



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİK- YL-2011-0001

**METİSİLİN DİRENÇLİ *Staphylococcus aureus*
SUŞLARININ MOLEKÜLER TİPLENDİRMESİ**

Biyolog Zeynep ERDEM

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ**

AYDIN - 2011

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİK- YL-2011-0001

**METİSİLİN DİRENÇLİ *Staphylococcus aureus*
SUŞLARININ MOLEKÜLER TİPLENDİRMESİ**

Biyolog Zeynep ERDEM

DANIŞMAN
Doç. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ

AYDIN - 2011

T.C.

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

AYDIN

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Zeynep ERDEM tarafından hazırlanan “ Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus* Suşlarının Moleküler Tiplendirmesi” başlıklı tez, tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Unvanı, Adı ve Soyadı:

Üniversitesi:

İmzası:

(Başkan).....

.....

.....

.....

.....

.....

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu yüksek lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun..... Sayılı kararıyla..... tarihinde onaylanmıştır.

Unvanı, Adı Soyadı

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Stafilokoklar 100 yıldan daha uzun bir süredir önemli enfeksiyon sebeplerinden biri olarak tıp dünyasını meşgul etmektedir. 1960 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 (1961), stafilokoklarda metisilin direnci tanımlanmış ve 1970’li yılların sonu ile 1980’li yılların başlarından itibaren de Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşlarında çoklu antibiyotik direnci ortaya çıkmaya başlamıştır. Günümüzde direnç sorununun giderek yaygınlaşması ile birlikte MRSA tüm dünyada olduğu kadar yurdumuzda da hem insanlarda hem hayvanlarda ciddi bir sorun haline gelmiştir.

Moleküler tiplendirme teknikleri, epidemik hastalıklara neden olan *Staphylococcus aureus* suşlarının yayılımını izlemek için kullanılmıştır. Bunlar arasında pulsed- field gel electrophoresis (PFGE), Stafilokokal protein A (*spa*) dizi tiplendirme ve çok lokuluslu sekans tiplemesi (MLST) ayrıca *Staphylococcus aureus* suşlarının hastane mi toplum kaynaklı mı olduğunu anlamamızı sağlayan Staphylococcal Kaset Kromozom *mec* (SCC*mec*) tiplendirmesidir. Bu moleküler tiplendirme teknikleri yüksek ayırım gücüne sahiptir.

MRSA enfeksiyonlarının kontrol çabalarının başarısı büyük ölçüde, etkenin tespiti ve klonal özellikleri, muhtemel bulaş kaynağı ve taşıyıcılar ile bulaş yolu gibi lokal epidemiyolojik özelliklerin tespitine bağlıdır. MRSA suşlarının klonal ilişkilerinin tespitinde PFGE altın standart olarak kabul edilmiştir. Son derece yüksek ayırım gücüne sahip olan bu yöntemin uzun sürede sonuç vermesi pahalı ekipmanlara ihtiyaç duyması gibi problemlere sahip olduğu bilinmektedir. Son yıllarda klonal ilişki tespitinde yapısal enzimlerin üretimindeki polimorfizmi dikkate alan Çok lokuluslu enzim elektroforezi (MLEE), genomdaki rastgele bölgelerin amplifiye edildiği; RAPD-PCR ve yapısal genlerin genomik analizini dikkate alan MLST ve SCC*mec* multiplex PCR gibi moleküler temelli yöntemler kullanılmıştır. MLST; Maiden ve arkadaşları tarafından 1998 yılında, gen ürünlerinin yerine, korunmuş metabolik faaliyetlerden sorumlu (housekeeping) genlerin dizilerinin karşılaştırmasına yönelik yaklaşımı ileri sürmüşlerdir. Bu yöntemde, yedi farklı yapısal metabolik genin yaklaşık 50 bp parçalarının dizi analizi yapılmakta ve elde edilen her bir allele bir kod verilerek, her köken için bir dizi tipi (sequence type, ST) saklanarak, dünyanın herhangi bir bölgesinden elde edilen diğer kökenlerle karşılaştırılabilmekte ve global epidemiyolojik çalışmalar açısından önemli bilgi ve hızlı işlem avantajı sağlamaktadır. Tekrarlayan ünitelerdeki tek lokuluslu DNA sekansına dayanan *spa* geni, MRSA suşlarının tiplendirilmesinde oldukça güvenilir, doğru ve ayırımı sağlayan bir yöntemdir. Son yıllarda yapısal genlerden olan ve genomik polimorfizmin en sık görüldüğü *spa* dizi analizi ile MRSA suşları arasındaki klonal ilişkinin PFGE kadar duyarlı tespit edilebildiği, ancak yöntemin PFGE’ine göre, daha ucuz ve hızlı sonuç veren bir yöntem olduğu gösterilmiş, lokal epidemiyolojik bilgi oluşturulması ve hastane enfeksiyonlarının önlenmesinde *spa*-dizi analizi sonuçlarına dayalı bilginin son derece yararlı olduğu ileri sürülmüştür. MLST ve *spa* dizi tipleme metodlarının yardımı ile elde edilen sonuçların taşınabilmesi, karşılaştırmaya uygun olması ve tekrarlanabilmesi bakımından PFGE’ye göre avantajlı olduğu kabul edilmektedir. PCR temelli SCC*mec* tiplendirmesi ise; hastane ve toplum kökenli suşların ayırımında önem kazanmıştır.

Yurdumuzda veteriner sahada moleküler tiplendirme yöntemleri (PFGE, *spa*, MLST ve SCC*mec*) kullanılarak yapılan çalışma sayısı yok denecek kadar azdır. Bu çalışmada sığırlardan ve sektör çalışanlarından izole edilen 12 adet MRSA suşu SCC*mec*, PFGE, MLST, *spa* dizi tiplendirme yöntemleri ile genotipik olarak incelenmiş ve PFGE yöntemi ile suşlar arasındaki klonal ilişki, SCC*mec* yöntemi ile suşların hastane ya da toplum kökenli olup olmadıklarının belirlenmesi, MLST ve *spa* dizi tiplendirme yöntemleri ile ise izolatlarımızın dünyadaki epidemiyolojik dağılımlarının ortaya konulması amaçlanmıştır.

Bu araştırma Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (VTF 11035 no'lu proje) tarafından desteklenmektedir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL VE ONAY	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
RESİMLER DİZİNİ	xi
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	xii
1. GENEL BİLGİLER	
1.1. Tarihçe.....	1
1.2. Genel Özellikleri.....	3
1.3. Morfolojik ve Kimyasal Özellikleri.....	4
1.3.1. Görünüm ve Boyanma.....	4
1.3.2. Üreme ve Kültür Özellikleri.....	4
1.3.3. Biyokimyasal Özellikleri.....	4
1.3.4. Genom Yapısı.....	6
1.3.5. Virulans ve Patojenite.....	6
1.3.5.1. Kapsül ve Slime Tabakası.....	7
1.3.5.2 Hücre Duvarı.....	8
1.3.5.2.1. Peptidoglikan Tabaka.....	8
1.3.5.2.2. Teikoik Asit.....	9
1.3.5.2.3. Yüzey Proteinleri.....	9
1.3.5.3 Stoplazmik Membran.....	10
1.3.5.4. Enzimler.....	10

1.3.5.4.1 Katalaz.....	10
1.3.5.4.2. Koagülaz.....	10
1.3.5.4.3 Slaym Faktör.....	11
1.3.5.4.4. Lipazlar.....	11
1.3.5.4.5. Penisilinaz (Beta Laktamaz).....	11
1.3.5.4.6. Hyalüronidaz.....	12
1.3.5.4.7.Fibrinolizin (Stafilokinaz).....	12
1.3.5.4.8. Fosfatid- Spesifik Fosfalipaz İnositol C.....	12
1.3.5.4.9. Termostabil nükleaz (TNaz).....	13
1.3.5.4.10. Deoksiribonükleaz (DNaz).....	13
1.3.5.5 Toksinler.....	13
1.3.5.5.1. Alfa toksin.....	13
1.3.5.5.2. Beta toksin.....	14
1.3.5.5.3. Delta toksin.....	14
1.3.5.5.4. Gama toksin ve Panton- Valentine (PV) lökosidin.....	14
1.3.5.5.5. Eksfoliyatif Toksin.....	15
1.3.5.5.6. Enterotoksin.....	15
1.3.5.5.7. Toksik şok sendrom toksin-1 (TSST-1).....	16
1.4. <i>Staphylococcus aureus</i> ' un İdentifikasyonu.....	17
1.4.1. <i>S.aureus</i> ' un Biyokimyasal İdentifikasyonu.....	17
1.4.1.1. Lam koagülaz testi.....	17
1.4.1.2. Tüpte koagülaz testi.....	17
1.4.1.3. Lateks aglütinasyon.....	17
1.4.1.4. Pasif hemaglütinasyon.....	18
1.4.1.5. Deoksiribonükleaz (DNase) Testi.....	18
1.4.1.6. Termostabil endonükleaz Testi.....	18
1.4.1.7.Mannitol Fermentasyonu.....	19
1.4.2. <i>S.aureus</i> ' un Genotipik İdentifikasyonu.....	19
1.4.2.1. Pulsed- Field Gel Electrophoresis (PFGE).....	20
1.4.2.2. <i>spa</i> dizi tipleme.....	23
1.4.2.3. Multi Lokus Sequence Tiplemesi (MLST).....	23
1.4.2.4. SCC <i>mec</i>	27
1.5. MRSA'nın Epidemiyolojisi.....	36
1.5.1. Evcil Hayvanlarda MRSA Taşıyıcılığı.....	38

1.6. Antimikrobiyal Direnç.....	42
1.6.1. Penisilin Direnci.....	42
1.6.2. Metisilin Direnci ve Mekanizmaları.....	43
1.6.2.1. Penisilin Binding Proteinler.....	43
1.6.2.2. PBP2a.....	44
1.6.2.3. Metisilin Direnç Düzeyini Etkileyen Faktörler.....	45
1.6.3. Stafilokoklarda Metisilin Direncini Saptamaya Yönelik Yöntemler.....	47
1.6.3.1. Direnç Fenotipinin Belirlendiği Yöntemler.....	47
1.6.3.2. Direncin Belirlenmesinde Kullanılan Genotipik Yöntemler.....	48
1.7. Stafilokok Enfeksiyonlarında Tedavi.....	50
2. MATERYAL VE METOT.....	52
2.1. Gereç.....	52
2.1.1. İzolasyon Örnekleri.....	52
2.1.2. Kullanılan Besiyerleri, Ayraçlar, Solusyonlar ve Antibiyotik Diskler.....	52
2.1.2.1. Besiyerleri.....	52
2.1.2.1.1. Blood Agar.....	52
2.1.2.1.2. Mannitol Salt Phenol Red Agar.....	52
2.1.2.1.3. Mueller- Hinton Agar.....	52
2.1.2.1.4. Brain Heart Infusion Broth (BHIB) (%20 gliserinli).....	53
2.1.2.1.5. Trypton Soy Broth (TSB) (%7,5 Tuzlu).....	53
2.1.2.2. Ayraç ve Solusyonlar.....	53
2.1.2.2.1. EDTA (0,5 M).....	53
2.1.2.2.2. TBE (Tris, Borik Asit, EDTA, pH:8.0) Buffer.....	53
2.1.2.2.3. Gel Loading Buffer (6X).....	54
2.1.2.2.4. Tris (1M).....	54
2.1.2.2.5. 1M NaCl.....	54
2.1.2.2.6. TE Buffer.....	54
2.1.2.2.7. Hücre Süspansiyon Tamponu.....	54
2.1.2.2.8. Lizis Solusyonu 1.....	55
2.1.2.2.9. Lizis Solusyonu 2.....	55
2.1.2.2.10. Sarkozin (%10).....	55
2.1.2.3. Antibiyotik Diskleri.....	55

2.1.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	56
2.1.3.1. Kullanılan Cihazlar.....	56
2.1.3.2. MgCl ₂ , Taq DNA Polimeraz, 10X Taq Buffer, dNTP Set.....	56
2.1.3.3. Primerler.....	56
2.1.4. Elektroforez Cihazı.....	58
2.1.4.1. Agarose Jel Hazırlanışı.....	58
2.1.4.2. Marker.....	58
2.1.4.3. Etidium Bromür.....	58
2.1.4.4. Standart Suşlar.....	59
2.2. Yöntem.....	59
2.2.1. Örnekler.....	59
2.2.1.1. Süt Örnekleri.....	59
2.2.1.2. Burun Sıvı Örnekleri.....	59
2.2.2. MRSA İzolasyonu.....	59
2.2.2.1. Fenotipik İdentifikasyon.....	60
2.2.2.1.1. Katalaz Testi.....	60
2.2.2.1.2. Basitrasin Duyarlılık Testi.....	60
2.2.2.1.3. Koagülaz Testi.....	60
2.2.2.1.4. Sefoksitin Duyarlılık Testi.....	60
2.2.2.2. Genotipik İdentifikasyon.....	61
2.2.2.2.1. PCR.....	61
2.2.2.2.2. Amplikonların Elektroforez Tankına Yüklenmesi.....	64
2.2.2.2.3. Yürütme.....	64
2.2.2.2.4. Görüntüleme ve Değerlendirme.....	64
2.2.2.3. Pulsed Field Jel Elektroforezi (PFGE).....	64
3. BULGULAR.....	68
3.1. İzolasyon.....	68

3.2. PCR	68
3. 3. PFGE	70
3. 4. Sekans Analizine Dayalı Tiplendirme Yöntemleri: <i>spa</i> ve MLST Analizleri	70
3. 4. 1. PCR Sonuçları	70
3. 4. 2. Sekans Analizi Sonuçları	73
3.4.2.1. <i>spa</i> Analizi	73
3.4.2.2. MLST Analizi	74
4. TARTIŞMA	77
5. SONUÇ	86
ÖZET	88
SUMMARY	89
KAYNAKLAR	90
ÖZGEÇMİŞ	120
TEŞEKKÜR	121

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. <i>S.aureus</i> ’ un biyokimyasal ve diğer özellikleri.....	5
Çizelge 1.2. <i>S.aureus</i> türünün diğer <i>Staphylococcus</i> türleri ile karşılaştırılması.....	5
Çizelge 1.3. <i>S.aureus</i> tarafından üretilen toksik komponent ve toksinler.....	16
Çizelge 1.4. <i>S. aureus</i> ’ ta belirlenen SCC <i>mec</i> tipleri.....	28
Çizelge 1.5. Farklı SCC <i>mec</i> tiplerinin özellikleri.....	33
Çizelge 2.1. MRSA suşlarının belirlenmesinde kullanılan primerler, dizileri, ampikon büyüklükleri ve kaynak	56
Çizelge 2.2. SCC <i>mec</i> tipi belirlenmesinde kullanılan primer dizilimleri, ampikon büyüklükleri ve SCC <i>mec</i> tipi.....	57
Çizelge 2.3. MLST tipi belirlenmesinde kullanılan primerler, primer dizilimleri ve ampikon büyüklükleri.....	57
Çizelge 2.4. <i>spa</i> dizi tiplemesinde kullanılan primerler, primer dizilimleri ve ampikon büyüklükleri.....	57
Çizelge 2.5. Mastermiksin hazırlanma oranları.....	61
Çizelge 2.6. SCC <i>mec</i> mastermiksinin hazırlanma oranları	62
Çizelge 2. 7. <i>mecA</i> PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı.....	62
Çizelge 2.8. <i>nuc</i> PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı.....	62
Çizelge 2.9. SCC <i>mec</i> PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı.....	63
Çizelge 2.10. <i>spa</i> PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı.....	63
Çizelge 2.11. MLST PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı.....	63
Çizelge 3.1. MLST analizi sonucunda izolatların alellik profilleri.....	74
Çizelge 3.2. Sonuçların Toplu Değerlendirilmesi.....	75

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. <i>Staphylococcus aureus</i> ' un virulens faktörleri.....	13
Şekil 1.2. PFGE tiplene yönteminin çalışma mekanizması.....	21
Şekil 1.3. MLST Analizi.....	25
Şekil 1.4. MLST Analizi.....	25
Şekil 1.5. <i>ccr</i> genlerinin sınıflandırılması.....	28
Şekil 1.6. <i>mec</i> gen kompleksinin sınıfları.....	30
Şekil 1.7. SCC <i>mec</i> elemanlarının yapıları.....	35
Şekil 3.1. <i>S. aureus</i> suşlarının izole edildiği kaynağa göre dağılımları.....	68
Şekil 3.2. <i>spa</i> dizi tiplendirmesinin izolatlara göre dağılımı.....	74
Şekil 3.3. MLST sekans tiplerinin izolatlara göre dağılımı.....	75
Şekil 3.4. PFGE analizi sonucu elde edilen evrimsel ağaç.....	76

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1.1. Oliviera ve arkadaşlarının saptadığı SCC <i>mec</i> Tipleri.....	49
Resim 3.1. <i>mecA</i> PCR elektroforez görüntüsü.....	69
Resim 3.2. <i>nuc</i> PCR elektroforez görüntüsü	69
Resim3.3. SCC <i>mec</i> PCR elektroforez görüntüsü.....	69
Resim 3.4. <i>S.aureus</i> suşlarının PFGE ile elde edilen DNA bant paternleri	70
Resim 3.5. <i>spa</i> dizi tiplendirmesinin elektroforez görünümü.....	71
Resim 3.6. <i>arcC</i> genine ait elektroforez görüntüsü.....	71
Resim 3.7. <i>aroE</i> genine ait elektroforez görüntüsü	72
Resim 3.8. <i>glp</i> genine ait elektroforez görüntüsü	72
Resim 3.9. <i>gmk</i> genine ait elektroforez görüntüsü	72
Resim 3.10. <i>pta</i> genine ait elektroforez görüntüsü	72
Resim 3.11. <i>tpi</i> genine ait elektroforez görüntüsü	73
Resim 3.12. <i>yqiL</i> genine ait elektroforez görüntüsü	73
Resim 3.13. Pulsotip A olan 7 izolatların <i>spa</i> analizi sekans sonucu	73
Resim 3.14. Pulsotip B olan 3 izolatların <i>spa</i> analizi sekans sonucu	74
Resim 3.15. Pulsotip C olan 1 izolatların <i>spa</i> analizi sekans sonucu	74
Resim 3.16. Pulsotip D olan 1 izolatların <i>spa</i> analizi sekans sonucu	74

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

- BHIA:** Brain Heart Infusion Agar
CC: Klonal Kompleks
ccr: Kaset Kromozom Rekombinaz
CDS: Centers for Diseases Control and Prevention
CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute
DNA: Deoksiribo Nükleik Asit
eBURST : Based Upon Related Sequence Types
EDTA: Etilen Diamin Tetraasetik Asit
ETA-ETB : Eksolyatif toksin A-B
hVISA: Heterojen Vankomisin Dirençli *Staphylococcus aureus*
HK-MRSA: Hastane Kaynaklı Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus*
HLA: İnsan Lökosit Antijeni
ISS: Integrasyon Bölge Dizileri
kbp: Kilo Baz Pair
KNS: Koagulaz Negatif Stafilocok
KPS: Koagulaz Pozitif Stafilocok
MCA: MacConkey Agar
MHA: Mueller- Hinton Agar
MLEE: Multi Locus Enzim Elektroforezi
MLST: Multi Lokus Sekans Tiplemeşi
MIC: Minimal İnhibitör Konsantrasyonu
MPCR: Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu
MRS: Metisilin Dirençli Stafilocok
MRSA: Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus*
MRKNS: Metisilin Dirençli Koagulaz Negatif Stafilocok
MSCRAMM: Mikrobiyal Yüzey Komponent Reaksiyonu ile Adherens Matriks Molekülleri
MSSA: Metisiline Duyarlı *Staphylococcus aureus*
NAG: N- Asetil Glukozamin
NAMA: N- Asetil Muramik Asit

PBP: Penisilin Bağlayıcı Protein
PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis
PVL: Panton- Valentine Lökositin
rRNA: Ribozomal Ribo Nükleik Asit
RS: Ribozomal Spacer
SCC: Stafilokokal Kaset Kromozom
SCC*mec*: Stafilokokal Kaset Kromozom *mec*
SID: Simpson Ayrım İndeksi
***spa*:** Stafilokokal Protein A
SSSS: Stafilokokal Haşlanmış Deri Sendromu
ST: Sekans Tipi
TK-MRSA: Toplum Kaynaklı Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus*
TSB: Tryptone Soy Broth
TSST: Toksik Şok Sendromu Toksini
VISA: Vankomisine Orta Derecede Duyarlı *Staphylococcus aureus*
VRSA: Vankomisine Dirençli *Staphylococcus aureus*

1. GİRİŞ

1. 1. Tarihçe

Stafilokokların, fare ve kobaylarda hastalık yaptığı 1881 yılında Alexander Ongston tarafından gösterildikten sonra, ilk kez 1898 yılında Robert Koch tarafından tanımlanmış ve o zamandan bu yana yaklaşık 100 yıldan daha uzun bir süredir önemli enfeksiyon etkenlerinden biri olarak tıp dünyasını meşgul etmektedir (Boyce 1994, Haznedaroğlu 2009).

Stafilokoklar o dönemlerde insanlarda tedavisi güç, çok ağır seyreden ölümcül enfeksiyonlara sebep olmaktadır. Alexander Fleming'in 1928 yılında penisilini bulmasını takiben 1940 yılında bu antibiyotiğin kullanıma başlanması ile birlikte stafilokokal enfeksiyonlarının tedavisinde önemli başarılar sağlanmıştır. Bununla birlikte, penisilinin yaygın kullanımı sonucunda, penisilini etkisizleştiren stafilokok türleri ortaya çıkmıştır. Stafilokoklarda penisilin direnci 1940'lı yılların ortalarından itibaren giderek artmıştır, 1950'li yıllarda penisilinin yanı sıra tetrasiklin, eritromisin ve streptomisin gibi antibiyotiklere de direnç gelişimi gözlenmiştir (Boyce 1994, Wenzel 1998, Haznedaroğlu 2009).

1960 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, 1961 yılında stafilokoklarda metisilin direnci tanımlanmış ve 1970'li yılların sonu ile 1980'li yılların başlarından itibaren de metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşlarında çoklu antibiyotik direnci ortaya çıkmaya başlamıştır. Günümüzde direnç sorununun giderek yaygınlaşması ile birlikte MRSA tüm dünyada özellikle hastane enfeksiyonu salgınlarına yol açan çok ciddi bir sorun haline gelmiştir (Boyce 1994, Wenzel 1998, Haznedaroğlu 2009).

Hayvanlarda ilk MRSA izolasyonu 1972 yılında mastitisli sığırlardan elde edilirken, bunu 1988 yılında kedi ve 1989 yılında köpek izolasyonları izlemiştir. Daha sonra dünyanın pek çok yerinde izolat sayısının artması ile MRSA enfeksiyonlarının hayvanlarda da önemli bir sorun olmaya başladığı görülmüştür (Leonard ve Markey 2008, Morgan 2008). MRSA suşlarının artık insan ve hayvanlar arasında bulaşabildiği bildirilmektedir (Juhasz-Kaszanyitzky ve ark. 2007, Morgan 2008). Hem mastitisli sığırlardan hem de onların bakıcılarından MRSA izolasyonu, MRSA suşlarının insan ve hayvanlar arasında bulaşabildiğini yani zoonotik önemlerinin olabileceğini göstermiştir. Hastane kökenli MRSA klonlarının köpeklerde (Rich ve ark. 2005) ve mastitisli sığır sütlerinde (Türkyılmaz ve ark. 2010) bulunması MRSA suşlarının insanlardan hayvanlara bulaşabileceğini düşündürmüştür. Weese ve ark. (2005), hem at çiftliklerinde hem de kliniklerde tedavi gören atlarda önemli oranlarda MRSA belirlemiş ve yaptıkları alt tiplendirme çalışmalarında karşılıklı at-insan bulaşını ortaya koymuştur. Ayrıca Kanada'da yapılan bir çalışmada burada izole edilen bölgesel MRSA suşlarının sağlıklı atların nazal mukozalarına adapte ve kolonize olduğu, bu hayvanlarla yakın temas sonrası insanlara bulaşabileceği bildirilmiştir (Willey ve ark. 2006). Duijkeren ve ark. (2004), sağlıklı bir köpeğin burnundan ve sahibinden aynı MRSA suşunu izole etmişler ve insandan köpeğe MRSA suşunun geçebildiğini bildirmişlerdir.

Son 25 yıldır çoklu dirençli MRSA suşlarına bağlı enfeksiyonların artması nedeniyle stafilokokal nozokomiyal (hastane kaynaklı) enfeksiyonların tedavisinde glikopeptid grubu antibiyotiklerden özellikle vankomisin kullanılmaya başlanmıştır. İlk olarak 1995'de Fransa'da (Ploy ve ark. 1998), 1996'da Japonya'da (Hiramatsu ve ark. 1997), 1997'de ABD (CDS 2004), Honk Kong (Mcmanus 1999), Kore'de (Mi-Na ve ark. 2000), Türkiye'de insanlarda ve hayvanlarda (Türkyılmaz ve ark. 2010) vankomisine orta derecede duyarlı *S. aureus* (Vankomisin Intermediate *S. aureus*-VISA) suşlarının izole edilmesi direnç sorununun ne kadar önemli olduğunu göstermiştir. İnsanlarda vankomisine dirençli ilk *S. aureus* (VRSA) suşu Haziran 2002'de ABD'de diyaliz tedavisi gören 40 yaşındaki bir erkek hastanın kataterinden izole edilmiştir (CDS 2002). VRSA suşları çeşitli ülkelerde gittikçe artan sayıda bildirilmesine karşın, ülkemizde henüz böyle suşların varlığı bildirilmemektedir. Ancak Türkiye'de heterojen dirençli suşlar görülmeye başlanmıştır. İlk heterojen direnç suşu (hVISA) 1998 yılında bildirilirken (Gülay ve ark. 1998), heteroglikopeptid (vankomisin ve teikoplanin) direnci, koagülaz negatif stafilokok suşlarında *S. aureus* suşlarına göre daha yüksek oranda (%11 ve %13) bildirilmiştir (Yaşar ve ark. 2004).

1. 2. Genel Özellikleri

Bergey'in 1986 yılında yaptığı sistematik bakteriyoloji sınıflandırmasına göre, *Staphylococcus* cinsi "*Micrococcus*", "*Stamatococcus*" ve "*Planococcus*" cinsleriyle birlikte "*Micrococcaceae*" familyası içerisinde yer almaktadır. Yunanca üzüm salkımı anlamına gelen *staphyle* ve *coccus* sözcüklerinden türetilmiştir. Bu yüzden *Staphylococcus*, bu Gram pozitif kokların üzüm tanelerinin kümelenmesine benzer şekildeki üremesini ifade etmek için kullanılır. Ancak klinik materyallerde bu mikroorganizma tek, çift veya kısa zincirler halinde de görülebilir (Bilgehan 2004).

Stafilokoklar Gram pozitif bakterilerdir. Çoğu ortamda kolayca üreyebilir ve metabolik olarak aktiftirler. Karbonhidratları fermente edebilirler ve beyazdan koyu sarıya kadar değişebilen pigmentler üretirler. Bazı türleri insan ve hayvan müköz membranları ve derilerinde normal flora bakterisi olarak yaşarken diğerleri cerahat, apse oluşumu, çeşitli piyozen enfeksiyonlar ve öldürücü septisemilere neden olmaktadır (Koneman ve ark. 2006, Brooks ve ark. 2007).

Patojen stafilokoklar genellikle kanı hemoliz ederler, plazmayı pıhtılaştırırlar ve ayrıca çeşitli ekstraselüler enzim ve toksinleri üretirler. Stafilokoklar antimikrobiyal ajanlara direnç geliştirerek güç tedavi sorunlarına yol açarlar (Koneman ve ark. 2006, Brooks ve ark. 2007).

Staphylococcus cinsi içerisinde en az 35 tür yer almaktadır. Bu cins içinde en çok bilineni *S. aureus*' tur. Diğer türlerden farklı olarak *S. aureus*, koagulaz pozitifdir ve en önemli patojendir. Hemen herkes hayatları süresince *S. aureus* enfeksiyonlarının bazı tipleri ile karşılaşmaktadır. Geçmişte sadece normal flora bakterisi olarak kabul edilen koagulaz negatif stafilokok (KNS) türlerinin günümüzde zararsız etkenler olmadığı bilinmektedir (Taponen ve Pyorola 2009). Klinik örneklerden en sık izole edilen stafilokok türü deride flora etkeni olan *Staphylococcus epidermidis*'tir (Kawamura ve ark. 1998, Alen ve ark 2006). Stafilokoklar genelde buldukları yerde konakla iyi huylu ve simbiyotik bir ilişkiye sahiptirler, ancak deri ve mukoza travma, enjeksiyon veya cerrahi müdahaleler sonucu oluşan portantreler ile dokuya girerek patojen olabilirler (Bannerman 2003).

1. 3. Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

1. 3. 1. Görünüm ve Boyanma

Stafilokokların çoğu 0,5-1,5 µm çapında; hareketsiz, sporsuz, kısa zincirler ya da düzensiz kümeler oluşturan küresel şekilli Gram pozitif boyanan mikroorganizmalardır (Bilgehan 2004).

1. 3. 2. Üreme ve Kültür Özellikleri

Stafilokoklar aerob ve fakültatif anaerobik bakterilerdir. Yüksek tuz konsantrasyonunda (%10 NaCl) ve 18–40°C arasında klasik besiyerlerinde üreyebilme özelliklerine sahiptir. Optimal üreme ısısı 30-37 °C ve pH: 7-7,5'dir. Kanlı agarda 18-24 saatte yuvarlak, düzgün kenarlı, hafif konveks, opak, 1-4 mm çapında koloniler oluştururlar (Bilgehan 2004). *S. aureus*, 18-24 saatte pigmentli (sarı-portakal rengi, krem rengi), S tipli, yuvarlak, hafif kabarık ve çoğunluğu kanlı agarda beta hemoliz yapan koloniler oluşturur. Belirgin kapsül oluşturan suşlar parlak ve nemli bir görünüme sahiptir. *S. aureus*' un kanlı besiyerinde küçük, pigmentsiz ve hemoliz oluşturmeyen küçük varyantları tanımlanmıştır (Bannerman 2003, Peacock 2005, Morgan 2008). Yüksek tuz yoğunluğunda üreyebilen *S. aureus*' un diğer stafilokoklardan ayırımı Mannitol Salt Agar (MSA)' da mannitolü fermente ederek koloniler etrafında sarı bir hale oluşturmasıyla ayrılır. Ancak *S. saprophyticus* gibi diğer bazı stafilokoklar da mannitolü fermente ederek benzer koloniler oluşturabilirler (Bannerman 2003, Peacock 2005, Morgan 2008).

Kuvvetli slaym tabakası oluşturan nadir türler mukoid koloni morfolojisine sahiptirler. Koloni büyüklüğü *S. haemolyticus*' da *S. epidermidis* ve *S. hominis*' e göre belirgindir. *S. aureus* ile birlikte *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus* suşlarının bazılarında da beta hemoliz görülebilir (Bannerman 2003, Alen ve ark. 2006).

1. 3. 3. Biyokimyasal Özellikleri

Stafilokok identifikasyonunda en önemli test koagülaz aktivitesinin belirlenmesidir. Bugün *S. aureus* identifikasyonu için tüp koagülaz testi referans olarak kabul edilmektedir. Stafilokoklar, streptokoklardan farklı olarak katalaz üretmektedirler. Stafilokoklar

karbonhidratları asit oluşturarak yavaş bir şekilde fermente ederler fakat gaz üretmezler. Stafilocoklar glukozu fermente eder ve son ürün olarak laktik asit oluşturular. Ayrıca laktoz, sükröz, mannoz, trehaloz ve maltozu da fermente edebilirler. Mannitolü ise sadece *S. aureus* fermente eder (Juhasz- Kaszanyitzky ve ark 2007, Morgan 2008). Patojen stafilocoklar çok sayıda ekstraselüler madde üretmektedir. Stafilocoklar kuru hava koşullarına, ısıya (50°C'ye 30 dakika) ve %9 sodyum klorüre dayanıklıdırlar. Fakat heksaklorofen (%3) gibi güçlü kimyasallar ile kolayca inaktive edilirler. Furazolidon ve lizostafine duyarlı olmalarına karşılık, basitrasin ve lizozime direnç gösterirler. Nitratları nitritlere indirgerler. Stafilocoklar çoğu antimikrobiyal ilaçlara duyarlıdır (Bannerman 2003, Alen ve ark 2006, Brooks ve ark 2007). *S. aureus*'un biyokimyasal ve diğer özellikleri Çizelge 1. 1'de (Cengiz 1999), *S. aureus*'un diğer stafilocok türleri ile karşılaştırılması Çizelge 1. 2'de (Joklik 1992) gösterilmiştir.

Çizelge 1. 1. *S. aureus*' un biyokimyasal ve diğer özellikleri

Özellik	<i>S. aureus</i>	Özellik	<i>S. aureus</i>
Aerobik ortamda üreme	+	Ksiloz	-
Anaerop ortamda üreme	+	Sellobioz	-
Hemoliz	+	Glikoz	+
Koagulaz	+	Hücre duvarı	
DNA'ase (Endonükleaz)	+	Ribitol	+
TMPA'da renk değişikliği	+	Gliserol	-
Asetoin	+	Protein A	+
Mannitol (asit oluşturma)	+	Alfa toksin	+
Trehaloz	+	Novobiosin duyarlılığı	+
Maltoz	+	Basitrasin duyarlılığı	-
Laktoz	+		

Çizelge 1. 2. *S. aureus*'un diğer stafilocok türleri ile karşılaştırılması

	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. saprophyticus</i>
Koagulaz	+	-	-
Anaerobik ortamda üreme ve glikoz fermentasyonu	+	+	-
Mannitol			
Aerobik ortamda asit üretimi	+	Değişken	Değişken
Anaerobik ortamda asit üretimi	+	-	-
α toksin	+	-	-
Isıya dayanıklı endonükleazlar	+	-	-
Üreme için biyotin ihtiyacı	-	+	Test edilmemiş
Hücre duvarı			
Ribitol	+	-	+
Gliserol	-	+	Değişken
Protein A	+	-	-
Novobiosin hassasiyeti	Hassas	Hassas	Dirençli

1. 3. 4. Genomik Yapı

Genomu yaklaşık 2000-3000 kbp büyüklükte kromozom ile profajlar, plazmidler ve transpozonlardan oluşmaktadır. Stafilocokların DNA'larındaki G+C oranı %30-90'dır (Tünger 2004, Peacock 2005). *S. aureus* genomu, 2500'e yakın geni kodladığı düşünülen 2800 kbp uzunluğunda tek bir kromozomdan oluşup, G+C içeriği yaklaşık %32' dir (Baba ve ark. 2002, Holden ve ark. 2004, Gill ve ark 2005). Bakterinin virulensinde ve direncinde sorumlu olan genler diğer *S. aureus* kökenlerine, stafilocok türlerine ve farklı cins Gram-pozitif bakterilere en sık olarak transdüksiyon ile aktarılmaktadır (Tünger 2004).

1. 3. 5. Virülens ve Patojenite

Stafilocok türleri konak organizmaya girdikleri bölgede ekstraselüler çeşitli maddeler oluşturarak değişik klinik tablolara sebep olabildikleri gibi konak dokuları arasında ve/veya kanda yayılmak suretiyle de enfeksiyona neden olabilirler (Koneman ve ark. 1997).

Stafilocoklar hücrenel komponent, enzim, ekstraselüler toksin ve hemolizin üreterek konak hücrede tahribata sebep olmaktadır. *S. aureus*' da bulunan kalın peptidoglikan tabaka virulense katkıda bulunmaktadır. Peptidoglikan tabaka aynı zamanda beyaz kan hücrelerinin agregasyonu ve komplement sisteminin aktivasyonu ile sonuçlanan makrofajlar tarafından çeşitli sitokinlerin salgılanmasını da uyarır. Aynı zamanda *S. aureus* özellikle MRSA suşlarında bulunan 5 serotip içeren mikrokapsül de salgılamaktadır (Lowy 1998).

S. aureus gibi primer hücre dışı bakteriyel patojenler; konağın hücre dışı matriks (Ekstraselüler Matriks-ECM) komponentlerine kolonize olmak için bağlanır. Yapışma hücre dışı peptidoglikan tabakasına "Adhesiv Matriks Molekülleri" olarak bilinen "Mikrobiyal Yüzey Komponentleri" (MSCRAMM)'nin kovalent olarak bağlanması ile gerçekleşir (Foster ve Höök 1998). MSCRAMM olarak bilinen yüzey proteinleri aşağıda özetlenmiştir.

