Şekil 2). Tüp koagülaz testinde pozitif kontrol olarak *S. aureus* ATCC 25923 standart suşu kullanıldı.



Şekil 2. Tüp koagülaz testi

3.1.5. DNase testi

İnsanlardan izole edilen *S. aureus* suşlarının %97'sinden fazlası koagülaz üretmektedir. Kaogülaz üretmeyen *S. aureus* suşlarının tespitinde DNase testi kullanılır (57). DNase testi için, saf kültür olarak izole edilen suşlar DNase agara çizgi şeklinde ekildi ve aerop ortamda 35°C'de etüvde 18-24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra besi yeri üzerine 1 N hidroklorik asit (HCI) damlatıldı, üreme bölgesinin etrafında saydam bir zon oluşan koloniler DNase pozitif olarak kabul edildi (Şekil 3). DNase testinde pozitif kontrol olarak *S. aureus* ATCC 25923 standart suşu kullanıldı.



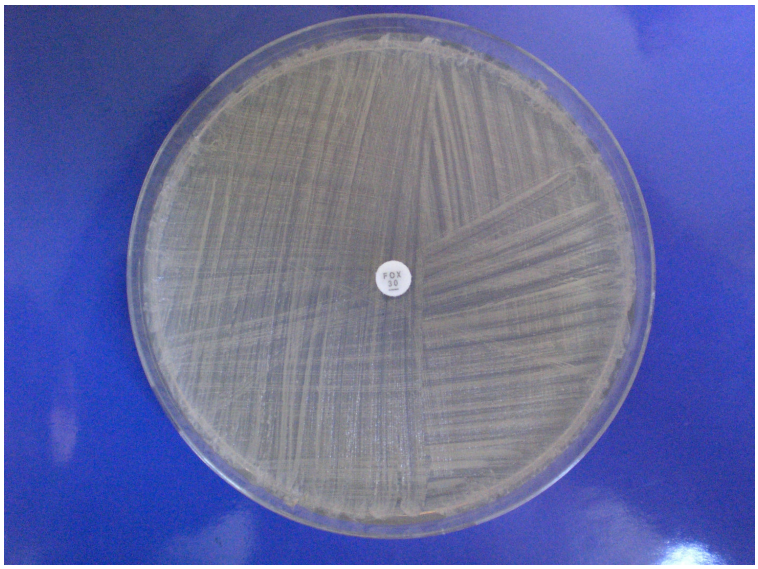
Şekil 3. DNase testi

3.2. *S. aureus* suşlarında metisilin direncinin belirlenmesi

Gram boyama, katalaz testi, trehaloz-mannitol testi, tüp koagülaz testi ve DNase testi sonucu *S. aureus* olduğu doğrulanan suşların metisilin direncinin belirlenmesi amacıyla CLSI önerileri doğrultusunda sefoksitin disk difüzyon testi kullanıldı.

3.2.1. Sefoksitin disk difüzyon testi

Fenotipik metisilin direncinin belirlenmesi için sefoksitin disk difüzyon testi CLSI önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi. Bu amaçla önce *S. aureus* olarak tanımlanan suşların taze kültürlerinden steril serum fizyolojik içerisinde, 0,5 McFarland standardına göre süspansiyon hazırlandı ve steril bir eküvyon yardımıyla MHA besiyerinin yüzeyine homejen olarak yayıldı. MHA besiyerleri oda ısısında 5-10 dk. bekletildikten sonra besiyerinin yüzeyine sefoksitin (30 µg) (Oxoid,UK) diski yerleştirildi ve 35°C'de etüvde 18-24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra oluşan inhibisyon zonları değerlendirildi (Şekil 4). CLSI kriterlerine göre 21 mm ve 21 mm'den küçük (R≤21 mm) inhibisyon zonu metisilin dirençli, 22 mm ve 22 mm'den büyük (S≥22 mm) inhibisyon zonu ise metisilin duyarlı kabul edildi (47).



Şekil 4. Sefoksitin disk difüzyon testi

3.2.2. MRSA'ların antibiyotiklere direnç oranlarının saptanması

Klinik örneklerden izole edilen MRSA suşlarının antibiyotik duyarlılıkları Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile CLSI önerileri dikkate alınarak MHA besiyerinde standartlara uygun olarak yapılmıştır. Daha sonra çalışma kapsamına alınan MRSA suşlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları incelenerek kullanılan antibiyotiklere karşı direnç oranları aşağıdaki formüle göre tek tek hesaplandı.

$$\text{Antibiyotiğe direnç oranı} = \frac{\text{Anibiyotiğe dirençli örnek sayısı}}{\text{Toplam örnek sayısı}} \times 100$$

3.3. MRSA SUŞLARININ GENOTİPLENDİRİLMESİ

Sefoksitin disk difüzyon testi ile metisilin dirençli olduğu belirlenen *S. aureus* suşları genetik yakınlıklarının belirleneceği güne kadar -70°C'de saklandı. Çalışmaya alınan toplam 100 MRSA suşunun genetik yakınlıklarının belirlenmesi için rep-PCR (Diversilab, Biomerieux, Fransa) yöntemi kullanıldı.

3.4. REP-PCR YÖNTEMİNİN UYGULANMASI

Çalışma yapılmadan once -70°C'de saklanan MRSA suşlarını canlandırmak amacıyla kanlı agara tek koloni pasajları yapılarak 35°C'de etüvde 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra ekimlerde kontaminasyon olup olmadığı gözle incelendi. Kontamine olmayan saf koloniler ikinci kez pasajları yapılarak 24 saat daha inkübasyona bırakıldı. Kanlı agara iki kez pasajları yapılarak elde edilen saf MRSA suşları rep-PCR yöntemi ile 4 aşamada genotiplendirildi.

1. İzole edilen MRSA suşlarına manuel DNA ekstraksiyonu yapıldı.
2. Thermalcycler'da DiversiLab Parmakizi kitleri kullanılarak rep-PCR yapıldı.
3. Biyoanalizör kullanılarak otomatik mikroakışkan elektroforez yapıldı.
4. İnternet tabanlı yorumlama yazılım programı ile kolay ve hızlı değerlendirme yapıldı.

3.4.1. Manuel DNA ekstraksiyonu

Bütün suşlar UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit (MO-BIO,USA) kullanılarak üretici firmanın ön gördüğü test kiti protokolüne uygun çalışıldı.

Ekstraksiyon kitinin içeriği

- ✓ Mikrobiyal DNA kumlu tüp
- ✓ Mikrobiyal DNA Bead solüsyonu
- ✓ Mikrobiyal DNA MD1 solüsyonu
- ✓ Mikrobiyal DNA MD2 solüsyonu
- ✓ Mikrobiyal DNA MD3 solüsyonu
- ✓ Mikrobiyal DNA MD4 solüsyonu
- ✓ Mikrobiyal DNA MD5 solüsyonu
- ✓ Mikrobiyal DNA filtreli tüp (2 ml'lik)
- ✓ Mikrobiyal DNA toplama tüp (2 ml'lik)

Ekstraksiyon Aşaması

1. Suş sayısı kadar mikrobiyal DNA kumlu tüp hazırlanıp numaralandırıldı ve kumlu tüplerin her birine 300 µl Bead solüsyonu pipet ile dağıtıldı.
2. Saf kolonilerden bir öze (10 µl) dolusu kumlu tüplere aktarıldı.
3. Üzerine 50 µl MD1 solüsyonu ilave edildi.
4. Karışım 10 dakika boyunca maksimum hızda vortekslendi.
5. 30 saniye 10.000 x g (gravite)'de santrifüj edildi.
6. Elde edilen supernatant 100 µl MD2 solüsyonu içeren ependorf tüplere aktarıldı.
7. Kısa bir süre vortekslendi.
8. Yeterli soğukluğa ulaşıncaya kadar 4°C'de buzdolabında 15-20 dk. bekletildi.
9. Buzdolabından çıkarılan örnekler 1 dakika 10.000 x g'de santrifüj edildi.
10. Elde edilen 200 µl supernatant 450 µl MD3 solüsyonu içeren ependorf tüplere aktarıldı.
11. Kısa bir sure vortekslenip daha sonra 30 saniye 10.000 x g'de santrifüj edildi.
12. Elde edilen 650 µl supernatant 2 ml'lik filtreli tüplere aktarıldı.
13. 30 saniye 10.000 x g'de santrifüj edildi. Aşağı akan sıvı atık kaplarında toplandı.
14. 300 µl MD4 solüsyonu filtreli tüplere ilave edildi.
15. 30 saniye 10.000 x g'de santrifüj edildi. Aşağı akan sıvı atık kaplarında toplandı.
16. Filtreli tüpler 1 dk. da kuru olarak 10.000 x g'de santrifüj edildi.

17. Filtreler temiz toplama tüplerine yerleştirildi ve üzerine 35 µl MD5 solüsyonu ilave edildi.

18. İki dakika oda ısısında inkübe edilip 30 saniye 10.000 x g'de santrifüj edildi.

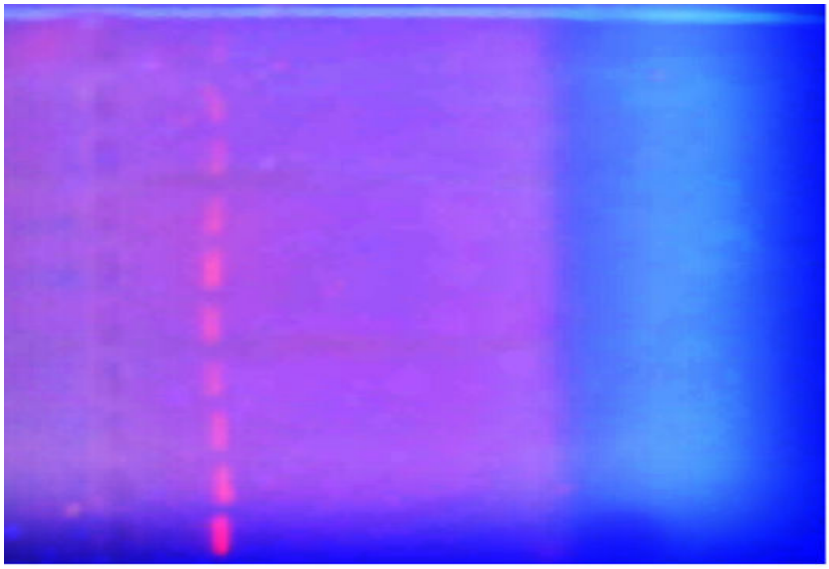
19. Filtreler çıkartılıp atıldı ve toplama tüplerinde kalan örnek DNA ekstraktı olarak elde edilmiş oldu.

Jel Elektroforez

Elde edilen DNA ekstraktlarının testin uygulanmasındaki diğer aşamalarda doğru sonuç verebilmesi için 25-40 ng/ml olması gerekmektedir. Bunu tespit edebilmek için elde edilen bütün DNA ekstraktlarına jel elektroforez yapıldı.

Hazırlanışı; 400 ml distile su ile 100 ml 10 x TBE (Tris-Borik asit-EDTA) solüsyonu karıştırıldı. Bu karışımdan 100 ml alınarak 2 gr agaroz ile karıştırılıp ısıtıldı. Karışımın tamamen şeffaflaştığının gözlenmesinin ardından bu karışıma 6 µl "etityum bromür" ilave edilerek yatay jel kabına döküldü. Elde edilen DNA ekstraklarından 10 µl alıp üzerine 5 µl yükleme boyası karıştırılarak donmuş olan jeldeki kuyucuklara pipet yardımıyla eklendi.

Yatay jel elektroforez tankındaki jelin içindeki örnekler 120 voltta 20 dakika yürütüldü. Jel translüminatörde ultraviyole ışık altında incelendi. Örnekler 35-40 basepare (bp) uzunluğunda olan pozitif kontrol ile aynı bölgede bant verdiğinde pozitif olarak kabul edildi (Şekil 5).



Şekil 5. MRSA izolatlarının jel elektroforezis görüntüsü

3.4.2. Thermalcycler'da DiversiLab parmakizi kit ile rep-PCR yapılması

Elde edilen tüm DNA ekstraktları Diversilab™ DNA Fingerprinting Kit (Biomerieux, Fransa) kullanılarak her seferinde 13 örnek için rep-PCR yapıldı.

DiversiLab Parmakizi kit içeriği

- ✓ rep-PCR MM1
- ✓ GeneAmp 10 X PCR buffer
- ✓ Primer Mix
- ✓ AmpliTaq DNA Polymerase

Testin uygulanması

Amplifikasyon aşaması izolasyon odasından farklı bir bölümde yapıldı. Amplifikasyon için kullanılacak Diversilab™ DNA Fingerprinting Kit -20°C'lik derin dondurucudan çıkarıldı ve 13 örnek için 2 hata payı olacak şekilde master miks hazırlandı (Tablo 4).

Tablo 4. DNA Fingerprinting Kit master miks hazırlanışı

µl /rxn		Toplam µl
18.0	rep-PCR MM1	270.0
2.5	GeneAmp 10X PCR buffer	37.5
2.0	Primer Mix	30.0
0.5	AmpliTaq DNA Polymerase	7.5
		345.0

Hazırlanan master miksten 200 µl'lik ependorf tüplerine 23 µl dağıtıldı. Daha sonra MRSA suşlarından elde edilen DNA ekstraktlarından ikişer µl 200 µl'lik ependorf tüplerine dağıtıldı. Tüplerin üzerleri sıkıca kapatılarak örneklerdeki nükleik asit "Thermalcycler" cihazında aşağıdaki sikluslar uygulanarak çoğaltıldı (Tablo 5).

Tablo 5. Thermalcycler cihazında uygulanan siklus

Adım	Sıcaklık (°C)	Zaman (saniye)
İlk Denatürasyon	94	120
Denatürasyon	94	30
Birleşme Reaksiyonu	45	30
Uzama	70	90
Final Uzama	70	180
Tutunma	4	-

3.4.3. Biyoanalizör kullanılarak otomatik mikroakışkan elektroforez yapılması

Diversilab™ DNA Fingerprinting Kit ile rep-PCR yapılarak örneklerdeki nükleik asitler çoğaltıldıktan sonra Diversilab™ DNA LabChip kiti kullanılarak mikroakışkan elektroforez yapıldı.

DNA LabChip kit içeriği

- ✓ Chip reaktifleri
- ✓ Marker
- ✓ Jel boyası
- ✓ Jel matriksi

Testin uygulanması

1. Steril bir 1.5 ml'lik ependorf tüp içerisinde 200 µl jel matriksi ile 10 µl jel boyası karıştırılıp vortekslendi ve kısa sure santrifüj edildi.

2. Mavi renkte olan bu karışım filtreli tüpe aktarılıp hava kabarcığı oluşumunu önlemek için 10 dakika 1500 x g'de santrifüj edildi.

3. Diversilab™ DNA LabChip üzerindeki siyah daire içerisindeki 'G' kuyucuğuna (Şekil 6) 9 µl jel karışımı kondu.

Şekil 6. Diversilab™ DNA LabChip

4. DNA LabChip yükleme istasyonuna alınarak şırınga pistonu 1 ml cizgisine kadar çekilip pozitif basınçla yüklendikten sonra 30 sn. beklendi.

5. İstasyon kapağı açılarak şırınga pistonu dengeye gelene kadar beklendi.

6. DNA LabChip üzerindeki diğer iki 'G' kuyucuğunun her birine 9 µl jel karışımı kondu.

7. DNA izolatlarının koyulacağı kuyucuklara 5 µl marker pipetlendi.

8. Elde edilen rep-PCR örneklerinden 1 µl bu kuyucuklara ilave edildi.

9. DNA LabChip daha sonra karıştırıcıya yerleştirilip 2200 devirde 1 dakika vortekslendi ve DNA Lab Chip on Agilent Bioanalyzer cihazına yüklendi.

Tüm MRSA suşlarının rep-PCR tabanlı parmak izi kalıpları DiversiLab'ın 2.1.66 versiyonlu internet tabanlı yorumlama ve yazılım programı ile elde edildi. Değerlendirme için benzerlik hesaplarının yapılmasında DiversiLab yazılımı Pearson Korelasyon kat sayısı ve UPGMA (Unweighted Pairvise Grouping Matematical Avenaging); matematiksel ortalamayla ağırlıksız çiftlerin gruplandırılması yöntemi rep-PCR profillerini otomatik olarak karşılaştırmak amacıyla kullanıldı.

4. BULGULAR

Bu çalışmada, gram boyama, katalaz reaksiyonu, trehaloz-mannitol testi, tüp koagülaz testi, DNase testi *S. aureus* suşlarının identifikasyonu amacıyla kullanılmıştır. Suşların metisilin direncinin belirlenmesi amacıyla CLSI önerileri doğrultusunda sefoksitin disk difüzyon testi kullanıldı. Ayrıca klinik örneklerden izole edilen MRSA suşlarının antibiyotik duyarlılıkları Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile CLSI önerileri dikkate alınarak MHA besiyerinde standartlara uygun olarak yapıldı.

Eylül 2008 ile Ekim 2009 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Gevher Nesibe Araştırma ve Uygulama Hastanesi klinik servislerinde yatan hastalara ait yara, apse, kan, plevral mayi, kateter ucu, endotrakeal aspirat (ETA), balgam, nazotrakeal aspirat (NTA), bronkoalvoeler lavaj (BAL) ve operasyon materyali içeren örneklerden elde edilen toplam 100 MRSA suşu çalışılmıştır. MRSA suşlarının izole edildiği klinik örneklere göre dağılımı Tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 6. MRSA suşlarının izole edildiği klinik örnekler (n:100)

Örnek	Sayı	%
Yara	41	41
Kan	26	26
Balgam	8	8
Kateter ucu	8	8
ETA	6	6
NTA	4	4
Apse	3	3
BAL	2	2
Operasyon Mat.	1	1
Plevral mayi	1	1
Toplam	100	100

Her hastanın sadece bir klinik örneği çalışmaya alınmıştır. Örneklerin %40 gibi büyük bir bölümü değişik yoğun bakım üniteleri (YBÜ)'nden gönderilmiştir. Bunu yüzde %18 ile çeşitli cerrahi servisler (Genel Cerrahi Servisi, Göğüs Cerrahi Servisi, Ortopedi Servisi, Plastik Cerrahi Servisi, Kalp Damar Cerrahi Servisi), %15 ile Erişkin Enfeksiyon Hastalıkları Servisi ve %11 ile Hematoloji-Onkololoji Servisi izlemiştir. MRSA suşlarının %94'ü erişkin hasta örneklerinden, %6'sı pediatrik hasta örneklerinden izole edilmiştir. Çalışmada kullanılan MRSA suşlarının izole edildiği örneklerin klinik servislere göre dağılımı Tablo 7'de gösterilmiştir.

Tablo 7. MRSA suşlarının izole edildiği klinik servisler (n:100)

Örnek	Sayı	%
Dahiliye YBÜ	15	15
Enfeksiyon Hastalıkları Servisi	15	15
Hemotoloji- Onkoloji	11	11
Genel Cerrahi YBÜ	11	11
Genel Cerrahi Servisi	8	8
Nefroloji Servisi	8	7
Göğüs Cerrahi Servisi	4	4
Göğüs Hastalıkları Servisi	4	4
Anestezi YBÜ	4	4
Yenidoğan YBÜ	4	4
Kardioloji YBÜ	3	3
Ortopedi Servisi	3	3
Gastroenteroloji Servisi	2	2
Göğüs Hastalıkları YBÜ	2	2
Pediatri İntaniye Servisi	2	2
Plastik Cerrahi Servisi	2	2
Beyin Cerrahi YBÜ	1	1
Kalp Damar Cerrahi Servisi	1	1
Toplam	100	100

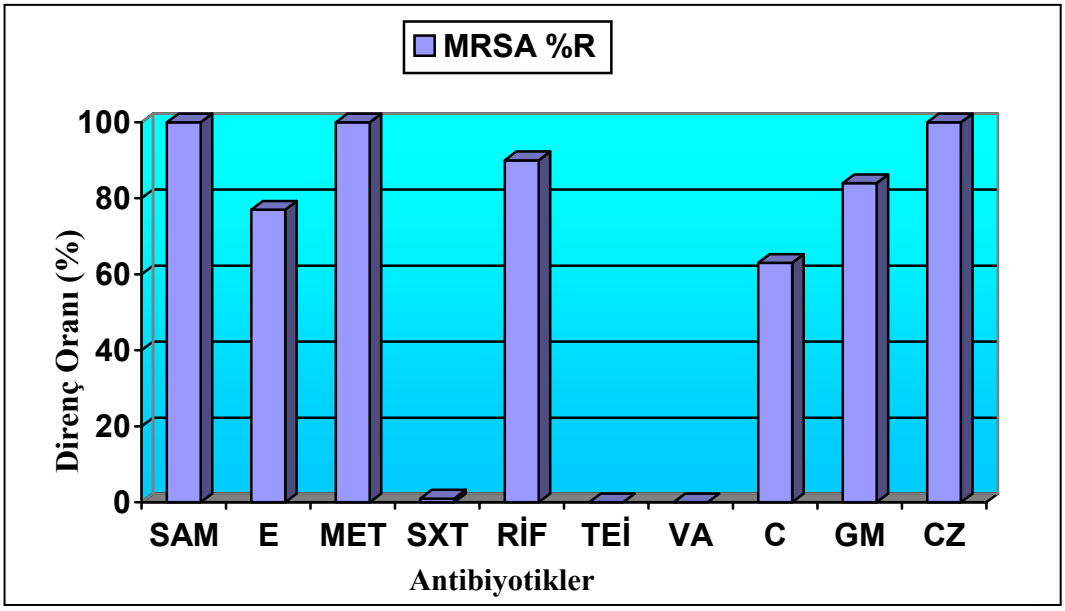
MRSA suşlarının klinik servis ve örneklere göre dağılımı Tablo 8'de gösterilmiştir. Buna göre yara örneklerinden izole edilen toplam 41 MRSA suşunun 11 (%26.8)'i YBÜ'nden, 10 (%24.3)'u Erişkin Enfeksiyon Hastalıkları Servisinden ve 7 (%17.07)'si Genel Cerrahi Servisinden gönderilmiştir. Kan kültürlerinden izole edilen toplam 26 MRSA suşunun 14 (%53.8)'ü yoğun bakım ünitelerinden gönderilmiştir. Balgam kültürlerinden izole edilen toplam 8 MRSA suşunun 6 (%75)'sı Hematoloji-Onkoloji Servislerinden gönderilmiştir.

Tablo 8. MRSA suşlarının klinik servislere ve örneklere göre dağılımı

	Yara	Kan	Plevral mayi	Kateter ucu	ETA	Apse	Balgam	NTA	BAL	Operasyon materyali
Dahiliye YBÜ	4	6		2	2				1	
Enfeksiyon Hastalıkları Servisi	10	2				1		2		
Hemotoloji- Onkoloji	2	2					6		1	
Genel Cerrahi YBÜ	5			5	1					
Genel Cerrahi Servisi	7					1				
Nefroloji Servisi	2	2				1	2	1		
Göğüs Cerrahi Servisi	3		1							
Göğüs Hastalıkları Servisi		3			1					
Anestezi YBÜ		3			1					
Yenidoğan YBÜ	1	2						1		
Kardioloji YBÜ		3								
Ortopedi Servisi	2									1
Gastroenteroloji Servisi		2								
Göğüs Hastalıkları YBÜ				1	1					
Pediatri İntaniye Servisi	1	1								
Plastik Cerrahi Servisi	2									
Beyin Cerrahi YBÜ	1									
Kalp Damar Cerrahi Servisi	1									

4.1. MRSA suşlarının antibiyotik direnç oranları

Çalışma kapsamına alınan MRSA suşlarının test edilen antibiyotiklere direnç oranları Bölüm 3.2.2.'deki formül kullanılarak sırasıyla; ampisilin-sulbaktam %100, eritromisin %77, metisilin %100, trimetoprim/sülfametoksazol %1, rifampisin %90, klindamisin %63, gentamisin %84, Sefazolin %100, teikoplanin ve vankomisin için ise % 0 olarak belirlendi. Bu oranlar Şekil 7'de özetlenmiştir. İzole edilen MRSA suşlarının abtibiyotiklere duyarlılık durumları da Tablo 9'da gösterilmiştir.



SAM; Ampisilin-sulbaktam, E; Eritromisin, MET; Metisilin, SXT; Trimetoprim/ sülfametoksazol, RİF; Rifampisin, TEİ; Teikoplanin, VA; Vankomisin, C; Klindamisin, GM; Gentamisin, CZ; Sefazolin.

Şekil 7. MRSA suşlarında antibiyotik direnç oranları

Tablo 9. İzole edilen MRSA suşlarının antibiyotiklere duyarlılık durumları

	SAM	E	MET	SXT	RİF	TEİ	VA	C	GM	CZ
MRSA 1	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 2	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R
MRSA 3	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 4	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 5	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 6	R	S	R	S	R	S	S	S	R	R
MRSA 7	R	S	R	S	R	S	S	S	R	R
MRSA 8	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 9	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 10	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 11	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 12	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 13	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R
MRSA 14	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 15	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 16	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 17	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 18	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 19	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 20	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 21	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 22	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 23	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 24	R	S	R	S	R	S	S	S	S	R
MRSA 25	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 26	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 27	R	S	R	S	R	S	S	S	S	R
MRSA 28	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R
MRSA 29	R	S	R	S	R	S	S	S	S	R
MRSA 30	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 31	R	R	R	S	R	S	S	R	S	R
MRSA 32	R	S	R	S	R	S	S	S	R	R
MRSA 33	R	S	R	S	R	S	S	S	R	R
MRSA 34	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 35	R	S	R	S	R	S	S	S	R	R
MRSA 36	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 37	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 38	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 39	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 40	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R

MRSA; Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*, SAM; Ampisilin sulbaktam, E; Eritromisin, MET; Metisilin, SXT; Trimetoprim/sülfametoksazol, RİF; Rifampisin, TEİ; Teikoplanin, VA; Vankomisin, C; Klindamisin, GM; Gentamisin, CZ; Sefazolin, R; Dirençli, S; Duyarlı

Tablo 9. İzole edilen MRSA suşlarının antibiyotiklere duyarlılık durumları (devamı)

	SAM	E	MET	SXT	RİF	TEİ	VA	C	GM	CZ
MRSA 41	R	S	R	S	R	S	S	S	S	R
MRSA 42	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 43	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R
MRSA 44	R	R	R	S	R	S	S	R	S	R
MRSA 45	R	R	R	S	R	S	S	R	S	R
MRSA 46	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 47	R	R	R	S	R	S	S	R	S	R
MRSA 48	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 49	R	R	R	S	R	S	S	R	S	R
MRSA 50	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 51	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 52	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 53	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 54	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 55	R	R	R	S	S	S	S	R	S	R
MRSA 56	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 57	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 58	R	S	R	S	R	S	S	S	R	R
MRSA 59	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 60	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 61	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 62	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 63	R	S	R	S	R	S	S	S	R	R
MRSA 64	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 65	R	S	R	S	R	S	S	S	R	R
MRSA 66	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 67	R	S	R	S	R	S	S	S	R	R
MRSA 68	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R
MRSA 69	R	S	R	S	R	S	S	S	R	R
MRSA 70	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 71	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 72	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 73	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R
MRSA 74	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 75	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 76	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 77	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 78	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R
MRSA 79	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 80	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R

MRSA; Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*, SAM; Ampisilin sulbaktam, E; Eritromisin, MET; Metisilin, SXT; Trimetoprim/sülfametoksazol, RİF; Rifampisin, TEİ; Teikoplanin, VA; Vankomisin, C; Klindamisin, GM; Gentamisin, CZ; Sefazolin, R; Dirençli, S; Duyarlı