Fibrinonektin bağlayan yüzey komponentleri (FnBPA-FnBPB): Bakterinin yapışmasında rol oynayan stafilocokal proteinler fibrinonektine bağlanan proteinlerdir. Fibrinonektine bağlanma, çoğu *S. aureus* suşu için temel bir özelliktir ve *S. aureus*'da iki gen tarafından kodlanan 2 adet fibronektin bağlayan protein vardır. Bunlar; fibronektin bağlayan Protein A (*FnBPA*) ve fibronektin bağlayan Protein B (*FnBPB*)' dir (Jonsson ve ark. 1991,

Greene ve ark. 1995). Bu proteinler in vitro koşullarda fibronektine bağlanarak *S. aureus*'un biyomateryallere yapışmasını sağlar. Bu durum bazı enfeksiyonların gelişimi ile sonuçlanır (Vaudoaux ve ark. 1993, Greene ve ark 1995).

Stafilokokal Protein A (spa): *S. aureus*'un en önemli yüzey proteinlerinden biri olan *spa*, 42 kDa ağırlığındadır ve hücre duvarının %7'sini teşkil eder. Bu protein IgG'nin Fc bölgesine bağlanarak opsonofagositozu inhibe eder. Bu bağlanma aynı zamanda hem klasik hem de alternatif yolla komplementin aktivasyonuna neden olur (Palmqvist ve ark. 2002, Gao ark 2004, Todar 2005). *Spa*; *S. aureus* suşlarının %90-95 inde bulunur ve sadece *S. aureus* suşlarında bulunan gruba özgü bir antijendir. Protein A'dan yoksun *S. aureus* suşlarının, in vitro koşullarda kolayca fagosite olduğu gösterildiğinden *spa* önemli bir virülens faktörü olarak kabul edilir (Akan 1993, Todar 2005).

Fibrinojen bağlayan MSCRAMM'lar (ClfA- ClfB): *S. aureus*'un fibrinojen kaplı substratlara bağlanma ve fibrinojen varlığında aglütine olabilme yeteneğini sağlayan bu protein, kümelenme faktörü (Clumping Factor – *ClfA*) adını alır (Foster ve Höök 1998). Bağlı koagulaz olarak da adlandırılan kümelenme faktörü Stafilokokların hücre yüzeyinde meydana gelir ve serbest bırakılmaz (Akan 1993). *S. aureus*' un fibrinojene spesifik olarak bağlanması temel olarak *ClfA* ve *ClfB* ile sağlanır. *ClfA*'nın inaktivasyonu, in vitro ve in vivo koşullarda fibrinojen kaplı yüzeylere *S. aureus*' un bağlanmasını inhibe eder (Wolz ve ark. 2002). *ClfA* bakterinin tüm çoğalma dönemlerinde bulunmasına rağmen; *ClfB* sadece erken çoğalma fazındaki hücrelerde bulunur ve durağan fazdaki hücrelerin yüzeyinden kaybolur (Foster ve Höök 1998).

Kollajen Bağlayan Protein (Cna): Kollajen bağlayan protein (*Cna*) kollajen maddelere ve kollajen dokulara bakteri hücrelerinin tutunmasına yardımcı olur. In vitro koşullarda *S. aureus*' un kıkırdağa yapışması için *Cna* gereklidir. *Cna*'ya karşı oluşan antikolar, kollajen dokulara bakterinin bağlanmasını inhibe ederek kıkırdağa bakteri tutunmasını engeller (Foster ve Höök 1998).

1. 3. 5. 1. Kapsül ve Slaym Tabaka

Kapsül; bakteriyi fagositozdan korur. Genetik faktörler ve üreme ortamlarına bağlı olarak, çoğu stafilokok tarafından monosakkarid, protein ve küçük peptidlerin oluşturduğu,

suda çözünebilir, gevşek bağlı ince bir yapı olan slaym tabaka üretilir. Bu ekstraselüler yapı bakteriyi dokulara ve katater, greft, protez materyallere ve şant gibi yabancı cisimlere bağlar. Bu da özellikle avirulan KNS'ların yaşamı için önemlidir. Stafilokokların hücre duvarının en dış tabakası polisakkarid kapsül ile örtülebilmektedir. *S. aureus*' da 11 kapsüler serotip tanımlanmaktadır. Enfeksiyonların çoğu serotip 5 ve 7 ile ilişkilidir. Serotip 1 ve 2 çok kalın bir kapsüle sahiptir ve mukoid görünümlü koloniler oluşturur (Muray ve ark. 2005).

1. 3. 5. 2. Hücre Duvarı

1. 3. 5. 2. 1. Peptidoglikan Tabaka: Hücre duvarının temel yapısını oluşturan, hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilerde bulunan karmaşık bir makromoleküldür. Stafilokokların hücre duvarı ağırlığının yarısı bu tabakadan oluşmaktadır. İnsan hücrelerinde bulunmayıp bakteri hücrelerinde bulunduğu için antibakteriyel ilaçlar için iyi bir hedef oluşturmaktadır. Glikan zincirlerin tabakalarından oluşan peptidoglikan iskelet N-asetilmuramik asit (NAMA) ve N-asetilglukozaminin (NAGA) 10-12 farklı subünitesinden meydana gelir. NAMA subünitelerine bağlanan oligopeptid yan zincirler pentaglisin köprüleriyle çapraz bağlanırlar. Çapraz bağlar hücre duvarının sağlamlığını sağlar ve bu bağların yapısı türler arasında farklılık gösterir. *S. aureus*' da çapraz bağlantı oranı yüksektir ve bu özellik bakterinin lizozim enzimine karşı dirençli olmasını sağlar (Ünal 2004, Lodise ve ark. 2005, Muray ve ark. 2005).

Hücre duvarı sentezi çoklu enzimatik adımlardan oluşan bir süreçtir. Özetle; disakkarit peptid şeklindeki prekürzörler plazma membranından transport edilir ve hücre duvarı sentezine katılması sağlanır. Son basamakta, oluşan peptid zinciri henüz çapraz bağlanmış peptid ve önceden hazırlanmış peptidoglikan arasında peptid bağı oluşturur. Bu bağlanma transpeptidaz enzimleri tarafından gerçekleştirilir. Bu transpeptidasyon olayı 3 boyutlu bir ağ oluşumuna sebep olur ve hücre duvarına tam bir sağlamlık kazandırır (Cottagnoud 2002). Transpeptidaz ve karboksipeptidazlar gibi hücre duvarı sentezinin son basamağına katılan bütün enzimler plazma membranına sıkıca bağlanmış durumdadırlar. Bu enzimler beta-laktam antibiyotiklere kovalent olarak bağlandıkları ve yine bu antibiyotikler tarafından inaktive edildikleri için penisilin bağlayan proteinler (PBP) olarak isimlendirilirler (Cottagnoud 2002). PBP'ler hücre duvarında bulunan transpeptidaz, karboksipeptidaz ve endopeptidaz gibi enzimlerdir. Bu enzimler bakterinin büyüme ve bölünmesi sırasında hücre duvarının oluşumu ve şekil almasından sorumludurlar. Bakteriler yapıları birbirine benzeyen 4 ayrı özellikte PBP

oluştururlar (Cottagnoud 2002). Bakteri türlerinde PBP'lerin sayısı, büyüklüğü, penisilinlerin bunlara afinitesi ve bu proteinlerin inaktivasyonları sonucunda bakteride farklı etkinlikler ortaya çıkar. Penisilinler bağlandıkları PBP'lere göre bakteride farklı etki gösterirler. *S. aureus*'larda hücre duvarı sentezinde normalde PBP 1,2 ve 3 görev alır. Bunlara ek olarak MRSA'lar farklı bir PBP olan PBP2a'ya sahiptirler. PBP'lerin inaktivasyonu bakterinin ölümüne yol açarken PBP'nin beta-laktam antibiyotiklere olan afinitesindeki azalma ise dirence neden olur (Cottagnoud 2002).

1. 3. 5. 2. 2. Teikoik Asit: Teikoik asit, suda eriyebilen, fosfodiester bağları ile peptidoglikan tabakasına kovalent olarak bağlanan uzun zincirler oluşturan şeker-alkol-fosfat polimerleridir. Hücre duvarı kuru ağırlığının yaklaşık olarak %30-50'ini oluşturur. Kalınlığının yaklaşık 10-12 nm arasında olduğu belirlenmiştir. Ribitol teikoik asit ve gliserol teikoik asit olmak üzere iki tipi bulunmaktadır (Ünal 2004, Lodise ve ark. 2005, Moreillon ve ark 2005). Tipe özgüdür. *S. aureus*'da ribitol teikoik asit ile NAGA rezidüleri bulunur. Teikoik asit *S. aureus*'un mukozal yüzeylerde fibronektine bağlanmasına aracılık eder. Teikoik asit zayıf immünojen olmakla birlikte, peptidoglikana bağlandığında özgül antikor cevabını uyarır. Antikor cevabının izlenmesi, sistemik stafilokok enfeksiyonlarının tespitinde kullanılsa da diğer tanısal testlere göre daha az duyarlıdır (Murray ve ark 2002). *S. aureus*'da peptidoglikan yapının içerdiği diğer proteinler olarak adezinler, fibronektin bağlayan protein, kollajen bağlayan protein ve clumping (kümelenme) faktör sayılabilir (Winn ve ark. 2006).

1. 3. 5. 2. 3. Yüzey Proteinleri: Protein A, elastin, kollajen, fibronektin bağlayan protein ve kümeleşme faktörü kimyasal yapıları ve hücre duvarı yerleşimleri birbirine benzeyen stafilokoklara özgü yüzey proteinleridir. Bu proteinler stafilokokların konak dokularına kolonize olmalarını sağlar (Cengiz ve ark 1999, Tünger 2004, Peacock 2005, Alen ve ark. 2006). Protein A, 42 kDa ağırlığında olup bu grubun protipidir. İlk olarak 1940'da Werney tarafından tanımlanmıştır. Büyük bir kısmı peptidoglikan yapıya kovalent olarak bağlanmıştır. Bir kısmı ise hücre dışı ortama salgılanmaktadır (Moreillon ve ark 2005, Peacock 2005, Alen ve ark 2006). En önemli özelliği IgG3 dışında tüm IgG, IgA2 ile bazı IgM'lerin Fc reseptörleri ile birleşebilmesidir. Bu özelliği Protein A'ya antikomplementer ve antifagositer etkinlik kazandırır (Cengiz ve ark. 1999, Alen ve ark 2006).

1. 3. 5. 3. Stoplazmik Membran

Stoplazmik membran; protein, lipid ve az miktardaki karbonhidratların birleşmesinden oluşmaktadır. Hücrede osmotik bariyer olarak çalışır. Hücre biyosentezinde ve solunum enzimlerinin sentezlenmesinde görevlidir (Muray ve ark. 2005).

1. 3. 5. 4. Enzimler

1. 3. 5. 4. 1 Katalaz: Tüm stafilokoklar tarafından üretilir. Bu enzim stafilokokların fagositozunda oluşturulan toksik hidrojen peroksiti su (H₂O) ve oksijene (O₂) ayırıştırır. Böylece bakterinin fagositoz sonrası yaşaması kolaylaşır (Koneman ve ark. 1997).

1. 3. 5. 4. 2. Koagulaz: Konak dokuda stafilotrombin adı verilen proteolitik etkinliği olan stabil bir kompleks oluşturur. Stafilotrombin, fibrinojeni fibrine dönüştürerek pıhtılaşmayı sağlar (Todar 2005). Koagulazın 4 farklı antijenik tipi vardır ve bunlar çeşitli memeli plazmalarını pıhtılaştıran birbirlerinden farklı özelliklere sahip enzimlerdir. Koagulaz fibrinojen ile doğrudan reaksiyona girmez, fakat plazmanın bir faktörü olan CRF-protrombin ile reaksiyona girerek trombin benzeri bir madde oluşturur (Akan 1993). Tüm *S. aureus* suşları plazmayı pıhtılaştıran bir enzim olan koagulazı üretir. Koagulaz oluşturan bütün suşlar *S. aureus* olarak tanımlanır ve klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında *S. aureus* identifikasyonu için kullanılan geleneksel bir göstergedir. Bu enzimin patojenitedeki rolü, bakterinin üzerini fibrinle örterek fagositozu inhibe etmesinden ileri gelmektedir. Ayrıca bakteriyi lökosit içi yıkıma karşı korumaları ve serumun normal bakterisidal aktivitesine karşı antagonist bir etki göstermeleri nedeni ile koagulazın virülensde özel bir önemi vardır (Akan 1993, Todar 2005). *S. aureus* suşlarının çoğu, hem tüpde yapılan koagulaz testinde plazmayı jele çeviren serbest koagulazı hem de lam üzerinde yapılan koagulaz testinde kokları aglütine eden bağlı koagulazı oluşturur. Az bir kısım suş ise sadece birini üretir (Mackie ve McCartney 1989).

Hücreye bağlı olan koagulaz kümelenme faktörü taşıyan stafilokoklar plazma ile karıştırıldığında, koagulaz aktivesi için “Coagulase Reacting Factor (CRF)”e gereksinim göstermezler. Fibrinojenin direkt olarak fibrine dönüşümü ile hücre yüzeyinde fibrin presipitasyonu meydana gelir ve bunun sonucu olarak da stafilokoklar aglütinasyona uğrarlar. Bu nedenle etki mekanizması, serbest koagulazın etki mekanizmasıyla aynı değildir. Serbest

koagulaz protein yapıdadır ve proteolitik enzimlerle kolaylıkla inaktive edilir. Bu enzim, fibrinojenin fibrine dönüşmesi ile plazmanın pıhtılaşmasına neden olan ve normal olarak plazmada var olan CRF'ü aktive ederek iş görür (Akan 1993).

1. 3. 5. 4. 3 Slaym Faktör: Slaym maddesi amorf yapıda glikokaliks materyalleri olup %40 karbonhidrat, %27 protein içermektedir. Kuvvetli antijenik yapıda olduğundan, tavşanlara şırınga edildiğinde çok yüksek titrede antikor cevabı elde edilir. Slaym pozitif stafilokok suşlarının daha virülan ve antibiyotiklere daha dirençli oldukları bildirilmektedir. Slaym faktör hücrel immun yanıtı baskılar, opsonizasyonu, nötrofil kemotaksisini ve nötrofil fagositozunu inhibe eder (Cengiz ve ark 1999, Alen ve ark 2006).

1. 3. 5. 4. 4. Lipazlar: *S. aureus*' un tüm suşları ve KNS'lerin %30'undan fazlası birkaç farklı lipaz üretir. Lipidleri hidrolize eden bu enzimler vücudun yağlı bölgelerinde stafilokokların lokalizasyonunu sağlayan bir fonksiyona sahiptir (Cauwelier ve ark 2004)

1. 3. 5. 4. 5. Penisilinaz (Beta-laktamaz): Penisilin ilk klinik kullanıma girdiği 1941 yılında stafilokoklar büyük oranda penisiline duyarlı iken, organizmanın ürettiği penisilinaz sayesinde bugün stafilokokların %90'ından fazlası penisilinaz dirençli durumdadır (Murray ve ark. 2002). Betalaktamaz enzimi; penisilin, sefalosporin ve benzer beta-laktam antibiyotikleri hidrolize ederek bu antibiyotiklere direnç gelişimine neden olur. Beta-laktam halkasındaki karbonil grubu ile bir ester köprüsü oluşturan bu enzimler siklik amid bağını bozar ve bir açil-enzim türevidir. Bu reaksiyonlar sonucunda beta-laktam antibiyotikler ile reaksiyona giren 3 grup protein vardır:

1-Karboksi peptidazlar (Düşük molekül ağırlıklı penisilin bağlayan proteinler (PBP))

2-Transpeptidazlar (Yüksek molekül ağırlıklı PBP'ler)

3-Beta-laktamazlar (Berger-Bachi ve ark. 2002)

Bütün PBP' ler yanısıra, betalaktamazların çoğunluğu aktif bölgelerinde bir serin aminoasidine sahiptir. Bu nedenle "serin peptidazlar" olarak adlandırılan bir enzim ailesinde yer alırlar. Bu enzimin beta-laktam ajanlara bağlanması sırasında önce bir açil-enzim türevidir oluşmaktadır. Bunu izleyen basamakta, bir diaçilasyon işlemi gerçekleşir ve enzim açil molekülünden ayrılarak rejener olur. PBP'ler ve beta-laktamazlar arasındaki farkı bu diaçilasyon basamağının hızı belirler. Beta-laktamazlar açil türeviden kısa sürede ayrılır, ancak PBP'lerde bu basamak gerçekleşmez. Sonuçta reaksiyon betalaktamazların aksine

enzim inaktivasyonu ile sonlanır. Geniş bir enzim grubu olan beta-laktamazlar molekül yapılarına ve işlevsel özelliklerine göre sınıflandırılırlar. Bu güne kadar 4 farklı molekül sınıfı (A, B, C, D) tanımlanmıştır. A, C ve D molekül sınıflarında yer alan beta-laktamaz yukarıda açıklanan serin-ester aracılı mekanizma ile işlev görür. Sınıf B beta-laktamazlar ise kofaktör olarak çinko gerektiren metalloenzimlerdir. A sınıfı, tercihen substratı penisilinler olan beta-laktamazlardan oluşur. Bu grup enzimler içinde *S. aureus*' un beta laktamazları da (grup 2a) yer alır (Gülay 1999). Gram pozitif bakteriler arasında beta-laktamaz üreten en önemli patojen stafilokoklardır. Stafilokokal beta-laktamazlar tercihen penisilinleri hidrolize ederler. Çoğu indüklenebilen ve ekstraselüler olarak salınabilen enzimlerdir. Stafilokokal beta-laktamazlar genellikle küçük plazmidlerle veya transpozonlarla taşınmakla beraber, büyük plazmidlerin kodladığı beta-laktamazlar ve diğer direnç mekanizmaları da bulunmaktadır. Bu beta-laktamaz enzimini kodlayan genler sadece *S. aureus*' lar arasında değil, *S. aureus* ve *S. epidermidis* arasında da konjugasyonla transfer edilebilir (Kuyucu 2007).

1. 3. 5. 4. 6. Hyaluronidaz: Hyaluronik asiti hidrolize eder. Bu enzim *S. aureus*' un dokuda yayılımını kolaylaştırır. *S. aureus* suşlarının %90' dan fazlası bu enzimi üretir (Cengiz 1999, Bilgehan 2000, Murray ve ark. 2002, Winn ve ark. 2006).

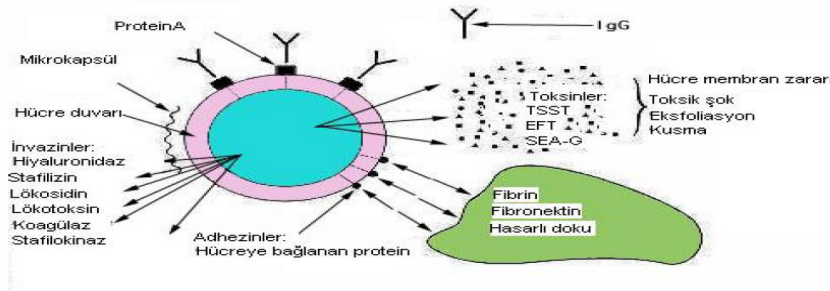
1. 3. 5. 4. 7. Fibrinolizin (Stafilokinaz): Birçok *S. aureus* suşu stafilokinaz olarak adlandırılan bir plazminojen aktivatörü salgılar. Bu faktör fibrinolitik etkinliğe sahiptir ve üretilmesi lizojenik bakteriyofajlarla sağlanır. Stafilokinaz ve plazminojen arasında oluşan bir kompleks, fibrin pıhtılarının erimesine sebep olan proteolitik aktiviteyi indükler. Tıpta koroner trombozu olan hastaları tedavi etmek için kullanılan streptokinaz ile benzer mekanizmaya sahiptir. Stafilokinaz, streptokinazın aksine ısıya dirençlidir (Akan 1993, Todar 2005). *S. aureus* suşlarının çoğu tarafından oluşturulmasına rağmen ve lokalize fibrinolizinin bakteriyel yayılmaya yardım edebildiği düşüncesine karşılık stafilokinazın bir virülens faktörü olduğuna dair çok kuvvetli bir kanıt yoktur (Todar 2005).

1. 3. 5. 4. 8. Fosfatid-Spesifik Fosfalipaz İnositol C: Özellikle erişkin tip solunum zorluğu sendromu ve dissemine intravasküler koagülasyon bulunan hastalardan izole edilen suşlarda saptanan bir enzimdir. Bu suşlar, antimikrobiyal ajanlara özellikle de penisiline daha dirençlidir (Alen ve ark. 2006).

1. 3. 5. 4. 9. Termostabil nükleaz (TNaz): Tüm *S. aureus* suşları endo ve ekzonükleolitik özelliklere sahip DNA veya RNA'yı parçalayabilen ısıya dayanıklı bir termonükleaz enzimini salgırlar (Bannerman 2003). TNaz üretimi, *S. aureus* identifikasyonunda doğrulayıcı bir test olarak kullanılmaktadır. TNaz aktivitesinin belirlenmesi için, toluidin mavili deoksiribonükleik asit agar besiyeri kullanılmaktadır. Bu besiyerinde ısıya dayanıklı nükleaz enzimi duyarlı bir şekilde belirlenmektedir (Lachica 1971, Barry ve ark. 1973, Cords ve Tatini 1973, Boothby 1979).

1. 3. 5. 4. 10. Deoksiribonükleaz (DNaz): Koagülaz pozitif *S. aureus* suşlarının %99' undan fazlası DNA'yı hidrolize eden, ısıya dirençli nükleaz enzimini üretir, ancak koagülaz negatif suşların %20' sinin de bu enzimi ürettiği bilinmektedir (Mackie & McCartney 1989).

S. aureus'un önemli virulens faktörleri Şekil 1.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 1.1. *S. aureus*' un virulens faktörleri

1. 3. 5. 5. Toksinler

S. aureus, beş sitolitik veya membran yıkımlayıcı toksin (alfa, beta, gama, delta ve Panton-Valentine lökositin (PVL)), 2 eksfoliyatif toksin (A ve B), 8 enterotoksin (A, B, C, D, E, G, H ve I) ve toksik şok sendrom toksin (TSST)'i içeren çok sayıda virülans faktörü üretir. Sitotoksinlerin nötrofilleri parçalaması sonucu salınan lizozomal enzimler çevre dokuda yıkıma neden olur. Sitotoksinlerden biri ve PVL şiddetli pulmoner ve kutanöz enfeksiyonlarla ilişkilendirilmektedir (Muray ve ark. 2005). Eksfoliyatif toksin A, TSST ve enterotoksinler süper antijenler olarak bilinen polipeptidler sınıfına aittir (Muray ve ark. 2005).

1. 3. 5. 5. 1. Alfa toksin: Hem bakteriyel kromozom hem de plazmid tarafından kodlanabilen 33.000 Da polipeptidten oluşan alfa toksin, *S. aureus*'un birçok suşu tarafından üretilmektedir. Bu toksin, kan damarlarındaki düz kasları yıkımlar. Eritrosit, lökosit,

hepatosit, trombosit ve hücre kültürlerini de içeren birçok hücrede toksik etki gösterir (Bilgehan 2000, Murray ve ark. 2002). Konak hücre membranının hidrofobik bölgelerine integre olarak 1-2 nm'lik por oluşumuna neden olur. Potasyumun hızla dışarı çıkması ve sodyum, kalsiyum ile diğer küçük moleküllerin içeri akışı osmotik lizis ile sonuçlanır (Murray ve ark. 2002, Winn ve ark. 2006). Alfa toksinin subkutanöz enjeksiyonu dermonekrotik etkili olup intravenöz yolla verildiğinde ölüme neden olur. Toksinin nörotoksik etkisi hayvan modeli deneylerinde miyelin kılıflarının demiyelinizasyonu ile gösterilmiştir. Toksinin bu sayılan özellikleri, *S. aureus* enfeksiyonunun patogeneğinde önemli rol oynadığını düşündürmektedir. *S. aureus* α -toksini, koyun kanlı agarda eritrositlerin hemolizine de neden olmaktadır (Winn ve ark. 2006).

1. 3. 5. 5. 2. Beta toksin: Sfingomyelinaz C olarak da isimlendirilen beta toksin, 35.000 Da molekül ağırlığında ısıya duyarlı proteinden ibarettir. Hemolitik aktivite için magnezyum iyonları gerekir, substrat özgülüğü sfingomyelin ve lizofosfatidilkolinle sınırlıdır (Murray ve ark. 2002, Winn ve ark. 2006). Fibroblast, makrofaj, lökosit ve eritrositleri içeren birçok hücreye toksik etki gösterir. Duyarlı hücrelerde membran fosfolipidlerinin hidrolizini katalize eder. Hücre yüzeyindeki sfingomyelin konsantrasyonu ile orantılı lizise neden olur. Stafilokokal enfeksiyonlarda doku harabiyeti ve apse oluşumunda alfa ve beta toksin birlikte rol oynar (Murray ve ark. 2002). Beta toksin grup B streptokoklarca üretilen CAMP faktör ile birlikte, B grubu streptokokların teşhisinde kullanılan CAMP testinde gözlenen sinerjistik hemolizden sorumludur (Winn ve ark. 2006).

1. 3. 5. 5. 3. Delta toksin: *S. aureus* suşları ve diğer stafilokoklar tarafından üretilen 3 kD'luk bir polipeptiddir. Bu toksin eritrosit, lökosit, makrofaj, lenfosit ve trombositler üzerine etkilidir. Diğer memeli hücreleri ve hücre içi membran yapılarını da içeren geniş bir sitolitik aktiviteye sahiptir. Delta toksin kısmi nonspesifik membran toksisitesiyle deterjan benzeri etki gösterir. Antijenik özelliğe sahip değildir (Pereira ve ark. 2007).

1. 3. 5. 5. 4. Gama toksin ve Panton-Valentin Lökositidin (PVL): Hemen hemen tüm *S. aureus* suşları tarafından üretilen gama toksin ve *S. aureus* suşlarının %5'inden azı tarafından üretilen PVL, 2 polipeptid zincirinden oluşan çift komponentli (S (yavaş) ve F (hızlı)) toksinlerdir. Şimdiye kadar 3S ve 2F protein tanımlanmıştır. Her iki toksini üretebilme yeteneğindeki bakteri bu proteinlerin tümünü 6 farklı toksin üretme potansiyeli ile kodlayabilir. Bu toksinler nötrofil ve makrofajları parçalayabilir. PVL toksini lökotoksiktir

ancak hemolitik aktivitesi yoktur. Bu toksinlerin sitolitik etkisi, membranlarda por oluşumunu takiben hücre katyon gradiyetindeki değişikliklere bağlı gelişen osmotik değişikliklerden kaynaklanmaktadır (Martins ve ark. 2007).

1. 3. 5. 5. 5. Eksfoliyatif Toksin: Stafilokokal haşlanmış deri sendromu, eksfoliyatif toksinin neden olduğu, eksfoliyatif dermatitle karakterize bir hastalıktır. *S. aureus* türlerinde toksin oluşturma prevalansı coğrafik çeşitlilik göstermekle birlikte bu oran %5-10'dan azdır (Murray ve ark. 2006). Herbirinin molekül ağırlığı 24 kDa olan *ETA* ve *ETB* olmak üzere iki proteinden meydana gelmiştir ve her ikisi de hastalık oluşturabilir (Murray ve ark. 2006, Winn ve ark. 2006). Bu iki protein biyokimyasal ve immünolojik olarak farklıdır fakat biyolojik aktiviteleri birbirine benzer (Winn ve ark. 2006). *ETA* ısıya dirençli ve kromozomal iken, *ETB* ısıya duyarlı ve plazmid kaynaklıdır (Bilgehan 2000, Murray ve ark. 2006, Winn ve ark. 2006). Yapılan detaylı çalışmalar bu toksinler ile karşılaşma sonrasında, epidermisin stratum granulosum tabakasında intraselüler köprülerde (desmozom) ayrılma olduğunu göstermiştir (Murray ve ark. 2006, Winn ve ark. 2006). Toksinler sitoliz veya inflamasyonla ilişkili olmadığından, epidermisin etkilenen tabakasında tipik olarak ne stafilokok ne de lökosit bulunmaz. Epidermisin toksin ile karşılaşması sonrasında, koruyucu nötralizan antikolar gelişir ve bu antikolar toksik sürecin rezolüsyonuna önderlik eder (Murray ve ark. 2006, Winn ve ark. 2006).

Stafilokokal haşlanmış deri sendromu, en fazla küçük çocuklarda görülmekte, yetişkin ve büyük çocuklarda ender olarak ortaya çıkmaktadır. Bunun sebebi *ETA* ve *ETB*'nin duyarlı yenidoğanların epidermisinde bulunan GM4-benzeri glikolipidlere bağlanmasıdır. GM4-benzeri glikolipidler erişkin ve çocuklarda bulunmaz (Murray ve ark. 2006).

1. 3. 5. 5. 6. Enterotoksin: Serolojik olarak sekiz farklı stafilokokal enterotoksin (A-E, G-I) ve enterotoksin C'nin üç alttipi tanımlanmıştır. Enterotoksinler 100°C'de 30 dakika ısıtmaya ve gastrik-jejunal enzimlere dirençlidirler. Bu nedenle besin maddesi enterotoksin üreten stafilokoklarla kontamine olduğunda yiyeceğin tekrar ısıtılması ya da sindirim süreci önleyici olmayacaktır. Bütün *S. aureus* suşlarının %30-50'si bu toksinleri üretmektedir (Cengiz 1999, Winn 2006). Stafilokokal üremeyi destekleyen yiyeceklerde (dondurma, et gibi) oluşmuş toksinlerin alınması sonucunda 2-8 saatte kusma görülür, bazen ishal de bu tabloya eşlik edebilir. Enfeksiyon 24-48 saatle sınırlıdır ve yalnızca destek tedavisi yeterlidir (Cengiz 1999, Winn 2006). Hastalıkla en fazla ilişkisi olan enterotoksin A'dır. Enterotoksin C

ve D kontamine süt ürünlerinde bulunmuştur. Enterotoksin B stafilokokal pseudomembranöz enterokolit nedenidir (Murray ve ark. 2006).

Belirli bir hayvan modeli bulunmadığından toksin aktivitesinin kesin mekanizması tam anlaşılamamıştır (Murray ve ark. 2006, Winn ve ark. 2006). Bu toksinler birer süperantijenlerdir, T hücrelerini nonspesifik olarak uyararak sitokin salınımına neden olurlar. Mide ve jejunumdaki karakteristik histolojik değişiklikler; epitelyum ve lamina propriada nötrofil infiltrasyonu ve jejunumda villus kaybıdır (Bilgehan 2000, Murray ve ark. 2006, Winn ve ark. 2006).

1. 3. 5. 5. 7. Toksik şok sendrom toksin (TSST): Önceden pirojenik ekzotoksin C ve enterotoksin F olarak isimlendirilen TSST, 22.000 Da ağırlığında, ısı ve proteolize dirençli, kromozomal kaynaklı bir ekzotoksindir. TSST bir süperantijendir, makrofaj ve T-lenfositlerden nonspesifik sitokin salınımına neden olur. TSST düşük konsantrasyonlarda endotel hücrelerin geçirgenliğini sağlarken, yüksek konsantrasyonlarda hücrelere sitotoksik etki gösterir. TSST, vajina veya yara bölgesinden mukozal bariyerlere penetre olabildiği için Toksik Şok Sendromunun (TSS) sistemik etkisinden sorumludur. TSS'de ölüm, hipovolemik şokun sebep olduğu çoklu organ yetmezliği sonucu oluşmaktadır (Bilgehan 2000, Dinges ve ark. 2000, Murray ve ark. 2002). *S. aureus* tarafından üretilen toksik komponent ve toksinler Çizelge 1. 3.'de verilmiştir (Timbury ve ark. 2002)

Çizelge 1. 3. *S. aureus* tarafından üretilen toksik komponent ve toksinler

TOKSİN	ETKİ
Hemolizinler (α, β, γ)	Sitolitik: çeşitli hayvan türlerinde eritrositlerin lizisi
Koagulaz	Plazmayı pıhtılaştırır. Laboratuarlarda KPS ve KNS ayırımında kullanılır
Fibrinolizin	Fibrinin yıkılmasını
Lökositidin	Lökositlerin tahribi
Hyaluronidaz	Hyaluronik asidin yıkılmasını
DNA'se	DNA hidrolizi
Protein A	Lipolitik
Kapsül	Antifagositik
Epidermolitik toksin	Epidermal yayılma ve ekfoliyasyon
Enterotoksinler	Kusma ve ishale sebep olan gıda zehirlenmesi
Toksik şok sendromu toksini	Şok, deri döküntüsü

KPS: Koagulaz Pozitif Stafilokok, **KNS:** Koagulaz Negatif Stafilokok

1. 4. *S. aureus*' un İdentifikasyonu

1. 4. 1. Biyokimyasal İdentifikasyon:

S. aureus'u tanımlamada en güvenilir testlerden biri koagulaz testidir. Serbest koagulaz "tüp koagulaz" ve bağı koagulaz "lam koagulaz" yöntemleriyle tespit edilir.

1. 4. 1. 1. Lam Koagulaz Testi: *S. aureus* suşlarının çoğu hücre duvarında bağı koagulaza veya 'clumping factor'e sahiptir. Bu faktör hızlı hücre aglütinasyonuna sebep olan plazmadaki fibrinojen ile direkt tepkimeye girer. Bu test kanlı agar, Columbia Colistin Nalidixic Agar ya da diğere nonselektif nutrient besiyerinde üreyen kolonilerden yapılabilir. Fakat yüksek tuz konsantrasyonu *S. aureus*'un bazı suşlarında otoaglütinasyona sebep olduğu için bu test, yüksek tuz içeren besiyerlerinde yapılmamalıdır. Clumping faktöre sahip olmayan suşlar serbest koagulaz üreteceği için, herhangi bir suş lam koagulaz testinde negatif çıkarsa bu sonuç bir tüp aglütinasyon testi ile doğrulanmalıdır. *S. lugdunensis* ve *S. schleiferi* gibi koagulaz negatif bazı suşlar clumping faktör üretip lam koagulaz testi ile pozitif sonuç verebilirler (Winn ve ark. 2006).

1. 4. 1. 2. Tüp Koagulaz Testi: Bu metod ile saptanan koagulaz ekstraselüler olarak salınır ve bir kompleks oluşturmak için plazmadaki Coagulase Reacting Factor (CRF) ile reaksiyona girerek stafilotrombin oluşturur. Stafilotrombin de fibrinojenle reaksiyona girerek fibrin oluşumunu tetikler. Bazı suşlar, 35°C' de uzayan inkübasyon periyodunda pıhtının çözülmesine sebep olan fibrinolizin üreteceği için testler 35°C' de 4 saat inkübasyondan sonra oda ısısına alınmalı ve 18-24 saat sonra tekrar değerlendirilmelidir. Nadiren bazı *S. aureus* suşları koagulaz negatif olabilmektedir. Hem tüp hem de lam koagulaz testi için önerilen EDTA'lı tavşan plazmasıdır. *Enterococcus* türleri gibi organizmalar sitratı kullanabildiği için sitratlı plazma kullanılmamalıdır. Tüp koagulaz testi *S. aureus* identifikasyonu için referans bir testtir. Bu test, pozitif kan kültüründen doğrudan tavşan plazması içerisine inoküle edilerekte yapılabilir (Winn ve ark. 2006).

1. 4. 1. 3. Lateks Aglütinasyon: Bu yöntemde plazma ile kaplanmış lateks parçaları kullanılır. Latekse bağı fibrinojen clumping faktörü saptar. Ayrıca parçacıklarda bulunan immunglobulin molekülleri stafilkokal hücre duvar proteini olan protein A'yı da saptayabilir. Bu protein IgG moleküllerine Fc reseptörü ile bağlanabilmektedir. Bir agar

plağından alınan kolonilerin test materyali ile karışması sonucu lateks-mikroorganizma süspansiyonu hızlı bir kümleşme gösterir. Ayrıca *S. lugdunensis* ve *S. schleiferi*' nin bazı suşları da clumping faktör üretir ve bu test pozitif reaksiyon verebilir (Winn ve ark. 2006).