Tablo 9. İzole edilen MRSA suşlarının antibiyotiklere duyarlılık durumları (devamı)

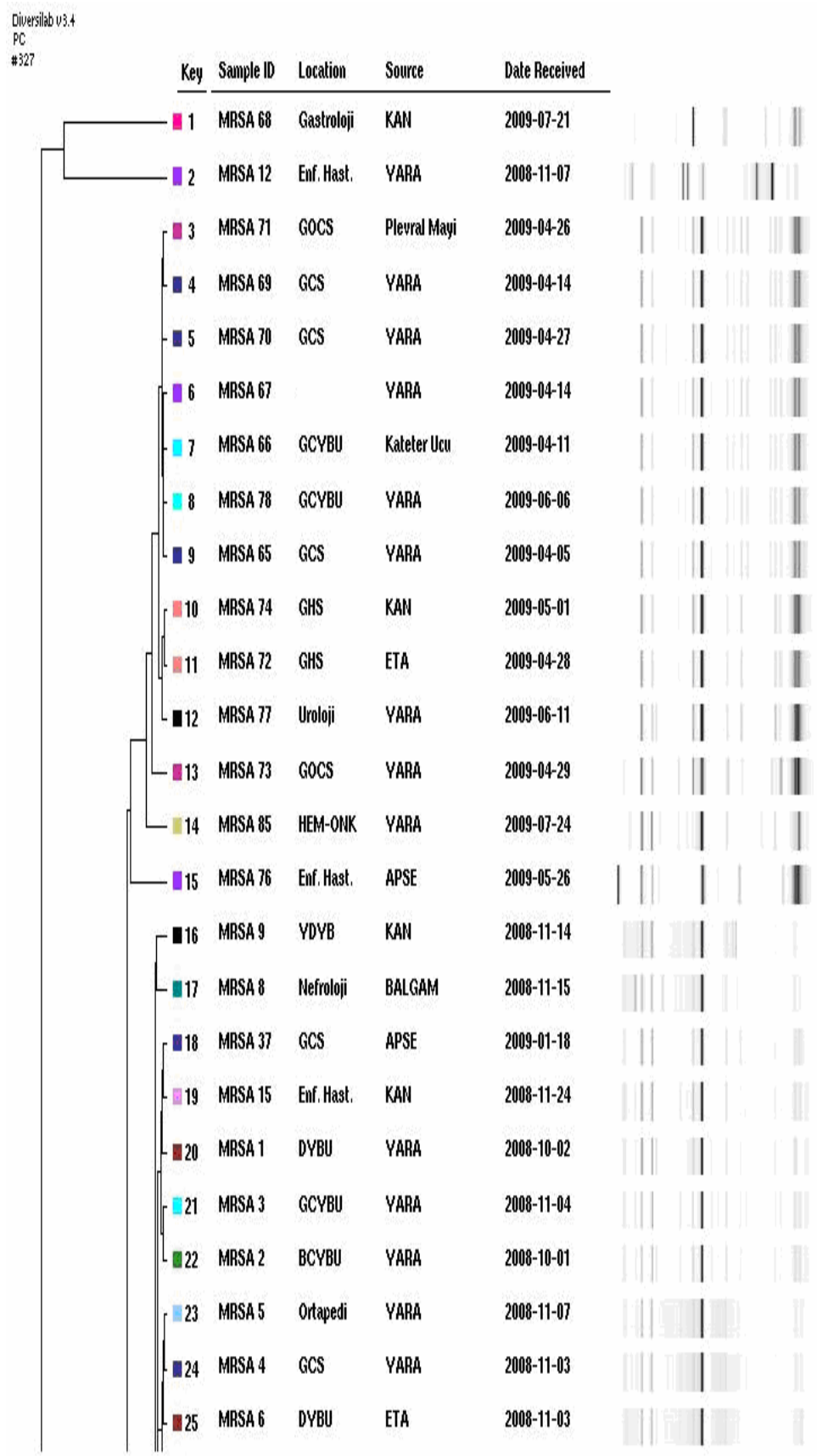
	SAM	E	MET	SXT	RİF	TEİ	VA	C	GM	CZ
MRSA 81	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 82	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 83	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 84	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 85	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R
MRSA 86	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 87	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 88	R	S	R	S	R	S	S	S	R	R
MRSA 89	R	S	R	S	R	S	S	S	R	R
MRSA 90	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 91	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 92	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R
MRSA 93	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R
MRSA 94	R	S	R	S	R	S	S	S	R	R
MRSA 95	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 96	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R
MRSA 97	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 98	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 99	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R
MRSA 100	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R

MRSA; Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*, SAM; Ampisilin-sulbaktam, E; Eritromisin, MET; Metisilin, SXT; Trimetoprim/sülfametoksazol, RİF; Rifampisin, TEİ; Teikoplanin, VA; Vankomisin, C; Klindamisin, GM; Gentamisin, CZ; Sefazolin, R; Dirençli, S; Duyarlı

4.2. Diversilab rep-PCR yöntemi ile klonal yakınlıkların araştırılması

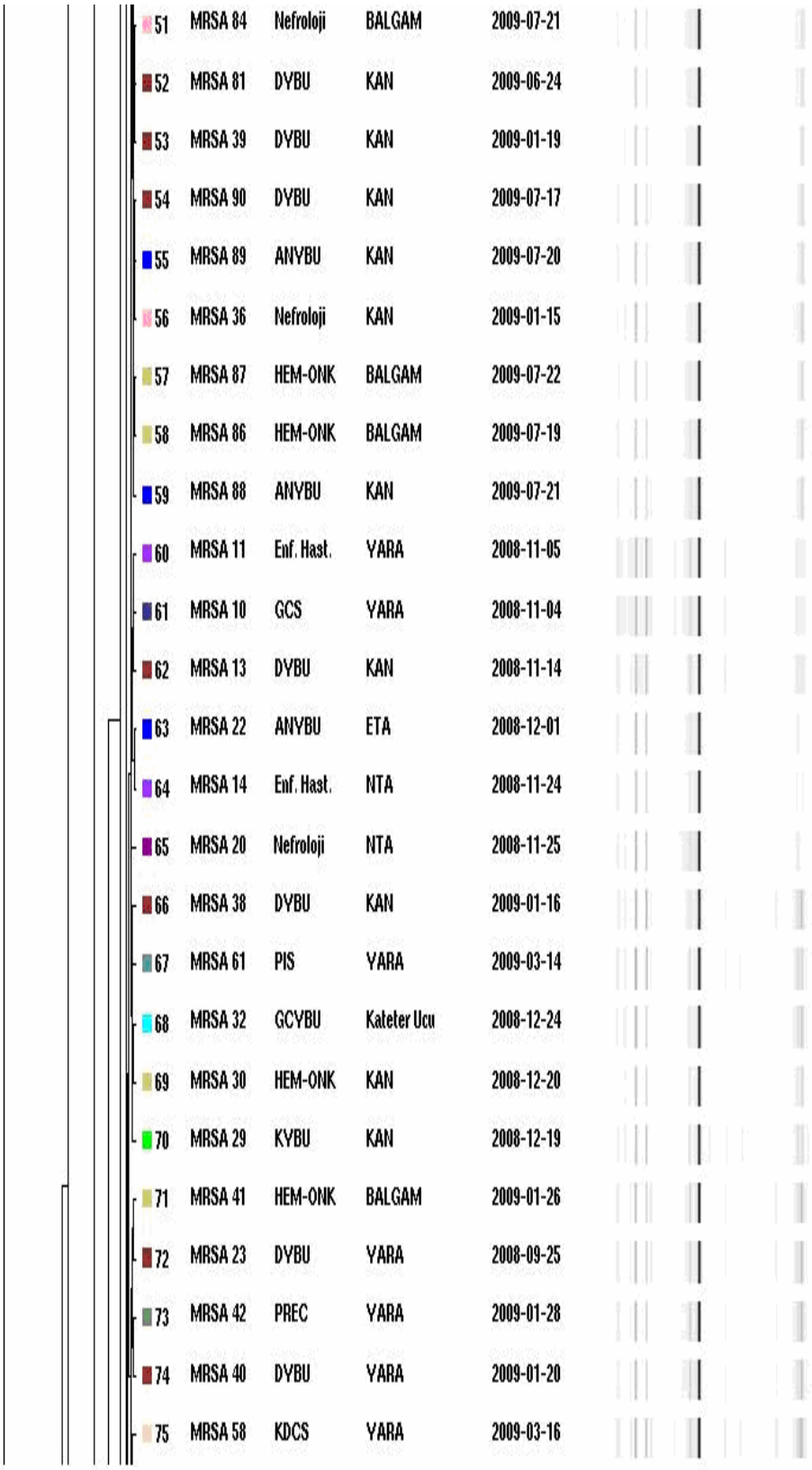
Çalışmaya alınan toplam 100 MRSA suşunun genetik yakınlıklarının belirlenmesi için repetitive-sequence-based PCR (rep- PCR) (Diversilab, Biomerieux, Fransa) yöntemi kullanıldı. Her bir izolat için jel benzeri görüntü, yüzde benzerlik oranları ve dendrogram raporu oluşturuldu. İzolatlar ayırt edilemez (benzerlik >%97), benzer (benzerlik %95-97 arasında,1-2 band farkı), ve farklı (benzerlik <%95 ve >2 band farkı) olarak sınıflandırıldı. Birbirleriyle %95'in üzerinde benzeyen şuşlar ana klon olarak kabul edildi. Anaklonlar içerisinde de %97'nin üzerinde benzer klonlar alt tip olarak kabul edildi. Benzerlik oranları %95'in altında olan suşlar ise farklı klon olarak değerlendirildi. Buna göre 3'ü (A-C) ana klon olmak üzere toplam 11 klon (A-K) belirlendi. Toplam 100 MRSA suşuna ait dendrogram Şekil 8'de gösterilmiştir. MRSA suşlarına ait Diversilab v3.4 yazılımı ile otomatik oluşturulan yüzde benzerlik matriksleri Şekil 9'da yine suşlara ait noktalama grafiği Şekil 10'da gösterilmiştir.

DENDROGRAM

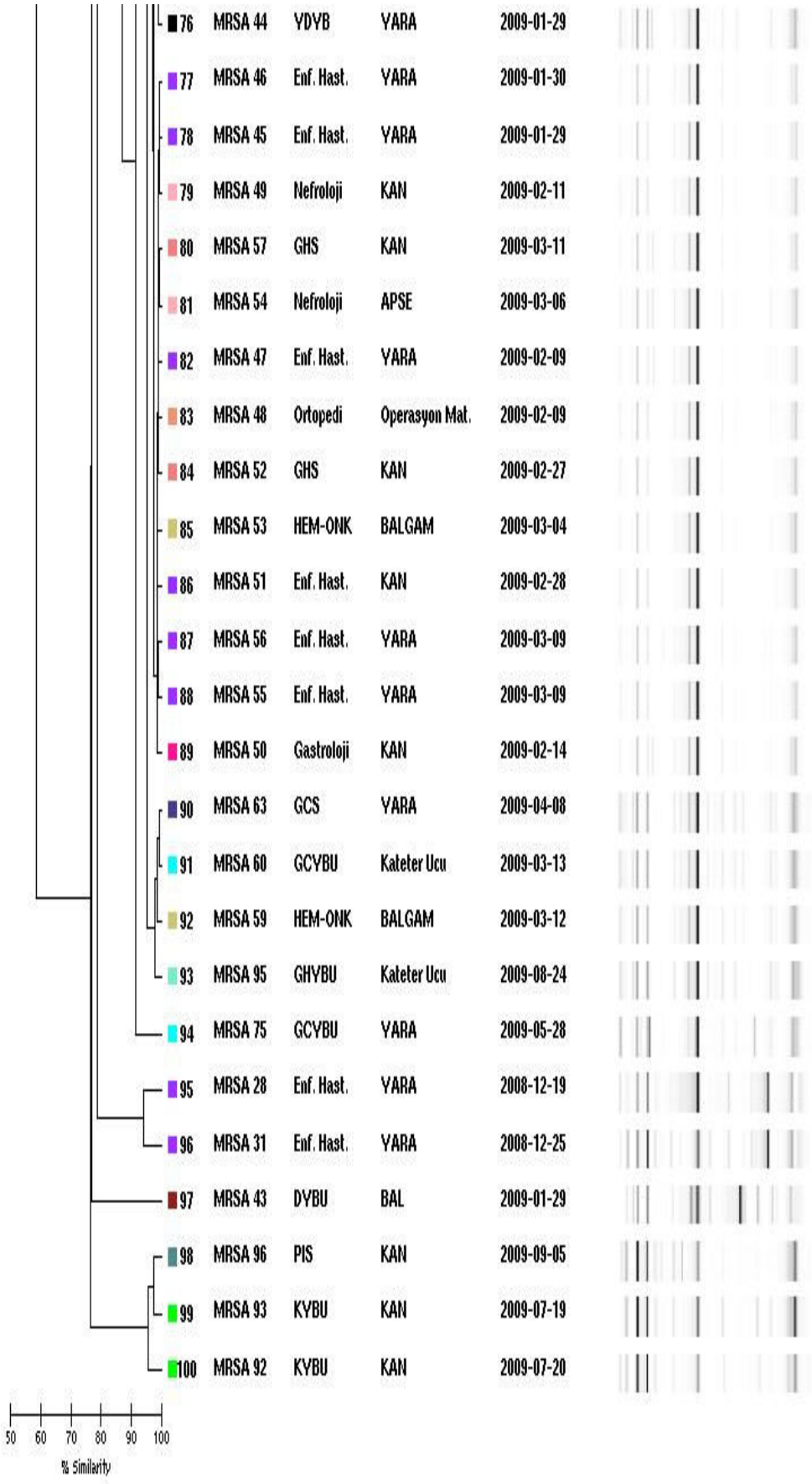


Şekil 8. MRSA suşlarının dendogramı

Şekil 8. MRSA suşlarının dendogramı (devamı)

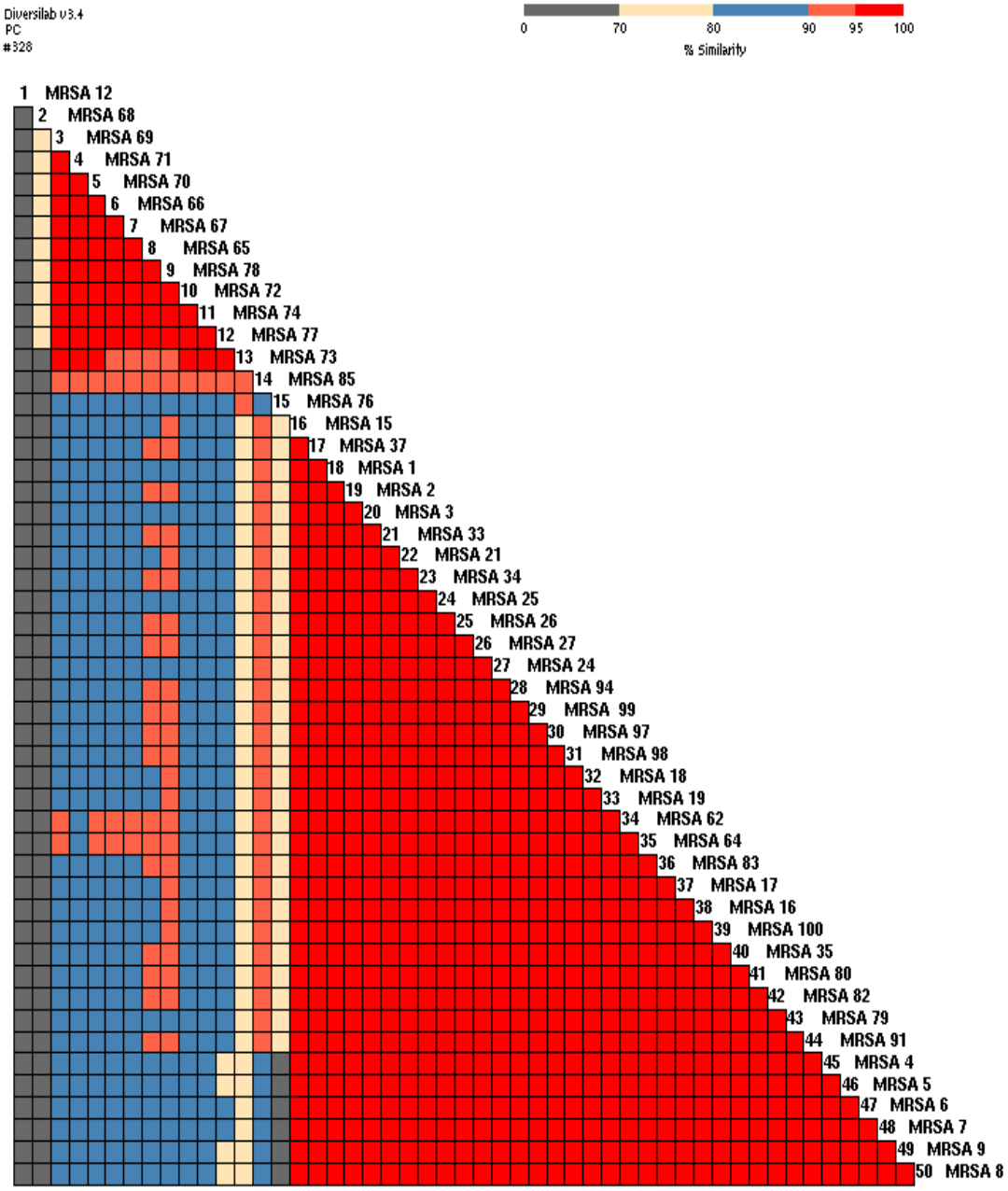


Şekil 8. MRSA suşlarının dendogramı (devamı)



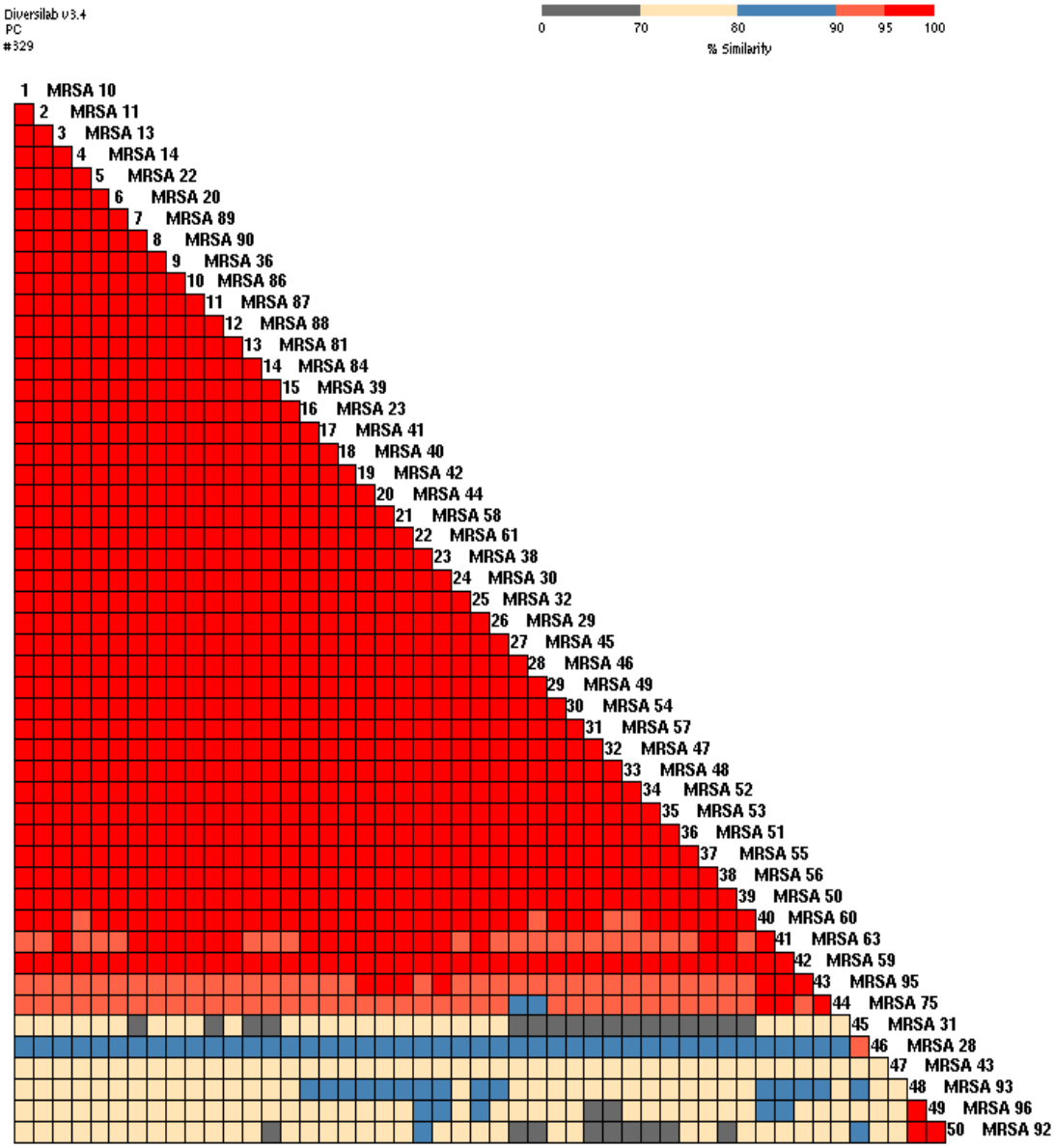
Şekil 8. MRSA suşlarının dendrogramı (devamı)

BENZERLİK MATRİKSİ



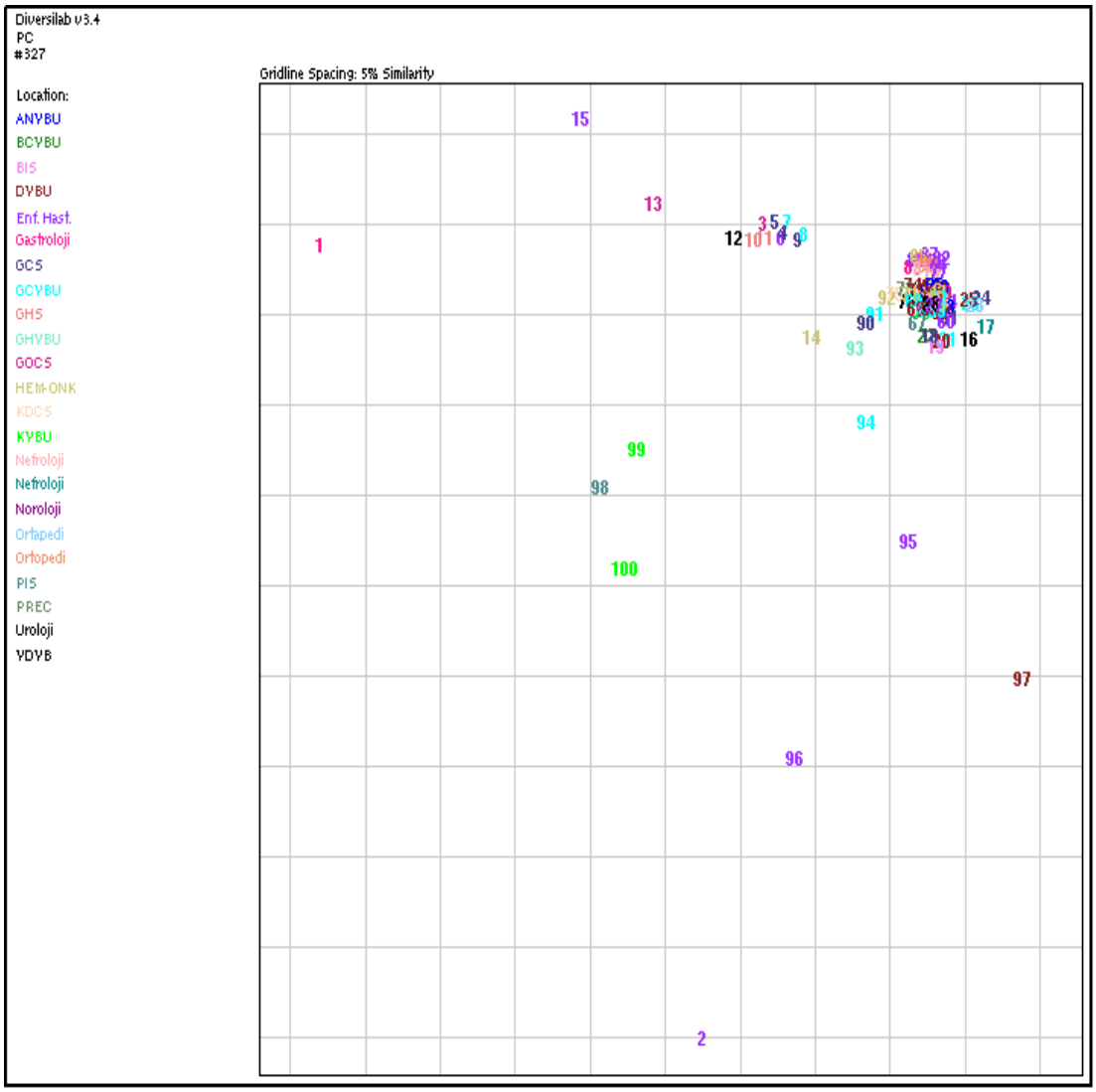
Şekil 9. MRSA suşlarının benzerlik matriksi

BENZERLİK MATRİKSİ



Şekil 9. MRSA suşlarının benzerlik matriksi (devamı)