1. 4. 1. 4. Pasif Hemaglünitasyon: Eritrositler ya da sentetik olarak hazırlanmış polistren lateks gibi parçacıklar, çeşitli yöntemlerle çok çeşitli antijenlerle kaplanabilirler. Bu şekilde kaplanmış olduğu antijenin taşıyıcısı durumuna gelen eritrosit ya da parçacıklar, elektrolitli ortamda bu antijenlerin antikorları ile karşılaştıklarında aglütinasyon verirler. Dolaylı hemaglünitasyon denilen bu testler çok duyarlı olup, ortamda çok az antikor bulunması bile sonuç için yeterli olmaktadır. *S. aureus* hücrelerinin yüzeyindeki clumping faktörü saptamak için fibrinojen ile sensitize edilmiş koyun eritrositleri bu amaçla kullanılır (Winn ve ark. 2006).

1. 4. 1. 5. Deoksiribonükleaz (DNaz) Testi: Bazı *S. aureus* suşları zayıf ya da şüpheli tüp koagulaz reaksiyonu oluşturabilir. Bu vakalarda koagulaz ile çok iyi uyum gösteren ek testler yapmak gerekebilir. *S. aureus* endonükleotik ve ekzonükleotik aktiviteye sahip olan DNaz ve termostabil nükleaz üretir (Gudding 1983). Bu enzimlerin her ikisi de nükleik asiti hidrolize eder. DNaz içeren bakteriler, DNA içeren besiyerinde DNA'yı parçalayıp oligonükleotidler oluştururlar. Bu deneyde DNA'lı plak besiyerine saf kültürden çizgi ekimi yapıp 35°C' de 18-24 saat bekletildikten sonra plak yüzeyine 1N HCl damlatılması ile bakteri DNaz oluşturuyorsa ekim çizgisinin çevresinde saydam bir zon oluşur. Bu test *S. aureus*' un identifikasyonunda ek bir test olarak yardımcı olmakla birlikte başka stafilokoklar da DNaz pozitif reaksiyon verebilir (Waller ve ark. 1985).

1. 4. 1. 6. Termostabil Endonükleaz Testi: Bu test için yine aynı DNaz test besiyeri kullanılır. Sadece agar içerisinde 3 mm çapında çukur açılır ve 15 dakika su banyosunda kaynatılmış 14 saatlik sıvı kültür ile bu kuyucuklar doldurulur. Plaklar 35°C' de 1 gece inkübe edilerek çukurların çevresinde pembe bir hale oluşup oluşmadığı izlenir. Bazı hayvan izolatları ısıya dirençli termonükleaz üretir. Bazı koagulaz negatif stafilokoklar zayıf pozitif reaksiyon verebilir. *S. aureus* endonükleaz testinin özgülüğü, *S. aureus* enzimlerine karşı hazırlanmış monoklonal veya poliklonal antikorlarla seroinhibisyon reaksiyonu veya *S. aureus* ısı stabil endonükleazını kodlayan *nuc* geni Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile gösterilerek doğrulanabilir (Mason ve ark. 2001).

1. 4. 1. 7. Mannitol Fermentasyonu: *S. epidermidis* ve diğer koagulaz negatif türlerin aksine *S. aureus* mannitolü fermente etmektedir. *S. aureus*' un dışkı, çevre örnekleri ile nazal taşıyıcıların taranmasında bu özelliği kullanılır. Kullanılan besiyeri “mannitol salt agar”dır. Bu besiyerinin bileşiminde mannitol (%1), NaCl (%7,5), fenol kırmızısı ve pepton içerir. Bu yüksek tuz konsantrasyonu, enterokoklar dışındaki diğer mikroorganizmaların üremesini engeller ve seçici olarak stafilocoklar ürer. İzole edilen *S. aureus* kolonileri, çevresinde mannitolden asit oluşumunu gösteren sarı bir zon varlığı ile saptanır. Nadiren başka stafilocok türleri de mannitolden asit üretilebilir. Bu sebeple bu besiyerinde üretilen mannitol pozitif organizmalar kanlı besiyerine pasajlanıp koagulaz üretimi açısından test edilmelidir (Winn ve ark. 2006).

1. 4. 2. Genotipik İdentifikasyon

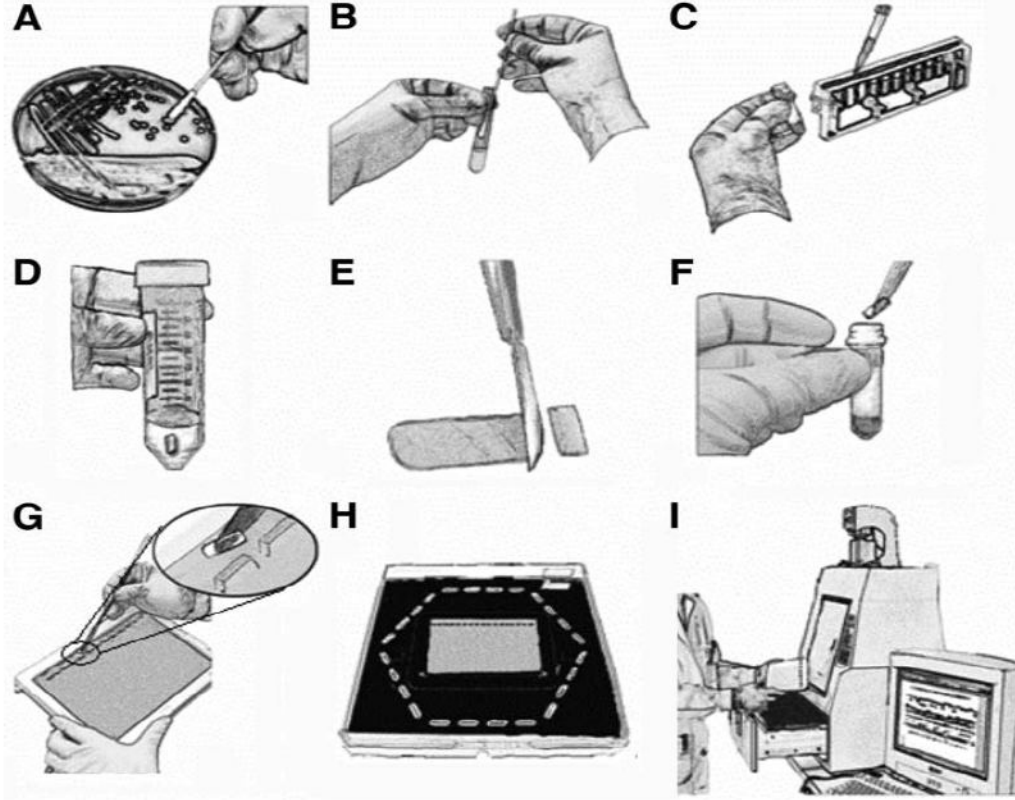
S. aureus'un identifikasyonunu sağlayan moleküler yöntemlerin çoğu PCR bazlıdır. Eskiden kullanılan testler ile identifikasyon için amplifikasyon ürünlerinin Southern blotting ile belirlenmesi gerekiyordu (Brown ve ark. 2005). Fakat daha sonra, türe spesifik hedef bölgelerin amplifikasyonu için düzenlenmiş, protein genleri gibi hedef bölgeler içeren primer çeşitliliği geliştirildi. Nükleaz (*nuc*), koagulaz (*coa*), protein A (*spa*) ve yüzey ilişkili fibrinojen bağlayan protein genleri gibi genler de *S. aureus*'un tanımlanmasında önemlidir. Ayrıca stafilocokal metisilin direncinin tespiti için *mecA* ve 16S rRNA gibi spesifik gen bölgelerini değerlendiren multipleks PCR yöntemi de mevcuttur (Grisold ve ark. 2002). Ticari olarak bulunan real time PCR ile başarı sağlanmıştır. Real-time PCR, ekipmanı olmayan rutin laboratuvarlarda PCR'ye alternatif sunmak için bir kolorimetrik mikrokuyucuk formatında, *coa* geninden mRNA transkripsiyonunun izotermal sinyal aracılı amplifikasyonunu kullanan yeni moleküler bir yöntemdir (Levi ve ark. 2003).

Moleküler tiplendirme teknikleri, epidemik hastalıklara neden olan *S. aureus* suşlarının yayılımını izlemek için kullanılmıştır. Bu teknikler arasında Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE), Stafilocokkal Protein A (*spa*) Dizi Tiplendirme ve Çok Lokuslu Dizi Tiplendirme (Multi Locus Sequence Typing: MLST) ve stafilocokal kromozomal kaset *mec* (*SCCmec*) yüksek ayırım gücüne sahip olan ve en çok kullanılanlardır.

1. 4. 2. 1. PFGE

Moleküler tiplendirme yöntemleri sıklıkla aynı türe ait iki mikroorganizmanın aynı klondan olup olmadıklarını belirlemek için kullanılmaktadır (Maiden ve ark. 1998, Aanensen ve Spratt 2005). PFGE, *S. aureus* ve diğer birçok patojen bakterilerin genetik farklılıklarını araştırmak için moleküler epidemiyolojide kullanılan önemli bir genetik tiplendirme metodudur. 1990 yılından beri kullanılan PFGE, birçok bakteri için etkili ve çok yönlü genetik tiplendirme metodudur. PFGE temel olarak bozulmamış bakteri hücrelerinin yumuşak agaroz jele gömülmesini daha sonra hücre duvarı lizisini ve kromozomun kesilmesi işlemlerini içermektedir. Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile genomun kesilmesinden sonra agaroz jel elektroforez yöntemi ile ayırma işlemi gerçekleştirilir. Meydana gelen fragmentlerin konvansiyonel elektroforez sistemlerle ayrılması çok zordur. PFGE sistemlerinde bu fragmentleri ayırmak mümkün olabilmektedir. Sistemlerde başlangıç vuruşları kısadır ve elektroforez devam ettiği sürece artar. Bant paternleri bir görüntüleme sistemi aracılığıyla değerlendirilir (Goering ve Winters 1992, Maslow ve ark. 1993, Tenover ve ark. 1994, Tenover ve ark. 1995, Matushek ve ark. 1996, Stemper ve ark. 2004, Kurt ve ark. 2007).

1984 yılında David Schwartz yeni bir teknik olarak periyodik aralıklarla yönü değiştirilen elektrik alanının DNA moleküllerini jel içinde ilk yerinden ayırıp bir hat üzerinde dizeceğini ileri sürmüştür. Özellikle agarozda 30-50 kb'dan 10 Mb'a kadar olan büyük parçalar yürütülebilmektedir. Bu metotla yüzlerce kilo baz ağırlıktaki mantar kromozom parçalarının uzunlamasına ayrıştırıldığı gösterildi. 1982 yılında ilk kullanımından sonra geliştirilen birçok cihazla çoklu elektrik alanları kullanılarak büyük molekül ağırlıklı DNA parçalarının ayırmasına çalışılmıştır (Hoşoğlu 2010). PFGE tiplendirme yönteminin çalışma mekanizması Şekil 1.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 1. 2. PFGE tiplene yönteminin çalışma mekanizması

A: Besiyerinden kolonilerin toplanması B: Kolonilerin tampon içinde süspense edilmesi, C: Eritilmiş agar ve bakteri süspansiyonunun plastik kalıp içine yerleştirilmesi, D: Agaroz kalıplarının lizis solusyonuna atılması, E: Jellerin elektroforez taraklarına uygun şekilde kesilmesi, F: Kesilen kalıpların restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilmesi, G: Kesilen parçaların kuyulara yerleştirilmesi, H: Jelin Chef DrII sistemine yerleştirilmesi ve ayarlanması, I: Jelin Ethidium Bromide ile boyanıp görüntülenmesi (Matushek ve ark. 1996).

PFGE yönteminin ve sonuçlarının yorumlanmasının kolaylaşması bu metodu daha kullanışlı hale getirmiştir. Birçok merkezde başta metisiline dirençli *S. aureus* klonlarını tanımlamaya yönelik olmak üzere çok sayıda bakteri için epidemiyolojik tiplendirmeler yapılmaktadır. PFGE bakteri ve mantarların hemen tamamında yeterince ayırım sağlamaktadır ve tekrarlanabilmesi nedeniyle gittikçe daha fazla kullanılır hale gelmiş bulunmaktadır. PFGE ile tiplendirme; araştırmacıların aynı hastada enfeksiyon ve kolonizasyona yol açan suşlar arasındaki ilişkiyi gözlemlemesinde, kontaminasyon ve enfeksiyona yol açan suşların ayırımında, hastane içinde hastalar arasındaki bulaşmayı takipte, tedavi sonrasında tekrarlayan enfeksiyonun reenfeksiyon mu yoksa nüks mü olduğunu belirlemede ve antibiyotiklere dirençli suşların hastane içi ve hastaneler arasında yayılımını takip etme konularında yardımcı olur. Farklı hastalardan izole edilen suşlar aynı PFGE tiplendirme profilini paylaşıyorlarsa bu suşların aynı klondan kaynaklandıkları, hastadan hastaya veya ortak bir kaynak ya da mekanizma ile bulaştıkları büyük olasılıklıdır (Hoşoğlu 2010).

Diğer epidemiyolojik tiplendirmelerde olduğu gibi PFGE’de de başlıca iki yaklaşım kullanılır: “Karşılaştırma Metodu” ile suşların tamamı aynı anda çalışılarak elde edilen paternler karşılaştırılır. “Kütüphane Tiplendirme Metodu”nda ise oluşturulan “fingerprint” katalogları kullanılarak elde edilen paternlerin epidemiyolojik bağlantıları ortaya konulmaya çalışılır. Birincisi salgınlarda kullanılırken ikincisi sörveyans çalışmalarında kullanılan sistemdir. Daha çok klinik sonuçlarla ilgilenen mikrobiyoloji laboratuvarları kütüphane tipi tiplendirmeyi pek kullanmazlar (Hoşoğlu 2010)

İdeal olarak, bir salgının kökenini temsil eden PFGE izolatları bir diğerinden ayrılmaz ve epidemiyolojik ilişkisiz kökenlerden tamamen farklıdır, böylesi durumlarda salgını saptamak nispeten kolaydır. Alternatif olarak, rastgele genetik olaylar (DNA’da nokta mutasyonları, insersiyonlar, delesyonlar) salgın esnasında elde edilen restriksiyon profilini değiştirebilir (Hoşoğlu 2010).

Standard jel elektorforez metodlarında moleküller statik elektrik alan altında hareket ederler. Elektrik alanının etkisi altında DNA parçaları bir hat üzerinde ilerleyerek ağırlıklarına göre dizilirler. DNA parçalarının hareketini etkileyen birçok faktör vardır. Jelin içeriği ve yoğunluğu, elektrik alanının gradiyenti, elektroforez tamponunun özellikleri ve sıcaklık en başta gelen faktörlerdir. Normalde standart metodla yapılan DNA elektroforezinde 20 kb’dan daha büyük parçalar aynı yöndeki sabit akımla yürütülerek ayrıştırılamaz. Başlangıçta büyük DNA parçalarını yürütmek için düşük yoğunluklu agaroz jelleri ve düşük voltaj gradiyenti kullanılmıştır. Ancak bu farklı şartlarda bile DNA parçalarının ayrıştırılması pek mümkün olmamıştır (Hoşoğlu 2010)

Büyük DNA parçalarının yürütülebilmesi için özel örnek hazırlama ihtiyacı ortaya çıkmıştır. Büyük DNA kolay kırılır ve yüksek viskozitesinden dolayı pipetlenmesi güçtür. Bu nedenle önce bir agaroz plak içine yüklenmesi ve daha sonra bu plakların enzimlerle muamele edilerek bakteri/mantar hücre duvarı ve proteinlerinin uzaklaştırılması yoluna gidilmiştir. Bu şekilde saflaştırılan sağlam DNA agaroz plağın uygun büyüklükte bir parçası restriksiyon enzimi ile muamele edilerek, kromozomal DNA daha küçük parçalara kesilmiş olur. Bu agaroz plak parçaları jeldeki kuyucuklara yerleştirilerek elektroforeze tabi tutulur. PFGE’de yanlış bakteri adlandırılması, kontaminasyon sonucu RNaz aktivitesi, çok az ya da çok fazla DNA, kullanılan kimyasalların kalitesi, suyun saflığı, plazmit DNA’sının eklenmesi, jel

kuyucuklarının genişliği ile bantların kayması, kötü fotoğraflama ve yürütme ısısının yüksek ya da düşük olması gibi sorunlarla karşılaşılabilir (Hoşoğlu 2010).

PFGE yönteminde değerlendirme oluşan bant sayılarına göre yapılır. PFGE’de üç bant farkı tek bir genetik olayla oluşabilir; bu nedenle böyle kökenler yakın ilişkili olarak sınıflandırılır; altı bantlık fark olması iki genetik olayla, yedi banttan büyük fark üç veya daha fazla genetik olayla ilişkilidir. Kökenler %100 benzerse aynı köken, %80’den fazla benzerse klonal ilişkili bir köken kabul edilir (Singh ve ark. 2006).

1. 4. 2. 2. *spa* Dizi Tipleme

Tekrarlayan ünitelerdeki tek lokuluslu DNA sekansına dayanan stafilokokal protein A geni (*spa*), MRSA suşlarının tiplendirilmesinde oldukça güvenilir, doğru ve ayrımı sağlayan bir yöntemdir. *S. aureus*’ta bulunan iki korunmuş gen bölgesi olan protein A (*spa*) ve koagülaz (*coa*) SSR bölgesinde ayrı ayrı düzenlenir. Bu korunmuş gen bölgeleri 24 ve 81 bp’lik ardı ardına tekrarlayan ünitelerden oluşur. Her iki gende, SSR ünitelerinde düzenlenir ve tekrarlayan üniteler şeklinde organize olur. SSR bölgesinde nokta mutasyonlar ve gen içi rekombinasyonla meydana gelen genetik değişimler; kromozom replikasyonu boyunca sürerek yüksek oranda polimorfizme neden olur (Shopsin ve ark. 1999, Shopsin ve ark. 2000)

Polimorfik DNA sekanslarında daha önce bildirilen; 3’kodlama bölgesinde, *S. aureus* suşlarına özel 24 bp *spa* salgın araştırmalarında genetik ayrımı sağlamak için kullanılır (Shopsin ve ark. 1999). Birden fazla PFGE’de genotipleme yöntemi karşılaştırmalı olarak değerlendirilirse *S. aureus* suşlarının ayrımında *spa* tiplendirmesinin önemi ortaya çıkar (Crisostomo ve ark. 1998, Oliveira ve ark. 2001).

1. 4. 2. 3. MLST

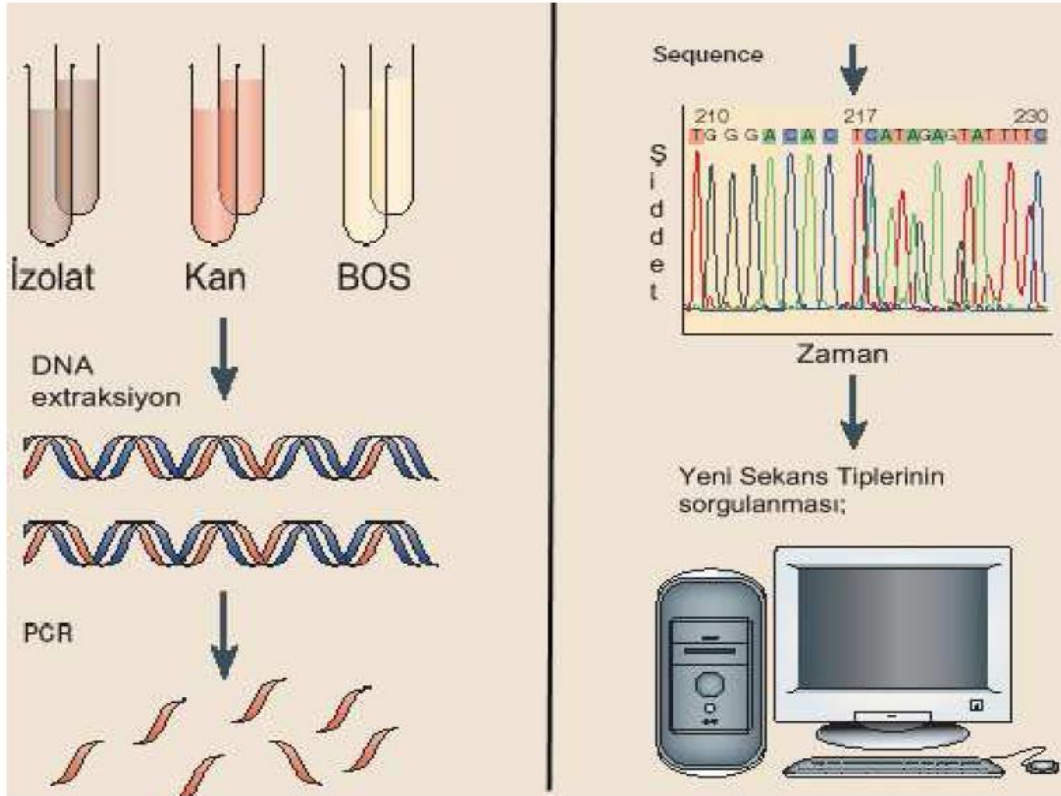
MLST, moleküler biyolojide kullanımı giderek artan ve mikroorganizmaya ait birden çok lokusun tiplendirilmesinde kullanılan bir tekniktir. Çok sayıda bakteriyel patojenin moleküler analizinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir ve bu yöntemle virulan veya antibiyotiklere dirençli klonların tiplendirilmesinin yanında, klonların evrimsel gelişimi de izlenebilmektedir. Maiden ve arkadaşları 1998 yılında, gen ürünlerinin yerine, metabolik faaliyetlerden sorumlu korunmuş gen (housekeeping) dizilerinin karşılaştırmasına yönelik

yaklaşımı ileri sürmüşler ve yöntemine “Multilokus Sekans Tiplemesi (MLST)” adını vermişlerdir. Yedi farklı yapısal metabolik genin yaklaşık 50 bp parçalarının dizi analizi yapılmakta ve elde edilen her bir allele bir kod verilerek, her köken için bir dizi tipi (sequence type, ST) saklanarak, dünyanın herhangi bir bölgesinden elde edilen diğer kökenlerle karşılaştırılabilmekte ve bu sayede global epidemiyolojik çalışmalar için önemli bilgi ve hızlı işlem avantajı sağlamaktadır (Maiden ve ark. 1998).

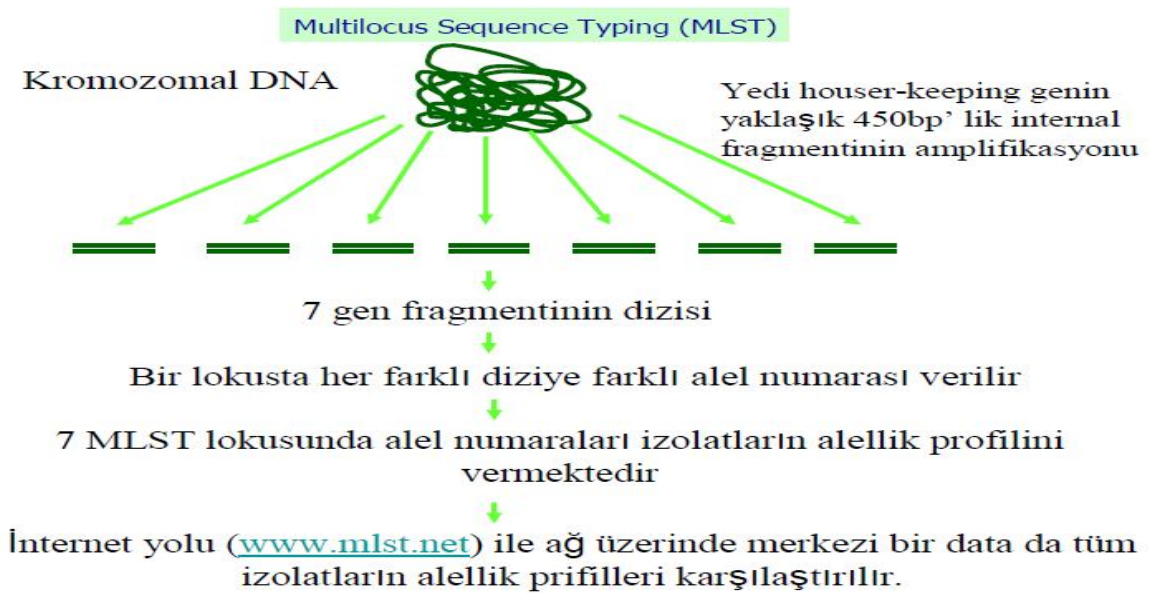
MLST, bir organizmadaki “yaşamsal faaliyetleri kodlayan” yedi adet gene ait parçaların dizilimleri ile aynı organizmanın farklı suşlarındaki özdeş gen gruplarının karşılaştırılmasını içerir. Bu genlerin, hücrenin temel fonksiyonlarını kodladığı ve plazmitlerden ziyade kromozomlar üzerine yerleştikleri bilinmektedir. Her bir gen için yaklaşık 450 bç’lik dizi PCR ile çoğaltılır ve dizilenir. Daha sonra karşılaştırmalı dizilem verileri bir dendogram ile ifade edilir (Madigan ve ark. 2000).

MLST’de bir gen için benzer dizilere sahip suşların, o gende aynı allele sahip olduğu söylenir ve o gen için aynı sayı tahmin edilir. Bir gen pek çok farklı allele sahip olabilir ve aynı tür içerisindeki bir grup suşa ait bir gende genelde 10 ila 30 adet allel bulunabilir. Her türe, o türe özgü bir seri sayı (çok lokuslu dizi tipi) verilerek sonuçlandırılır. Daha sonra her dizi tipi arasındaki 0 (benzersizlik)’dan 1 (suşlar benzerdir, sadece uzaktan ilişkilidir)’e kadar olan bağıllık uzaklığı bir dendogramı çizilerek ifade edilir (Madigan ve ark. 2000).

Bugün için internet ortamında, www.pubmlst.org, www.mlst.net gibi çok sayıda mikroorganizmaya ait bilgi içeren geniş veritabanlarının yanı sıra www.shigatox.net, www.neisseria.org, www.mlstoslo.uio.no gibi tek mikroorganizmaya yönelik veri tabanlarına da ulaşmak mümkündür. www.mlst.net veri tabanında, 15 Haziran 2007 tarihinden itibaren tüm dünyada tanımlanmış ve veri tabanında yer alan dizi tiplerine ait haritalar da yer almaya başlamıştır. Böylece, araştırmacılara ellerindeki mikroorganizmaya ait dizi tipinin dünya coğrafyasındaki dağılımını izleme imkanı sunulmaktadır (www.mlst.net). Şekil 1.3. ve Şekil 1. 4.’ de MLST analizi özetlenmiştir.



Şekil 1. 3. MLST Analizi



Şekil 1. 4. MLST Analizi

MLST çok yakın akraba suşlarını bile ayırt edebilme gücüne sahiptir. Bu nedenle organizmaları tür seviyesine kadar tanımlamada, rRNA dizilenmesine göre çok daha iyi bir yöntemdir. MLST analizlerinde incelenen yedi genle ve gen başına 20 allele birkaç milyar

farklı genotipin ayırımının yapılabildiği hesaplanmıştır. Bunun aksine MLST organizmaları tür seviyesinin üzerinde karşılaştırmak için uygun değildir, çünkü çözünürlüğü daha yüksek seviyedeki bir taksonun anlamlı bir filogenisini oluşturamayacak kadar duyarlıdır (Madigan ve ark. 2000).

MLST yöntemi ile elde edilen verilerin değerlendirilmesi ve çeşitli epidemiyolojik araştırmalarda kullanılması önemli bir çalışma alanıdır. Klonal ilişkili toplulukları belirlemeye yönelik algoritmalar kökenin genetik olarak ilişkisini ortaya koymak için uygundur. Fakat MLST gibi çok sayıda köken içeren veri tabanlarının analizinde uygulanmaları pratik değildir. Ayrıca bu yöntemler, popülasyondaki evrimsel değişimleri taramak açısından çok kullanışlı değildir (Feil ve Enright 2004).

MLST patojen suşların ayırımında klinik mikrobiyolojiye önemli katkılar sağlamıştır. *Escherichia coli* türü için bu durum düşünüldüğünde K-12 gibi bazı suşlar zararsız iken, O157:H7 gibi bazı suşlar çok ciddi ölümcül enfeksiyonlara yol açabilmektedir. MLST yöntemi ile bir bakteriyel patojenin virulent bir suşu takip edilebilir ve popülasyonda yakından akraba pek çok organizma olsa bile, suşun kesin teşhisi yapılabilir. Bunun yanı sıra teknik PCR temelli olduğundan, klinik numuneleri laboratuvar kültüründen izole etmeden de test edebilme imkanı sağlar. Bu durum, klinik bir numuneden patojenik bir suşun DNA'sı izole edildiğinde MLST analizlerinin kolaylıkla yapılabileceğini göstermektedir (Madigan ve ark. 2000).

MLST analizleri bakterilerde bazı ilginç genetik desenler ortaya çıkarır. *S. aureus* gibi bazı prokaryotlar çok küçük MLST değişiklikleri gösterebilmektedir. Bu değişiklikler, bu organizmaların ekolojisindeki farklılıkları ve onları farklı kılan faktörleri kesin olarak yansıtır. Bu tür bilgiler, bir patojenin genetik kararlılığına veya kararsızlığına dayanan ilaç ve aşı geliştirme stratejilerine de katkıda bulunabilir (Madigan ve ark. 2000).

S. aureus suşlarının moleküler tiplendirmesi ile ilgili olarak yapılan MLST analizlerinde hayvansal kaynaklı izolatlarda en yaygın sekans tipinin ST 348 olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Carmen ve ark. 2011 ve Nathaus ve ark. 2011). Bölümümüzde yapılan bir araştırmada 2002-2006 yılları arasında izole edilen *S. aureus* suşlarında PFGE ve varyantları ile birlikte 3 pulstipin varlığı belirlenmiştir. Bu araştırmada Pulstip B suşları SCC*mec* tiplendirmesi ile tip IV, MLST ile ST8 (USA 300 olarak da bilinen ABD'de toplum

kökenli izolatlar arasında en yaygın olarak görülenlerden bir tanesi) *spa* ile t190; pulsotip A ve C suşlarının ise SCCmec tip III, *spa* tiplendirmesi ile t030 ve MLST ile ST 239 ve ST 239 benzeri bir klon olduğu belirlenmiştir. Bu klonlardan ST 239 Brezilya klonu olarak bilinir ve önemli hastane kökenli klonlardan birisidir (Türkyılmaz ve ark. 2010).

1. 4. 2. 4. SCCmec

SCC, stafilocok türleri arasında genetik madde alışverişine aracılık eden hareketli bir elemandır. Yapı olarak patojenite adasına benzemekle birlikte hiç virülens geni içermemektedir. MRSA suşlarının en belirleyici özelliği Staphylococcal Casette Chorosome *mec* (SCCmec)'e sahip olmalarıdır. Bu hareketli genetik eleman *mecA* geni tarafından kodlanan geniş spektrumlu betalaktam direnci için önemli bir belirleyicidir. Metisilin dirençli stafilocok suşlarının ortaya çıkması duyarlı suşların kromozomlarına SCCmec elemanlarının aktarılması yolu ile olmaktadır (IWG-SCC 2009). SCCmec kasetinin kökeni hala bilinmemekle birlikte *S. sciuri*' nin PBP'si ile PBP2a'sı arasında %87,8 oranında homoloji nedeniyle kökeninin bu bakteri olduğu düşünülmektedir (Said-Salim ve ark. 2003).

SCCmec elemanları oldukça farklı yapısal organizasyonu ve genetik içeriği ile tip ve alt tiplere ayrılmıştır. Günümüzde MRSA klonları yaygın olarak pratikte SCCmec tipi ve kromozomal yapısına dayanan sekans tipleri ile tanımlanmaktadır (Enright ve ark. 2002). Eskiden *mecA* taşımayan SCC ve SCCmec tip ve alt tipleri herhangi bir standardizasyon yapılmadan bildirilmekteydi. Bu nedenle günümüze kadar SCC elemanlarının sınıflandırılmasında tutarsızlık ve belirsizlik olmuştur. Bu konuda Stafilokokal Kromozom Kaset Elemanlarının Sınıflandırılması Uluslararası Çalışma Grubu (International Working Group on the Classification of Staphylococcal Casette Chorosome Elements (IWG-SCC))' nun çalışmaları sayesinde SCCmec ve diğer SCC elemanlarının başarılı bir şekilde sınıflandırılması yapılmıştır (IWG-SCC 2009).

PBP2a, 2 kb'lık DNA segmentine lokalize bir gen olan *mecA* geni tarafından kodlanmaktadır. *mecA* geninin kodladığı PBP2a diğer PBP'lerden farklı olarak beta-laktam antibiyotiklere afinitesi zayıftır. Beta-laktam antibiyotiklerin varlığında diğer PBP'ler inhibe olurken, PBP2a 'nın işlevselliği devam ederek hücre duvar sentezi görevini sürdürür. Bu nedenle metisilin direnci olan bir stafilocok kökeninin, duyarlılık testi yapılmaksızın tüm beta-laktam grubu antibiyotiklere (penisilinler, betalaktam+betalaktamaz inhibitör

kombinasyonları, tüm sefolosporinler, monobaktamlar, karbapenemler) dirençli olduğu kabul edilir (CLSI 2005).

Bazen bu gen indüklenebilir ve dirençli suşlardan duyarlı suşlara transfer edilebilir. *mecA* geni regülasyonunu sağlayan *mecI* (baskılayıcı gen) ve *mecR1* (sinyal dönüştürücü gen) ile birlikte SCC üzerinde taşınır ve stafilokok türleri arasında transfer edilebilen hareketli bir genetik eleman olarak kabul edilir. *mecA*'nın farklı stafilokok türlerine yaygın olarak dağıldığı anlaşıldıktan sonra, bunun stafilokok türleri arasında nakledilen hareketli bir genetik eleman üzerinde taşındığı ileri sürülmüştür (IWG-SCC 2009).

Casette Chromosome Recombinases (*ccr*) olarak bildirilen yer spesifik gen kompleksi SCC*mec* gen kasedinin ikinci ana genetik yapısıdır ve kasedin bakteriyel genoma integrasyonu ve eksizyonundan sorumludur (İto ve ark. 1999, Katayama ve ark. 2000). SCC*mec*'in tanımlanmasından kısa süre sonra SCC*mec*'in birçok farklı elemanları tanımlanmıştır. Bu elemanların önemli özellikleri şöyledir: a) *mec* gen kompleksinde *mecA*'nın taşınması b) *ccr* gen kompleksinde *ccr* gen(leri) nin taşınması c) stafilokokal kromozomda *ccr* ile ilgili rekombinasyonlarda hedef olarak işlev yapan ve SCC için integrasyon bölge dizileri (integration site sequence (ISS)) olarak isimlendirilen stafilokokal kromozomda özel bir integrasyon bölgesi d) ISS içeren direkt tekrar dizilerinin varlığı. Son sınıflandırmaya göre *S. aureus*'da belirlenen SCC*mec* tipleri Çizelge 1.4.'te verilmiştir (IWG-SCC 2009).

Çizelge 1. 4. *S. aureus*' ta belirlenen SCC*mec* tipleri

SCC <i>mec</i> tipi	<i>ccr</i> gen kompleksi*	<i>mec</i> gen kompleksi
I	1(A1B1)	B
II	2(A2B2)	A
III	3(A3B3)	A
IV	2(A2B2)	B
V	5(C)	C2
VI	4(A4B4)	B
VII	5(C)	C1
VIII	4(A4B4)**	A

*gen kompleksinde *ccr* genleri parantez içinde gösterilmektedir.

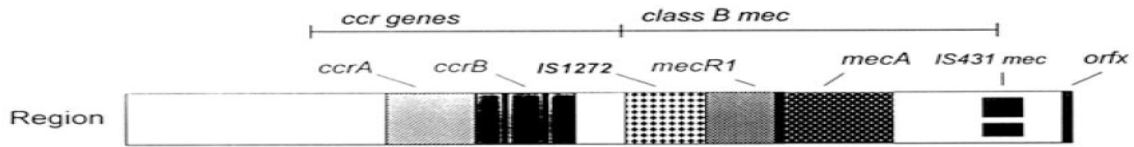
***ccrA4B4* genleri SCC*mec* tip VIII' de bulunur.

SCCmec Elemanlarının Sınıflandırılması

SCC*mec* üç önemli gen kompleksi tarafından oluşturulur; *ccr* gen kompleksi, *mec* gen kompleksi ve J bölgesi (IWG-SCC 2009).

a. *ccr* gen kompleksi: *ccr* gen allotipleri tarafından oluşturulur. Birçoğunun etrafında fonksiyonu tam olarak bilinmeyen Open Reading Frames (ORFs) olarak isimlendirilen diziler bulunur ve kasetin bakteriyel genoma integrasyon ve eksizyonundan sorumludur. Bunlar invertaz/resolvaz ailesinden *ccrA*, *ccrB* ve yeni tanımlanan *ccrC* olmak üzere 3 farklı rekombinaz kodlayan genlerdir. SCC*mec*'in mobilitesini sağlarlar. *ccrA* invertaz varlığında, SCC*mec* kromozomun doğru bölgesine girer ve *ccrB* resolvaz ile kromozomdan tam bir şekilde, eksiksiz olarak ayrılır (Zhang ve ark. 2005, Martins ve Cunha 2007).

Farklı allotiplere ait *ccr* genleri % 60-82 arasında nükleotid benzerliği gösterirken, genelde %85 'in üzerinde nükleotid benzerliği gösteren *ccr* genleri aynı allotip içinde toplanır. Ayırt edilen tüm *ccrC* varyantlarında % 87 nin üzerinde dizi homolojisi saptandığı için sadece tek bir *ccrC* allotipi vardır. *ccrC* genlerinin farklılığının numara kullanılarak allellerle ifade edilmesi önerilmektedir (örn *ccrC1* allel 2 veya *ccrC1* allel 8 gibi). *ccrA* ve *ccrB* genleri 4, *ccrC* genlerinin ise 1 allotipi bulunmaktadır. *ccr* genlerinin sınıflandırılması Şekil 1. 5.' te gösterilmiştir.

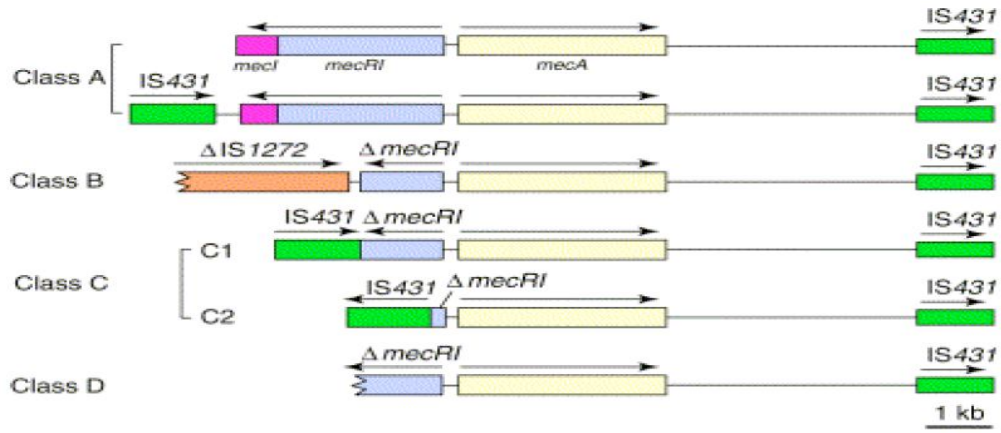


Şekil 1. 5. *ccr* genlerinin sınıflandırılması

S. aureus'dan başka stafilocokları da içeren türlerde *ccr* gen temsilcileri filogenetik ilişki içindedir. Diğer stafilocok türlerinde bulunan DNA dizileri *S. aureus*' dan farklılık göstermesine karşın, bunların hepsi *ccrA*, *ccrB* veya *ccrC* olarak sınıflandırılmıştır. *S. aureus* dışındaki stafilocoklarda birkaç ekstra *ccr* allotipi bulunmuştur. Bunlar; *ccrA5* *S. pseudintermedius* KM241 suşunun *ccrA* genidir, *ccrB6* *S. saprophyticus* ATCC 15305 suşunun *ccrB* genidir ve *ccrB7* *S. saprophyticus* TSU33 suşunun *ccrB* genidir. *ccr* gen kompleksleri bulunuş sırasına göre numaralandırılır. Bugüne kadar iki farklı grup bildirilmiştir. Bunlardan biri *ccrA* ve *ccrB*' yi birlikte taşır, diğeri ise *ccrC*'yi taşır. *ccr*'deki allellik varyasyonlara dayanan bir seri allotip tanımlanmıştır. *S. aureus*' da bulunan *ccr* gen kompleksi, tip 1 (*ccrA1B1* taşıyan), tip 2 (*ccrA2B2* taşıyan), tip 3 (*ccrA3B3* taşıyan), tip 4 (*ccrA4B4* taşıyan) ve tip 5 (*ccrC* taşıyan)'i içerir ve bunlar PCR ile saptanabilir.

Önerilen adlandırma sisteminde, DNA dizi benzerliği % 50 nin altında ise ancak o zaman yeni bir *ccr* geni bulunmuş kabul edilmekte, yeni bir allotipin tesisi için ise dizi homolojisinin % 50-85 arasında olması gerekmektedir. Bu koşullar sağlanmadıysa *ccr* geni adlandırılabilir.

b. mec gen kompleksi: *mec* gen kompleksi; *mecA*, regüle edici genler ve insertion sequence denilen IS elemanlarından oluşur. Beta-laktam direnç fenotipidir ve metisilin direncinden sorumludur. İçerdikleri yapıya göre *mec* gen kompleksi 4 sınıfta incelenir (Hiramatsu ve ark. 2001, Hanssen-Ericson 2006, Martins-Cunha 2007). *mec* gen kompleksi sınıfları Şekil.1. 6'da (Biçer 2009) gösterilmiştir.



Şekil 1. 6. *mec* gen kompleksinin sınıfları

Sınıf A *mec* gen kompleksi (class A *mec*) *mec A*'nın yukarısında tam *mecR1* ve *mecI* düzenleyici genlerini, aşağısında hyper variable region (HVR) olarak isimlendirilen aşırı değişken bölgeyi ve insertion sequence IS431 içeren prototip komplekstir. Sınıf B *mec* gen kompleksi *mecA*'nın yukarısında kısa bir *mecR1*, insertion sequence IS1272 aşağısında HVR ve insertion sequence IS431 içeren komplekstir. Sınıf C *mec* gen kompleksi, muhtemelen bağımsız olarak evrimleştiklerinden, C1 ve C2 olmak üzere *mecR1* bölgesinin uzunluğuna ve IS431'in yerleşimine göre iki farklı tipte olabilir. *mecA*'nın yukarısında kısa bir *mecR1* ile birlikte IS431 ve aşağısında HVR ve IS431 içerir. Sınıf D *mec*, *mec* gen kompleksi *mecA*'nın yukarısında *mecR1* ve aşağısında HVR ve IS431' den oluşur. Ana *mec* gen kompleksi sınıflarında çeşitli varyantlar bulunmuştur. Bunlar sınıf A *mec* gen kompleksinde *mecA*'nın yukarısına IS431 veya IS1182 insersiyonu, veya sınıf B *mec* gen kompleksinde *mecA*'nın

yukarisına Tn4001 insersiyonudur. Bu varyantlar sınıfa eklenmiş alt numara olarak gösterilir (IWG-SCC 2009).

c. *J bölgesi*: SCCmec elemanı *mec* ve *ccr* gen komplekslerinden başka üçüncü bir bölge olan J bölgesi olarak isimlendirilen, *mec* ve *ccr* gen komplekslerinden başka bir bölge olarak tanımlanan, SCCmec tipleri arasında farklılık gösteren diziler içerir. J dizileri arasında “insertion sequence” denilen IS elemanları farklı antibiyotiklere dirençten sorumlu transpozonlar yer almaktadır. İsmi ilk olarak L-C, C-M ve I-R bölgeleri olarak bildirilen bu yapı daha sonra J bölgesi olarak değiştirilmiştir. Ancak J bölgesi “birleşme bölgesi”(junkyard region) olarak isimlendirilmektedir. J1 (eskiden L-C) bölgesi *ccr* kompleksi ile sağ kromozom arasında, J2 (C-M) *ccr* gen kompleksi ve *mec* geni arasında ve J3 (I-R) *mec* gen kompleksi ile sol kromozomal bölge arasındaki bölgedir. Aynı *mec-ccr* kompleksinde J bölgesindeki değişiklikler SCCmec alttiplerini tanımlamak için kullanılmaktadır (IWG-SCC 2009).

SCCmec Tipleri:

Günümüze kadar yukarıda belirtilen kriterlere göre sekiz farklı SCCmec tipi tanımlanmıştır. İlk olarak tanımlanan SCCmec tip I, II ve III (Ito ve ark 1999, Ito ve ark 2001)' ü, SCCmec tip IV, V, VI, VII; VIII izlemiştir (Ma ve ark. 2002, Ito ve ark 2001, Oliveira ve ark 2006, Berglund ve ark. 2008, Zhang ve ark 2009). Yeni SCCmec elemanlarının tanımlanmasında mevcut *mec* sınıfı ve *ccr* tipi esas alınarak isimlendirilmesi önerilmektedir. Örneğin SCCmec tip I (1B) tip I *ccr* ve class B *mec* gen kompleksi taşır. Diğer SCCmec tipleri tip II (2A), tip III (3A), tip IV (2B), tip V (5C2), tip VI (4B), tip VII (5C1) ve tip VIII (4A) olarak adlandırılır. Bu nedenle SCCmec tipleri roma rakamları kullanılarak tanımlanır bunu parantez içerisinde *ccr* ve *mec* komplekslerinin tipinin birlikte yazımı izler. Tip III ve tip VI SCCmec elemanları yeni sekans bilgilerine göre düzenlenmiştir. Tip III SCCmec elemanı 67kb uzunluğundadır ve en uzun SCCmec elemanı olduğu bildirilmektedir. Bununla birlikte, 2006 yılında, bu 67 kb'lık elementin SCCmercury ve tip III (3A) SCCmec (tip 3 *ccr* ve class A *mec* taşıyan) olarak bilinen iki küçük SCC elementinin ard arda gelmesinden oluştuğu bildirilmiştir. SCCmec ile SCCmercury' i birbirine karıştırmamak için bu yeni yapı SCCHg olarak isimlendirilmiştir. *S. aureus* HDE288 suşu ilk olarak tip IV SCCmec (Oliviera ve ark. 2001) olarak isimlendirilmiş ancak daha sonra Tip VI SCCmec (4B) olarak yeniden tanımlanmıştır (Oliviera ve ark 2001).

Günümüzde tanımlanmış 8 SCCmec tipi aşağıda özetlenmiştir:

SCC*mec* Tip I; sınıf B *mec* gen kompleksi ve tip I *ccr* gen kompleksinden oluşmaktadır. 34,364 bp olup, transpozon veya plazmid taşımamaktadır. Metisilin ve ağır metaller dışındaki ilaçlara karşı direnç geni taşımamaktadır.

SCC*mec* Tip II; sınıf A *mec* gen kompleksi ve tip II *ccr* kompleksinden oluşmaktadır. 53,017 bp olup metisilin direnci oluşturan *mecA* ve *mecR1* genleri dışında, J bölgesinde pUB110 plazmidi ve Tn554 transpozonu taşımaktadır. Tn554; makrolid, klindamisin ve streptogramin B' ye karşı dirençten, pUB110 ise aminoglikozidlere karşı dirençten sorumludur.

SCC*mec* Tip III; sınıf A *mec* gen kompleksi ve tip III *ccr* gen kompleksinden oluşmaktadır. Beş tipin en büyüğü (66,896 bp) olup, *mecA*, *mecR1* dışında pT181 plazmidi Tn554 transpozonu ve pseudo Tn554 (YTn554) taşımaktadır. YTn554 kadmiyuma karşı dirençten, pT181 tetrasiklin ve civaya karşı dirençten sorumludur. Diğer tiplerde bulunmayan *Yccr* geni adı verilen geni de içerir.

SCC*mec* Tip IV; sınıf B *mec* gen kompleksi ve tip2 *ccr* gen kompleksinden oluşmaktadır. Bu yapı küçük olup *mecA* dışında direnç geni taşımaz.

SCC*mec* Tip V; sınıf C2 *mec* gen kompleksi ile tip5 *ccr* gen (*ccrC*) içermektedir. Ito ve ark. tarafından bir Avustralya suşundan tanımlanmıştır. Bu kasetin boyutu 27,624 bp olup tip IV' den biraz daha büyüktür. Sadece metisilin direnci kodlayan genlere sahiptir (Ito ve ark. 2001, Zhang ve ark 2005, Martins- Cunha 2007).

SCC*mec* Tip VI; sınıf B *mec* gen kompleksi ile tip4 *ccr* gen içermektedir.

SCC*mec* Tip VII; sınıf C1 *mec* gen kompleksi ile tip5 *ccr* gen (*ccrC*) içermektedir.

SCC*mec* Tip VIII; sınıf A *mec* gen kompleksi ile tip4 *ccr* gen içermektedir (IWG-SCC 2009).

SCC*mec* tip I, II ve III esas olarak hastanede kazanılmış metisilin dirençli stafilokok suşlarında bulunur. Bunlar plazmid veya transpoze olabilen genetik elemanlar üzerinde

taşınır. SCCmec tip II ve III çoklu betalaktam dışı antimikrobiyallere dirence neden olur. SCCmec tip IV ve V tipik olarak toplumda kazanılmış metisilin dirençli stafilocok suşlarında bulunur. Bu SCCmec tiplerinin boyutları daha küçüktür ve diğer çoklu direnç genleri taşımazlar (Zaoutis ve ark 2006). Bu gen kasetleri diğer gen kasetlerine kıyasla çok daha küçüktür ve bu özelliğin diğer suşlara aktarımı kolaylaştırdığı düşünülmektedir. Ayrıca bu gen kasetlerinde betalaktam dışı antibiyotiklere direnç geni bulunmaz. Toplum Kökenli Metisilin Dirençli *S. aureus* (TK-MRSA)'da metisilin direnç kazanım mekanizması SCCmec gen kasedi aracılığıylaadır. Bu gen kasetinin boyutunun küçük olması ve hareketliliğini sağlayan genlere sahip olması nedeniyle, gelecekte ciddi sağlık problemlerine neden olması ve diğer Gram pozitif bakterilerde de görülmeye başlaması, gerekli önlemler alınmazsa kaçınılmaz bir son olacağını göstermektedir (Ünal 2006). TK-MRSA prevalansında artış görülmesi ve insanların yanı sıra hayvan rezervuarlarının belirlenmesi ile araştırmalar farklı bir boyut kazanmıştır (Kollef-Micek 2006, Aygün ve ark. 2007). TK-MRSA' nın yayılmasında; hastane kaynaklı klonlardan köken alarak toplumda yayıldığı ya da metisiline duyarlı stafilocokların (MSSA) *mecA* genini MRSA lardan kazanarak yayıldığı şeklinde iki görüş üzerinde durulmaktadır (O'Rourke 2003). TK-MRSA'nın, başlangıçta bakım evlerinde yaşayan, damar içi ilaç bağımlıları ya da kronik hastalığı bulunan insanlarda görülmesine rağmen son zamanlarda askerler, sporcular, çocuklar, tutuklular ve homoseksüel bireyler gibi yakın temasla popülasyonlarda da salgınlar geliştirebildiği belirtilmektedir (CDC 2011). Farklı SCCmec tiplerinin özellikleri Çizelge 1. 5.'te (File 2008) verilmiştir.

Çizelge 1. 5. SCCmec tiplerinin özellikleri

Suş	SCCmec Tipi	Antibiyotik Direnci	PFGE Tipi	Toksinleri	PVL genleri	İnfeksiyon Spektrumu
HK-MRSA	Tip I, II ve III	Çoklu direnç	USA 100	Az	Nadir	Kan, solunum ve üriner sistem infeksiyonları
TK-MRSA	Tip IV ve V	Çoklu direnç görülmesine rağmen eritromisine ve beta laktamlara direnç tipik olarak sınırlıdır	USA 300	Genellikle PVL varlığında fazla	Yaygın	Deri ve yumuşak doku infeksiyonları ve nekrotize pnömöni

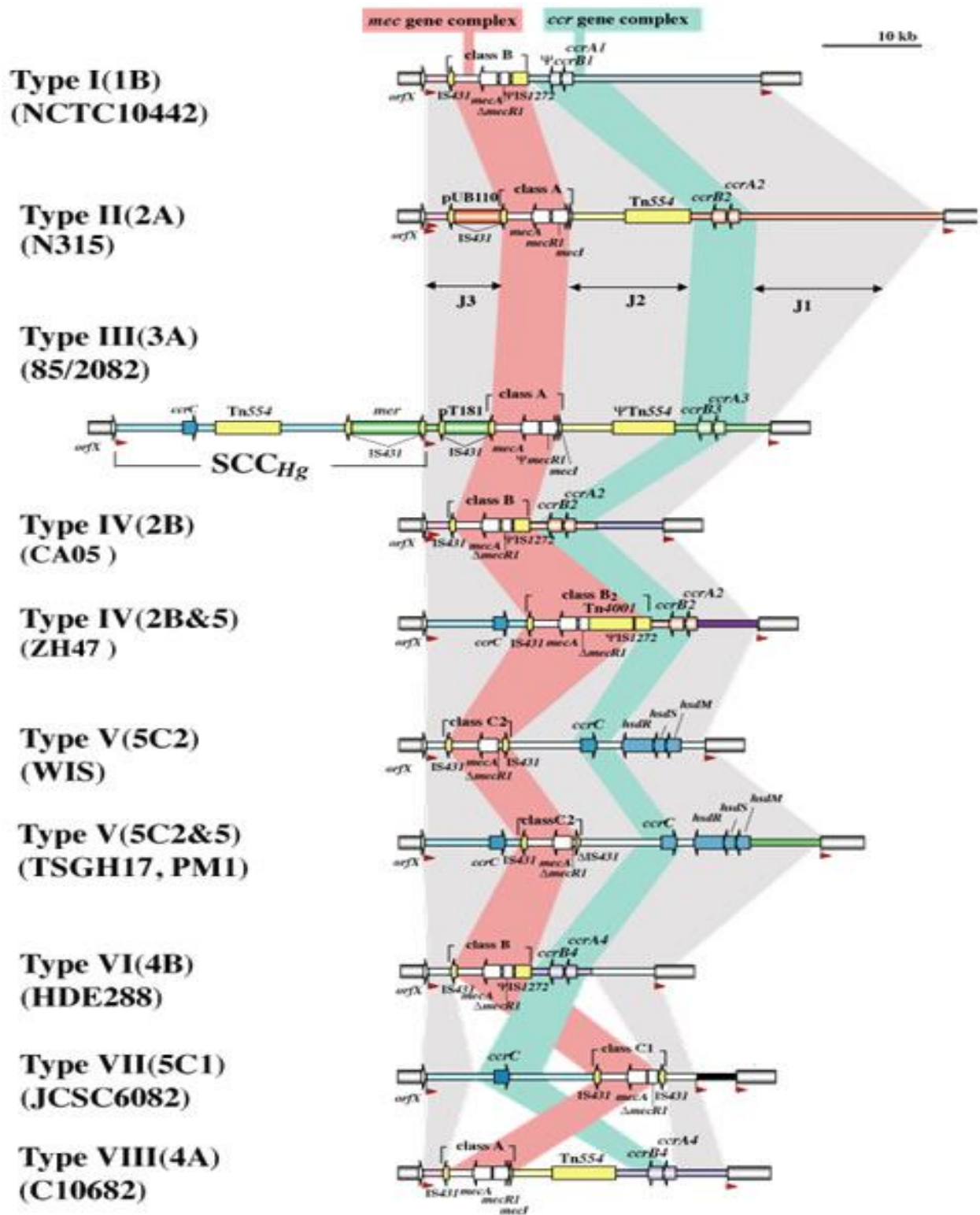
TK-MRSA: Toplum kökenli metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*

HK-MRSA: Hastane kökenli metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*

PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis

Ito ve ark. tarafından üç önemli SCCmec elementinin yapısı tümüyle ortaya konmuştur. İngiltere'de 1961 yılında izole edilen ilk MRSA (NCTC 10442) suşunun Tip I, Japonya' da 1982 yılında izole edilen MRSA(N315) suşunun Tip II, Yeni Zelanda' da 1985

yılında izole edilen MRSA (85/2082) suşunun ise tip III *SCCmec* içerdiği saptanmıştır (Ito ve ark. 1999, 2001). 1990'lı yılların sonlarına doğru izole edilmeye başlanan TK-MRSA suşlarının Tip IV *SCCmec* içerdiği görülmüştür (François ve ark. 2004). *SCCmec* Tip IV MRSA, ağırlıklı olarak daha önce hastane ortamında bulunmamış kişilerde saptanmamıştır. Dünya genelinde MSSA epidemilerine neden olan köken çeşidi çok fazla, buna karşın MRSA epidemilerine neden olan köken çeşidi sınırlı sayıdadır. Bu durum *mec* elemanının geçişinin daha çok horizontal olduğunu düşündürmektedir. MRSA biyotipi ve tek bir kökenin evrimsel profili alıcı MSSA ile *SCCmec*'in DNA parmak izi analizi ile ortaya konmuştur (Okuma ve ark. 2002, Ünal 2004). Şekil 1.7.'de *SCCmec* elemanlarının yapıları gösterilmiştir (IWG-SCC 2009).



Şekil 1.7. SCC_{mec} elemanlarının yapıları (IWG-SCC 2009).

1. 5. MRSA'nın Epidemiyolojisi

Stafilokoklar enfeksiyon etkeni olarak tanımlandıkları 1881 yılından bu yana insan ve hayvanlarda geliştirdikleri hastalıklarla patojen mikroorganizmalar arasında ilk sıralarda yer almışlardır. Beşeri hekimlikte metisilin, penisiline dirençli stafilokokların tedavisinde kullanılmasından kısa bir süre sonra metisiline dirençliliği ortaya çıkmış MRSA'lar tanımlanmış ve bu bakteriler nozokomiyal patojen olarak tüm dünyada önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir. MRSA'lar hastalığın kaynağına göre hastane ya da toplum kaynaklı olabilmektedir (Çetinkaya ve Ünal 1996). Toplumdan köken alan MRSA türleri (TK-MRSA), deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarının yanı sıra artan oranda invaziv enfeksiyonlara da neden olmaktadır. Hastane kaynaklı MRSA (HK-MRSA) enfeksiyonları, yıllarca insanlarda önemli hastalıklara ve ölümlere neden olmuştur. Yüksek mortalite oluşturmaları ile hastane kaynaklı bakteriler araştırmaların odağı haline gelmiştir. Bununla birlikte TK-MRSA prevalansında artış görülmesi ve insanın yanı sıra hayvan rezervuarlığının belirlenmesi ile araştırmalar farklı bir boyut kazanmıştır (Kollef ve ark. 2006).

Stafilokoklar her yerde bulunabilirler. İnsan ve hayvanların derilerinde KNS vardır ve nemli deri kıvrımlarının *S. aureus*'la geçici kolonizasyonu yaygındır. Yeni doğanda kesilmiş göbek kordonu, deri ve perineal bölgenin *S. aureus*'la kolonizasyonu sık rastlanır. *S. aureus* ve KNS'ler orofarinks, gastrointestinal sistem (GİS) ve ürogenital sistemde de bulunurlar. Büyük çocuk ve erişkinlerde kısa süreli veya kalıcı *S. aureus* taşıyıcılığı, nazofarinkste orofarinksten daha yaygındır. Normal sağlıklı erişkinlerin yaklaşık %15'inde nazofaringial *S. aureus* taşıyıcılığı bulunmakla birlikte; yatan hastalar, sağlık personeli, ekzematöz deri hastalığı olanlar ve sürekli ilaç kullananlarda bu oran daha yüksektir. Bu mikroorganizmaların mukozal epitele yapışması stafilokokal hücre yüzey adezinleri tarafından sağlanır (Murray ve ark. 2005). Stafilokokların deri ve nazofarinkste bulunmalarından dolayı yayılması kolaydır ve birçok hastane kaynaklı enfeksiyondan sorumludurlar. Stafilokoklar yüksek ısı, dezenfektanlar ve antiseptik solusyonlara duyarlıdır ancak, kuru yüzeylerde uzun süre canlılıklarını sürdürebilirler. Bu mikroorganizmalar duyarlı kişilere direkt temas ve kontamine materyallerle transfer edilebilir (Murray ve ark. 2005).

MRSA enfeksiyonları 1970'lerin sonlarına doğru öncelikle Avrupa'da daha sonra Amerika'da endemik olarak görülmeye başlanmıştır. Daha az sıklıkla olmakla birlikte, MRSA'lar yaşlı bakım evleri, kreşler ve kronik intravenöz ilaç kullanıcıları gibi toplum

kaynaklı enfeksiyonlarda da etken olabilmektedir. Nozokomiyal enfeksiyonların yaklaşık 2/3' ü yoğun bakım birimlerinde görülmektedir. Metisiline dirençli stafilocokların kolonizasyon veya enfeksiyon oluşturmada, uzun süreli hospitalizasyon, çeşitli antibiyotiklerle ve uzun süreli tedavi, metisiline dirençli stafilocoklarda kolonize veya enfekte hastalarla aynı kapalı ortamda bulunma hastalara ait önemli risk faktörlerini oluşturmaktadır. Yanık vakalarındaki bireylerde bu risk oldukça yüksektir. Bu nedenle, nozokomiyal kökenli *S. aureus* enfeksiyonlarının identifikasyon ve antibiyotik duyarlılık paternlerinin erken ve doğru olarak tespiti son derece önemlidir (Durupınar 2001). Son yıllarda, tüm dünya da olduğu gibi ülkemizde de hastanede yatan hastalardan izole edilen *S. aureus* suşlarında metisilin direncinde ciddi artışlar saptanmaktadır (Derbentli 2005).

MRSA enfeksiyonlarının sıklığı ülkeden ülkeye, hastaneden hastaneye ve hatta hastane içinde değişik servisler arasında bile büyük farklılıklar göstermektedir. Bu bakteri ile görülen enfeksiyonların sıklığı İskandinav ülkelerinde %1'den, Yunanistan, İtalya, İspanya, Japonya ve Fransa' da olduğu gibi % 80' lere kadar değişmektedir (Martins ve Cunha 2007). ABD'de yoğun bakım ünitelerinden izole edilen *S. aureus* suşlarının %52'sinden, yoğun bakım harici ünitelerin ise % 42'sinden metisilin direnci saptanmıştır (NNIS 2004). KNS açısından bakıldığında ABD'de bakteriyemilerden izole edilen suşların % 65'inin metisilin dirençli olduğu bildirilmiştir (Martins ve Cunha 2007).

Türkiye'de MRSA enfeksiyonları özellikle beşeri hekimler tarafından yıllardır takip edilmektedir. 1996-1999 yılları arasında yapılan 9 ayrı çalışmada metisilin direncinin ortalama % 47.5 olduğu hesaplanmış, 2000-2003 yıllarında 8 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 (Derbentli 2004). Türkiye geneline bakıldığında KNS' lere 2003-2004 yıllarında belirlenen metisilin direnç oranının (%50), *S. aureus* suşlarındakine benzer olduğu gözlenmiştir (Derbentli 2005). Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi'nde 2007-2008 yıllarında, metisilin direnç oranı *S. aureus* suşlarında % 49, KNS suşlarında % 60 olarak bulunmuştur. Bozca ve arkadaşları İzmir Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde 2005-2006 yıllarında izole ettikleri 720 *S. aureus* ve 1169 KNS suşunu metisilin direnç oranlarını yönünden inceledikleri bir çalışmada; *S. aureus* suşlarında % 34, KNS suşlarında % 56 oranında metisiline direnç belirlemişlerdir (Bozca ve ark. 2008). Yapılan çalışmalarda bildirilen MRSA oranları; Marmara Üniversitesi'nde 2000'de % 67,

2001’de % 60 (Korten 2003), Gazi Üniversitesi’nde 2001’ de % 73, 2002’ de % 77 (Kaçmaz ve ark. 2002), Erciyes Üniversitesi’nde % 66 (Esel ve ark. 2003), Ankara Üniversitesi’nde 1988’de % 32, 1995’te % 45; Hacettepe Üniversitesi’nde 1988’de % 20, 1995’te % 25 olarak bildirilmiştir (Çetinkaya 2000). Adnan Menderes Üniversitesi’nde 2009 yılı hastane enfeksiyonlarından izole edilen 198 suşun 31’i (% 15,6) MRKNS, 23’ü (% 11,6) MRSA olarak tespit edilmiştir (İnegöl 2010). Genelde yıllar geçtikçe dirençli suş sayısında bir artış gözlenmektedir. Ancak Sipahi ve arkadaşları Ege Üniversitesi Hastanesi’nde yaptıkları çalışmada metisilin direncinin 2001’de % 73,8 iken 2005’de % 55,3 olduğunu, 2003 bütçe uygulama talimatı sonrasında metisilin ve diğer antibiyotiklere karşı dirençteki istatistiksel olarak anlamlı düşüş uygulamanın yalnızca antibiyotik harcamalarında düşüğe değil, antibakteriyel dirençte azalmaya da neden olduğunu düşündüğünü bildirmektedir (Sipahi ve ark. 2007).

1. 5. 1. Evcil Hayvanlarda MRSA Taşıyıcılığı

Veteriner hekimlikte MRSA ile ilgili geçmiş yıllarda az sayıda olgu mevcut olmasına karşın, günümüzde evcil hayvanlarda MRSA enfeksiyonları ve taşıyıcılığı ile ilgili çalışmalar artmıştır. Özellikle de at, domuz, kedi ve köpek gibi çeşitli evcil hayvanlarda MRSA taşıyıcılığı ve hayvan rezervuarlığı bildirilmiştir. Ev veya çiftlikte beslenen evcil hayvanlar MRSA kaynakları ile temas sonrası etkeni alarak rezervuar olabilmekte, bu suretle bireylerde enfeksiyonlara ya da nüklere neden olabilmektedirler (Duijkeren ve ark. 2004).

TK-MRSA’nın insan ve hayvanları kapsayan geniş bir rezervuar spekturumunun olması mücadeleyi zorlaştırmaktadır. Evcil hayvanlarda MRSA enfeksiyonları ve taşıyıcılık hayvan orjinli *S. aureus* ve KNS (*S. intermedius*, *S. felis*, *S. schleiferi*, *S. simulans*, *S. sciuri*, *S. hominis*, *S. xylosus*, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus*) *mecA* geni ve metisilin dirençliliği belirlenmiştir (Gortel ve ark. 1999).

Metisiline dirençli ya da duyarlı olan *S. aureus*’lar, hayvanlarda sistemik ve lokal çeşitli enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bu hastalıklar; pnömoni, rinitis, bakteriyemi, septik artiritis, osteomyelitis, omfaloflebitis, metritis, mastitis, fistül, apse, dermatitis, pyoderma ve postoperatif yara enfeksiyonları şeklinde görülmektedir. İnsanlarda olduğu gibi hayvan izolatu olan MRSA enfeksiyonlarında da inkübasyon süresi klinik sendroma göre değişebilir ve hayvanlar klinik bulgu göstermeden değişik periyotlarda kolonize olabilir. Köpek, kedi, at ve

diğer evcil hayvanlar arasında asemptomatik MRSA taşıyıcılığı bulunabilmekte ve bu hayvanlar hem insanlar hem de diğer hayvanlar için rezervuar olarak görev almaktadır. Çeşitli ülkelerde yapılan çalışmalarda evcil hayvanlar arasında MRSA enfeksiyonları, kedi, köpek, at, sığır, koyun, domuz, tavşan, papağan ve tavuklarda bildirilmiştir. Hayvanlarda MRSA taşıyıcılığına yönelik yapılan araştırmalar insan çalışmaları kadar fazla olmasa da her geçen gün artmaktadır (Weese ve ark. 2006).

Atlarda MRSA Taşıyıcılığı: Atlarda veteriner kliniklerde belirlenen MRSA enfeksiyonlarında hayvanların tedavisi güçleşmekte mortalite yükselmektedir. Bir yaş altı atlarda endemik olarak MRSA taşıyıcılığı bulunabilmekte ve bu durum rezervuar hayvanların ülke içi ya da ülkeler arası sevkiyatlarında kaygı verici olarak ifade edilmektedir. Kanada veteriner araştırma hastanesi at kliniklerinde üç yılı kapsayan bir çalışma başlatılmış; 2002 yılında 17, 2003 yılında 10 ve 2004 yılında 36 atta MRSA kolonizasyonu tespit edilmiştir. Kanada at izolatlarının (CMRSA-Kanada Epidemik MRSA) moleküler tiplendirilmesine yönelik bir çalışmada, 79 MRSA' nın 75' i tiplendirilmiş bunlardan 72 sinin CMRSA-5/SCCmecA tip IV olduğu ve bu türün toplum kökenli MRSA tipleri arasında yer aldığı bildirilmiştir. Hem at çiftliklerinde hem de kliniklerde tedavi gören atlarda önemli oranlarda MRSA belirlenmiş ve alt tiplendirmelerde karşılıklı at-insan bulaşı ortaya konulmuştur. CMRSA' nın hastane kökenli insan izolatları arasında pek yaygın bir tür olmadığı ancak genç atlar ve taylarda, at bakıcılarında ve riskli meslek gruplarında bu tipin yaygın olduğu belirlenmiştir. Ayrıca CMRSA-5' in sağlıklı atların nazal mukozalarına iyi adapte ve kolonize olduğu, bu hayvanlarla yakın temas sonrası insanlara bulaşabileceği bildirilmiştir (Weese ve ark. 2006).

Domuzlarda MRSA Taşıyıcılığı: Domuz yetiştiriciliğinin yapıldığı ülkelerde özellikle Hollanda'da, domuz populasyonunda MRSA taşıyıcılığının araştırıldığı bir çalışmada bu hayvanların TK-MRSA' nın yayılmasında önemli bir rezervuar olduğu belirtilmiştir. Domuz yetiştiriciliğinde MRSA bulaşı risk gruplarını; domuz yetiştiricileri, hayvan nakliyecileri, mezbaha çalışanları ve veteriner hekimler oluşturmaktadır (Neeling ve ark. 2007). Voss ve ark. domuz teması olan 3 kişiden MRSA taşıyıcılığı belirlemişlerdir (Voss ve ark. 2005). Neeling ve arkadaşları Hollanda' da 9 farklı domuz kesimhanesinde 540 sağlıklı domuzun burun deliklerinden kesim öncesi sürüntü numunesi almışlar ve örneklerin 209 (%39)'unda MRSA tespit etmişlerdir. Ayrıca bu türlerde yüksek oranda tetrasiklin, doksisisiklin, eritromisin ve klindamisin dirençliliği saptanmıştır (Neeling ve ark. 2007).

Çiftlik Hayvanlarında MRSA Taşıyıcılığı: MRSA'lar, sütçülük sektöründe oluşturdukları mastitisler ile insan ve hayvan sağlığının yanı sıra ekonomiye de büyük zarar vermektedir. 1997-2004 tarihlerinde Kore'de 153 farklı çiftlikte, 3047 mastitisli inek sütünden 835 *S. aureus* ve 763 KNS izole edilmiştir. Bu izolatların metisilin dirençliliği araştırıldığında 21 (% 2,5) *S. aureus* ve 19 (% 2,4) KNS suşunda dirençlilik tespit edilmiştir (Moon ve ark. 2007). 2001' de antibiyotik dirençliliğine yönelik Macaristan' da yapılan bir sörveyde, hayvanlarda ve hayvansal ürünlerde hiçbir vakada *mecA* pozitif stafilokok izole edilmemiş ancak 2004' de devam eden bu çalışmada sığır sürülerinde 5 MRSA izolasyonu yapılmıştır (Kaszanyitzky ve ark. 2002). Ülkemizde sığırlarda yapılan bir çalışmada, mastitisli süt örneklerinden 2 MRSA ve 1 MRKNS suşu izole edilmiştir (Kireççi ve ark. 2002). Portekiz' de, subklinik mastitisli ineklerden izole edilen 9 *S. epidermidis* suşunda metisilin dirençliliği belirlenmiştir (Nunes ve ark. 2007). Büyükbaşların yanı sıra koyun ve keçi gibi küçükbaş hayvanlarda da metisine dirençli Stafilokoklar tespit edilmiştir (Bochev ve ark. 2005). Hayvanlarda ve hayvansal ürünlerde MRSA/MRKNS varlığı, günümüzde çok yaygın olmasa da gelecekte bu bakterilerin gıdalar ile oluşturacağı sağlık sorunu göz ardı edilmemelidir.