NOKTALAMA GRAFİĞİ

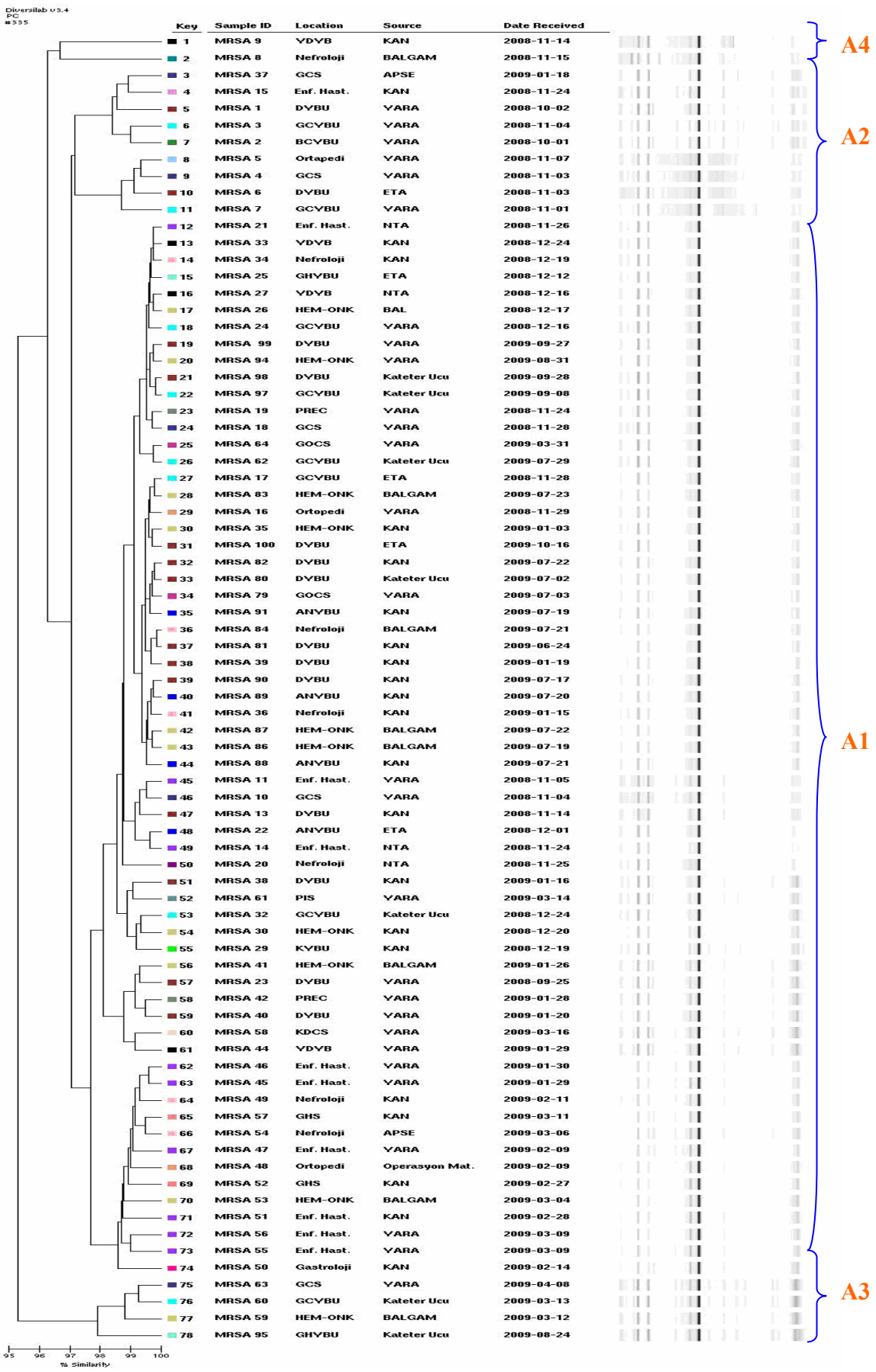


Şekil 10. MRSA suşlarına ait noktalama grafiği

Diversilab rep-PCR sonuçları incelendiğinde MRSA suşlarının %78'nin A ana klonuna ait olduğu görüldü ve A klonunun dört farklı alt tipi (A1-A4) belirlendi. A klonuna ait 78 izolatın 63 (%80.76)'ü A1 alt tipine, 9 (%11.53)'u A2 alt tipine, 4 (%5.12)'ü A3 alt tipine, 2 (%2.56)'si A4 alt tipine ait olduğu görüldü. A klonuna ait örneklerin %43.58'i YBÜ'nden gönderilmiştir. A klonuna ait 78 suşun 60 (%76.92)'ı aynı duyarlılık paternini göstermektedir. A ana klonun hakim olduğu servislere göre dağılımı Tablo 10'da gösterilmiştir. A klonuna ait klinik servis ve örnek türüne ait dendrogram Şekil 11'de gösterilmiştir.

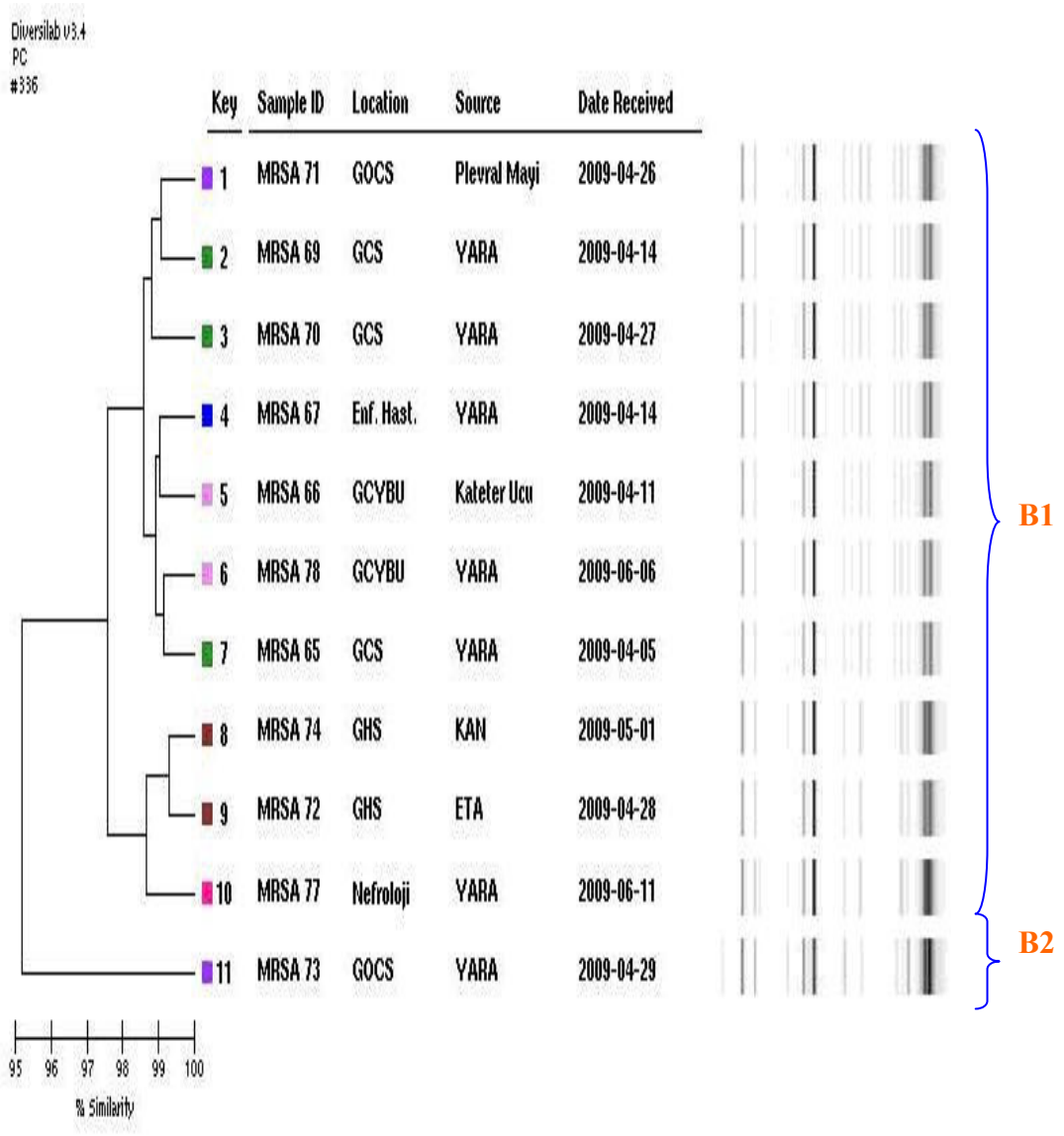
Tablo 10. A ana klonunun servislere göre dağılımı

SERVİSLER	**A KLONU**			
	A1	**A2**	**A3**	**A4**
Dahiliye YBÜ (n:14)	12	2		
Enfeksiyon Hastalıkları Servisi (n:10)	9	1		
Hemotoloji- Onkoloji (n:10)	9		1	
Genel Cerrahi YBÜ (n:8)	5	2	1	
Genel Cerrahi Servisi (n:5)	2	2	1	
Nefroloji Servisi (n:7)	6			1
Göğüs Cerrahi Servisi (n:2)	2			
Göğüs Hastalıkları Servisi (n:2)	2			
Anestezi YBÜ (n:4)	4			
Yenidoğan YBÜ (n:4)	3			1
Kardioloji YBÜ (n:1)	1			
Ortopedi Servisi (n:3)	2	1		
Gastroenteroloji Servisi (n:1)	1			
Göğüs Hastalıkları YBÜ (n:2)	1		1	
Pediatri İntaniye Servisi (n:1)	1			
Plastik Cerrahi Servisi (n:2)	2			
Beyin Cerrahi YBÜ (n:1)		1		
Kalp Damar Cerrahi Servisi (n:1)	1			

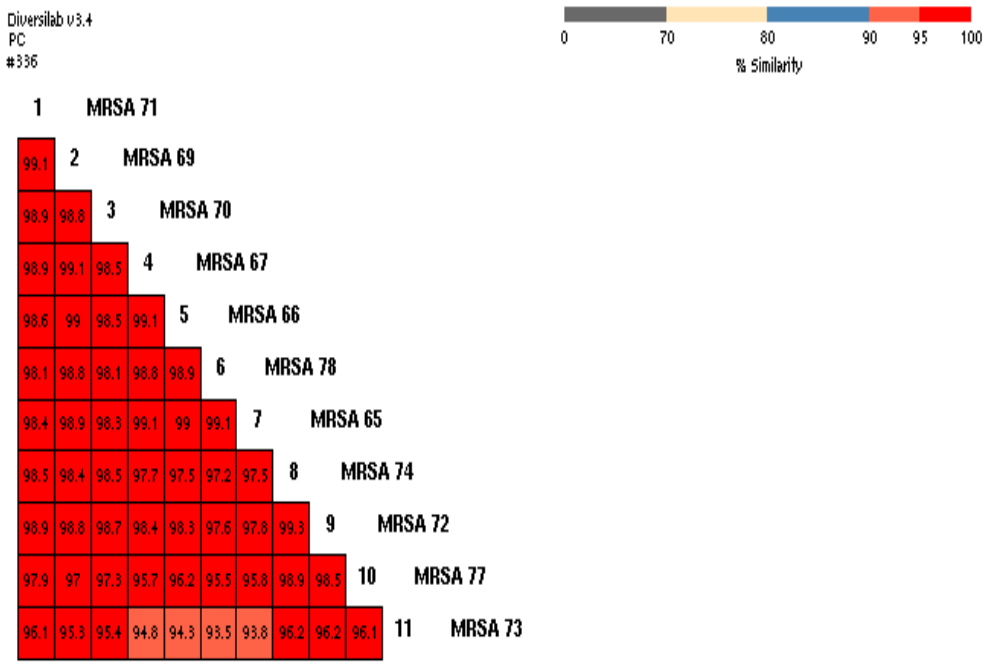


Şekil 11. A klonuna ait dendrogram

Çalışmada ikinci hakim klon olarak B ana klonu belirlendi. B ana klonuna ait toplam 11 suş belirlendi. B ana klonu içerisinde de iki alt tip (B1-B2) belirlendi. B1 alt tipine ait 10 suş, B2 alt tipine ait 1 suş belirlendi. B klonuna ait 11 suşun 7 (%63.63)'si sadece TMP-SXT, vankomisin ve teikoplanine karşı duyarlı bulunmuştur. B klonuna ait dendrogram Şekil 12'de gösterilmiştir. B klonuna ait oluşturulan benzerlik matriksi ise Şekil 13'de gösterilmiştir.

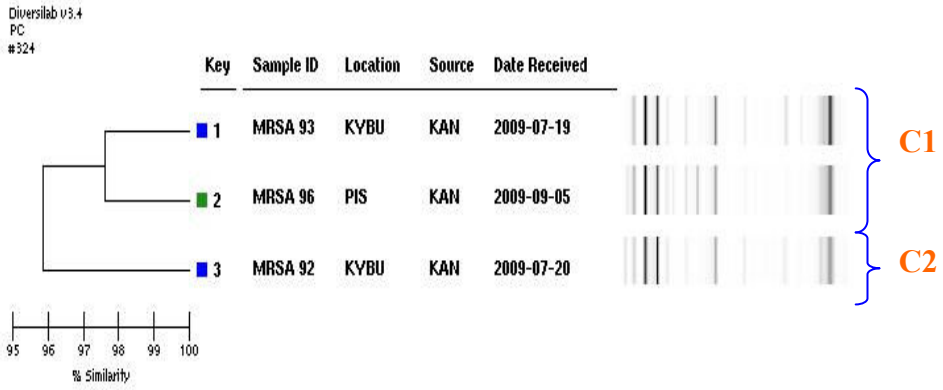


Şekil 12. B klonuna ait dendrogram



Şekil 13. B klonuna ait benzerlik matriksi

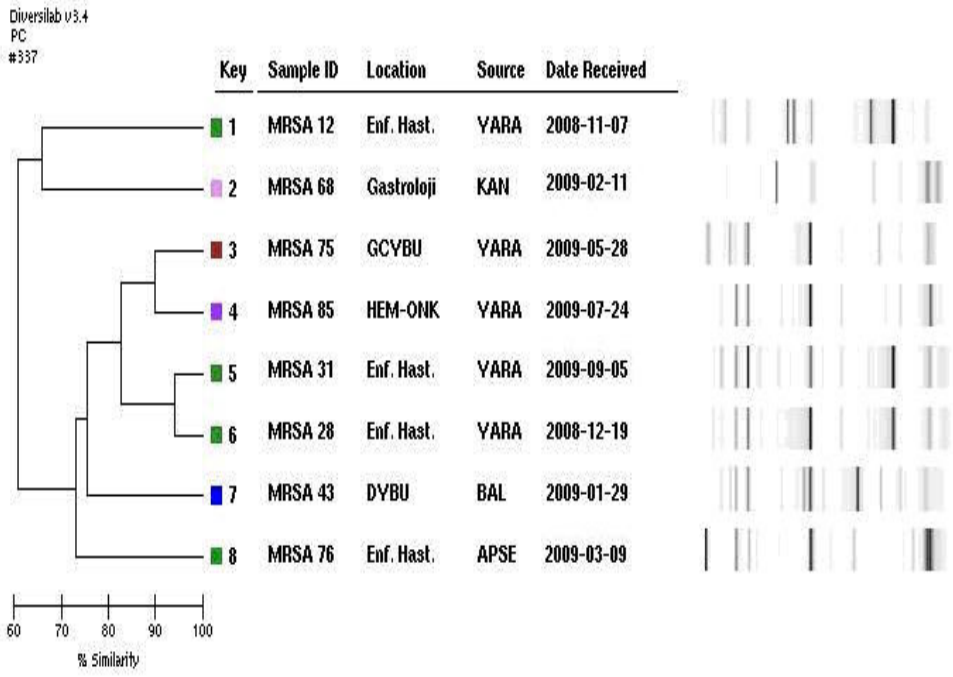
Çalışmada üçüncü ana klon olarak C ana klonu belirlendi. C ana klonunun da iki alt tipi (C1,C2) belirlendi. C klonuna ait sadece 3 suş belirlendi. C klonuna ait suşların tamamı metisiline dirençli, çalışılan diğer antibiyotiklere duyarlı bulunmuştur. C klonuna ait dendrogram Şekil 14'te, benzerlik matriksi ise Şekil 15'de gösterilmiştir.