Pet Hayvanlarında MRSA Taşıyıcılığı: Pet hayvanlarında taşıyıcılık oranının ortaya konulması güç olup böyle vakalar genellikle insan ya da hayvan hastalıklarının takibi sırasında ortaya çıkmaktadır. Amerika'da bir hemşirede MRSA tespitini takiben yapılan incelemelerde, bu bireyin çocuğunda ve evinde beslediği köpeğin oral-nazal, anal mukozasında MRSA izolasyonu yapılmış ve ev ortamında aile içi bulaşma olduğu anlaşılmıştır. Bu çalışmada köpeğin daha önce antibiyotik tedavisi görmediği ve bu bulaşmanın hayvan sahibinden kaynaklandığı tespit edilmiştir (Duijkeren ve ark. 2004).

1998'de Kore' de ilk kez evcil köpeklerde MRSA bildiri yapılmış ve veteriner kliniklerinde tanısı konulan 12 köpekte MRSA izole edilmiştir. Bu izolatlarda, beta laktamlar, aminoglikozidler ve kinolonlar' a karşı düşük sensitivite, mupirasin ve glikopeptidlere ise yüksek sensitivite belirlenmiştir (Pak ve ark. 1999). Brezilya'da sağlıklı kedilerin taşıyıcılık yönünden araştırılmasında, 148 kediden 11' i MSSA ve 3' ü MRSA olmak üzere toplam 14 *S. aureus* suşu izole edilmiştir (Lilenbaum ve ark. 1998). İngiltere'de ev hayvanlarına yönelik kapsamlı bir çalışmada, yapılan sörveyde 6519 hayvanın 95'inde (69 köpek, 24 kedi, 1 tavşan,1 at) MRSA tespit edilmiştir (Rich ve ark. 2004). Aseptomatik taşıyıcı insanlardan,

veteriner kliniklerinde tedavi gören hayvanlara MRSA bulaşabilmektedir. İrlanda veteriner kliniğinde cerrahi operasyon sonrası bir köpekte MRSA izolasyonu yapılmış ve ameliyatı gerçekleştiren veterinerin nazal florasında da aynı suş tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmalarda köpek izolatu MRSA' nın yaygın bir insan suşu olan epidemik MRSA-15 olduğu belirlenmiştir (Leonard ve ark. 2006). Loeffler ve arkadaşları veteriner kliniklerinde personelin % 17.9'unda MRSA taşıyıcılığı saptamışlar ve bu kişilerin bulaşmada rol aldıklarını belirtmişlerdir (Loeffler ve ark. 2005).

Bu araştırmalar, gerek ev ortamında gerekse veteriner kliniklerinde yakın temas sonrası hayvan ile hayvan sahibi arasında MRSA bulaşımın olduğunu ortaya koymaktadır. Hayvanların taşıyıcılığı, enfeksiyon kaynağı olarak çoğu zaman göz ardı edilmekte ve TK-MRSA yaygınlaştıkça bu oran sahipli evcil hayvanlara da yansımaktadır. Bulaşmanın ilk olarak hayvandan mı yoksa sahibinden mi kaynaklandığını belirlemek güç olmaktadır. Ancak sonuç olarak hayvanlar etkeni nazal olarak bulundurabilmekte ve MRSA geniş bir rezervuar potansiyeline ulaşarak insanoğluna karşı varlığını daha da güçlendirmektedir. Evcil hayvanlarda MRSA taşıyıcılığı ile mücadelede, insanlarda MRSA nazal taşıyıcılığını elimine etmek için intranasal mupirasin uygulaması gibi antibakteriyel tedaviler yapılmaktadır. MRSA, nazal yerleşimin dışında vücudun diğer bölgelerinde kolonize olmuş ve mupirasin dirençliliği varsa, özellikle aynı ailenin bireylerinde ya da pet hayvanlarında taşıyıcılık bulunuyorsa, nazal tedaviyi takiben reenfeksiyonlar sıklıkla görülebilmektedir (Van Duijkeren ve ark. 2004).

Hayvanlarda nazal taşıyıcılığın eliminasyonunda topikal aplikasyonlar pratik olmadığından ya da tedavide elverişsiz kaldığından sistematik tedavi gerekmektedir (Duijkeren ve ark. 2004). Günümüzde hayvanlarda, nazal taşıyıcılığı önlemede kabul edilebilir ve güvenli eradikasyon seçenekleri bulunmamaktadır. Ülkeler arası canlı hayvan ya da hayvansal besin ithalatı nedeniyle TK-MRSA'nın yayılarak uluslar arası zoonotik bir risk olabileceği vurgulanmaktadır (Wulf ve ark. 2008). Hollanda' da hastane kaynaklı MRSA' nın düşük bir orana (%1) sahip olduğu ve bu durumun ise katı sağlık kuralları ile sağlandığı bildirilmektedir. Ayrıca benzer bir mücadelenin TK-MRSA için yapılması gerektiği ve bu amaçla hastane girişlerinde risk gruplarında taramalar, hayvan taşıyıcılığına yönelik ise "bul ve yok et" uygulamalarının önemi vurgulanmaktadır (Wulf ve ark. 2008).

Günümüzde MRSA'lar hem insanlarda hem de evcil hayvan popülasyonunda gittikçe büyüyen bir küresel sorun haline dönüşmektedir. Hayvanlarda MRSA taşıyıcılığının belirlenmesi ile TK-MRSA yayılımında evcil hayvanların rezervuar olarak son derece önemli olduğu ortaya konulmuştur. Hayvan-insan bulaşmasına karşı, çoğu ülkede ciddi sağlık tedbirleri bulunmamaktadır. Bununla birlikte hayvanlarda MRSA taşıyıcılığı ile mücadelede yapılacaklar; risk gruplarında hayvan teması öncesi ve sonrasında el hijyeni, tarama testleri, bariyer uygulamaları ile sürü taramalarında taşıyıcı olduğu belirlenen hayvanların eradikasyonu şeklinde özetlenebilir. Aktif sorveyans ve enfeksiyon kontrol önlemleri sadece insanlarda değil aynı zamanda evcil hayvanlarda da uygulanmalı, yani mücadele her iki popülasyona yönelik olmalıdır. İnsan vakalarını takiben ev halkı ile evde bakılan hayvanlar taranmalı ve taşıyıcılar en uygun yöntemlerle sağaltılmalıdır. Bu uygulamalar hem toplum kaynaklı MRSA prevalansının azalmasına hem de hayvanlardaki enfeksiyonların erken teşhis ve tedavisine olanak sağlayacaktır (Kireççi 2009).

1. 6. Antimikrobiyal Direnç

Hem hastane hem de toplum kaynaklı enfeksiyonlara neden olan *S. aureus*'un antibiyotiklere hızla uyum sağlama yeteneği dikkat çekicidir. Özellikle MRSA'un, tüm beta-laktam antibiyotiklere intrinsik direnci ve ayrıca diğer antibiyotiklere de direnç geliştirme eğilimi vardır (Berger ve Rohrer 2002).

1.6.1. Penisilin Direnci

Stafilokoklar sıklıkla hayvan ve insanların deri ve mukoz membranlarında kolonize olurlar ve hızlı bir şekilde özellikle klinik kullanıma yeni giren antimikrobiyal ilaçlara direnç kazanma kapasitesine sahiptirler. Birçok stafilokok suşu içerisinde *S. aureus* en patojenik potansiyele sahiptir çünkü *S. aureus* tarafından direnç genlerinin kazanılması stafilokokal enfeksiyonların tedavi ve kontrolüne mani olan en önemli sorundur (Jevons 1961).

Bugün stafilokokların % 90'ından fazlası penisilinaz üretmektedir. Beta-laktamazı kodlayan gen, plazmid üzerinde lokalize olmuş, aktarılabılır bir elementtir ve çoğu kez ek antimikrobiyal direnç genlerini de taşır. Stafilokokların penisilin direncine beta-laktamazı kodlayan *blaZ* geni aracılık eder. Beta-laktamaz ekstraselüler bir enzim olup, stafilokoklar beta-laktam antibiyotiklere maruz kaldığı zaman sentezlenir. Bu enzim, beta-laktam halkasını

hidrolize ederek penisilini inaktive eder. *blaZ*, represör *blaI* ve antirepresör *blaR1* olmak üzere iki regülatuar genin kontrolü altındadır (Lowy 2003).

1.6.2. Metisilin Direnci ve Mekanizmaları

Penisilinaza dirençli semisentetik bir penisilin türü olan metisilin ilk olarak 1961'de tanıtılmıştır. Takibinde de metisilin dirençli izolat rapor edilmiştir (Lowy 2003, Pottumarthy 2005). Bu tarihten itibaren birçok farklı MRSA klonu dünyanın her tarafına yayılmıştır. MRSA ilk başlarda tipik bir nozokomiyal patojenken, son zamanlarda artık toplumda da görülmeye başlanmıştır. Nozokomiyal suşların aksine TK-MRSA, sadece birkaç direnç determinantı taşımaktadır. Bu yeni tip toplum kaynaklı MRSA bugünlerde metisilin direncinin yayılımının yeni halkasını başlatmıştır (Berger ve Rohrer 2002, Winn ve ark 2006).

Bazı TK-MRSA enfeksiyonlarının yüksek mortalite ile ilişkili olması endişe doğurmaktadır. Klonal olarak ilişkili MRSA suşlarının dört sağlıklı çocukta ölüme neden olduğu gösterilmiştir. Bu enfeksiyonlarda ilk olarak beta-laktamların ampirik olarak seçilmesi morbiditenin artışına katkıda bulunmuştur. Ek olarak bazı toplum kaynaklı enfeksiyonlarda enterotoksinler veya Panton-Valentin Lökosidin gibi virülens genlerinin bulunması hasta morbiditesini artırır (Lowy 2003).

TK-MRSA'nın yüksek virülens potansiyelinin, PVL subünitlerini kodlayan *lukS-PV* ve *lukF-PV* genleriyle ilişkili olduğunu gösteren epidemiyolojik ve klinik veriler vardır. PVL genleriyle ilgili takip eden çalışmalar, TK-MRSA izolatlarındaki PVL'nin şiddetli cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları ile nekrotizan pnömoni ve sepsis ile ilişkisini ortaya koymuştur (Boyle ve Daum 2007).

1.6.2.1. Penisilin Bağlayan Proteinler

Stafilokoklar 20-40 nanometre kalınlığında, peptidoglikan olarak adlandırılan ağ benzeri bir yapı ile çevrilmiştir (Stapleton ve Taylor 2002). Peptidoglikan tabaka 3 bölümden meydana gelir: 1-Polisakkarit yapıda bir iskelet, birbirine β (1,4) bağlarıyla bağlı, tekrarlayan N-asetil glukozamin (NAGA) ve N-asetil muramik asit (NAMA) alt birimlerinden oluşur. 2-N-asetil muramik asite bağlı D ve L aminoasitlerden oluşmuş tetrapeptid zincir. 3-Bir

tetrapeptidin dördüncü aminoasitinin (alanin) α -terminal karboksil grubu ile komşu N-asetil muramik asit'deki tetrapeptidin üçüncü aminoasitinin amino grubu arasındaki çapraz bağlar.

NAGA ve NAMA, β (1,4) bağları ile bağlanarak peptidoglikan iskeletini oluşturur. Muramik asite bağlı tetrapeptid zincirlerindeki alanin aminoasitinin karboksi terminali ile lizin aminoasitinin amino grubu pentaglisin peptid zincirleri ile çapraz bağlanır (Cengiz 1999). Pentaglisin çapraz köprüleri, *fem* (factor essential for resistance to methicillin) genlerinin kodladığı *FemX*, *FemA*, *FemB* proteinleri ile sitoplazmada oluşturulur. Bu Fem proteinleri ana peptiddeki L-lizin rezidülerine, glisin rezidülerini bağlar. Çapraz bağlama veya transpeptidasyon reaksiyonlarını sitoplazmik membranın dış yüzeyinde yer alan “Penisilin Bağlayan Proteinler” (PBP) katalize ederler (Stapleton ve Taylor 2002, Lowy 2003).

S. aureus'da dört penisilin bağlayan protein PBP1-PBP2-PBP3-PBP4 vardır. Bu PBP'ler yüksek molekül ağırlıklı iki protein domainine sahiptir. Birisi transpeptidasyon (çapraz bağlamada) diğeri ise transglükolizasyonu (glukan zincirini büyüten) içerir. Ana peptide bağlı terminal D-alanin-D-alanin'e benzeyen beta-laktam antibiyotikler, PBP'lerin transpeptidasyon domainlerini inhibe ederler. Böylece çapraz bağlanma reaksiyonuna müdahale ederler. Peptidoglikanın çapraz bağlanması olmayınca hücre duvarı mekanik olarak zayıflar, stoplazmik içeriklerin bazıları dışarı salınır ve hücre ölür (Chambers 1988, Berger ve Rohrer 2002, Stapleton ve Taylor 2002, Lowy 2003, Hardy ve ark. 2004).

Metisilin direnci, metisilini hidrolize eden beta-laktamaz ekspresyonundan ve normal PBP2'lerle karşılaştırıldığında daha düşük penisilin bağlama afinitesi olan, PBP2'nin değişmiş formlarının ekspresyonu yoluyla ortaya çıkar. Bununla birlikte *S. aureus*'daki metisilin direncinin ana mekanizması PBP2a'nın ekspresyonu ile olur. Bu PBP2 ile karıştırılmamalıdır. PBP2a'nın sentezi normalde düşük seviyelerdedir, fakat bu sentezi düzenleyen genlerde mutasyon oluşursa sentez seviyesi artar (Hackbarth ve Chambers 1989, Berger ve Rohrer 2002, Stapleton ve Taylor 2002, Lowy 2003, Hardy ve ark. 2004, Velasco ve ark. 2005, Akcam ve ark. 2007, Perez ve ark. 2007).

1. 6. 2. 2. PBP2a

MRSA, MSSA izolatlarından genetik olarak kromozomlarındaki “*mec* elementi” denilen yabancı DNA'nın varlığıyla ayrılır. *mecA* geni, 76 kDa ağırlığında PBP2a'yı kodlar.

Mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber *mecA* geninin orjininin *S. sciuri* olduğu ileri sürülmektedir. Diğer PBP'lerle benzer olarak PBP2a'da penisiline bağlanma ile ilişkili ortak yapısal motif gösterir. Fakat beta-laktam antibiyotiklere afinitesi oldukça düşüktür. Bunun sonucunda diğer PBP'lerin transpeptidasyon aktivitesini inhibe edebilecek metisilin dozlarında, PBP2a peptidoglikanda glikan zincirlerinin çapraz bağlanmasını sağlayacak şekilde aktif kalır. Bundan dolayı metisilin direncinde sefalosporinleri de içeren tüm beta-laktam antibiyotiklere direnç vardır. (Berger ve Rohrer 2002, Stapleton ve Taylor 2002, Lowy 2003, Hardy ve ark 2004).

1. 6. 2. 3. Metisilin Direnç Düzeyini Etkileyen Faktörler

Metisilin direnci; *mecI*, *mecR* proteinleri, *blaZ* sisteminin regülatör sinyal verici proteinleri, *fem* gibi metisilin direnci için gerekli olan faktör genler ve diğer bazı faktörlerce düzenlenir (Chambers 1997, Hiramatsu ve ark. 2002, Ünal 2004). Çoğu MRSA suşu heterojen metisilin direnci göstermektedir. Bu fenotipteki hücrelerin küçük bir kısmında yüksek düzeyde metisilin direnci vardır. Yüksek düzeydeki direnç birçok farklı mekanizmaya bağlı olabilir ancak bunlardan henüz çok az bir kısmı tanımlanabilmiştir. Yüksek düzeyde direnç gösteren subklonun %1' den az kısmında *lytH* inaktivasyonu vardır (Ünal 2004). *lytH*; asetilmuramil-L-alanin amidaz ile homoloji gösteren bir litik enzimi kodlar ve bu enzim yüksek düzeyli dirence neden olur. Bunun dışında yüksek düzeyli direnç nedeni olan farklı mekanizmalarda bulunabilmektedir (Chambers 1997, Bachi ve Rohrer 2002).

Metisilin direncinin insersiyon ile önlendiği deneysel çalışmalar *fem* ve *aux* (auxiliary) diye adlandırılan iki grup genin tanımlanmasına yol açmıştır. Tanımlanan bu faktörler housekeeping genlerdir ve koruyucudurlar. Bunlar *S. aureus*' un yaban tip suşlarının genomlarında bulunur ve aktiviteleri direncin aktarılmasında çok önemlidir. *fem* veya *aux* faktörlerinin sayısı 20'den fazladır. Birçoğu direkt veya indirekt yolla peptidoglikan sentezinde rol oynar. Fakat hiçbirinin PBP2a ekspresyonunu etkilediği gösterilmemiştir (Chambers 1997, Bachi ve Rohrer 2002).

Metisilin Direnç Düzeyini Etkileyen İnternal Faktörler: Genetik ve biyokimyasal çalışmalar PBP2a' nın fonksiyonelliği için bazı substratlara ihtiyacı olduğunu ortaya koymuştur. Bu substratların oluşumunu engelleyen faktörün metisilin direncini etkileme

ihtimali vardır. Yapılan çalışmalarda PBP2a'nın aşağıda belirtilen faktörlere ihtiyacı olduğu gösterilmiştir (Chambers 1997, Bachi ve Rohrer 2002, Ünal 2004).

a. Belirli Uzunluktaki Glikan Zincirleri: PBP2a, PBP2'nin transglikozilaz aktivitesine bağımlıdır. Beta laktamlar yüksek molekül ağırlıklı PBP' lerin transpeptidaz "domain"inin inaktivasyonu daha kısa olan glikan zincirlerin sayısında artışa ve metisilin direncinde belirgin azalmaya neden olur (Bachi ve Rohrer 2002, Ünal 2004).

b. Normal Peptid Konfigurasyonu İçin Gerekli Kök Peptidler: Ortama glisin konulduğunda, peptidoglikan zincirinin sonunda normal koşullarda olması gereken iki alanin rezidüsünün yerini, iki glisin rezidüsünün almasının metisilin direncinde azalmaya ve homojen fenotipin heterojen fenotipe dönüşmesine neden olduğu bilinmektedir. UDP-N-asetil- muramil tripeptid sentetazı kodlayan gen olan *murE* (*femF*)'nin inaktivasyonu sonucunda da metisilin direncinde azalma olur. Nedeni hücre duvarı prekürzör havuzundaki UDP-bağlı muramil dipeptidlerin birikmesidir. Bu sonuçlar PBP2a' nın doğru uzunlukta ve normal seride peptid eldesi için kök peptidlerine ihtiyaç olduğuna işaret etmektedir (Bachi ve Rohrer 2002, Ünal 2004).

c. İntakt İçin Gerekli Pentaglisin Çapraz-Köprüleri: Glikan zincirlerini birbirine bağlayan pentaglisin çapraz köprülerinin yapımından *femA*, *femB* ve *femX* (FmhB) sorumludur. *FemX* birinci glisini, *femA* ikinci ve üçüncü glisinleri ve *femB* de dördüncü ve beşinci glisinleri köprüye sokar. *femA* ve *femB* arasında değişme olmadığından ve bu proteinlerden herhangi birini kodlayan genlerin inaktivasyonu sonucu mono veya tri-glisinli çapraz köprüler oluşur. *femA* veya *femB* genlerinin herhangi birinin inaktivasyonu bakteri için letal olduğundan, *femA* ve *femB* proteinleri ilaç çalışmalarının yeni hedefleridir (Bachi ve Rohrer 2002, Ünal 2004).

Metisilin Direnç Düzeyini Etkileyen Eksternal Faktörler: Tuz konsantrasyonu, pH, ortam kompozisyonu, osmolarite ve ortam sıcaklığı metisilin direncini etkileyen eksternal faktörlerdir. Yüksek (%6,5) NaCl konsantrasyonunun ve düşük sıcaklığın (30-35 C) metisilin direncini nasıl artırdığı tam olarak bilinmemektedir. İnkübasyon süresinin 18 saat yerine 24 saate uzatılmasının da metisilin dirençli suşların saptanma şansını artırdığı bilinmektedir (Ünal 2004).

1. 6. 3. Stafilokoklarda Metisilin Direncini Saptamaya Yönelik Yöntemler

Antimikrobiyal ilaçlara karşı duyarlılık birçok yöntem ile saptanabilir. Yöntemler iki genel başlık altında toplanabilir. Bunlar; direnç fenotipinin belirlendiği yöntemler: Disk difüzyon yöntemi, dilüsyon yöntemleri, epsilometrik yöntem (E test), antimikrobiyal ajanları inaktive eden enzimlerin saptanması ve genotipik yöntemlerdir.

1. 6. 3. 1. Direnç Fenotipinin Belirlendiği Yöntemler

Disk Difüzyon Yöntemi: Bu yöntemde belirli bir miktar antimikrobiyal ajan içeren diskler, bakterinin standart süspansiyonunun yayıldığı agar plakları yüzeyine yerleştirilir. Antibiyotik için inhibitör olan düzeyi, disk çevresinde üreme olmayan alanın çapı ölçülerek belirlenir. Antibiyotik ve bakteri türüne göre farklı olabilen değerler standartlara göre yorumlanır. Sınır değerler, her antimikrobiyal ajan için MİK ve ulaşılabilir serum düzeyleri göz önüne alınarak belirlenmiştir. Disk difüzyon yöntemi kolay ve ucuzdur. Bu nedenle de rutin laboratuvar uygulamalarında da sık olarak kullanılmaktadır. Ancak uluslararası standartlara göre ve kalite kontrolü yapılarak uygulanmalıdır (Cengiz 1999, Jorgense ve Turnidge 2003, Turnidge ve ark. 2003, Brown ve ark. 2005).

Dilüsyon Yöntemleri: Katı veya sıvı besiyerlerinde uygulanabilir. In vitro duyarlılık testleri arasında “altın standart” olarak kabul edilir. Antimikrobiyal ajan iki katlı dilüsyonlar şeklinde azalan yoğunluklarda hazırlanır. Agar dilüsyon yönteminde ise; belirli konsantrasyonlarda antimikrobiyal ajan besiyeri içinde yer alır. Belirli dilüsyondaki bakteriden ekim yapılarak, inkübasyon süresi sonunda gözle görülür üremeyi engelleyen en düşük antimikrobiyal ilaç yoğunluğu saptanır. Buna Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MİK) denir ve (g/ml) şeklinde ifade edilir. MİK değerinin duyarlılığı mı yoksa direnci mi temsil ettiğini belirlemek için, test sonunda saptanan konsantrasyon, duyarlılık sınırı adı verilen bir değer ile karşılaştırılır. Duyarlılık sınırı, sağaltım sırasında ulaşılan serum düzeyleri ile duyarlılık özelliği kesin olarak bilinen bakterilerin MİK değerleri göz önüne alınarak belirlenmektedir. Her antimikrobiyal ajan için ayrı bir sınır değeri söz konusudur. MİK değeri bu sınırdan küçük ise, bakteri söz konusu ajana duyarlı olarak değerlendirilir. Dilüsyon temeline dayanan testler kantitatif sonuç verdikleri için tercih edilmektedirler. Ancak teknik güçlükleri nedeniyle diğer yöntemler de geliştirilmiştir (Cengiz 1999, Jorgense ve Turnidge 2003, Turnidge ve ark. 2003, Brown ve ark. 2005).

Epsilometrik Yöntem (E test): Plastik stripler ile MİK değerini saptamayı amaçlayan bir antimikrobiyal duyarlılık yöntemidir. Stripin bir tarafında ilaç belirli ve sürekli bir konsantrasyon değişimi olacak şekilde, diğer yüzünde de antimikrobiyal ajanın stripin ucundan olan uzaklığa karşılık gelen konsantrasyonları bir cetvel gibi sıralanmış olarak yer alır. Standart bakteri süspansiyonu katı besiyeri üzerine yayıldıktan sonra stripler yerleştirilir. İnkübasyon süresi sonunda, elips şeklindeki inhibisyon alanının stripi kestiği konsantrasyon MİK olarak belirlenir (Cengiz 1999 ve Brown ve ark. 2005).

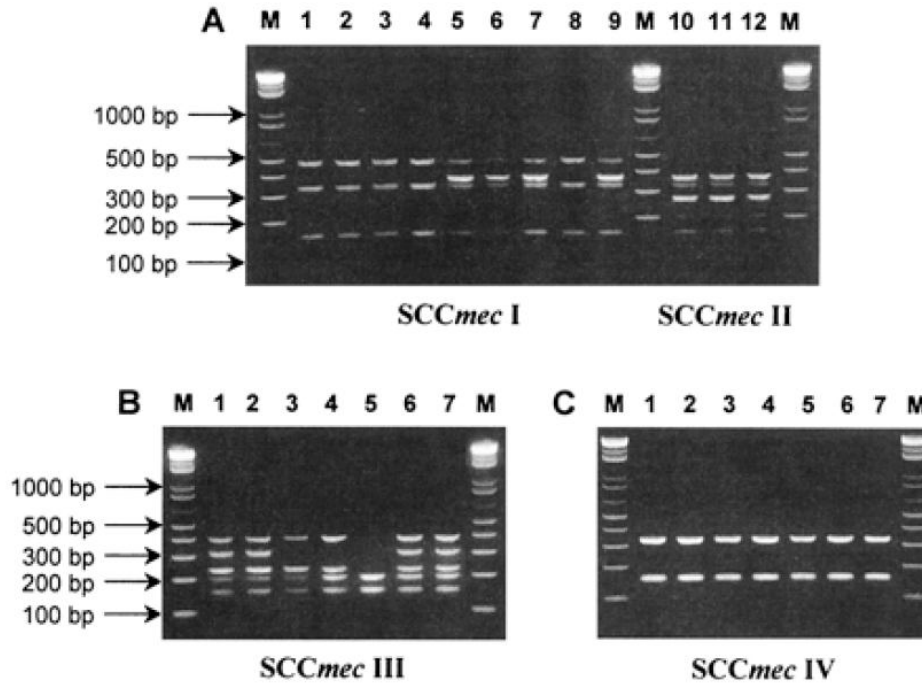
Antimikrobiyal Ajanları İnaktive Eden Enzimlerin Saptanması: Enzimatik aktivitenin saptandığı hızlı yöntemler arasında beta-laktamaz ve kloramfenikol asetil transferaz aktivitesinin saptandığı testler sayılabilir (Cengiz 1999). MRSA suşlarında metisilin direncinin gösterilmesinde uygun konvansiyonel yöntemin belirlenmesine yönelik çalışmalar bulunmaktadır. Swenson ve ark., Boubaker ve ark. tarafından yapılan çalışmalarda metisilin direncinin rutin olarak saptanmasında sefoksitin disk difüzyon testinin değerlendirilmesi yapılmış, disk difüzyon ile sefoksitin duyarlılığı % 96,5 özgüllüğü % 100 olarak saptanmıştır (Boubaker ve ark. 2004, Swenson ve ark. 2005).

1. 6. 3. 2. Direncin Belirlenmesinde Kullanılan Genotipik Yöntemler

Son yıllarda birçok antibiyotik direnç geni tanımlanmıştır. Bu genlerin ekspresyonu sonucunda klinik sağaltımda kullanılan tüm antimikrobiyal ajanlara karşı direnç gelişebilmektedir. Günümüzde gen ekspresyonu sonucunda direnç gelişimini saptayan ve yukarıda özetlenen fenotipik yöntemlerin dışında, direnç genlerinin varlığını saptayan genotipik yöntemler de geliştirilmiştir. Bu yöntemler, direnç özelliklerinin kısa sürede ve doğru olarak saptanmasını sağlayarak, hasta ve taşıyıcıların tanımlanması ve sağaltımına olanak sağlanmaktadır (Cengiz 1999).

Stafilokoklarda metisilin direncinin belirlenmesi için, moleküler olarak *mecA* geninin saptanması, fenotipik yöntemlere kıyasla daha duyarlıdır. PCR ve DNA hibridizasyon teknikleri ile *mecA* geninin saptanması da altın standart olarak kabul edilmektedir (Chambers 1997, Lim ve ark. 2002, Bannerman 2003, Jorgense ve Turnidge 2003, Turnidge ve ark. 2003, Nolte ve Caliendo 2003, CLSI 2005).

Oliveira ve ark. genetik yapıları MLST ile belirlenmiş 26 MRSA suşunun *SCCmec* yapılarını multipleks PCR yöntemiyle saptamışlardır. Bu yöntemin, MRSA izolatlarının mec elementlerinin yapısal tiplendirilmesinde hızlı bir yöntem olduğu düşünülmektedir (Oliveira ve Lencastre 2002, Fey ve ark 2003, Tristan ve ark. 2003, O'Brien ve ark 2004). Resim 1.1.'de Oliviera ve arkadaşlarının saptadığı *SCCmec* tipleri (Oliviera ve ark 2002) verilmiştir.



Resim 1. 1. Oliviera ve arkadaşlarının saptadığı *SCCmec* Tipleri

Yurdumuzda MRSA suşlarının moleküler epidemiyolojilerinin çalışıldığı en kapsamlı çalışma Yıldız ve arkadaşları tarafından 2010 yılında bildirilmiştir. Çalışmada Türkiye' de 2005-2007 yılları arasında izole edilen 12 farklı coğrafi bölgedeki 12 hastaneden izole edilen 397 suşun moleküler epidemiyolojik analizleri yapılmış 8 ulusal 4 bölgesel klon varlığı bildirilmiştir. 359 suşun *SCCmec* Tip III, 4 suşun Tip I ve 30 suşun Tip IV olduğu; 4 suşunda tiplendirilmesinin yapılamadığını bildirmişlerdir. Ulusal klonların hepsinin ST239, bölgesel klonun bir tanesi ST97, üç tanesinin de ST737 olduğu; yalnızca 5 suşun PVL pozitif olduğu bunlardan ikisinin ST80 ve *SCCmec* TipIV oldukları bir tanesinin *SCCmec* Tip IV ve ST8 olduğunu bildirmişlerdir. Bu çok merkezli çalışma Türkiye' de en yaygın ulusal MRSA klonunun ST239-*SCCmec* Tip III (bu klon Brezilya klonu olarak bilinmektedir); bölgesel klon ST737 *SCCmec* IV olarak belirlenmiştir (Yıldız ve ark. 2010). Yurdumuzda veteriner sahada bu konuda yapılmış en detaylı moleküler epidemiyolojik çalışma Türkyılmaz ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışmada Aydın yöresinde izole edilen *S. aureus* suşlarında

sefoksitin ile metisilin direnç oranının MRSA suşlarında % 17,2 olduğu bildirilirken; moleküler tiplendirme yöntemleri içerisinde altın standart olarak kabul edilen PFGE yöntemi 3 pulsotip belirlenmiştir. Pulsotip B suşlarının SCC_{mec} Tip IV, t190 ve ST8 olduğu; pulsotip A ve C'nin SCC_{mec} Tip III, t030 ve ST239 (pulsotip A) ve ST239 benzeri (pulsotip C) oldukları belirlenmiştir. Çoklu antibiyotik direncine sahip oldukları belirlenen suşların hiçbirisinde PVL toksin genine rastlanmadığı bildirilmiştir. Çalışmada 16 MRSA suşunun 14'ünün hastane kaynaklı MRSA ST239-III olduğu ve bu suşların insanlardan hayvanlara bulaşmış olabileceğini vurgularken; MRSA ST8-IV suşlarının yörede toplum kökenli suşların varlığını gösterdiğini bildirmişlerdir (Türkyılmaz ve ark. 2010).

1. 7. Stafilokok Enfeksiyonlarında Tedavi

İnsanların deri, burun ve boğaz florasında stafilokoklar bulunmaktadır. Deri stafilokoklardan temizlense bile damlacıklar ile yeniden enfekte olabilir. Kıyafet ve parmaklar aracılığı ile enfeksiyon bir bölgeden vücudun diğer bölgelerine yayılabilmektedir. Frunkül gibi lezyonların kontrolü için lokal antiseptikler önemlidir. Ciddi deri enfeksiyonları (akne ve fronkül) çoğunlukla ergenlik dönemlerinde görülmektedir. Benzer deri enfeksiyonları uzun süre kortikosteroid tedavisi alan hastalarda görülür. Aknede stafilokok ve korinebakterilere ait lipaz enzimi yağlardaki yağ asitlerinin serbest kalmasını sağlamaktadır ve bundan dolayı dokuda irinli bölgeler oluşmaktadır. Bunların tedavisinde tetrasiklin uzun süre kullanılabilir (Moreillon ve ark. 2005). Apseler ve cerrahi lezyonlar antimikrobiyal tedavide gerekli olan drenaj uygulaması ile tedavi edilir. Birçok antimikrobiyal ilaç in vitro olarak da stafilokoklara karşı aynı etkiye sahiptir. Fakat enfekte insanlardan patojenik stafilokokların tamamen temizlenmesi zordur. Çünkü mikroorganizmalar çok hızlı bir şekilde antibiyotik ajanlara karşı direnç geliştirmektedir (Moreillon ve ark. 2005). Akut osteomyelitte antimikrobiyal ajanlar kullanıldığında iyi sonuçlar alınırken, kronik ve rekürren osteomyelitte ancak, cerrahi drenaj ve ölü kemiklerin uzaklaştırılması sonrası uygun ilaçların uzun süre kullanılması ile elde edilmektedir. Ancak stafilokokların tamamen yok edilmesi zordur. Bu hastalıkta hiperbarik oksijen tedavisi de önerilmektedir (Moreillon ve ark. 2005).

S. aureus'un sebep olduğu bakteriyemi, endokardit, pnömoni ve diğer enfeksiyonlarda β - laktamaza dirençli penisilinin intravenöz olarak uzun süre kullanımı gerekmektedir. Metisiline dirençli suşlarda vankomisin tercih edilmektedir. Eğer enfeksiyon β - laktamaz üretmeyen *S. aureus*'tan dolayı ise penisilin G seçilmelidir. Fakat sadece *S. aureus*'ların bir

kısmı penisilin G' ye hassastır. Dirençli suşların sıklığından dolayı, önemli stafilokok izolatları sistemik ilaçların seçimi için antibiyogram testi yapılmalıdır. Eritromisin grubu ilaçlara olan direnç çok hızlı gelişebildiği için kronik enfeksiyonların tedavisinde bu ilaç kullanılmalıdır. Plazmidler tarafından belirlenen ilaç direnci (penisilin, tetrasiklin, aminoglikozit ve eritromisin) transdüksiyon ve konjugasyon yolu ile diğer stafilokoklara taşınabilir. Klinik enfeksiyonlardan izole edilen penisilin G'ye dirençli *S. aureus* suşları daima penisilinaz üretirler. Bu suşlar genellikle β - laktamazlara dirençli penisilinlere, sefalosporinlere veya vankomisine duyarlıdır. Metisilin direnci β -laktamaz üretiminden bağımsızdır. Metisilindeki direnç farklı ülke ve zamanlarda değişiklik göstermektedir. Vankomisin' e orta düzeyde hassas olan *S. aureus* suşları diğerlerine nazaran daha az yaygın bulunmuştur ve vankomisine dirençli suşların izolasyonu nadirdir. Yaygın ilaç direnci olan ciddi stafilokokal veya enterokokal enfeksiyonlu hastalarda yeni antimikrobiyal ajanlardan linezolit, daptomisin ve dalfopristin kullanılabilir (Moreillon ve ark. 2005).

MRSA'lar taşıdıkları virülens faktörleri ile kendilerine karşı kullanılan antibiyotiklere hızlı direnç geliştirebilme potansiyelleri vardır. Bu nedenle de hastalarda tedavisi güç enfeksiyonlara neden olmalarıyla günümüzde önemli patojenler arasında kabul edilmektedirler. PCR; metisilin direncinin tespitinde, MRSA suşlarının genotiplendirilmesinde ve virülans faktörlerinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (Baba ve ark. 2002). Moleküler tiplendirme yöntemlerindeki gelişmeler MRSA epidemiyolojisi ile ilgili yeni bilgilerin elde edilmesine olanak sağlamaktadır. MRSA suşlarının genotipik özelliklerinin incelenmesinde kullanılan en geçerli moleküler tiplendirme yöntemleri; suşlar arasındaki klonal ilişkiyi en iyi şekilde gösterebilmesi nedeniyle kromozomal DNA ekstraksiyonuna dayanan PFGE, izolatların hastane veya toplum kökenli olarak ayırımında *SCCmec* (Oliveira ve ark. 2001), izolatların tüm dünyadaki diğer izolatlar ile karşılaştırılabilmesine imkan sağlayan sekansa dayalı *spa* ve MLST analizleridir (Enright ve ark. 2002). Bu çalışmada Ocak-Mayıs 2010 tarihleri arasında ADÜ Vet. Fak. Mikrobiyoloji ABD'da izole edilmiş olan insan ve sığır orjinli 12 MRSA suşunun moleküler epidemiyolojilerinin PFGE, *SCCmec*, *spa* ve MLST gibi moleküler tiplendirme yöntemleri kullanılarak incelenmesi amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE METOT

2. 1. Gereç

2. 1. 1. İzolasyon Örnekleri

Çalışmada 2010 Ocak-Mayıs tarihleri arasında, Aydın ili ve çevresinde 15 işletmede bulunan 56 inekten alınan 145 subklinik mastitisli süt ile yine aynı ineklerden alınan 56 nazal svap ve bu işletmelerdeki hayvanlarla yakın temasta bulunan sektör çalışanlarından alınan 34 nazal svap örneği olmak üzere toplam 235 materyal MRSA varlığı yönünden incelendi.

2. 1. 2. Kullanılan Besiyerleri, Ayıraçlar, Solusyonlar ve Antibiyotik Diskler

2. 1. 2. 1. Besiyerleri

2. 1. 2. 1. 1. Blood Agar

Kanlı agar besiyerinin (Merck 1. 10886) pH'sı 7,2-7,4'e ayarlanarak otoklavda 121°C'de 15 dk sterilize edildikten sonra, 50 °C'ye kadar soğutulup, içine %7 oranında steril koyun kanı ilave edilerek petrilere döküldü.

2. 1. 2. 1. 2. Mannitol Salt Phenol Red Agar (MSA)

Besiyerinin (Merck 1,05404) pH'sı 7,2-7,4'e ayarlanarak otoklavda 121°C'de 15 dk sterilize edildikten sonra 50 °C'ye kadar soğutulup petrilere döküldü.

2. 1. 2. 1. 3. Mueller- Hinton Agar (MHA)

Besiyerinin (Oxoid CM 129) pH' sı 7,3'e ayarlanarak 121°C'ye ayarlı otoklavda 15 dk sterilize edildikten sonra 50 °C' ye kadar soğutulup petrilere döküldü.

2. 1. 2.1. 4. Brain Hearth Infusion Broth (BHIB) (%20 gliserinli)

Karışımın (OxoidCM 0225) pH' sı 7,2-7,4'e ayarlanıp 121°C'ye ayarlı otoklavda 15 dk sterilize edildikten sonra, 0,5 ml miktarda ependorf tüplere dağıtıldı.

2. 1. 2. 1. 5. Trypoton Soy Broth (TSB) (%7,5 Tuzlu)

Karışımın (Oxoid CM 129) pH' sı 7,2-7,4'e ayarlanıp 121°C'ye ayarlı otoklavda 15 dk sterilize edildikten sonra 5 ml miktarda tüplere dağıtıldı.

2. 1. 2. 2. Ayıraç ve Solusyonlar

2. 1. 2. 2. 1. EDTA (0,5 M)

Disodium EDTA-2 H₂O.....186,1 g

EDTA 800 ml distile suda manyetik karıştırıcıda çalkalanarak eritilip, NaOH ile pH 8,0'e ayarlandıktan sonra 1000 ml'ye tamamlanıp 121 °C'de 15 dk otoklav edildi.

2. 1. 2. 2. 2. TBE (Tris, Borik Asit, EDTA, pH:8.0) Buffer

10X TBE Stok Solusyonu

Tris Base.....121,1 g

Borik Asit.....61,83 g

EDTA.....5,84 g

Distile su ile hacim 1000 ml'ye tamamlanarak 121 °C'de 15 dk otoklavda steril edilip, pH 8,0'e ayarlanarak buzdolabında saklanır.

0,5X TBE Kullanma Solusyonu

10X TBE.....50 ml

Distile su.....950 ml

Karıştırılarak solusyon hazırlanır.

2. 1. 2. 2. 3. Gel Loading Buffer (6X)

Bromfenol Mavisi.....	25 mg
Sükroz	4 g
H ₂ O.....	10 ml

Karıştırılarak solusyon hazırlanır.

2. 1. 2. 2. 4. Tris (1M)

Tris Base 800 ml distile suda eritilip, yaklaşık olarak 60 ml HCl asit ilave edilerek pH: 7,6'ya ayarlanarak karışım 1000 ml'ye tamamlanır. 121 °C'de 15 dk otoklav ile steril edilir.

2. 1. 2. 2. 5. 1M NaCl

NaCl	58,44 g
Distile Su.....	800 ml

NaCl distile suda çözüldükten sonra son hacim 1000 ml' ye tamamlanır.

2. 1. 2. 2. 6. TE Buffer (10mM tris+ 1mM EDTA)

Tris (1M).....	10 ml
EDTA(0,5 M).....	2 ml

Karıştırıldıktan sonra karışım 1000 ml distile su ile tamamlanır.

2. 1. 2. 2. 7. Hücre Süspansiyon Tamponu (HST) (pH: 7,2)

Tris-HCl.....	1,576 g
EDTA (0,5 M).....	18,61 g
NaCl.....	1,17 g

Distile su ile 1000 ml' ye tamamlanır ve pH: 7,2'ye ayarlanır.

2. 1. 2. 2. 8. Lizis Solusyonu 1 (pH:7,2)

Tris-HCl(SIGMA T3253).....	0,788gr
NaCl(1M).....	1,461gr
EDTA(0,5M).....	9,306gr
Deoksikolat (Deoxycholic acid sodium salt, 25gr, Fluka Biochemica, 30975).....	1 gr
Sarkozin (N-Lauroylsarcosine sodium salt for molecular biology > %94, Sigma L9150 100 gr)	2,5 gr

Ultra pure su ile son hacim 1000 ml'ye tamamlanır.

2. 1. 2. 2. 9. Lizis Solusyonu 2

250 mM EDTA.....	18,612gr
N-lauryl Sarcosine	5gr

Ultra pure su ile son hacim 100 ml'ye tamamlanır.

0,5 M EDTA pH: 9,0'a ulaşana kadar tam çözünmedi. Bu nedenle NaOH pelletleri kullanıldı. Her örnek solusyonuna Proteinaz K (50µg/ml) eklendi.

2. 1. 2. 2. 10. Sarkozin (%10)

Sarkozin.....	5 gr
Distile su.....	50 ml

2. 1. 2. 3. Antibiyotik Diskleri

Metisilin direncinin belirlenmesinde sefoksitin (Oxoid, Fox, 30µg) diskinden, stafilokok ve mikrokok ayırımının yapılmasında ise basitrasin (Oxoid, B, 0,04 IU/ml) diskinden yararlanıldı.

2.1.3. PCR

2. 1. 3. 1. Kullanılan Cihazlar

PCR, 96 örnek kapasiteli Eppendorf Master Cycler kademeli termal döngüleme cihazında gerçekleştirilir.

2. 1. 3. 2. MgCl₂, Taq DNA Polimeraz, 10X Taq Buffer, dNTP Set

25mM MgCl₂, Taq DNA polimeraz (5U), 10X Taq Buffer (100 mM (Tris-HCl, pH 8,3, 500mM KCl), 100mM deoksinükleotid trifosfat (dNTP) set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Fermentas) kullanılmıştır.

2. 1. 3. 3. Primerler

Metisilin dirençli stafilokok suşlarının belirlenmesinde kullanılan primerler (*mecA* ve *nuc*) Çizelge 2.1’de, SCC*mec* tipi belirlenmesinde kullanılan primer Çizelge 2.2’de, MLST tipi belirlenmesinde kullanılan primerler (Enright ve ark. 2002) Çizelge 2.3’de, *spa* dizi tiplendirmesinde kullanılan primerler (<http://www.spaserver.ridom.de/>) Çizelge 2.4’de verilmiştir.

Çizelge 2. 1. MRSA suşlarının belirlenmesinde kullanılan primerler, dizileri, amplikon büyüklükleri ve kaynak

Primer	Dizi (5’-3’)	Amplikon Büyüklüğü (bp)	Kaynak
<i>nuc</i> F1 <i>nuc</i> R1	GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC	279	Kim ve ark. 2001
<i>MECA</i> P4 <i>MECA</i> P7	TCC AGA TTA CAA CTT CAC CAG G CCA CTT CAT ATC TTG TAA CG	162	Oliveira ve ark. 2001

Çizelge 2. 2. SCCmec tipi belirlenmesinde kullanılan primer dizilimleri, ampikon büyüklükleri ve SCCmec tipi

Primer	Dizi (5'-3')	Ampikon Büyüklüğü	SCCmec Tipi
CIF2 F2 CIF2 R2	TTCGAGTTGCTGATGAAGAAGG ATTTACCACAAGGACTACCAGC	495	I
KDP F1 KDP R1	AATCATCTGCCATTGGTGATGC CGAATGAAGTGAAAAGAAAGTGG	284	II
MECI P2 MECI P3	ATCAAGACTTGCATTTCAGGC GCGGTTTCAATTCACCTTGTC	209	II,III
DCS F2 DCS R1	CATCCTATGATAGCTTGGTC CTAAATCATAGCCATGACCG	342	I,II,IV
RIF4 F3 RIF4 R9	GTGATTGTTTCGAGATATGTGG CGCTTTATCTGTATCTATCGC	243	III
RIF5 F10 RIF5 R13	TTCTTAAGTACACGCTGAATCG GTCACAGTAATTCCATCAATGC	414	III
IS431 P4 pUB110 R1	CAGGTCTCTTCAGATCTACG GAGCCATAAACACCAATAGCC	381	IA
IS431 P4 pT181 R1	CAGGTCTCTTCAGATCTACG GAAGAATGGGGAAAGCTTCAC	303	IIIA

Çizelge 2. 3. MLST tipi belirlenmesinde kullanılan primerler, primer dizilimleri ve ampikon büyüklükleri

Primer	Primer dizilimleri (5'-3')	Ampikon Büyüklüğü
<i>arcC1</i> <i>arcC2</i>	TTGATTACCAGCGCGTATTGTC AGGTATCTGCTTCAATCAGCG	456
<i>aroE1</i> <i>aroE2</i>	ATCGGAAATCCTATTTACATTC GGTGTGTATTAATAACGATATC	456
<i>glpF1</i> <i>glpF2</i>	CTAGGAACTGCAATCTTAATCC TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC	465
<i>gmk1</i> <i>gmk2</i>	ATCGTTTTATCGGGACCATC TCATTAACTACAACGTAATCGTA	429
<i>pta1</i> <i>pta2</i>	GTAAAAATCGTATTACCTGAAGG GACCCTTTTGTGAAAAGCTTAA	474
<i>tpi1</i> <i>tpi2</i>	TGGTTCATTCTGAACGTCGTGAA TTGCACCTTCTAACAATTGTAC	402
<i>yqiL1</i> <i>yqiL2</i>	CAGCATACAGGACACCTATTGGC CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC	516

Çizelge 2. 4. *spa* dizi tiplemesinde kullanılan primerler, primer dizilimleri ve ampikon büyüklükleri

Primer	Primer Dizilimleri (5'-3')	Ampikon Büyüklüğü
<i>spa</i> 1113F	TAAAGGCGATCCTTCGGTGAGC	net bir bant
<i>spa</i> 1514R	CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT	net bir bant

2. 1. 4. Elektroforez Cihazı

Elektroforez işlemi Thermo marka, 80 kuyucuk kapasiteli elektroforez tankında, görüntüleme işlemi Vilber Lourmat marka görüntüleme cihazında gerçekleştirildi.

2. 1. 4. 1. Agaroz Jel Hazırlanışı

Agarose (Sigma)..... 1,5 veya 2 g
TBE (0,5X)..... 100 ml

Buffer, şişe içerisindeki agarozun üzerine ilave edilip, karıştırıldı ve mikrodalga fırında yaklaşık 3-5 dk kaynatılan karışım, 40-50 °C'ye kadar soğutuldu. Halen sıvı halde olan karışım, jel kalıbının içerisine yavaşça, kabarcık bırakmayacak şekilde döküldü ve içerisine yükleme kuyucuklarını oluşturacak olan taraklar yerleştirilerek, 15-20 dakika oda ısısında soğumaya bırakıldı. Soğutulan jel, kalıptan çıkarılarak, elektroforez tankına dikkatlice yerleştirildi.

2. 1. 4. 2. Marker

Marker olarak 100 bp'lik DNA ladder (Fermentas) ve PstI enzimi ile kesilmiş lambda faj DNA'sı (Fermentas) kullanıldı.

PstI Enzimi ile Kesilmiş Lambda Faj DNA'sının Hazırlanışı:

30 µl λ DNA (Fermentas)

30 µl 10X Buffer

4 µl PstI enzimi (Fermentas)

236 µl enjeksiyonluk distile su

Bir saat 37 °C'de bekledikten sonra 30 µl loading dye eklendi. Her elektroforez reaksiyonu için 7 µl kullanıldı (Anderesson 2009).

2. 1. 4. 3. Etidyum Bromür

Elektroforez işleminden sonra jelin boyanması amacıyla % 1' lik etidyum bromür 500 ml 0,5X TBE içerisine 100 µl miktarında eklenerek kullanıldı.

2. 1. 4. 4. Standart Suşlar

Tüm testlerde kontrol olarak metisilin duyarlı *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ve metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* N315 (SCCmec Tip II) suşları ile PFGE’de NCTC 8325 suşu marker olarak kullanıldı.

2. 2. Yöntem

2. 2. 1. Örnekler:

2. 2. 1. 1. Süt örnekleri: Süt örnekleri alınırken meme başları su ve sünger yardımı ile temizlenerek %70’lik alkol ile dezenfekte edildi. Eller sabunla yıkandıktan sonra eldiven giyilip meme başındaki saprofit bakterileri uzaklaştırmak için ilk birkaç ml süt atıldı (Baştan 2002). Süt örnekleri steril enjektörler içine 5 ml miktarda alındı.

2. 2. 1. 2. Burun sıvı örnekleri: Sürüntüler her iki taraf burun konkasının ön 1/3'lük kısmından serum fizyolojikle ıslatılmış steril pamuk eküvyonlarla sağa ve sola birkaç kez çevirmek suretiyle alınarak Stuart Transport Medium’a konuldu. Alınan tüm örnekler soğuk zincir altında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Teşhis Laboratuvarına aynı gün getirilip izolasyon çalışmalarına başlandı. İncelemesi yapılan tüm materyallerinin izni alınarak temini sağlandı.

2. 2. 2. MRSA İzolasyonu

Laboratuvara getirilen örneklerden stafilocokların saf olarak izolasyonu için, burun sıvı örnekleri önce %7,5 tuzlu TSB’a ekilip, 37°C’de 24 saat inkube edildi, takiben sıvı kültürden MSA’a ekimler yapıldı. Süt örnekleri ise doğrudan MSA’a ekilerek 24-48 saatlik inkübasyon sonunda üreyen stafilocok suşları, fenotipik özelliklerinin belirlenmesi için kanlı agara pasajı yapıldı. Stafilocok suşlarının biyokimyasal ve morfolojik özellikleri standart işlemler uygulanarak gerçekleştirildi (Murray 2003).

2. 2. 2. 1. Fenotipik İdentifikasyon

İzolatların fenotipik identifikasyonlarında kullanılan katalaz, basitrasin duyarlılık, tüp koagulaz testleri aşağıdaki bildirildiği şekilde gerçekleştirildi.

2. 2. 2. 1. 1. Katalaz Testi: Bu test için besiyerinde üreyen kolonilerden steril öze ile temiz bir lam üzerine aktarıldıktan sonra üzerine 1–2 damla %3'lük H₂O₂ damlatıldı. Katalaz enzimi oluşturan bakteriler H₂O₂'i su ve oksijene ayrıştırdığı için ortamdaki oksijen çıkışı kabarcık oluşumu ile belirlendi. Bu nedenle test sonucu kabarcıklar meydana geldiğinde katalaz pozitif, kabarcıklar oluşmadığında ise katalaz negatif olarak değerlendirildi.

2. 2. 2. 1. 2. Basitrasin Duyarlılık Testi: Mikroskopik olarak Gram pozitif kok görünümündeki katalaz pozitif mikroorganizmalar *Micrococcaceae* grubuna dahil edildi. Bu suşların MHA'a ekimi yapılarak basitrasin diski yerleştirildi. 37°C'de 18–24 saat inkübe edildikten sonra basitrasine dirençli suşlar *Staphylococcus* spp. olarak ayrıldı (Koneman ve ark 1997).

2. 2. 2. 1. 3. Koagulaz Testi: Bakterilerin koagulaz testleri tüpte gerçekleştirildi. Bunun için incelenecek bakteri kolonisi, içerisinde 0,8 ml serum fizyolojik tuzlu su ve 0,2 ml EDTA içeren tavşan plazması (Bactident Coagulase, 1.13306.0001 Merck) bulunan bir tüpe aktarılarak 37°C'de benmaride 1, 2, 4, 8 ve 24. saatlerde pıhtı oluşumu gözlemlendi. Koagulaz enzimine sahip türlerin kan plazmasını koagule etmesi sonucunda test tüpünde pıhtılaşma meydana gelirse, test sonucu pozitif, pıhtılaşma meydana gelmiyorsa negatif olarak değerlendirildi. Elde edilen tüm pozitif suşlar daha sonra kullanılmak üzere %20 lik gliserinli BHIB içerisinde -80°C'de muhafaza edildi.

2. 2. 2. 1. 4. Sefoksitin Duyarlılık Testi: İzole edilen stafilokok suşlarının metisilin dirençliliği sefoksitin diski kullanılarak Kirby-Bauer disk diffüzyon yöntemine (Bauer 1966) göre belirlendi. Bu amaçla, izole edilen suşlar %7 koyun kanlı agar besi yerine pasajlanarak 37 C de 24 saat inkübe edildi. Elde edilen kültürlerden TSB besiyerlerinde McFarland No. 0,5 (10⁸ bakteri/ml)'e uygun süspansiyonlar hazırlandı. Her bakteri türünün ayrı süspansiyonlarından steril eküvyon ile yayma tarzında ekimler yapıldı. Ekim yüzeyinin kurumaması için oda ısısında 10-15 dk. beklenildikten sonra antibiyotik diski besiyerine yerleştirilerek 37°C'de 18 saat inkübe edildi. İnhibisyon zon çapları ölçülerek sonuçlar

duyarlı (S) orta derecede duyarlı (I) ve dirençli (R) olarak yorumlandı. Zon çapı *S. aureus* için 19 mm'den küçük veya eşit olan suşlar MRSA olarak belirlendi (CLSI 2006).

2. 2. 2. 2. Genotipik İdentifikasyon : *S. aureus* izolatlarından total DNA ekstraksiyonu ticari genomik DNA ekstraksiyon kiti (InstaGene Matrix, Katalog No: 732-6030, BIO-RAD, München, Germany) kullanılarak üretici firmanın önerdiği şekilde aşağıdaki gibi gerçekleştirildi:

Bir öze dolusu stafilokok kültürü 1 ml steril bir ependorf tüp içerisinde steril distile su ile süspanse edildi. Müteakiben 12.000 rpm.de 1 dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant atıldı. Pelet üzerine matrix (InstaGene)'den 200 µl ilave edilerek 56°C'de yarım saat inkübe edildi. Yüksek hızda 10 sn vortekslendi. Tüpler benmaride 100°C'de 8 dk inkübe edildi. Yüksek hızda 10 sn vortekslendikten sonra 12.000 rpm.de 3 dk santrifüj yapıldı. Testte 30 µl'lik bir PCR reaksiyonu için 2 µl süpernatant kullanıldı.

2. 2. 2. 2. 1. PCR

Master Mikslerin Hazırlanması: SCCmec PCR dışında, tüm PCR reaksiyonlarında bir örnek için PCR amplifikasyonu 30 µl toplam hacimde, son konsantrasyonları Taq enzimi tampon çözeltisi için 1X, magnesium klorür (MgCl₂) 2 mM, dNTP 0,2 mM, primer (her biri için) 0,4 pmol, Taq DNA polimerase 1,5 U olacak şekilde gerçekleştirildi. Kullanılan malzemeler ve miktarları Çizelge 2. 5.'de belirtilmiştir.

Çizelge 2. 5. Master miks'in hazırlanma oranları

Malzeme	İstenen Son Konsantrasyon	10 örnek (µl)
Buffer (10X)	1X	30
MgCl ₂ (25 mM)	2mM	24
dNTP (10 mM)	0,2 mM	6
Primer-F (100 pmol)	0,4 pmol	1,2
Primer-R (100 pmol)	0,4 pmol	1,2
Taq Polimeraz (5 U)	1,5 U	1,8
dH ₂ O	Son hacme tamamlanır	235,8
TOPLAM		300

SCCmec PCR Miksi hazırlanışı: Bunun için öncelikle multipleks PCR'da kullanılmak üzere SCCmec primer miksi hazırlandı: KDP F1, KDP R1, RIF4 F3 ve RIF4 R9 primerleri 200 nM; CIF2F2, CIF2 R2, MECI P2, MECI P3, RIF5 F10, RIF5 R13, pUB110 R1 ve pT181R1 primerleri 400 nM; DCS F2, DCS R1, MECA P4, MECA P7 ve IS431 P4 primerleri de 800 nM konsantrasyonda olacak şekilde kullanıldı. Mastermiksin her 50 µl'si için bu miksinden 1 µl ilave edilerek PCR gerçekleştirildi (Oliveira ve de Lencastre 2002).

SCC*mec* mastermixin hazırlanmasında kullanılan malzemeler ve miktarları Çizelge 2. 6.'da belirtilmiştir.

Çizelge 2. 6. SCC*mec* mastermixin hazırlanma oranları

Malzeme	Son Konsantrasyon	10 örnek (µl)
Buffer (10X)	1X	30
MgCl ₂ (25 mM)	2 mM	24
dNTP (10 mM)	0,2 mM	6
SCC <i>mec</i> primer miks	1 µl/ 50 µl	6
Taq Polimeraz (5 U)	0,3 µl/50µl	1,8
dH ₂ O	Son miktara tamamlanır	232,2
TOPLAM		300

Mastermikslar hazırlandıktan sonra 0,2 ml'lik tüpler, örnek adedi kadar numaralandırılıp, içlerine 28'er µl hazırlanılan mastermiksdan ilave edildi. Daha sonra, ekstraksiyonu yapılan DNA'dan ilgili tüplere 2'şer µl eklenerek ağızları sıkıca kapatıldı. Hazırlanan tüpler daha sonra termal döngüleme (termal cycler) cihazına yüklenip, programlandı. *mecA*, *nuc*, *SCCmec*, *spa* ve MLST analizlerinde kullanılan PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı sırası ile Çizelge 2.7., Çizelge 2.8., Çizelge 2.9., Çizelge 2.10. ve Çizelge 2.11.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2. 7. *mecA* PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre
Başlangıç Denatürasyon	1	94	5 dk
Denatürasyon	35	94	30 sn
Bağlanma	35	50	30 sn
Uzama	35	72	30 sn
Son Uzama	1	72	10 dk

Çizelge 2. 8. *nuc* PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre
Başlangıç Denatürasyon	1	94	10 dk
Denatürasyon	35	94	5 dk
Bağlanma	35	50	30 sn
Uzama	35	72	30 sn
Son Uzama	1	72	10 dk

Çizelge 2. 9. SCCmec PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre
Başlangıç Denatürasyon	1	94	4 dk
Denatürasyon	30	94	30 sn
Bağlanma	30	53	30 sn
Uzama	30	72	30 sn
Son Uzama	1	72	5 dk

Multipleks PCR yöntemi ile SCCmec tip I, II, III ve IV tespiti yapıldı.

Çizelge 2. 10. spa PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre
Başlangıç Denatürasyon	1	94	10 dk
Denatürasyon	30	95	30 sn
Bağlanma	30	38	30 sn
Uzama	30	72	45 sn
Son Uzama	1	72	10 dk

Çizelge 2. 11. MLST PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre
Başlangıç Denatürasyon	1	94	4 dk
Denatürasyon	35	95	30 sn
Bağlanma	35	57	30 sn
Uzama	35	72	1 dk
Son Uzama	1	72	10 dk

spa ve MLST analizleri için PCR işleminden sonra elde edilen amplikonlar, sekans analizleri için 96 kuyucuklu pleyt içerisinde MacroGen (MacroGen Inc., 1001 World Meridian Venture Center, #60-24, Gasan-dong, Geumchun-gu, Seoul, 153-781, Korea) firmasına gönderildi. Firma saflaştırmayı takiben sekans analiz cihazı ile (ABI Primse) sekans analizini gerçekleştirdi.

spa analizi: Sekans analizi sonrasında elde edilen DNA dizilerinin *spa* tiplerinin belirlenmesi için StaphType yazılım programı kullanıldı. Elde edilen *spa* tiplerinin Ridom SpaServer adresinden (<http://www.spaserver.ridom.de/>) diğer bilgiler ile tekrar bölgeleri belirlenerek *spa* tipleri tespit edildi.

MLST analizi: Hedef gene ait her bir lokus için, her farklı dizilim farklı bir allel numarası ile gösterildi ve bu şekilde her suşa ait bir allelik profil tanımlandı. Tanımlanan allelik profiller, dizi tipi olarak ifade edildi. Belirlenen allelik profiller, MLST veri bankası (<http://www.mlst.net>)nda bilinen allellerle kıyaslanarak tespit edilen allel profilinin diğer ülkelerdeki yaygınlık derecesi hakkında bilgi edinildi.

2. 2. 2. 2. 2. Amplikonların Elektroforez Tankına Yüklmesi

Her bir örnek için 5 µl PCR ürünlerine 1 µl miktarında 6x loading dye ilave edilerek jeldeki uygun kuyucuğa yüklendi.

2. 2. 2. 2. 3. Yürütme

Hazırlanmış olan jele, istenilen örnekler ve markerların yüklemesinden sonra, elektroforez tankının kapağı kapatılıp, elektrotlar uygun pozisyonda bağlandıktan sonra, elektroforez cihazında 100V 400A akımda 30 dakika yürütüldü.

2. 2. 2. 2. 4. Görüntüleme ve Değerlendirme

Otuz dakikalık elektroforez süresinin ardından elde edilen jel, dikkatli bir şekilde içerisinde %1'lik etidyum-bromür olan tanka konuldu. Burada 15 dakika boyanmaya bırakıldı. Süre sonunda boyanan jel, bilgisayara bağlı durumdaki transilluminatör cihazındaki odacığa yerleştirildi. UV ışığı altında fotoğraflandıktan sonra, bant uzunlukları her PCR için ayrı ayrı değerlendirildi.

Değerlendirme daha önce bildirilen şekilde yapıldı. Bunun için *mecA* primerleri için 162 bp (Oliveira ve ark. 2001), *nuc* primerleri için 279 bp (Kim ve ark. 2001), SCC*mec* tip tayini için (Oliveira ve de Lencastre 2002): Tip I'de 342, 381 ve 495 bp; Tip II'de 209, 284 ve 342 bp; Tip III'de 209, 243, 303 ve 414 bp ve Tip IV'de 342 bp uzunluğunda bant aranırken; *spa* primerleri için net bir bant görüntülenmesi (<http://www.spaserver.ridom.de/>) sağlandı. MLST analizinde ise; *arcC* ve *aroE* primer çiftleri için 456 bp, *glpF* primeri için 465 bp, *gmk* primeri için 429 bp, *pta* primeri için 474 bp, *tpi* primeri için 402 bp ve *yqiL* primeri için 516 bp uzunluğunda bant oluşumu gözlemlendi (<http://www.mlst.net>).

2. 2. 2. 3. Pulsed Field Jel Elektroforezi (PFGE)

S. aureus ve diğer birçok patojen bakterilerin genetik farklılıklarını araştırmak için moleküler epidemiyolojide kullanılan önemli bir genetik tiplendirme yöntemi PFGE metodudur. PFGE işlemi; izolatların hazırlanması, agarozaya gömülmesi, agaroz içindeki

hücrelerin parçalanması, hücre lizisinden sonra agaroz kalıpların yıkanması, agaroz kalıpları içindeki DNA'nın RE ile kesimi, elektroforez jelinin hazırlanması, kalıpların jele yüklenmesi, elektroforez sonucunun gözlenmesi ve analiz aşamalarından oluşmaktadır. Yöntem daha önce bildirildiği şekilde (Mulvey ve ark. 2001) aşağıdaki gibi yapıldı.

a) İzolatların Hazırlanması

1. İlk olarak *S. aureus* suşlarını canlandırılması amacıyla % 7 koyun kanlı agara pasajı yapıldı.
2. Daha sonra tripitik soy agara, tek koloni pasajı yapılarak bir gece inkübasyona bırakıldı.
3. Saf kültür halinde üreyen koloniler plastik öze yardımıyla 1 ml TE solusyonu içerisinde süspanse edildi.
4. Hücre süspansiyonu 13,000 rpm'de 4 °C'de 5 dakika santrifüje tabii tutuldu. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı.
5. Bakteri yoğunluğu yaklaşık McFarland 4 olacak şekilde ayarlandı.

b) İzolatların Agaroz Gömülmesi

1. Kalıpların hazırlandığı agaroz kalıp aparatı buzdolabına konuldu.
2. 9 ml distile su içerisine 0,2 gr low melting agar (BIO-RAD 161-3113EDU) ilave edilerek mikrodalga fırında homojen hale gelinceye kadar eritildi.
3. Agarozdan 150 µl miktarında ependorf tüplere dağıtılarak 50 °C'deki ısıtıcı kuru bloğa konuldu.
4. TE içinde hazırlanmış bakteri süspansiyonundan 150 µl alınarak, 50 °C'de bekleyen agaroz bulunan tüpe eklendi.
5. Üzerine 2 µl lizostafin eklenerek karışımın homojen hale gelebilmesi için birkaç defa pipetaj işlemi yapıldı.
6. Hemen hücre-agaroz karışımından agaroz kalıp aparatına dağıtıldı. Kalıplar agaroz katılaşmaya kadar +4 °C'de bekletildi.

c) Agaroz İçindeki Hücrelerin Parçalanması

1. Her agaroz kalıp için, 5 ml' lik steril kapaklı tüplere, 0,5 ml lizis I solusyonu konuldu.
2. İçerisinde bakteri bulunan agaroz, kalıptan çıkarılarak lizis I solusyonuna yerleştirildi.
3. Lizis I solusyonuna alınan kalıplar 37 °C'de 1 saat çalkalamalı su banyosunda bekletildi.
4. Bu işlemin sonunda lizis I solusyonu dökülerek, yerine 0,5 ml lizis II solusyonu eklenerek ve 50 °C'de 30 dakika çalkalamalı su banyosunda bekletildi.

d) Hücre Lizisinden Sonra Agaroz Kalıpların Yıkanması

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

e) Agaroz Kalıplarındaki DNA' nın RE ile Kesimi

1. Agaroz kalıbı bir lam üzerine alınarak bir bistürü yardımıyla 1/3 oranında kesildi.
2. Parçalardan biri, 100 µl 1x SmaI tamponu içine alınarak oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi ve daha sonra bu tampon boşaltıldı.

3. Her agaroz kalıbı için aşağıdaki enzim karışımı hazırlandı.

10 µl 10 x SmaI tamponu

2,5 µl SmaI enzimi (10 U/µl) (Fermentas)

1 µl BSA (10 mg/ml)

86,5 µl steril ultra saf su

4. Agaroz kalıbına bu karışım eklenerek çalkalamalı su banyosunda 30 °C'de 2 saat inkübe edildi.

5. İnkübasyon sonunda tüpler buzdolabında 15 dakika bekletildi.

f) Elektroforez Jelinin Hazırlanması ve Kalıpların Jele Yüklenmesi

1. 2 litre 0,5XTBE buffer hazırlandı ve içerisinden 100 ml ayrılarak kalan tampon elektroforez tankına döküldü.

2. Ayrılan 100 ml tampon içerisine 1,1 gr pulsed-field certified (BIO-RAD) agaroz eklenerek % 1,1' lik agaroz hazırlandı ve mikrodalga fırında eritildi.

3. Agaroz dökülecek kaset hazırlandı, SmaI ile kesilmiş olan agaroz kalıpların her biri tarak dişlerinin uç kısmına yerleştirildi.

4. Tarağın kenar dişlerine marker kalıplar yüklendi ve kurutma kağıdı ile agaroz kalıplarının kenarındaki sıvının fazlası alındı.

5. Tarak kalıplarla birlikte agaroz dökülecek kaset içine yerleştirildi.

6. Agaroz dikkatli bir şekilde hava kabarcığı oluşturmadan kaset içine döküldü.

7. Oda ısısında 20 dakika katılaşmaya bırakıldı, dikkatlice tarak çekildi ve elektroforez tankına yerleştirildi.

8. Agaroz kasetinin çerçeveleri çıkarıldı ve tabla ile agaroz alındı. Daha sonra içerisinden 1900 ml 0,5 x TBE tamponu bulunan PFGE tankına yerleştirildi.

g) Elektroforez

1. CHEF- DR III sisteminde elektroforez koşulları ayarlandı:

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

h) Sonucun Gözlenmesi ve Analiz

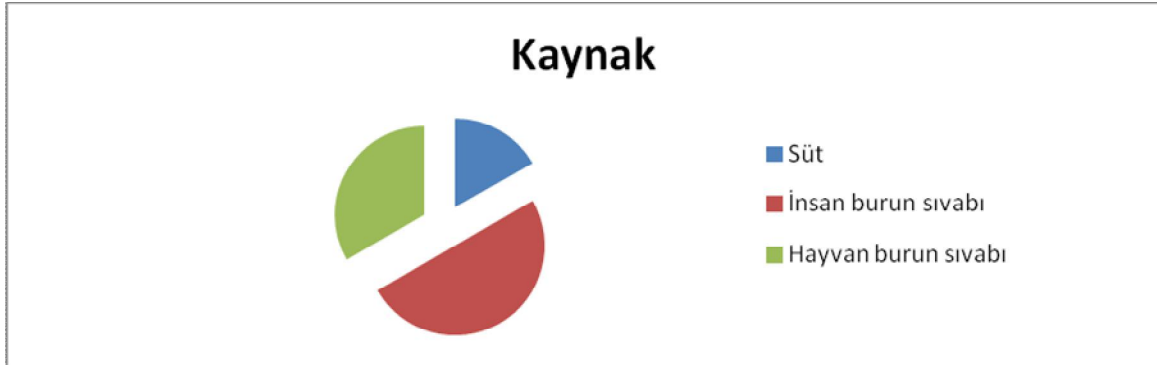
1. Elektroforezden sonra jel 5 µg/ ml etidyum bromür içeren 500 ml ultra saf su içine alındı ve 20 dakika boyandı.

2. UV ışığı altında görüntülendi ve fotoğrafı çekildi.

3. BULGULAR

3.1. İzolasyon

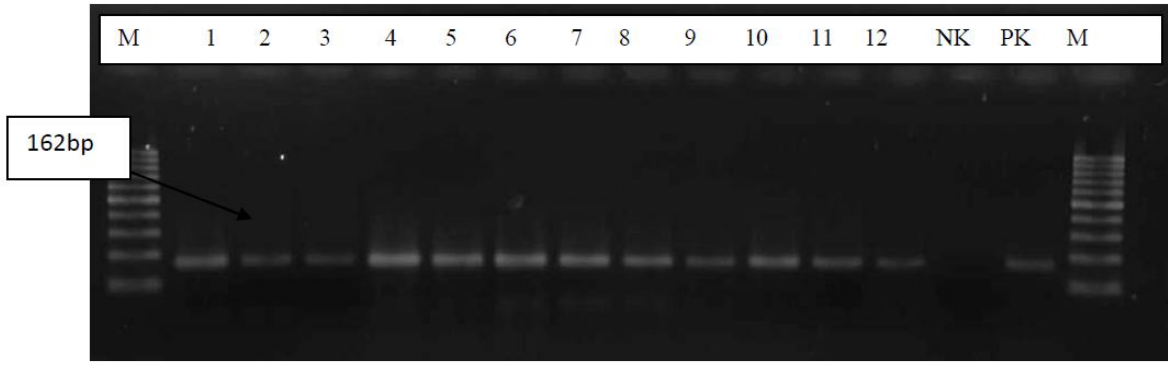
Çalışmada 2010 Ocak-Mayıs tarihleri arasında, Aydın ili ve çevresinde bulunan 15 işletmede bulunan 56 inekten alınan 145 subklinik mastitisli süt ile yine aynı ineklerden alınan 56 nazal svap ve bu işletmelerdeki hayvanlarla yakın temasta bulunan sektör çalışanlarından alınan 34 nazal svap örneği olmak üzere toplam 235 materyalin MRSA varlığı yönünden incelenmesi sonucunda 12 MRSA izolasyon ve identifikasyonu yapıldı. Şekil 3.1.'de MRSA izolatlarının izole edildiği kaynağa (süt, insan burun sıvabı, sığır burun sıvabı) göre dağılımı verilmiştir. Buna göre izolatların 2 si süt, 4 ü hayvan nazal svap ve 6 sı da insan (bakıcı ve veteriner) orjinli olduğu belirlendi.