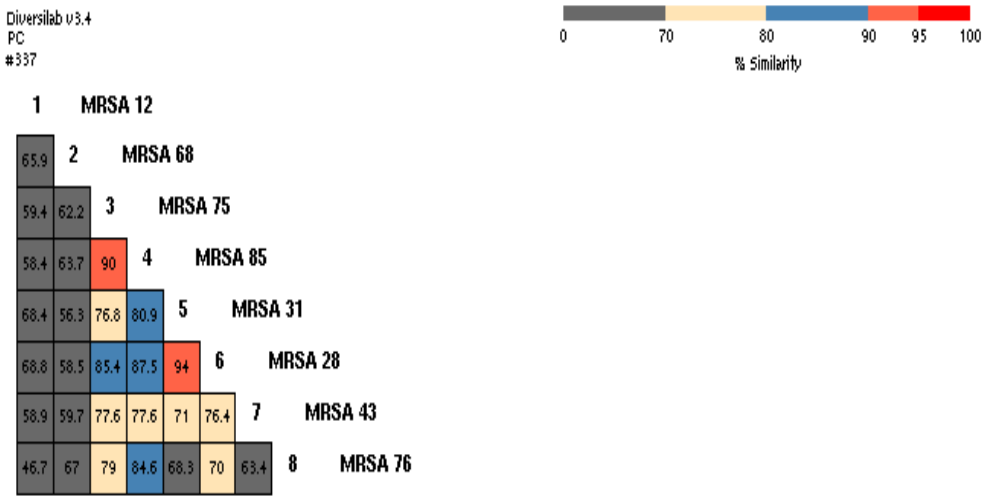
Şekil 14. C klonuna ait dendrogram

Şekil 15. C klonuna ait benzerlik matriksi

Çalışmada 3 ana (A-C) klonun dışında benzerlik oranları %95'den küçük ve 2 banttan daha fazla aralarında fark olan 8 klon (D-K) daha belirlendi. Bu 8 farklı suşun 4 (%50)'ü enfeksiyon hastalıkları servisinden gönderilmiştir. Suşlara ait dendrogram Şekil 16'da, benzerlik matriksi ise Şekil 17'de gösterilmiştir.



Şekil 16. D, E, F, G, H, İ, J, K klonlarına ait dendrogram



Şekil 17. D, E, F, G, H, İ, J, K klonlarına ait benzerlik matriksi

5. TARTIŞMA

S. aureus insanda hastalık etkeni olarak sık rastlanan, virülansı yüksek bir mikroorganizmadır. *S. aureus* 1950'li yıllarda birçok antibiyotiğe direnç kazanmış ve 1961 yılında ise MRSA suşlarında çoklu antibiyotik direnci problemi ortaya çıktığı bilinmektedir (58). Son yıllarda vankomisin dirençliliğinin bildirilmeye başlanması MRSA enfeksiyonları ile mücadelede ciddi endişelere neden olmaktadır (59,60).

Birçok antibiyotiğe dirençlilik gösteren MRSA 1980'li yıllardan sonra hastane enfeksiyonu etkenleri arasında önemli bir sorun haline gelmiştir. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre, hastanede yatarak tedavi gören yaklaşık 10 hastadan birinde hastane enfeksiyonu ortaya çıkmaktadır (60,61). Çoklu dirençliliğe sahip suşların neden olduğu bu tip enfeksiyonları tedavi etmek için daha geniş spektrumlu ve genellikle daha pahalı antibiyotikler kullanmak gerekmektedir (62). Hastane enfeksiyonları, bilindiği üzere klasik enfeksiyonlardan daha ağır seyreden, tedavisi oldukça güç ve tedavi maliyeti de bir o kadar yüksek enfeksiyonlar olmaktadır. Örneğin; Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesinde yapılan bir çalışmada, hastane enfeksiyonu nedeniyle hastaların hastanede yaklaşık 20 gün daha fazla kaldığı ve hasta başına maliyetin 1582 dolar arttığı gösterilmiştir (63).

Günümüzde MRSA ile enfekte olguların tedavisi ancak; nadiren etkili olan birkaç antibiyotik dışında, glikopeptid grubu olarak adlandırılan ve sadece damar içi yoldan uygulanabilen vankomisin ve teikoplanin adlı iki antibiyotikle mümkün

olabilmektedir. Diğer önemli bir husus ise, uygun dozda kullanılsa bile vankomisinin, hastada mevcut MRSA kolonizasyonunu ortadan tamamen kaldıramamasıdır; yani MRSA enfeksiyonu olduğu için etkin olarak tedavi edilen bir hastanın tedavi bitiminden sonra da bu bakteri ile kolonize olma olasılığı bulunmaktadır (13).

Dünya çapında MRSA'nın sebep olduğu hastane enfeksiyonlarında görülen artış enfeksiyon önleme çalışmalarında kullanılmak üzere hızlı ve kolay uygulanabilir yöntemlerin geliştirilmesini zorunlu kılmıştır. Bu amaçla MRSA tiplendirilmesinde kullanılan bir çok yöntem tanımlanmıştır. Klinik laboratuvarlarda kullanılan bu tiplendirme yöntemleri MRSA suşları arasındaki fenotipik ve genotipik farklılıkları esas almaktadır. Hastane enfeksiyonuna yol açan mikroorganizmaların kaynağının, bulaş yollarının ve kontrol önlemlerinin alınmasında temel noktayı epidemiyolojik çalışmalar oluşturur. Başarılı bir epidemiyolojik çalışmanın yapılabilmesi için hastane enfeksiyonu etkeni olan mikroorganizmaların arasındaki klonal ilişkinin açık bir şekilde ortaya konması gerekir. Bugün rutin pratikte organizmalar arasındaki ilişkileri belirlemede en sık kullanılan yöntem organizmaların antibiyotik duyarlılık profilleridir. Çünkü antibiyotik duyarlılık sonuçları aynı olan bakterilerin orijininin ortak olma olasılığı daha yüksektir. Ancak tüm fenotipik yöntemler gibi antibiyotik duyarlılık profilleri de üreme ortamından, üreme fazından ve spontan mutasyon oranlarından etkilenebildiğinden kararlı bir tiplendirme yöntemi değildir. Bu sebeple tüm dünyada genotipik tiplendirme yöntemleri tercih edilmektedir. Bu genotiplendirme yöntemleri içerisinde PFGE (Pulse-Field Gel Electrophoresis) yüksek ayırım gücü, tiplendirebilirliği ve tekrarlanabilirliği olan bir yöntem olup; moleküler tiplendirme yöntemlerinin "altın standardı" olarak kabul edilir (64-68). Ancak bu yöntemin bir takım dezavantajları mevcuttur. En önemli dezavantajı yavaş ve pahalı bir yöntem olmasıdır. Yöntem sonunda elde edilen bantların çok sayıda oluşu yorumlama güçlüğü yaratmaktadır. Ayrıca bantların yorumlanmasında laboratuvarlar arasında henüz bir standart protokolün oturtulmuş olmaması bir diğer dezavantajdır. Bu nedenle PFGE'nin çok sayıda örneğin bir arada çalışılmasını gerektiren rutin laboratuvarlarda kullanımı kısıtlıdır (69). Bu nedenle araştırmacılar daha hızlı ve kolay bir yöntem olan PCR bazlı yöntemleri araştırmaya yönelmişlerdir. Swaminathan ve Matar (70) tiplendirme yöntemlerinin hız ve maliyetlerini analiz ettikleri çalışmalarında, PFGE protokolünün uzun inkübasyon basamakları nedeniyle ortalama 5 gün ya da daha

fazla süren ayrıca pahalı ekipmanlar gerektiren bir yöntem olduğunu saptanmıştır. Söz konusu çalışmada PFGE ile karşılaştırıldığında PCR bazlı tiplendirme yöntemlerinin gerek hızı ve uygulama kolaylığı, gerekse düşük maliyeti nedeniyle *S. aureus* tiplendirmesinde önemli avantajlara sahip olduğunu rapor edilmiştir.

Rep-PCR analizi bu amaçla kullanılan; hızı ve kullanım kolaylığı nedeniyle son zamanlarda ön plana çıkan PCR bazlı bir tiplendirme yöntemidir. Ayrıca yöntem sonunda ortaya çıkan bantların PFGE'ye göre daha kolay yorumlanabilir olması yanı sıra rutin laboratuvarlarda çok sayıda örneğin çalışılabilmesine olanak vermektedir. Bu durum Ross ve arkadaşlarının MRSA suşlarını tiplendirmede PFGE ve rep-PCR yöntemlerini karşılaştırmak üzere yaptıkları bir çalışmada rapor edilmiştir (71).

MRSA'nın etken olduğu epidemiyolojik çalışmalarda suşlar arasındaki klonal ilişkiyi saptamak oldukça önemlidir. Bu çalışmada rep-PCR yöntemi, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde çeşitli klinik örneklerinden izole edilen MRSA suşları arasındaki klonal ilişkiyi ortaya koymak amacıyla kullanılmıştır.

Daha önce yapılan çalışmalarda MRSA enfeksiyonunun yoğun olduğu klinikler yoğun bakım üniteleri ve cerrahi klinik servisler olarak sıralanmış olup çalışmamızla benzerlik göstermektedir (72-75). Bu çalışmada da izole edilen MRSA örneklerinin %40'ı yoğun bakım ünitelerinden ve %18'i çeşitli cerrahi klinik servislerden izole edilmiş olup tüm MRSA enfeksiyonlarının %58'ini oluşturmaktadır (Tablo 7).

Çalışmada izole edilen MRSA suşlarının klonal yakınlıkları incelendiğinde üçü ana klon olmak üzere 11 farklı klon belirlendi. Suşların %78'inin A ana klonuna ait olduğu görüldü ve A klonunun hakim tip olduğu belirlendi. Hakim klon olarak belirlenen A klonu Dahiliye YBÜ'nden toplanan 15 örneğin 14 (%93.3)'nü oluşturmaktadır. Yine aynı klon Enfeksiyon Hastalıkları Servisi'nden toplanan 15 örneğin 10 (%66.6)'unu, Hematoloji-Onkoloji Servisinden toplanan 11 örneğin 10 (%90.9)'unu oluşturmaktadır. Ayrıca Anestesi YBÜ ve Yenidoğan YBÜ'den izole edilen MRSA suşlarının tamamının A klonu ait olduğu görülmektedir. Bu örneklerin ait olduğu hastaların kayıtları incelendiğinde örneklerin izolasyon tarihlerinin birbirine çok yakın tarihler olduğu görülmüştür. Bu veriler rep-PCR analizi sonucu hakim klon olarak tespit edilen A tipini gösteren suşların klonal olarak ilişkili olduklarını açıkça ortaya koymaktadır.

Çalışmada ikinci hakim klon olarak belirlenen B klonunun, örneklerin laboratuvara geliş tarihleri incelendiğinde özellikle Nisan 2009, Mayıs 2009 ve Haziran 2009 tarihlerinde klonal yayılım gösterdiği görülmektedir. Çalışmada dikkat çeken diğer bir nokta D, E, F, G, H, İ, J, K olarak tiplendirilen suşların rep-PCR sonucu verdikleri bant profillerinin diğer tüm suşlardan farklı olduğu gözlenmiştir. Bu örneklerin laboratuvara geliş tarihleri incelendiğinde farklı tarihlerde geldiği görülmektedir. Böylece çalışmada kullanılan rep-PCR yönteminin MRSA tiplendirilmesinde epidemiyolojik olarak ilişkili izolatların yakınlığını ortaya koymada olduğu kadar ilişkisiz izolatların ayrımında da başarılı olduğu sonucuna varılmıştır.

Diversilab rep-PCR sistemi teknik personel zamanının önemli olduğu klinik laboratuvarlar için çok cazip bir yöntem olarak görünmektedir. Bu yöntemin en yoğun emek gerektiren kısmı manuel DNA ekstraksiyonudur ve yaklaşık 60-90 dakika sürmektedir. Önerilen DNA ekstraksiyon prosedürü teknik olarak basit olsa da emek açısında çok yoğundur. Sistemde geliştirilmeye ihtiyaç duyulan kısım burasıdır ve manuel DNA ekstraksiyon prosedürlerinin otomatik sistemlerle yapılması üzerine çalışmalar sürmektedir (76). Diversilab rep-PCR yönteminin maliyet açısından uygun olması için her çalışmada 12 örnek ve bir pozitif kontrol ya da pozitif kontrol kullanılmayacaksa 13 örnek test edilmelidir. Çünkü mikroakışkan Chip içerisinde 13 kuyucuk vardır ve örnek konulmayan kuyucuklar jel matriksi bozulacağından tekrar kullanılamamaktadır (76).

Yöntemin diğer bir dez avantajı örnekler Chip (Şekil 6) içerisindeki mikroakışkan kuycuklara doldurulurken hava kabarcıkları oluşması sorun çıkartmaktadır. Bu durumda testin tekrarlanması gerekmekte ve zaman kaybına yol açmaktadır.