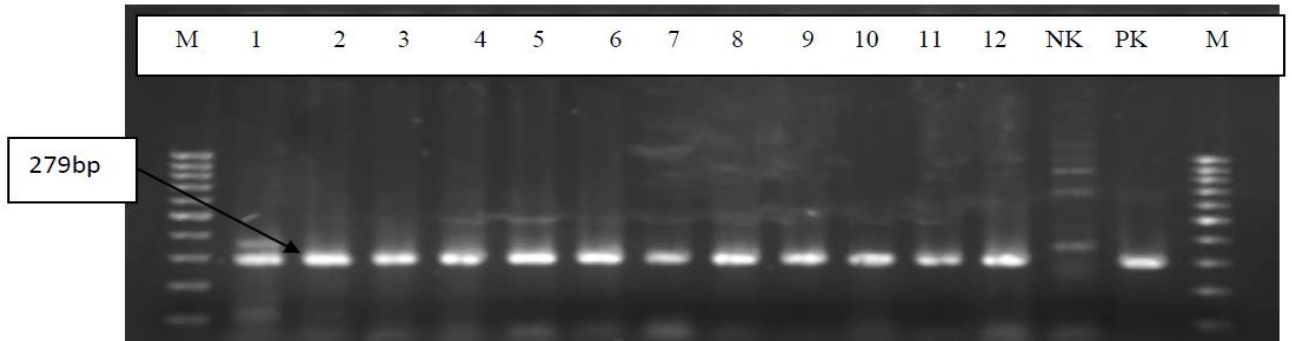
Şekil 3.1. *S. aureus* suşlarının izole edildiği kaynağa göre dağılımları

3. 2. PCR

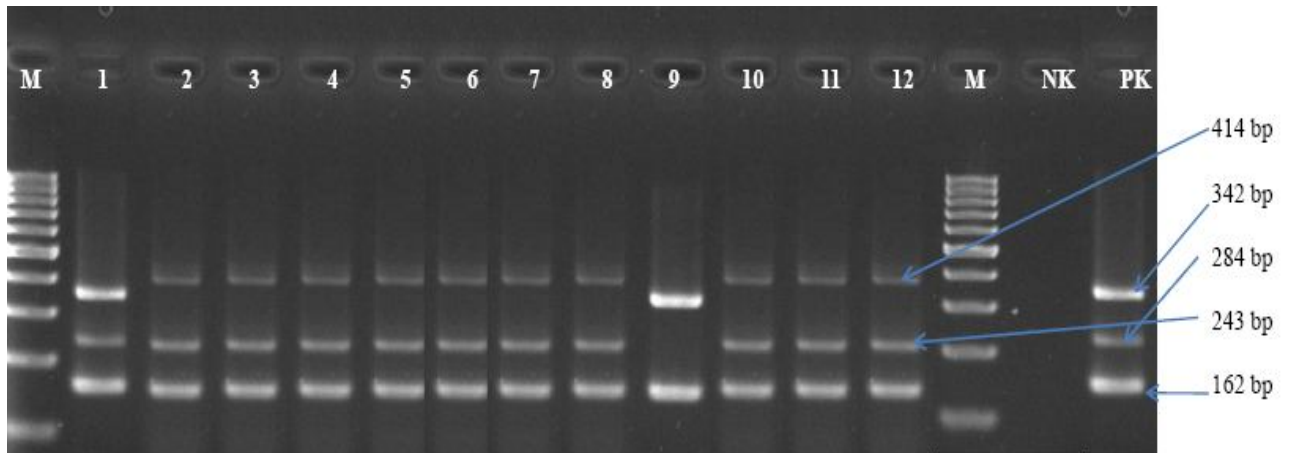
mecA, *nuc*, *SCCmec* PCR sonuçları sırasıyla Resim 3.2., Resim 3.3. ve Resim 3.4.'de verilmiştir.



Resim 3.1. *mecA* PCR elektroforez görüntüsü 1-12: *mecA* pozitif *S. aureus* suşları NK: *S. aureus* ATCC 29213 suşu PK: *S. aureus* N315 suşu M: 100 bp DNA ladder



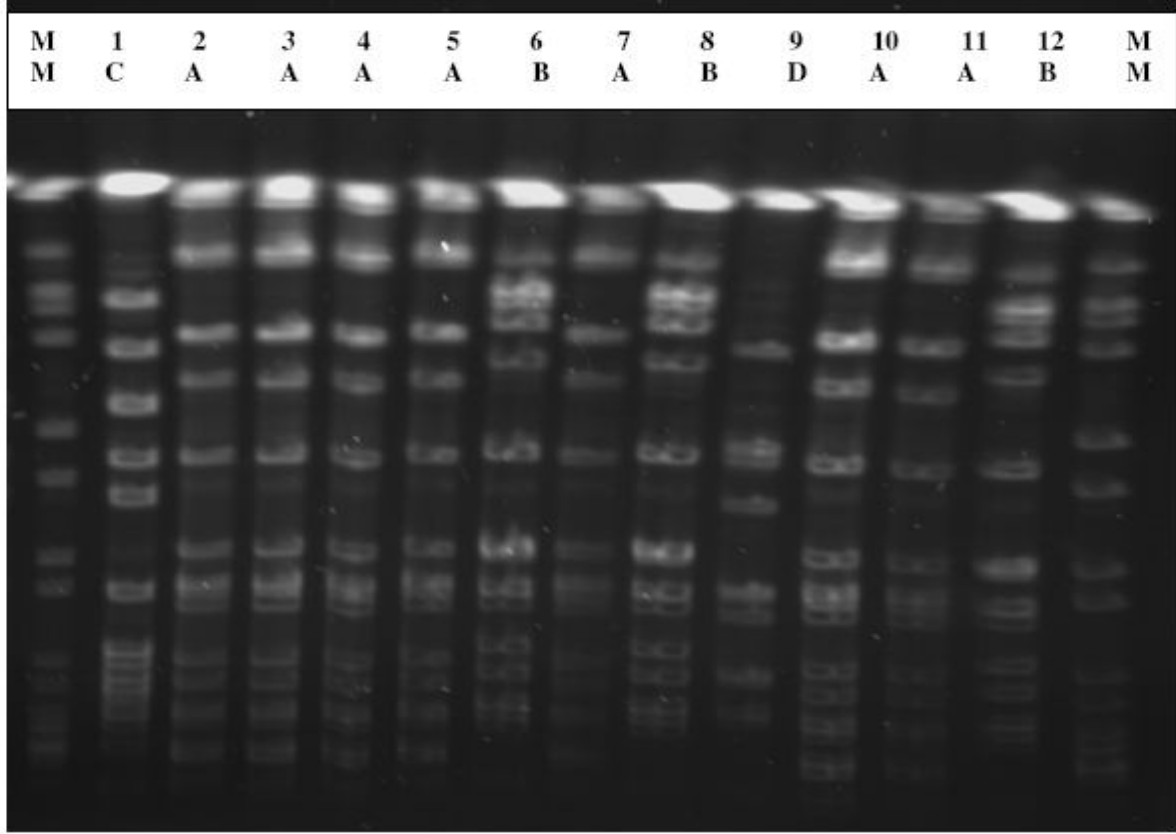
Resim 3. 2. *nuc* PCR elektroforez görüntüsü 1-12: *nuc* pozitif *S. aureus* suşları NK: negatif kontrol PK: pozitif kontrol M: 100 bp DNA ladder



Resim 3. 3. SCCmec Tipleri M: Marker: 100 bp DNA ladder, 1: SCCmec tip II (284 bp, 342 bp); 2-8 ve 10-12: SCCmec tip III (243 bp, 414 bp); 9: SCCmec tip IV (342 bp) 6: NK: Negatif Kontrol (Metisilin duyarlı *Staphylococcus aureus* ATCC 29213), PK: Pozitif Kontrol SCCmec tip II (*S. aureus* N315 suşu).

3. 3. PFGE

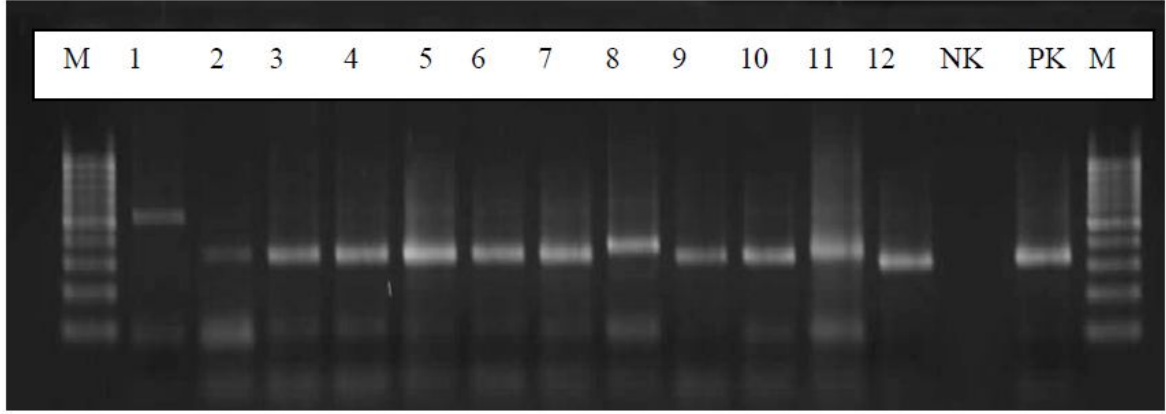
On iki MRSA izolatu arasında klonal ilişkinin tespiti için tüm izolatlar PFGE yöntemi ile incelendi. Resim 3.4.'de suşların hepsinin PFGE ile elde edilen DNA bant paternleri verilmiştir. PFGE sonucuna göre 7 izolat pulsotip A, 3 izolat pulsotip B, 1 izolat pulsotip C ve 1 izolat da pulsotip D olarak belirlenmiştir.



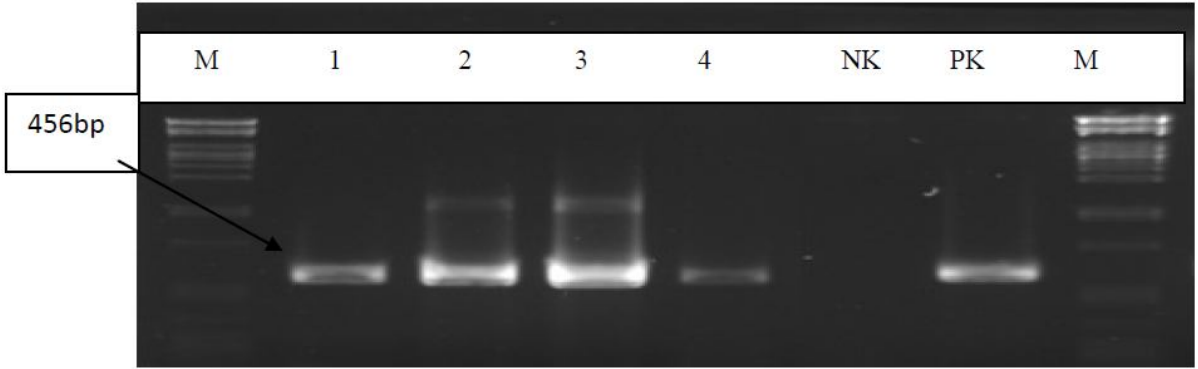
Resim 3. 4. *S. aureus* suşlarının PFGE ile elde edilen DNA bant paternleri M: Marker (*S. aureus* NCTC 8325 suşu) 1: Pulsotip C, 2-5: Pulsotip A, 6: Pulsotip B, 7: Pulsotip A, 8: Pulsotip B, 9: Pulsotip D, 10-11: Pulsotip A, 12: Pulsotip B, M: Marker (*S. aureus* NCTC 8325)

3. 4. Sekans Analizine Dayalı Tiplendirme Yöntemleri: *spa* ve MLST Analizleri

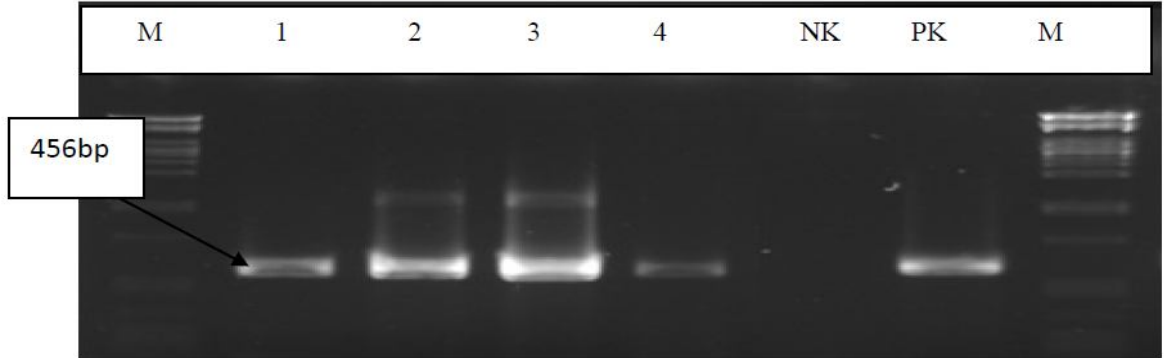
3. 4. 1. PCR Sonuçları: *spa* analizleri elektroforez görünümü Resim 3. 5.'de verilirken; MLST primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PCR'lerin elektroforez görünümleri her bir primer için sırasıyla Resim 3. 6. ile Resim 3. 12. arasında gösterilmiştir.



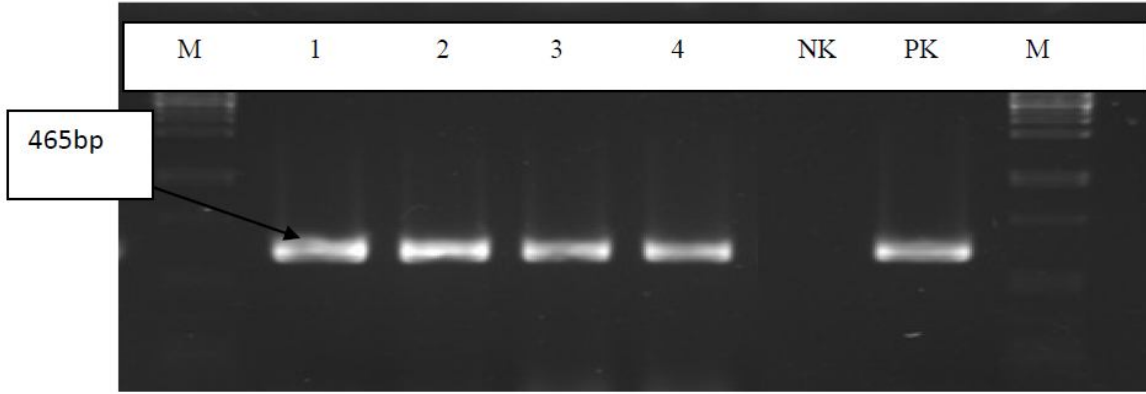
Resim 3. 5. *spa* dizi tiplendirmesinin elektroforez görünümü. 1-12: *spa* pozitif izolatlar, **NK:** negatif kontrol, **PK:** pozitif kontrol, **M:** 100 bp DNA ladder



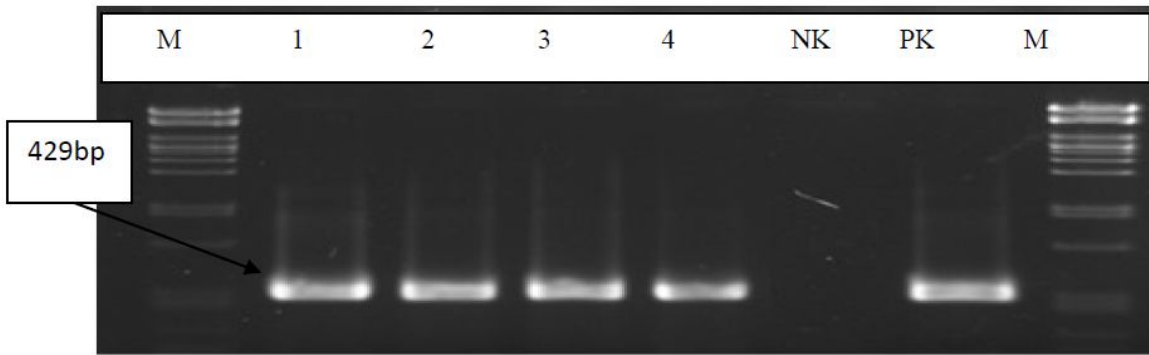
Resim 3. 6. *arcC* genine ait elektroforez görüntüsü. 1-4: *arcC* geni pozitif olan izolatlar **NK:** negatif kontrol **PK:** pozitif kontrol **M:** PstI enzimi ile kesilmiş lambda faj DNA' sı



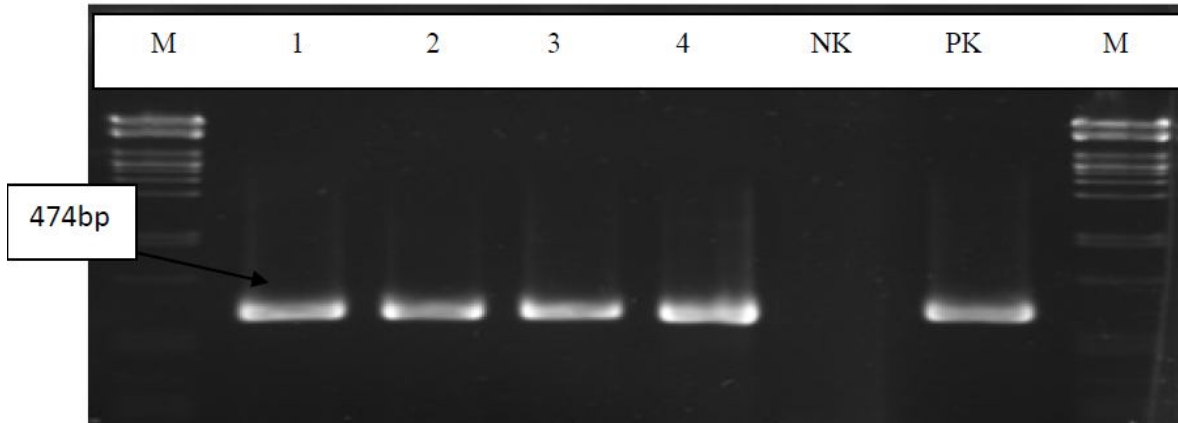
Resim 3. 7. *aroE* genine ait elektroforez görüntüsü. 1-4: *aroE* geni pozitif olan izolatlar **NK:** negatif kontrol **PK:** pozitif kontrol **M:** PstI enzimi ile kesilmiş lambda faj DNA' sı



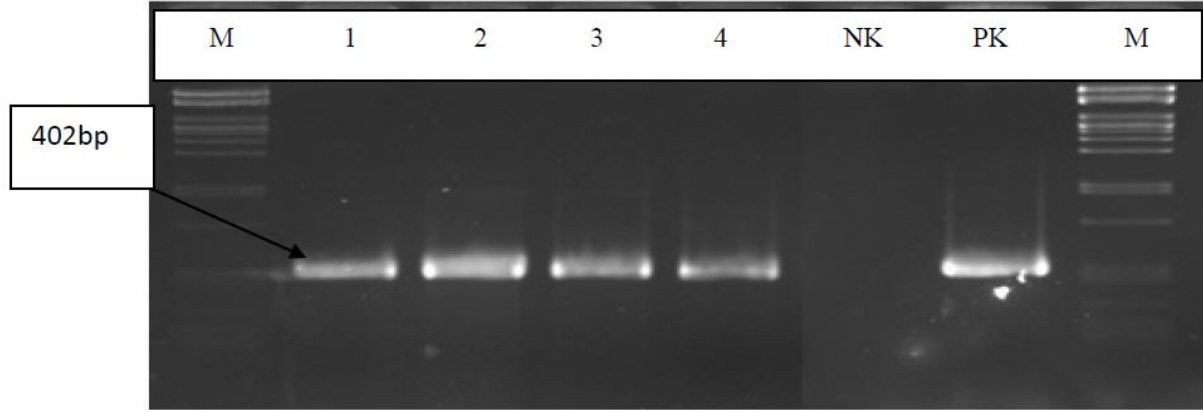
Resim 3. 8. *glp* genine ait elektroforez görüntüsü. 1-4: *glp* geni pozitif olan izolatlar NK: negatif kontrol PK: pozitif kontrol M: PstI enzimi ile kesilmiş lambda faj DNA'sı



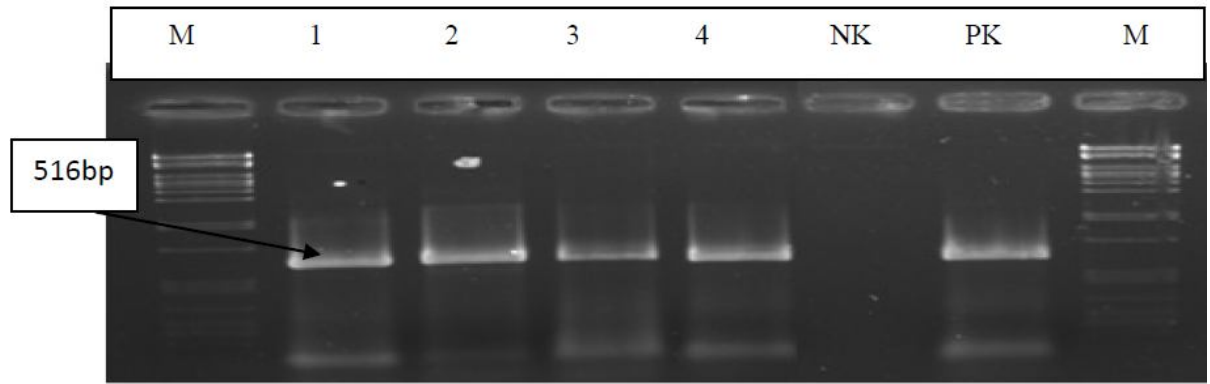
Resim 3.9. *gmk* genine ait elektroforez görüntüsü. 1-4: *gmk* geni pozitif olan izolatlar NK: negatif kontrol PK: pozitif kontrol M: PstI enzimi ile kesilmiş lambda faj DNA'sı



Resim 3. 10. *pta* genine ait elektroforez görüntüsü. 1-4: *pta* geni pozitif olan izolatlar NK: negatif kontrol PK: pozitif kontrol M: PstI enzimi ile kesilmiş lambda faj DNA'sı



Resim 3. 11. *tpi* genine ait elektroforez görüntüsü. 1-4: *tpi* geni pozitif olan izolatlar NK: negatif kontrol PK: pozitif kontrol M: PstI enzimi ile kesilmiş lambda faj DNA' sı



Resim 3.12. *yqiL* genine ait elektroforez görüntüsü. 1-4: *yqiL* geni pozitif olan izolatlar NK: negatif kontrol PK: pozitif kontrol M: PstI enzimi ile kesilmiş lambda faj DNA' sı

3. 4. 2. Sekans Analizi Sonuçları: *spa* ve MLST analizleri için suşların DNA'ları ilgili primerler ile çoğaltıldıktan sonra, maliyeti en aza indirebilmek için, PFGE sonucuna göre her pulstipten bir suş belirlenerek, bu suşlara ait ampliconlar sekans analizi için Kore'ye gönderildi.

3.4.2.1. *spa* Analizi: Elde edilen DNA dizileri StaphType yazılım programının yardımı ile *spa* tiplerinin belirlenmesi için kullanıldı. Elde edilen *spa* tiplerinin diğer bilgileri internet yardımı ile Ridom SpaServer adresinden sağlandı. *spa* analizi sekans sonuçları Resim 3.13-Resim 3.16 arasında verilmektedir.

AAA GAGGAAGACAACAACAAGCCTGGC AAAAGAAGACAACAACAAGCCTGGT AAAGAAGACGGCA
 ACAAACCTGGT AAAGAAGACAACAAAAACCTGGC AAAAGAAGATGGCAACAAGCCTGGTAAAGA
 AGATGGCAACAAGCCTGGT AAAGAAGACGGCAACGGAGTACATGTCGTTAAACCTGGTGATACAG

Resim 3. 13. Pulsotip A olan 7 izolatların *spa* analizi sekans sonucu
 İzolatın tekrar bölgeleri; 15-12-16-02-24-24 olarak belirlenirken ***spa* tipi** t030

CAAAAAGAGGAAGACAACAACAAGCCTGGCAAGAAGACAACAACAAGCCTGGTAAAGAAGACGG
CAACAAACCTGGTAAAGAAGACAACAACAACAAGCCTGGCAAGAAGATGGCAACAAGCCTGGTAAA
GAAGATGGCAACAAGCCTGGTAAAG

Resim 3. 14. Pulsotip B olan 3 izolatların spa analizi sekans sonucu
İzolatin tekrar bölgeleri; 15-12-16-02-24 olarak belirlenirken **spa tipi** t459

GCTCAAGCACCAAAAAGAGGAAGACAATAACAAGCCTGGCAAGAAGACAACAACAAGCCNGGTC
AAGAAGACGGCAACAAGCCTGGTAAAGAAGACAACAACAACAAGCCTGGCAAGAAGACGGCAACA
GCCTGGTAAAGAAGACAACAACAAGCCTGGTAAAGAAGACAACAACAAGCCTGGTAAAGAAGAC
GGCAACAAGCCTGGTAAAGAAGACGGCAACGGAGTAC

Resim 3. 15. Pulsotip C olan 1 izolatların spa analizi sekans sonucu
İzolatin tekrar bölgeleri; 11-12-41-20-17-12-12-17 olarak belirlenirken **spa tipi** t660

GTAAAGAAGACGGCAACAACAAGCCTGGCAAGAAGACAACAACAAGCCTGGTAAAGAAGACGGCAA
CAACCTGGCAAGAAGACAACAACAACAAGCCTGGTAAAGAAGACGGCAACAACAAGCCTGGCAAGA
GATGGCAACAACAAGCCTGGCAAGAAGACAACAACAACAAGCCTGGCAAGAAGACGGCAACAAGCCTG
GTAAAGAAGATGGCAACAACAAGCCTGGTAAAGAAGACGGCAACAAGCCTGGTAAAGAAGATGGCAA
CAACCTGGTAAAGAAGACGGCAACAACAAGCCTGGTAAAGAAGATGGCAACAACAAGCCTGGCAAGA

Resim 3. 16. Pulsotip D olan 1 izolatların spa analizi sekans sonucu
İzolatin tekrar bölgeleri; 26-23-13-23-13-23-31-05-17-25-17-25-16-28 olarak belirlenirken **spa tipi**
t542

spa dizi tiplendirmesinin izolatlara göre dağılımı Şekil 3. 2.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. spa dizi tiplendirmesinin izolatlara göre dağılımı

3.4.2.2. MLST Analizi: PFGE sonucuna göre 4 farklı pulsotip belirlendikten sonra bu şuşların kromozomal DNA'ları 7 farklı yapısal metabolik genin (*arcC*, *aroE*, *glp*, *gmk*, *pta*, *tpi* ve *yqiL*) yaklaşık 450-500 bp'lik internal fragmentleri her primer ayrı ayrı olarak PCR ile çoğaltıldı. Elde edilen ürünlere dizi analizi yapıldı. Mevcut verilerle karşılaştırılarak elde edilen her bir allele bir kod verildi. Her köken için bir dizi tip (sequence type, ST) belirlendi. Veriler dijital bir veritabanında saklanarak, dünyanın herhangi bir bölgesinden elde edilen diğer kökenlerle karşılaştırıldı. MLST analizi sonucunda izolatların allellik profilleri Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. MLST analizi sonucunda izolatların allellik profilleri

Pulsotip	MLST Lokusları							Sekans Tipi
	<i>arcC</i>	<i>aroE</i>	<i>glpF</i>	<i>gmk</i>	<i>pta</i>	<i>tpi</i>	<i>yqiL</i>	
A	2	3	1	1	4	4	3	239
B	2	3	1	1	4	4	115	1294
C	213	1	4	1	5	5	4	1940
D	7	6	1	70	8	8	6	737

MLST dizi tiplendirmesinin izolatlara göre dağılımı Şekil 3. 3.'de verilmiştir.



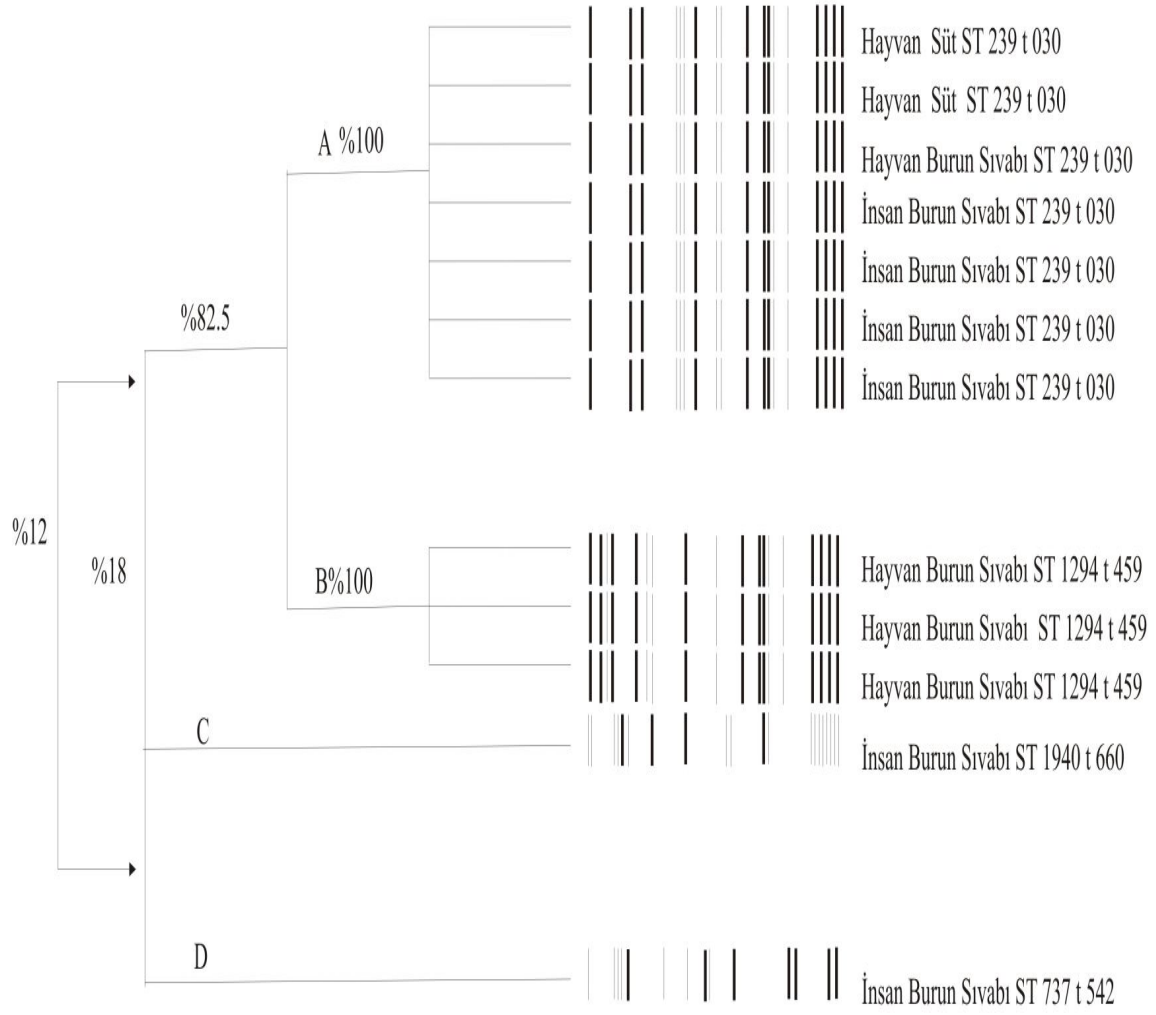
Şekil 3.3. MLST dizi tiplendirmesinin izolatlara göre dağılımı

Elde edilen tüm sonuçların toplu sunumu Çizelge 3. 2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Sonuçların Toplu Değerlendirilmesi

Suş No	İşletme No	Kaynak	SCCmec	PFGE	MLST	spa
1	1	İnsan Burun Svabı	Tip II	Pulsotip D	ST737	t542
2	2	İnek Sütü	Tip III	Pulsotip A	ST239	t030
3	7	İnek Burun Svabı	Tip III	Pulsotip B	ST1294	t459
4	7	İnek Burun Svabı	Tip III	Pulsotip B	ST1294	t459
5	10	İnek Sütü	Tip III	Pulsotip A	ST239	t030
6	10	İnek Burun Svabı	Tip III	Pulsotip A	ST239	t030
7	11	İnek Burun Svabı	Tip III	Pulsotip B	ST1294	t459
8	11	İnsan Burun Svabı	Tip III	Pulsotip C	ST1940	t660
9	12	İnsan Burun Svabı	Tip IV	Pulsotip A	ST239	t030
10		İnsan Burun Svabı	Tip III	Pulsotip A	ST239	t030
11		İnsan Burun Svabı	Tip III	Pulsotip A	ST239	t030
12		İnsan Burun Svabı	Tip III	Pulsotip A	ST239	t030

PFGE analizleri ile *spa*, MLST analizleri karşılaştırıldığında sonuçların birbirleri ile birebir uyumlu olduğu gözlemlenmiştir. Şekil 3.4.'te PFGE analizi sonucu elde edilen evrimsel ağaç verilmiştir.



Şekil 3.4. PFGE analizi sonucu elde edilen evrimsel ağaç

4. TARTIŞMA

Stafilokoklar, hayvanlar ve insanlarda önemli enfeksiyonlara neden olmaktadır. *S. aureus*, bütün dünyada süt ineklerinde görülen mastitisin en önemli nedenidir. İnsanlarda ise nozokomiyal ve toplum kaynaklı enfeksiyonlara neden olurlar. Ayrıca, son yıllarda MRSA izolatlarının sıklığında meydana gelen artışlar, stafilokok enfeksiyonlarının ve antibiyotiklere karşı mikroorganizmalardaki direnç gelişiminin kontrolü için etkili stratejiler geliştirme gereğini ortaya çıkarmıştır. Bu nedenle, *S. aureus* epidemiyolojisinin, patogenezinin ve populasyon genetiğinin iyi bilinmesi gerekmektedir (Fluit 2002).