Yörük'ün (77) yaptığı benzer bir çalışmada 1 Haziran 1999 – 1 Haziran 2001 yılları arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Gevher Nesibe Hastanesi Klinikleri ve YBÜ'nde stafilokoksik kan dolaşımı enfeksiyonu tanısı konan toplam 215 hasta incelenmiştir. Etkenlerin metisiline direnç durumları araştırıldığında nozokomiyal 142 *S. aureus* suşunun %65.5'inin, 38 KNS suşunun %81.6'sının metisiline dirençli olduğu gözlenmiştir. Çalışma süresi boyunca izole edilen MRSA suşlarından 80 tanesi PFGE ile analiz edilebilmiştir. Buna göre 10 (A-İ) farklı klon belirlenmiştir. Suşların 61 (%76.3)'nin A klonuna ait olduğu görülmüş ve bu klonun beş farklı alt tipi belirlenmiştir. B klonuna ait beş, C klonuna ait dört, D klonuna ait üç, E klonuna

ait iki, F, G, H, I, İ klonlarına ait birer suş saptanmıştır. Genel Cerrahi YBÜ'sinden izole edilen 29 MRSA suşundan 25 (%86.2)'inin, Dahiliye YBÜ'sinden izole edilen 15 MRSA suşundan 9 (%60)'unun, Nefroloji Kliniklerinden izole edilen 11 MRSA suşundan 8 (%72.7)'inin, Beyin Cerrahisi YBÜ'sinden izole edilen 6 MRSA suşundan 5 (%83.3)'inin, Beyin Cerrahisi Servisi'sinden izole edilen 6 MRSA suşundan 3 (%50)'ünün ve Kalp Cerrahisi YBÜ'sinden izole edilen 5 MRSA suşundan 5 (%100)'inin A klonuna ait olduğu tespit edilmiştir. B klonuna ait beş suş ve diğer klonlar farklı kliniklerden izole edilmiştir.

Çetinkaya ve ark. (78)'nın yaptıkları bir çalışmada cerrahi bir serviste başlayan MRSA epidemisinde arbitrarily primed PCR (AP-PCR) yöntemi kullanarak suşlar arasındaki klonal ilişki ve epidemi kaynağının saptanması amaçlanmıştır. Çalışma sonucunda klinik örneklerden ve tarama amacıyla alınan kültürlerden izole edilen MRSA suşlarının çoğunun iki ana klona ait olduğu gözlenmiştir. Servisdeki MRSA epidemisinin pansuman küvetinin MRSA ile kontamine olmasından ve servis personelindeki nasal taşıyıcılıktan kaynaklandığını rapor etmişlerdir (78).

Ross ve ark. (71) beş farklı hastanede oluşan MRSA salgınlarını rep-PCR ve PFGE yöntemleri ile analiz etmişlerdir. Salgınlarda izole edilen toplam 109 MRSA suşun klonal olarak yakınlıkları incelenmiştir. Birinci hastanede oluşun salgında 44 MRSA suşu izole edilmiş ve PFGE analiz sonucu 4 farklı klon tespit edilmiş. Rep-PCR ile 44 suşun 38'i PFGE ile karşılaştırıldığında doğru olarak belirlenmiş ve rep-PCR ile PFGE analizleri arasında %86 uyum bulunmuştur. İkinci MRSA salgını bir hastanenin Yenidoğan YBÜ'de tespit edilmiş ve 28 MRSA suşu PFGE analizi sonucu 2 farklı klon belirlenmiştir. Rep-PCR ile sadece 2 suş farklı olarak tanımlanmış ve iki yöntem arasında %77 uyum rapor edilmiştir. Üçüncü MRSA salgınında 12 suş izole dilmiş ve 3 farklı klon belirlenmiştir. Bu salgında ise iki farklı yöntem arasında %83 uyum rapor edilmiştir. Rep-PCR yöntemi ile PFGE analizi karşılaştırıldığında dördüncü MRSA salgınında %100 ve beşinci salgında ise yalnızca %73 uyum bulunmuştur.

Çalışmamızda toplam 41 yara örneğinden izole edilen MRSA suşunun 28 (%68.29)'i tek bir klona (A klonu) ait olması yara bakımı ile ilgili bazı genel kurallara ve el yıkama gibi kolay bazı enfeksiyon kontrol önlemlerine yeterince uyulmadığını düşündürmektedir. MRSA'nın bilinen en iyi yayılım mekanizması hastane personelinin ellerinde geçici süre ile taşınmasıdır (78).

Epidemiyolojik incelemeler alınacak önlemlerin belirlenmesi, epideminin kaynağının bulunması ve MRSA epidemisinin sonllandırılması açısından büyük önem taşır. Eğer kaynak saptanamazsa yoğun tarama ve izolasyon çalışmalarının yapılması gerekir. Moleküler tiplendirme yöntemleri MRSA suşlarının klonal yayılımının tespit edilmesini ve böylece enfeksiyon kontrol önlemlerine uygun bir yaklaşım sağlar (78,79).

Çalışmamızda MRSA suşlarının tamamı vankomisin ve teikoplanine duyarlı bulunmuştur. Ülkemizde yapılan diğer çalışmalarda da vankomisin direnci bildirilmemiştir. Ertem ve ark. (80) çalışmalarında çeşitli klinik örneklerden izole edilen 129 *S. aureus* suşu, Çıtak ve Karaçocuk (62) toplum ve hastane kaynaklı 135 MRSA suşu incelemiş ve vankomisin direncine rastlamamışlardır. Bununla birlikte, Nakipoğlu ve ark. (81) çalışmalarında, 135 *S. aureus* suşundan 9'unu vankomisinli besiyerinde üretmiştir. Bu 9 suşun 1'i vankomisine azalmış duyarlı ve teikoplanine dirençli *S. aureus* suşu olarak tespit edilmiştir. Ülkemizde yapılan diğer çalışmalarda da teikoplanine dirençli suşlar bildirilmektedir. Güleroğlu (82), MRSA suşlarında teikoplanine %1.8 oranında direnç, %7.3 orta duyarlılık belirlemiştir. Bu durum, *S. aureus* suşlarında gözlenen teikoplanin direncinin dikkatle izlenmesi ve kontrol edilmesi gerekliliğini düşündürmektedir.

Hasbek ve ark. (83) 2002 yılında ülkemizde yaptıkları çalışmada rifampisin direncini %64 olarak, Ekşi ve ark. (84) ise 2007 yılında yaptıkları çalışmada %73.2 olarak rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda rifampisin direnci %90 gibi yüksek oranda tespit edilmiştir. Bu durum MRSA suşlarında rifampisine karşı giderek artan bir direnç oranı olduğunu göstermektedir.

MRSA suşlarının gentamisine olan direncini Çetin ve ark. (85) %62, Ekşi ve ark. (84) ise %76 olarak belirtirken bizim çalışmamızda bu değer %84 şeklindedir (Şekil 7). Görüldüğü gibi çalışmamızda gentamisine karşı görülen direnç oranı literatür sonuçlarına göre daha yüksek oranda saptanmış olup; bu bulgu da MRSA suşlarında gentamisine karşı artan bir direnç oranı olduğunu düşündürmektedir.

MRSA suşlarında eritromisin direnci ülkemizde yapılan çalışmalarda farklılık göstermektedir. Çeşitli klinik örneklerden izole ettikleri MRSA'larda eritromisin direncini Aydın ve ark. (86) %21.5, Baysal ve ark. (87) %59.2, Hasbek ve ark. (83) %52 olarak vermektedir. Çetin ve ark. (85) yara örneklerinden izole edilen MRSA

suşlarında eritromisin direncini %70 olarak saptamışlardır. Bizim çalışmamızda da MRSA suşlarında eritromisin direnci %77 olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda, MRSA suşlarında klindamisin direnci %63 olarak bulunmuştur. Klinik örneklerden izole edilen MRSA suşlarında klindamisin direnç oranları da çeşitli çalışmalarda farklılık göstermektedir. Aydın ve ark. (86) çalışmalarında %28 oranında direnç bulurken, Hasbek ve ark. (83) %72 oranında klindamisin direnci bildirmişlerdir.

Çalışmamızda MRSA suşlarında vankomisin ve teikoplanine karşı direnç gözlenmemiştir. Bunlardan sonra en etkili görünen antibiyotik TMP-SXT olarak tespit edilmiştir. Çetin ve ark. (85) MRSA suşlarında TMP-SXT direncini %15, Hasbek ve ark. (88) %20 olarak bulmuştur. Doğan ve ark. (88) MRSA suşlarında TMP-SXT direncini %28.9 olarak rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise TMP-SXT direnci sadece %1 olarak bulunmuştur.

Ülkemizde antibiyotik kullanımında ciddi sorunlar yaşandığı bir gerçektir. Özellikle geniş spektrumlu antibiyotiklerin akılcı olmayan kullanımları antibiyotiklere direnç gelişiminde başlıca faktördür. Zamanla toplum içinde çoklu dirençli MRSA suşların oluşturduğu infeksiyonların artması, sağaltımın hem maliyetini artırmakta hem de zorlaşmasına neden olmaktadır. Bu enfeksiyonların tedavisi için çok az antimikrobiyal tedavi seçeneği vardır. MRSA enfeksiyonlarını kontrol altına almak amacıyla alınacak önlemler hastane kaynaklarına, o hastanedeki MRSA prevalansına göre belirlenmelidir ve asıl amaç MRSA'nın eradikasyonunun sağlanması olmalıdır. Bunun mümkün olmadığı durumlarda MRSA yayılmasının en aza indirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla MRSA suşları arasındaki klonal ilişkinin tespiti, hem hastane enfeksiyonlarının kaynağının ortaya çıkmasını sağlayacak hem de hastane enfeksiyonlarına bağlı olarak ortaya çıkan ekonomik kayıpların en aza indirilmesi açısından son derece faydalı olacaktır.

6. SONUÇLAR

Günümüzde çoklu antibiyotik direncinin getirdiği tedavi güçlüğü ve hastane kökenli salgınlara yol açan bir patojen olması nedeniyle MRSA önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Hastanenin herhangi bir servisinde MRSA ile enfekte olan hastaların sayısında artış belirlenmesi o servisdeki bir MRSA epidemisinin habercisi olabilir. MRSA'ya bağlı salgınlarda, bir bölümde değişik hastalardan aynı tip bakterinin üretilmesi, bulaşın aynı kaynaktan hastadan hastaya bulaştığını göstermektedir. Bu durumda hastane enfeksiyonuna neden olan mikroorganizmanın kökeninin araştırılması gerekir. Mikroorganizmalar arasındaki klonal ilişkilerin kesin olarak belirlenmesi ile enfeksiyon kaynağı, taşıyıcıları, yayılma yolu kesin olarak ortaya konur ve doğru korunma önlemleri alınabilir.

Çalışmamızda Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri'nde MRSA suşlarının klonal yayılım gösterdiği ve A klonun hakim klon olduğu bulunmuştur. Ayrıca suşların çoğunlukla diğer antibiyotiklere de dirençli olduğu belirlenmiştir. Epidemiyolojik çalışmalarda kullanılacak mikroorganizma tiplendirme yöntemleri uygulanması kolay, hızlı, güvenilir ve ucuz olmalıdır. Bu kriterler göz önüne alındığında çalışmamızda kullanılan rep-PCR yönteminin epidemiyolojik çalışmalarda kullanılabilecek başarılı bir yöntem olduğunu düşünmekteyiz. Bu nedenle hastane salgınlarına yönelik epidemiyolojik çalışmalarda rep-PCR yöntemi tercih edilecek yöntemlerden biri olabilir. Söz konusu yöntem gerek hızı gerekse uygulama kolaylığı ile salgınların erken dönemde araştırılmasında faydalı olacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Şardan Çetinkaya Y, Korten V, Şahin Özkaya G, ve ark. Gram Pozitif Kok İnfeksiyonaları Sorunlar ve Çözümler. Güneş Kitapevi, Ankara, 2003; 66-67.

2. Levinson W, Jawetz E. Tibbi Mikrobiyoloji ve İmmünoloji. Güneş Kitabevi, Lange medical Boks/McGraw-Hill medical Publishing Division, Ankara, 2001; 723-724.

3. Chambers HF. Methicillin Resistance in Staphylococci; Molecular and Biochemical Basis and Implications. Clin Microbiol Rev 1997; 10: 781-791.

4. Cengiz AT. *Staphylococcus.* Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ustacelebi S. Günes Kitabevi, Ankara . 1999; 339- 347.

5. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, et al. The Gram Positive Cocci. The Color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology, 5th ed. Philadelphia, JB Lippincott Co. 1997; 539- 576.

6. Kloss WE, Bannerman Tl, Murray PR, et al. *Staphylococcus* and *Micrococcus.* Manual of Clinical Microbiology, 6th ed. Washington DC, ASM pres, 1995; 282-298.

7. Cosgrove SE, Sakulas G, Perencevich EN, et al. Comprison of Mortality Associated with Methicillin-Resistant and Methicillin Susceptible *S. aureus* Bacteremia: a Meta Analysis. Clin Infect Dis 2003; 36: 53-60.

8. Deplano A, Vaneechoutte M, Verschraegen G, et al. Typing *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains by PCR analysis of Inter-IS256 spacerlength polymorphisms. J Clin Microbiology 1997; 2580-2587.

9. Ünal S. Stafilokoklarda Metisilin Direnç Mekanizmaları ve Metisilin Direnç Tespit Yöntemleri. Flora 1996; 1: 14-17.

10. Akan E. *Staphylococcus*. Tıbbi Mikrobiyoloji. 2. Baskı, Saray Yayınları, İzmir, 1993; 1-18.

11. Tünger A. *Staphylococcus aureus*: Mikrobiyoloji, Patogenez ve Epidemiyoloji. Ulusoy S, Usluer G, Ünal S. Gram-Pozitif Bakteri İnfeksiyonları. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 2004; 9-38.

12. Kloos WE. Systematic and The Natural History of Staphylococci. J Aplied Bacteriol 1990; 69: 25-37.

13. Haznedaroğlu T. Metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA). 2009 (Erişim: http://www.gata.edu.tr/infkom/MRSA.pdf)

14. Boyce JM, et al. Methicillin resistant *Staphylococccus aureus* (MRSA): a briefing for acute care hospitals and nursing facilities. Infection Control and Epidemiology 1994; 15(2): 105-115.

15. Wenzel RP, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus* outbreak: A consensus panel's defination and management guidelines. American Journal of Infection Control 1998; 26(2): 102-110.

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

17. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, et al. Gram positive cocci Part I: Staphylococci and related gram positive cocci. Colar Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology 6th ed. Philadelphia, Lippincott, 2006; 623-662.

18. Garrity G, Holt JG. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: an overview of the road map to the manual. New York: Bergey's Manual Trust, 2005; 1315-1326.

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

20. Waldvogel FA. *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Mandell, Douglas and Bennet's Principles and Practice of Infectious Diseases. New York: Churchill Livingstone, 2000; 2069-2092.

21. Cohen ML. *Staphylococcus aureus*: Biology, mechanisms of virulence, epidemiology. J Pediatr 1986; 108: 796-799.

22. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS et al. *Staphylococcu*s and related organisms. Medical Microbiology 4th ed. St. Louis Mosby Inc 2005; 202-216.

23. Moreillon P, Que Y, Glauser MP. *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock) In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th Ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2005; 2321-2351.

24. Gray GS, Keohe M. Primary sequence of the α-toxingene from *Staphylococcus aureus* Wood 46. Infect Immun 1984; 46: 615-618.

25. Valeva A, Palmer M, Bhakdi S. Staphylococcal exotoxin: formation of the heptameric pore is cooperative and proceeds through multiple intermediate stages. Biochemistry 1997; 36: 13298-13304.

26. Crass BA, Bergdoll MS, Involvement of coagulase negative staphylococci in toxic shock syndrome. J Clin Microbiol 1986; 23: 43-45.

27. Tünger A, Çavuşoğlu C, Korkmaz M. Stafilokoklar ve Benzer Bakteriler. Asya Mikrobiyoloji 2005; 72-81.

28. Şardan YÇ. Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* enfeksiyonlarının epidemiyolojisi ve kontrolü. Hastane infek Derg 2000; 4: 205-207.

29. Dündar V, Öztürk Dündar D. Stafilokok Enfeksiyonları. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Ed. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 2008; 2065-2077.

30. Kluytmans J, Van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: Epidemiology of underyling mechanisms and associated risks. Clin Microbiol Rev 1997; 10: 505-520.

31. Peacock SJ. *Staphylococcus*. In Borriello SP, Murray PR, Funke G. (Ed). Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. 10th Ed. Hodder Arnold, London, United Kingdom, 2005; 771-832.

32. Martins A, Cunha MLRS. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci: Epidemiological and molecular aspects. Microbiol Immunol Rev 2007; 51: 787-795.

33. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System. NNSI System Report, data summary from January 1992 through June 2004. Am J Infect Control 2004; 32: 470-485.

34. Cuevas O, Cercenado E, Vindel A et al. Evolution of the antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. in Spain. Five nationwide prevalence studies, 1986 to 2002. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 4240-4245.

35. Bouza E, San Juan R, Munoz P et al. Cooperative Group of the European Study Group on Nosocomial Infections (ESGNI). A European perspective on intravascular catheter-related infections: report on the microbiology workload, aetiology and antimicrobial susceptibility (ESGNI-005 Study). Clin Microbiol Infect 2004; 10: 838-842.

36. Derbentli Ş. Cerrahi infeksiyonlarda dirençli Gram pozitif bakteri sorunu. Ankem Derg 2004; 18: 215-221.

37. Derbentli Ş. Sitafilokoklarda antibiyotik direnci: 2003-2004 Türkiye haritası. Ankem Derg 2005; 19: 54-60.

38. Usluer G, *Staphylococcus aureus*'un Neden Olduğu İnfeksiyonlar. Usluer G, Ulusoy S, Ünal S. Gram-Pozitif Bakteri İnfeksiyonları. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 2004; 39-52.

39. Gülay Z. Koagulaz negatif Stafilokoklar: Mikrobiyoloji, Epidemiyoloji ve Patogenez. Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S (eds). Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 2003; 73-102.

40. Dündar V, Öztürk Dündar D. Stafilokok İnfeksiyonları. In Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. (eds). İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2002; 1507-1516.

41. Aydın K. Koagülaz Negatif Stafilokokların neden olduğu infeksiyonlar ve tedavi seçenekleri Usluer G, Ulusoy S, Ünal S. Gram Pozitif Bakteri İnfeksiyonları. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 2004; 105-119.

42. Brown Derek FJ. Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). J Antimicrob Chemother 2005; 56: 1000-1018.

43. Çokça F, Arman D, Altay G. Vankomisin ile Rifampisin, Amikasin, Siprofloksasin ve İmipenem Kombinasyonlarının *Staphylococcus aureus* Suşlarına in-Vitro Sinerjik Etkisi. Klimik Dergisi 1998; 11: 109-111.

44. Chang S, Sievert DM, Hageman JC et al. Infection with Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Containing the *vanA* Resistance Gene. The New England Journal of Medicine 2003; 348: 1342-1347.

45. Lowy FD. Antimicrobial Resistance: The Example of *Staphylococcus aureus.* The Journal of Clinical Investigation 2003; 111: 1265-1273.

46. Delialioğlu N, Aslan G, Ozturk C ve ark. Inducible Clindamycin Resistance in Staphylococci Isolated from Clinical Samples. Japanese Journal of Infectious Diseases 2005; 58: 104-106.

47. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighteenth Informational Supplement. CLSI document M100-S18 (ISBN: 978-975-6058-42-8). Clinical and laboratory standards institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2008.

48. Janapatl RP, Yan JJ, Huang AH, et al. Inducible Clindamycin Resistance in *Staphylococcus aureus* Isolates Causing Bacteremia at a University Hospital in Southern Taiwan. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 2007; 58: 203-209.

49. Shukla SK. Community-Associated Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* and its Emerging Virulence. Clinical Medicine and Research 2005; 3: 57-60.

50. Chongtrakool P, Ito T, Kondo Y et al. Staphylococcal Cassette Chromosome *mec (SCCmec)* Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated in 11 Asian Countries: a Proposal for a New Nomenclature for *SCCmec* Elements. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2006; 50: 1001-1012.

51. Kılıç S, Beşirbellioğlu B, Kılıç A, ve ark. Bir Eğitim Hastanesinde 2003-2004 Yıllarında Saptanan Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* İnfeksiyonları. Gülhane Tıp Dergisi 2005; 47: 195-198.

52. Sancak B. *Staphylococcus aureus*'ta Metisilin ve Vankomisin Direnci. Hacettepe Tıp Dergisi 2007; 38: 127-134.

53. Çetinkaya Y, Ünal S. Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus* İnfeksiyonları: Epidemiyoloji ve Kontrol. Flora Dergisi 1996; 3: 3-16.

54. Durmaz R. Moleküler epidemiyolojinin Prensipleri. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. Nobel Tıp Kitabevleri, 2001; 139-147.

55. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyoloji. Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. Barış Yayınları, İzmir, 1990; 184-204.

56. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. *Staphylococcus, Micrococcus* and Smilar Organism: Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 12 th Ed, USA, 2007; 254-263.

57. Collin CH, Lyne PM, Grange JM. Collin's and Lyne's Microbiological Methods. Oxford University PRESS Inc, Newyork 2001; 110-111.

58. Tambic A, Power EGM, Talsania H et al. Analysis of outbreak of non-phage-typeable methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by using a randomyl amplified polymorphic DNA assay. J Clin Microbiol 1997; 35: 3092-3097.

59. William D, Ibergan T, Moosdean F. Arrival of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus.* Antibiotics and Chemotherapy 1997; 2: 110-112.

60. Onasanya A, Mignounam HD, Thottappilly G. Genetic fingerprinting and phylogenetic diversity of *Staphylococcus aureus* isolates from Nigeria. African J Biotech 2003; 2: 246-250.

61. Mayon-White R.T, Ducel G, Kereselidze T, et al. An international survey of the prevalence of hospital-acquired infection. J Hosp Infect 1988; 11: 43-48.

62. Çıtak S, Karaçocuk E. Hastane ve Toplum Kaynaklı Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* Suşlarının Çeşitli Antibiyotiklere Duyarlılığı. CÜ. Tıp Fakültesi Dergisi 2004; 26(1): 13-17.

63. Yalçın AN, Hayran M, Ünal S. Economic analysis of nosocomial infections in a Turkish university hospital. J Chemotherapy 1997; 9: 411-414.

64. Carles-Nurit MJ, Christophle B, Broche S, et al. DNA polimorphisms in methicillin-sensitive and methicillin-resistant strains of *Staphylococcus* aureus. J Clin Microbiol 1992; 30: 2092-2096.

65. Prevost G, Jaulac B, Piemont Y. DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis is more effective than ribotyping in distinguishing among methicillin resistant Staphylococcus aureus isolates. J Clin Microbiol 1992; 30: 967-973.

66. Saulnier P, Bourneix C, Prévost G, et al. Random amplified polymorphic DNA assay is less discriminant than pulsed-field gel electrophoresis for typing strains of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 1993; 31: 982-985.

67. Schwardzkoph A, Karch H. Genetic varation in *Staphylococcus aureus* coagulaese genes: Potential and limits for Use as epidemioligical marker. J Clin Microbiol 1994; 32: 2407-2412.

68. Tenover FC, Arbeit, R, Archer G, et al. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 1997; 32: 407-415.

69. Goh SH, Byrne SK, Zhang JL, et al. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of coagulase gene polymorphisms. J Clin Microbiol 1992; 30: 1642-1645.

70. Swaminathan B, Matar GM. Molecular typing methods. Diagnostic molecular microbiology, American Society for Microbiology, 1993; 26-50.

71. Ross TL, Merz WG, Farkosh M, et al. Comparison of an Automated Repetive Sequence Based PCR Microbial Typing System to Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Analysis of Outbreaks of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2005; 43: 5642-5647.

72. Boyce JM, White RL, Causey WA, et al. Burn units as a source of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. JAMA 1983; 249: 2803-2804.

73. Rutala WA, Katz EBS, Sherertz RJ, et al. Environmental study of a methicillin resistant *Staphylococcus aureus* epidemic in a burn unit. J Clin Microbiol 1983; 18: 683-688.

74. Casewell MW, Hill RLR. The carrier state: methicillin resistant *Staphylococcus aureus.* J Antimicrob Chemother 1986; 18: 1-12.

75. Brumfit W, Hamilton-Miller J. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. N Eng J Med 1989; 320: 1188-1196.

76. Cherly KS, June IP, Sam Rp, et al. Clinical Evaluation of the Diversilab Microbial Typing System Using Repetitive Sequence Based-PCR for Characterization of *Staphylococcus aureus* Strains. J Clin Microbiol 2005; 43: 1187-1192.

77. Yörük A. Stafilokoksik kan dolaşımı infeksiyonlarının epidemiyolojisi ve metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarının "pulsed field" jel elektroforez ile analizi, Uzmanlık Tezi, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kayseri, 2002; 48-49.

78. Çetinkaya Y, Kocagöz S, Hayran M, ve ark. Nozokomiyal bir metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* epidemisinin arbitrary-primed polymerase chain reaction (AP-PCR) ile analizi. Flora İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Dergisi 1998; 3(2): 96-106.

79. Roberts RB, Lencastre A, Eisner W et al. Molecular epidemiology of methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* in 12 New York hospitals. J Infect Dis 1998; 178: 164-71.

80. Tuncer Ertem G, Gültekin B, Aydın N, ve ark. Klinik Örneklerden İzole Edilen Stafilokok Suşlarının Vankomisin ve Teikoplanine Karşı İn-Vitro Duyarlılıkları. İnfeksiyon Dergisi 2003; 17: 185-188.

81. Nakipoğlu Y, Katrancı H, Çağatay A, ve ark. İstanbul Tıp Fakültesinde Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen Stafilokok Suşlarında Glikopeptid Direncinin Araştırılması. Ankem derg 2004; 18(4): 209-212.

82. Güleroğlu S. Metisiline Dirençli Stafilokoklarda Vankomisin, Teikoplanin ve Fusidik Asit Direncinin Mikrodilüsyon Yöntemi ile Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, 2001; 55-67.

83. Hasbek M, Hakgüdener Y, Kaya S, ve ark. Stafilokoklarda Metisilin Direncinin Farklı Yöntemlerle Belirlenmesi ve Çoğul Antibiyotik Direnci. Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2002; 24(4): 179 –184.

84. Ekşi F, İcal B, Efgan DG, ve ark. Klinik Örneklerden Soyutlanan *Staphylococcus aureus* Şularının Metisilin Direncinin Belirlenmesi ve Antimikrobiyal İlaçlara Duyarlılıklarının Değerlendirlimesi. İnfeksiyon Dergisi 2007; 21(1): 27-31.

85. Çetin BD, Özcan N, Oktar M, ve ark. Yara Örneklerinden İzole Edilen Stafilokok Suşlarının Çeşitli Antibiyotiklere Direncinin Azalması. Şeh Tıp Bülteni 2004; 38(2): 45-47.

86. Aydın N, Gültekin B, Eyigör M, ve ark. Klinik Örneklerimizden İzole Edilen Stafilokokların Antibiyotik Direnci. ADÜ Tip Fak Der 2001; 2(3): 21 – 26.

87. Baysal B, Tuncer Y, Eryaman B, ve ark. Klinik Örneklerden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarının Fusidik Asit ve Baz Antibiyotiklere Duyarlılıkları. İnfeksiyon Dergisi 2003; 17(1): 27-30.

88. Doğan Ö, Yalınay ÇM, Engin D, ve ark. Klinik Örneklerden İzole Edilen Stafilokoklarda Metisilin Direnci ve Çeşitli Antibiyotiklere İn-Vitro Duyarlılıkları. Ankem Derg 2005; 19(1): 39-42.

T. C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

Dr. İsmail GÜLER'e ait **''Çeşitli Klinik Örneklerden Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* Türlerinin İzolasyonu ve Genotiplendirilmesi''** adlı çalışma, jürimiz tarafından Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih :

Başkan ..... İmza

Üye ..... İmza

Üye ..... İmza

Üye ..... İmza

Üye ..... İmza