S. aureus penisiline karşı direnç geliştiren ilk bakteridir. Bu bakteri diğer antibiyotiklerin yanı sıra, pek çok bakterinin direnç geliştiremediği metisilini bile etkisiz kılmıştır. Günümüzde MRSA enfeksiyonları sadece glikopeptid antibiyotiklerle tedavi edilebilmektedir. Bu antibiyotikler pahalı oldukları gibi insan hücrelerine de zararlıdır. Bununla birlikte, bir zamanlar yenilmez olarak görülen ve MRSA'lara karşı elde edilen son silahlar olan glikopeptidlere dirençli *S. aureus* suşları Mayıs 1998'den başlayarak sırayla Japonya, Amerika, Fransa ve İngiltere' den izole edilmiştir. MRSA oranının artmasına paralel olarak, glikopeptid antibiyotiklerin kullanımıyla, glikopeptidlere dirençli *S. aureus* suşlarının miktarı kaçınılmaz olarak artacaktır (Durmaz 2001). Çoğu bakteride olduğu gibi MRSA'nın epidemiyolojik çalışmalarında, tiplendirme amacı ile kullanılan fenotipik ve genotipik yöntemlerin ayırım güçleri kıyaslanmış, birçok çalışmada bakteri genomundaki polimorfik bölgelerde oluşan tek nokta mutasyonlarını bile ortaya koyabilen genotiplendirme yöntemlerinin fenotipik yöntemlerden daha yüksek ayırım gücüne sahip olduğu gösterilmiştir. MRSA'nın hızlı bir şekilde yayılmasının önüne geçmek için genotiplendirme metodları ile doğru bilginin elde edilmesi gerekmektedir. Bu amacı yerine getirebilmek için pek çok moleküler teknik geliştirilmiştir. Bu tekniklerin başında MRSA izolatlarının tiplendirilmesinde en çok tercih edilenler PFGE, MLST, SCC mec ve *spa* tiplendirme (Deurenberg ve ark 2007). Hoefnagels-Schuermans ve ark. epidemiyolojik ve genetik olarak ilişkili olan MRSA izolatlarını antibiyotipleme, Protein A gen analizi, PFGE kullanılarak yaptıkları çalışma (Hoefnagels ve ark. 1997) ile Elsa Velazco ve arkadaşlarının yaptığı 43 *S. aureus* izolatının antibiyotipleme, PFGE, PCR ve faj tiplendirme gibi yöntemleri kullanarak

yaptıkları çalışma (Velazco ve ark. 2008) MRSA'nın kontrol ve tanımlanması için fenotipik yöntemlerin yetersiz kaldığı, MRSA salgınlarında moleküler araştırmaların yapılması gerektiği bildirilmiştir. Bu çalışmada sığırlardan ve sektör çalışanlarından izole edilen 12 adet MRSA suşu SCC*mec*, PFGE, MLST, *spa* dizi tiplendirme yöntemleri ile genotipik olarak incelenmiş ve PFGE yöntemi ile suşlar arasındaki klonal ilişki, SCC*mec* yöntemi ile suşların hastane ya da toplum kökenli olup olmadıklarının belirlenmesi, MLST ve *spa* dizi tiplendirme yöntemleri ile ise izolatların dünyadaki epidemiyolojik dağılımlarının ortaya konulması amaçlanmıştır.

Türkiye'de ve dünyada farklı yıllarda yapılan çalışmalarda mastitislerde *S. aureus* genellikle tür düzeyinde en sık izole edilen etken olmuştur (Giannechini ve ark. 2002, Shitandi ve ark. 2004, Tel ve ark. 2009, Kaynarca ve Türkyılmaz 2010, Ünal ve Yıldırım 2010). Türkiye'de değişik bölgelerde yapılan çalışmalarda mastitisli ineklerden %28-73 arasında değişen oranlarda *S. aureus* izole edilmiştir (Arda ve İstanbulluoğlu 1980, Aydın ve ark. 1995, Türütoğlu ve ark. 1995, Kuyucuoğlu ve Uçar 2001, Rişvanlı ve Kalkan 2002, Beytut ve ark. 2002, Yavuz ve Esendal 2002, Kırcan ve ark. 2005). Hayvanlarda ilk MRSA suşu 1972 yılında mastitisli sığırlarda bildirilmiştir. İlerleyen yıllarda da bu sayı artmıştır (Juasz-Kaszanyitzky ve ark 2007, Leonard ve Markey 2008). 1997-2004 yılları arasında Kore'de 153 farklı çiftlikte, 3047 mastitisli inek sütünden 835 *S. aureus* ve 763 KNS izole edilmiştir. Bu izolatların metisilin direnci araştırıldığında 21 (%2,5) *S. aureus* ve 19 (%2,4) KNS'de dirençlilik tespit edilmiştir (Moon ve ark 2007). 2001 yılında ise antibiyotik dirençliliğine yönelik Macaristan'da yapılan bir araştırmada hayvanlarda ve hayvansal ürünlerde hiçbir vakada *mecA*-pozitif stafilokok izole edilmemiş ancak 2004 de devam eden bu çalışmada, sığır sürülerinde 5 MRSA izolasyonu yapılmıştır (Kaszanyitzky ve ark. 2003). Vanderhaeghan ve ark. ise Belçika'da yaptıkları çalışmalarında klinik ve subklinik mastitisli sütlerde yaklaşık %10 olarak bulmuşlar ve ülkelerinde MRSA oranının beklenmedik bir şekilde yüksek çıktığını vurgulamışlardır (Vanderhaeghan ve ark. 2010). Türkiye'de mastitisli süt örneklerinde metisilin direncinin incelendiği sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda metisilin direnci fenotipik yöntemler kullanılarak belirlenmiş ve bu çalışmalar arasında MRSA tespitinde oransal açıdan farklılıklar bulunmaktadır. Ak ve ark. (2000) İstanbul'da, Güler ve ark. (2005) Konya'da izole ettikleri mastitise neden olan stafilokok suşlarında oksasilin direnci bulunmadığını bildirirlerken; Kireçci ve Çolak (2002) Erzurum yöresinde metisilin dirençli 5 (%5,8) suş izole ettiklerini bildirmişlerdir. Hadimli ve ark. (2001), 78 *S. aureus* izolatından 1 tanesinde metisilin direnci saptamışlardır. Türütoğlu ve ark.

(2006) ise Burdur yöresinde %17,5 oranında MRSA izole ettiklerini bildirmişlerdir. Bu konuda en yüksek oranlar Aydın ilinden bildirilmiştir. Kırkan ve ark. (2005) Aydın yöresinde yaptıkları çalışmada inceledikleri *S. aureus* suşlarında oksasilin direncinin %60 olduğunu bildirmişlerdir.

mecA geninin yalnızca fenotipik olarak disk yöntemi ile belirlenmesi yeterli değildir hatalı pozitif ve negatif sonuçlar çıkabileceğinden elde edilen bulguların moleküler yöntemlerle de doğrulanması oldukça yararlıdır (Murakami ve ark. 1991). Yurdumuzda veteriner sahada bu konuda yapılmış en kapsamlı çalışma Türkyılmaz ve ark. (2010) tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışmada sefoksitin direncinin MRSA suşlarında %17,2 olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada ise %20,30 (59 hayvan ve insan kökenli izolattan 12 tanesi)'dur. Bu yüksek oranın sebebi aslında yaklaşık bir buçuk yıl önce Kaynarca ve Türkyılmaz tarafından incelenen pozitif olan işletmelerdeki pozitif hayvanlardan kaynaklanmış olabilir. İşletmedeki hayvanlar değişmesine rağmen bu işletmedeki bakıcılar aynı olup; yine aynı veteriner hekimler tarafından işletmeler kontrol edilmektedir. Bu durum pozitif olan 6 işletmede sağım hijyenine dikkat edilmediğini ayrıca insandan hayvana da bir bulaşma olabileceğini akla getirmektedir. Bu durumu ayrıca izolatların çoğunun hastane kökenli olması da desteklemektedir. Bakıcıların el ve burunlarından izole edilen *S. aureus* izolatlarının, inek meme başı derisi ve mastitisli inek sütlerinden izole edilenlerle genetik yakınlıkta olabildiği Türkiye ve dünyada yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (Fox ve ark. 1991, Roberson ve ark. 1998, Ünal ve İstanbulluoğlu 2009). Mastitisin kontrolünde her zaman vurgulandığı gibi sağım hijyeninin önemi oldukça fazladır. Bu konunun açıklığa kavuşturulabilmesi için PFGE, *spa* veya MLST gibi daha ileri moleküler yöntemler kullanılarak çalışmalar yapılması ve insan ile sığır izolatlarının orijininin belirlenmesi gerekmektedir. Yaptığımız bu çalışma bu 3 genotipik yöntemi ve izolatların hastane kökenli mi toplum kökenli mi olduğunu gösteren SCCmec tiplendirilmesini esas almaktadır.

Hayvanların, insanlarda enfeksiyona neden olan MRSA için rezervuar olabileceği çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (Cefai ve ark. 1994, Middleton ve ark. 2005). Cefai ve ark. (1994) bir köpeğin, MRSA taşıdığını ve iki hemşireye iki kez bulaştırarak bu hemşirelerinde hastalarını bu etkenle enfekte etmelerine aracılık ettiğini rapor etmişlerdir. Michigan Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesine 13 aylık bir zaman periyodunda gelen 11 hasta attan nozokomiyal epidemiyeye neden olan MRSA suşları izole edilmiş ve bu suşlar PFGE ile tiplendirilmiştir (Seguin ve ark. 1999). Son yıllarda yapılan

çalışmalar MRSA enfeksiyonlarının insan kaynaklı olabileceğini göstermektedir (Morgan 2008). Yaptığımız bu çalışmada inek burun sıvılarından ve sütlerinden izole edilen *S. aureus* suşlarının; HK-MRSA (1 adet SCCmec TipII ve 10 tane SCCmec TipIII) olarak belirlenmesi MRSA enfeksiyonlarının insan kaynaklı olabileceğini düşünmemize sebep olmuştur. Bununla birlikte bu konunun tam olarak açıklığa kavuşturulabilmesi için aynı işletmedeki insan ve bakıcılardan aynı pulsotipe ait suşların izolasyonunun yapılmasını gerektirmektedir. Çalışmada aynı işletmede bulunan hayvan bakıcılarından ve onların ilgilendikleri sığırlardan bu tip bir izolasyon yapılamamakla birlikte yörede çalışan veteriner hekimlerden 3 tanesinden ST239 ve t030 *spa* tipli izolatların elde edilmesi bu suşun bu kadar yaygın olmasında veteriner hekimlerin rolü olabileceğini akla getirmektedir.

Yapılan çalışmalar, son yıllarda giderek daha önemli bir sorun haline gelen toplumdan kazanılmış MRSA enfeksiyonlarından izole edilen kökenlerin çoğunlukla tip IV ve tip V SCCmec taşıdıklarını ortaya koymaktadır. SCCmec sınıflandırılması ile bu kökenlerin hastane kaynaklı kökenlerden ayırımı yapılmakta ve toplum içinde yayılım haritaları çıkarılmaktadır (Oliveira 2002, Kwon ve ark 2005, Kluytmans-Vandenbergh 2006). Bugün için MRSA kökenlerinin genotiplendirilmesinde, SCCmec tiplendirmesinin, diğer yöntemlerle birlikte kullanımı, ayırım gücünü önemli oranda yükseltmiş; ayrıca MSSA suşunun SCCmec kasetini edinerek MRSA fenotipine dönen kökenlerinin evrimsel gelişimlerinin izlenmesine olanak sağlamıştır (Feil ve Enright 2004, Bratu ve ark 2006). Çalışmamızda izole ettiğimiz 12 MRSA suşundan bir tanesinin (%8,3) SCCmec tip IV gen kasedi taşıdığı ortaya konuldu. Farklı ülkelerde sıklıkla görülen SCCmec tipleri bulunmaktadır. SCCmec Tip II Japonya ve Kore’de, Tip III Suudi Arabistan, Sri Lanka, Singapur, Çin, Tayland ve Hindistan gibi diğer bazı Asya ülkelerinde bildirilirken (Changtrakool ve ark. 2006); Tip I özellikle Hırvatistan’da (Budimir ve ark. 2006) ve İsviçre’de (Blanc ve ark. 2007), Tip IV İspanya’da (Laplana ve ark. 2007), Portekiz (Amorim ve ark. 2007), Almanya (Monecke ve ark. 2008), Yunanistan (Chini 2008), Belçika (Hallin ve ark. 2008), İrlanda (Shore ve ark. 2005), İsviçre (Qi ve ark. 2005), Danimarka (Faria ve ark. 2005), Fransa (Lina ve ark. 2006) ve Finlandiya (Vainio ve ark. 2008), Tip II ve IV ABD’de en yaygın tipler olarak bildirilmiştir (O’Brien ve ark. 2005, Kılıç ve ark. 2008). Türkiye’de insanlarda en çok görülen SCCmec tipinin Tip III olduğu; %82,1 (Kılıç ve ark. 2008) ve %90,4 (Yıldız ve ark. 2010) yapılan iki önemli araştırma ile bildirilmiştir. Veteriner sahada yurdumuzda yine benzer şekilde mastitisli sığır sütlerinden izole edilen *S. aureus* suşlarında insanlardakine benzer şekilde Tip III en yüksek oranda bulunmuştur. Yaptığımız bu çalışmada izolatlarımızdaki en yaygın SCCmec tipinin Tip III (%8,3) olduğunu gözlemledik.

83,3) olduğu saptanmıştır. Bu durumda yöremizde hastane kökenli suşların çokluğu dikkati çekmekle birlikte bu suşların insanlardan orijin alan suşlar olduğu ve hijyenik önlemlere dikkat edilmemesi sebebi ile bir şekilde hayvanlara bulaşabildiği düşünülmektedir.

Strommenger ve arkadaşları, MRSA suşlarını da içine alan 99 izolatın MLST, PFGE ve *spa* tiplendirme metodu ile sınıflandırılmasını ve aralarındaki ilişkiyi incelemişlerdir. PFGE çalışması sonucunda Tenover ve arkadaşlarının kriterlerine göre 99 suşu 74 farklı grup altında toplanmıştır. Yapmış oldukları diğer bir çalışma olan *spa* tiplendirmeye göre de izolatlar 2 (t586) ile 16 (t032) tekrarı içeren 44 farklı *spa* tipini tespit etmişlerdir. MLST çalışmasına göre de 22 farklı dizi tipi (sequence type (ST)) tanımlamışlardır. Yaptıkları bu çalışmalar sonunda gruplara ayrılan izolatları birbirleri ile eşleştirmişler ve metodlar arasındaki avantajları ve dezavantajları kıyaslamışlardır. Bunlar içinde PFGE yönteminin *S. aureus* suşlarının tiplendirilmesinde diğer genotiplendirme metodları ile karşılaştırıldığında altın standart olduğunu ileri sürmüşlerdir. Buna karşılık, MLST ve *spa* dizi tiplendirme metodlarının yardımı ile elde edilen sonuçların taşınabilmesi, karşılaştırmaya uygun olması ve tekrarlanabilmesi bakımından diğer metodlara göre avantajlı olduğunu tespit etmişlerdir. Bu iki metod arasında *spa* tiplendirmesinin MLST'ye göre daha avantajlı olduğunu bulmuşlar ve rutin çalışmalar için *spa* tiplendirmesinin daha uygun olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bunların yanı sıra yaptıkları çalışmada bu 3 metoddan elde ettikleri sonuçların birbiri ile uyumlu olduğunu da göstermişlerdir (Strommenger ve ark. 2006). Faria ve ark. yaptıkları çalışmada çeşitli bölgelerden izole ettikleri *S. aureus* suşlarında SCC*mec* tiplendirme, MLST, *spa* dizi tiplendirme ve PFGE gibi moleküler yöntemler arasındaki farkları araştırmışlardır. Bunlardan PFGE sonuçlarına göre MRSA suşlarında 32 tip ve 92 alt tip, MSSA suşlarında 30 tip ve 63 alt tip bulmuşlardır. Diğer bir yöntem olan *spa* tiplendirme yöntemi ile MRSA için 51, MSSA için ise 55 alt tip bulmuşlardır. MLST yöntemi kullanarak da suşları klonal kompleksler (CC) içerisinde gruplandırmışlardır. Simpson'un ayırım indeksini (SID) kullanarak metodlar arasındaki ayırım güçlerini incelemişlerdir. Bunlar arasında en yüksek SID'ye PFGE' nin sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Fakat PFGE tipleri ile *spa* tipleri karşılaştırıldığında ayırım güçlerinde benzerliğin olduğunu bulmuşlardır. MLST ve *spa* tiplendirme gibi metodların PFGE'ye göre daha karşılaştırılabilir olduğunu ve bu nedenle global epidemiyolojik çalışmalar için daha uygun bulunduğunu ileri sürmüşlerdir (Nuno ve ark. 2008). Bu çalışmada da izolatların PFGE analizleri ile *spa*, MLST analizleri karşılaştırıldığında sonuçların birbirleri ile birebir uyumlu olduğu evrimsel ağaç çizilerek gösterilmiştir. Bu nedenle

yukarıda bahsedilen araştırmacıların sonuçları ile bu çalışma sonuçları arasında paralellik bulunmaktadır.

Gülay, “Gram Pozitif Bakteri Enfeksiyonlarında Direnç ve Epidemiyoloji” adlı çalışmasında; MLST’nin PFGE’ den farklı olarak klon içerisindeki alt tipleri ve farklılıkları göstermediğini, PFGE’nin ise bunları gösterdiği için salgın analizlerinde yararlı olabileceğini savunmuştur. Yine aynı çalışmasında *spa* dizi tiplendirmesinin klonal soyları saptama ve tekrarlanabilirlik açısından MLST ile eşdeğer olduğunu savunmuştur. Ayrıca MRSA enfeksiyonlarının MSSA enfeksiyonlarına göre mortalitesinin daha yüksek olmasının bazı klonal soyların içerdiği genetik elemanlarla ilgili olabileceğini öne sürmüştür. ST 239 suşunun ise septisemilerden izole edilen en yaygın suş olduğunu belirtmiştir (Gülay 2008). Bu çalışmada incelenen 12 MRSA izolatı içerisinde 7 tanesi ST 239 olarak tespit edilmiştir. Yöremizde en yaygın *spa* tipinin t030 olduğu sonucuna varılmıştır.

Tenover ve ark. metisiline duyarlı ve dirençli suşların karakterizasyonu için Amerika’ da 4 yıl boyunca nazal kùltürlerden çok sayıda suş elde etmişlerdir. Yaptıkları çalışmada suşların 14 mikrobiyal ajana duyarlılıklarını incelemiş ve tüm MRSA-MSSA izolatlarını PFGE ile tiplendirmişlerdir. PFGE sonucunda MSSA’larda toplam 11 farklı PFGE tipi saptanırken, MRSA’larda 8 farklı PFGE tipi saptamışlardır. Yaptığımız çalışmada 12 adet MRSA suşunun PFGE yöntemiyle incelenmesi sonucunda 4 pulsotip belirlenmiştir. Araştırmacılar ayrıca izolatları topladıkları yıllara göre de sınıflandırmışlardır. Yaptıkları çalışmanın sonucunda bir PFGE tipi olan USA300’ ün MRSA izolatı ile nazal kolonizasyonda 2003-2004 yılları arasında belirgin bir artışın olduğunu tespit etmişlerdir (Tenover ve ark. 2008). MRSA’nın PFGE alt tipi olan USA 300 (ST8 ve CC8 SCC*mec* Tip IV) ilk olarak 2000 yılında Amerika Birleřik Devletleri’nde Pennsylvania’daki üniversite futbol takımı oyuncularının ve Missouri’deki mahkumların deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarında tespit edilmiştir. Beş yıl sonra Amerika’da 11 hastanede yapılan araştırma ile baskın kommünite haline geldiği saptanmıştır. USA300 deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarının yanı sıra invaziv rahatsızlıklardan olan bakteriyemi, endokardit, nekrotik pnömoni ve osteomyelitis gibi hastalıklardan da izole edilmiştir. USA 300 izolatları, genellikle Panton–Valentine lökositidin (*pvl*) adı verilen ve arjinin katabolik mobil element olan bir geni de taşımaktadır. Nadiren de olsa stafilokokal enterotoksin genlerini barındırabilirler. USA 300 izolatları Avrupa, Güney Amerika ve Avustralya’da son yıllarda yaygınlaşmaya başlamıştır (Tenover ve Goering 2009). USA300 izolatları Avustralya (Gottlieb ve ark. 2008), Avusturya

(Ruppitsch ve ark. 2007), Kolombiya (Arias 2008), Danimarka (Larsen 2007), Almanya (Witte ve ark 2008), İtalya (Valentini ve ark. 2008), Japonya (Shibuya ve ark. 2008), İsviçre (Tietz ve ark.2005), İngiltere (Otter ve ark. 2009) ve Hawaii (CDCP 2004) de tespit edilmiştir. Yıldız ve ark. 2009 ile Ergon ve ark. 2010 yılında yapmış oldukları çalışmalar ile veteriner sahada yapılan (Türkyılmaz ve ark. 2010) çalışmalar ile USA 300'ün Türkiye'de en yaygın klon olduğunu göstermişlerdir (Yıldız ve ark. 2009, Ergon ve ark. 2010, Türkyılmaz ve ark. 2010). USA 300'ün bu kadar yaygın ve önemli olmasının nedeni; dünyanın birçok bölgesinde dağılım göstermesi ve bu dağılımın nedeninin seyahat hastalıklarından kaynaklanmasıdır. Bizim çalışmamızda en yaygın klon (%58,3) olan ST 239 (Brezilya klonu) da USA 300 alt tipi bünyesinde bulunur.

Türkiye'de 2008 yılına kadar yapılan çalışmalarda görülen *spa* tipleri; t001, t002, t003, t010, t045, t062, t105, t178, t179, t187, t214, t311, t319, t389, t443 olarak bildirilmiştir (Deurenberg ve Stobberingh 2008). 2010 yılından günümüze kadar *spa* dizi tiplendirmesi ile yapılan çalışmalar Türkiye'de' ki en yaygın *spa* tipinin t030 olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda *spa* dizi tiplendirmesi ile elde edilen t459 izolatu; Almanya, Danimarka ve Çin'de 2005 ile 2011 yılları arasında insan kaynaklı örneklerden, t542 izolatu; Danimarka ve Almanya'da 2006 ile 2010 yılları arasında insan kaynaklı örneklerden, t660 izolatu; Fransa, Almanya, Hollanda, İspanya, İsveç ve Lübnan'da 2007-2011 yılları arasında insan kaynaklı örneklerden ve t030 ise Türkiye, Çin, Hollanda, İran, Almanya, İsveç, Avusturya, Güney Afrika, Çek Cumhuriyeti, Norveç, İspanya, Danimarka, İsviçre, Lübnan, Romanya, Hırvatistan, Kıbrıs, Bulgaristan ve Fransa' da 1998 ile 2011 yılları arasında insan ve hayvan kökenli suşlardan izole edilmiş ve <http://www.ridom.de/spa-server/> adresine global epidemiyolojik çalışmaların yapılabilmesi için bildirilmiştir (www.ridom.de/spa-server/). Türkiye'de *spa* dizi tiplendirmesine yönelik çalışma sonuçlarının daha sağlıklı değerlendirilebilmesi için www.ridom.de/spa-server/ adresine bildirilmesi gereklidir.

Yıldız ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma sonucunda Türkiye'de ki çoğu MRSA klonlarının ST239 SCC*mec* Tip III olduğu saptanmıştır. Bu klonlar Brezilya klonu olarak da bilinmektedir ve izole edilen ST239 suşları PFGE ile tiplendirildiklerinde %56'sında beş bant farklılığı gözlenmektedir. ST239 ile ST737 (SCC*mec* tiplendirmesine göre Tip IV) Türkiye'de en yaygın olarak bulunan suşlardır. Şimdiye kadar yapılmış olan geniş kapsamlı bu epidemiyolojik çalışma; TR03 (ST239-SCC3) ve TR11 (ST737-SCC4) klonlarının hastane kökenli olduğunu göstermektedir (Yıldız ve ark. 2009). Bölümümüzde yapılan çalışmada

2002-2006 yılları arasında izole edilen *S. aureus* suşlarında PFGE ve varyantları ile birlikte 3 pulsotipin varlığı belirlenmiştir. Pulsotip B suşları SCCmec tiplendirmesi ile tip IV, MLST ile ST8 (USA 300 olarak da bilinen ABD’de toplum kökenli izolatlar arasında en yaygın olarak görülenlerden bir tanesi) *spa* ile t190; pulsotip A ve C suşlarının ise SCCmec tip III, *spa* tiplendirmesi ile t030 ve MLST ile ST 239 ve ST 239 benzeri bir klon olduğu belirlenmiştir. ST 239 Brezilya klonu olarak bilinir ve önemli hastane kökenli klonlardan birisidir (Türkyılmaz ve ark 2010)

Danimarka’da yapılan bir çalışmada, toplumda kazanılmış MRSA izolatlarının çoğunluğunun bir klona ait olduğu gözlenmiş ve hakim klonun *spa* tipinin t070 (UJGBBPB), SCCmec tipinin Tip IV ve sekans tipinin de ST 80 olduğu belirlenmiştir. Hastane kökenli MRSA izolatlarında ise sekiz farklı PFGE paterni saptanmış ve klonlardaki bu çeşitlilik hastane infeksiyonlarının kontrolündeki başarıya bağlanmıştır (Faria ve ark. 2005). Onbir Avrupa ülkesine ait hastane kökenli MRSA izolatlarının moleküler epidemiyolojisinin araştırıldığı bir diğer çalışmada ise; en sık *spa* t051 ve ST247 klonu belirlenmiştir (Cookson ve ark. 2007).

Carmen ve ark., hayvanlar ve hayvan bakıcıları ve veteriner hekimlerin nazal svab örnekleri ile yaptıkları çalışmada en yaygın MLST tipinin ST398 olduğunu saptamışlardır (Carmen ve ark. 2011). Nathaus ve ark., Almayada domuz çiftliklerindeki hayvanların nazal svapları ile çiftliklerle ilgilenen veteriner hekimlerin nazal svaplarından aldıkları örneklerden yaptıkları çalışmada en yaygın MLST tipinin ST398 olduğunu saptamışlardır (Nathaus ve ark. 2011). Feßler ve ark., 17 çiftlikte mastitisli sığırlardan izole ettikleri MRSA suşları içerisinde en yaygın MLST tipinin ST398 olduğunu saptamışlardır. Yine aynı çalışmada mastitisli sığırlarda saptanan en yaygın *spa* tiplerinin t011, t034 ve t2576 olduğu belirtilmiştir (Feßler ve ark. 2010). Monecke ve ark., 2007 yılında mastitisli ineklerden izole ettikleri 128 adet MRSA suşuyla yaptıkları çalışmada en yaygın MLST tipini ST398, en yaygın *spa* tipini ise t034, olarak saptamışlardır (Monecke ve ark. 2007). Hasman ve ark. 2009 yılında mastitisli sığır, kümes hayvanları ve domuzlardan izole ettikleri toplam 296 *S. aureus* suşu ile yaptıkları çalışmada en yaygın MLST tipinin domuzlarda ST398 ve en yaygın *spa* tipinin t034, sığırlarda en yaygın MLST tiplerinin ST50, ST71, ST151 ve ST9 olduğunu en yaygın *spa* tiplerinin ise t518, t524 ve t529; kümes hayvanlarında ise en yaygın MLST tipinin ST5 ve *spa* tipinin t002 ve t306 olduğunu saptamışlardır (Hasman ve ark. 2009). Huber ve ark. 2009 yılında domuz bakıcısı, veteriner, mezbaha çalışanı, domuz, buzağı, inek, tavuk karkası ve

hayvan orijinli yiyecekler ile mastitisli sığır sütlerinden izole ettikleri toplam 2662 adet *S. aureus* suşunu moleküler tiplendirme yöntemlerini (SCC*mec*, PFGE, MLST ve *spa*) kullanılarak tiplendirmişlerdir. Çalışma sonucunda sığırlarda, domuzlarda ve mastitisli ineklerde en yaygın MLST tipini ST398, en yaygın *spa* tipini t034 ve SCC*mec* tipini ise TipIV olarak saptamışlar, insanlarda ise en yaygın MLST tipini ST 398 ve ST8, *spa* tipini t011 olarak saptarken SCC*mec* tipini TipIV olarak saptamışlardır (Huber ve ark. 2010). ST398'in önemi MLST analizlerinin yapılması ile artmıştır. ST398'in t011, t034, t108, t567, t899 ve t939'un dahil olduğu farklı *spa* tiplerini içerdiği (Van Duijkeren ve ark. 2007), Fransız ve Alman MRSA suşlarının çoğunluğunun ST398 ve *spa* tipinin t108 olduğu (Armand-Lefevre ve ark. 2005) ve bu tipin Hollanda'da insanlarda görülen MRSA suşlarının %20'sini oluşturduğu bildirilmiştir (Van Loo ve ark. 2007). Ikawaty ve ark. 2009 yılında mastitisli sığır sütlerinden izole ettikleri 85 MRSA suşunun moleküler tiplendirilmesine yönelik çalışmada; en yaygın MLST tiplerini ST504, ST479, ST71 ve ST451, *spa* tiplerini t529, t543, t524 olarak saptamışlardır. Yine aynı çalışmada PFGE bant paternlerine göre 5 farklı pulsotipe rastlanmıştır (Ikawaty ve ark. 2009).

Çalışmada saptadığımız ST1940 İran'nın İsfahan bölgesinde 2010 yılında yapılan bir çalışmayla saptanmıştır. Bu çalışmada üriner sistem enfeksiyonuna sahip 50 yaşındaki bir kadından alınan idrar örneğinden izole edilen *S. aureus* suşunun MLST tiplendirmesi yapılmıştır. Elde edilen sekans tipinin toplum kökenli olduğu saptanmıştır. ST1940'a ilişkin hayvan kökenli bir kaynak henüz belirtilmemiştir (www.mlst.net 2011)

Çalışmada saptadığımız bir diğer sekans tipi ST1294 ise; Çin'in Tianjin bölgesinde 2006 yılında yapılan bir çalışmayla saptanmıştır. Yapılan bu çalışmada pnömoni hastası olan 80 yaşındaki bir erkek hastanın balgamından izole edilen *S. aureus* suşunun MLST tiplendirmesi yapılmıştır. Elde edilen sekans tipinin hastane kökenli olduğu saptanmıştır. ST1294'e ilişkin hayvan kökenli bir kaynak henüz belirtilmemiştir (www.mlst.net 2011) Bizim çalışmamızda ST1294 sekans tipine sahip suşların hayvan kökenli olması veteriner sahada MLST analizine dayanan çalışmaların azlığından, hijyen koşullarına dikkat etmeyen bakıcı ve veteriner hekimlerin hayvanlara bu suşu bir şekilde bulaştırmış olmasından kaynaklanmaktadır. Bu konunun açıklığa kavuşturulması için; hem hayvandan hem de onunla ilgilenen personelden aynı suşu izole edip PFGE tiplendirmesi ile klonal ilişkilerinin belirlenmesi gerekmektedir.

5. SONUÇ

Çalışmada toplam 235 materyal (145 subklinik mastitisli süt, 56 sığır, 34 insan nazal svap örneği) MRSA varlığı yönünden incelendi. 12 adet MRSA tespit edildi. *S. aureus* suşlarının SCCmec, PFGE, *spa* ve MLST genotipik yöntemleri ile incelenmesinden elde edilen sonuçlara göre;

1) Çalışmamızda 2. işletmedeki süt örneği ile bu işletmeye bakan veteriner hekimden ve 10. işletmeden izole edilen süt ve hayvan burun svap örneği ile bu işletmeye bakan veteriner hekimden izole edilen MRSA suşları aynı klondandır, bu sonuç hayvanlara bulaşın muhtemelen muayene sırasında veteriner hekim tarafından geçtiğinin göstergesidir. Yine aynı şekilde 7. işletmede ve 11. işletmede sığır burun svaplarından HK-MRSA izolatlarının saptanması muhtemel bulaşın veteriner hekimlerden veya ineklere bakan bakıcılardan kaynaklandığı göstermektedir. *S. aureus* suşlarının insan kaynaklı olabileceğini gösteren bir başka sonuç ise hastane kökenli SCCmec (HKMRSA) tiplerinin %91,6 (11/12) gibi yüksek bir oranda hayvanlarda da görülmesidir.

2) PFGE ile tespit edilen bant profillerine göre suşlar 4 farklı pulsotipe ayrılmıştır.

3)MLST analizi sonucunda en yaygın sekans tipinin ST239 (%58,3) olduğu saptanmıştır. Bu sekans tipi ülkemizdeki en yaygın sekans tipidir. Çalışmamızda saptadığımız sekans tipleri olan ST737, ST1294 ve ST1940'a daha önce hayvan suşlarında rastlanmamıştır. Bunun nedeni hayvan kökenli kaynaklardan izole edilen *S. aureus* suşlarına MLST tiplendirmesinin yapılmamasının veya hayvanlara bu izolatların insanlar tarafından bir şekilde bulaştırıldığına göstergesi olabilmektedir.

4) *spa* dizi tiplendirme yöntemi sonucu elde edilen en yaygın (%58,3) *spa* tipinin ise yine ülkemizde en yaygın bulunan t030 olduğu saptanmıştır.

Kullandığımız genotipik tiplendirme yöntemleri ışığında PFGE'nin MRSA enfeksiyonlarının araştırılmasında, hastaların epidemiyolojik olarak birbirleriyle olan ilişkilerinin ortaya çıkarılmasında yüksek tekrarlanabilirlik ve ayırım gücü bakımından en iyi yöntemlerden biri olması; PFGE'nin MRSA izolatları için altın standart olduğunun bir göstergesidir. *spa* dizi tiplemesi ve MLST'nin ise sonuçlarının kolay karşılaştırılabilir olması ve internet yolu ile tüm dünyadaki verilere ulaşılması global salgın araştırmalarının izlenmesi açısından daha uygun olduğu sonucunu göstermektedir. Ayrıca SCC*mec* tiplendirmesi ile MRSA suşlarının toplum ya da hastane kökenli olup olmadıklarının incelenmesi izolatların olası bulaş kaynaklarının tespitinde önemli rol oynamaktadır.

Yaptığımız çalışmadaki PFGE, MLST ve *spa* dizi tiplendirme yöntemlerinin sonuçları birbirleriyle birebir örtüşmektedir. Bu sonuç 3 farklı genotipik yöntem olan MLST, PFGE ve *spa* dizi analizinin benzer ayırım kuvvetine sahip olduğunun göstergesidir.

Veteriner sahada MLST ve *spa* dizi tiplendirme esaslarına dayanan çok merkezli bir çalışma; ülkemizdeki MRSA izolatlarının tüm dünyadaki verilerle karşılaştırılarak global epidemiyolojik araştırmalarının yapılması önerilmektedir. Diğer yandan PFGE yönteminin kullanılması suşlar arasındaki klonal benzerliğin ortaya konulması için gereklidir. Bu sayede *S. aureus* suşlarının insan kaynaklı mı zoonoz mu olduğu konusuna açıklık getirilebilir.

ÖZET

Erdem, Z. Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus* Suşlarının Moleküler Tiplendirmesi

Metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) nozokomiyal ve toplum kökenli enfeksiyonlara yol açan önemli bir patojendir. MRSA suşları dünya çapında ortaya çıkmış ve çeşitli antibiyotiklere dirençli hale gelmiştir. Bu bakterinin en önemli özellikleri kolonize olma ve klonal yayılabilmesidir.

Bu çalışmada, Ocak-Mayıs 2010 tarihleri arasında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda subklinik mastitisli inek sütlerinden (n=90) ve nazal svaplardan [insan (n=35) ve sığır (n=56)] izole edilen 12 MRSA suşunun pulsed field jel elektroforezis (PFGE), stafilokokal protein A (*spa*), çok lokuslu dizi tiplendirme (MLST) ve stafilokokal kromozom kaset *mec* (SCC*mec*) tiplendirmesi yapılarak moleküler özelliklerinin ortaya konulması amaçlandı. İzolatların SCC*mec* tipleri multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile belirlendi. Stafilokokal protein A'yı kodlayan *spa* geni ve *S. aureus* suşlarında bulunan 7 farklı yapısal metabolik gen (*arcC*, *aroE*, *glp*, *gmk*, *pta*, *tpi* ve *yqiL*) PCR ile amplifiye edildi ve sekanslandı. PFGE analizi sonucunda 12 MRSA izolatında pulstip A-D olmak üzere dört pulstip belirlendi. Pulstip A olan suşların (n=7) sekans tipi (ST) tipi ST 239, *spa* tipi t030 olarak bulunurken biri hariç hepsinin SCC*mec* III taşıdığı tespit edildi. Pulstip B (n=3) ST1294, t459 ve SCC*mec* Tip III; pulstip C (n=1) ST1940, t660, SCC*mec* Tip III ve pulstip D (n=1) ST737, t542, SCC*mec* tip II olarak belirlendi. *spa* tip t030 Türkiye'deki hastanelerde ve doğu ülkelerinde en sık görülen tiptir. Bu klon Amerika ve Avrupa'da nadir olarak görülmekle birlikte "Türk Klonu" olarak isimlendirilmektedir. Hastane kökenli MRSA suşlarının fazlalığı MRSA suşlarının humanoza olabileceğini düşündürmektedir. Aynı klonla enfekte olan 2 inek sütü, 2 inek burun svabı ve bu hayvanlara bakan veteriner hekimlere ait burun svaplarından oluşan toplam 7 suş, MRSA'un klonal yayılma özelliğinin olduğunu gösterdi. Çalışma sonucunda Aydın yöresinde inek sütü, insan ve inek burun svaplarından izole edilmiş olan en yaygın *spa* tipi t030, MLST tipinin ise ST 239 olduğu belirlendi.

Anahtar kelimeler: MRSA, PFGE, MLST, *spa*, SCC*mec*

SUMMARY

Erdem, Z. Molecular Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains

Methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) is a major pathogen causing both nosocomial and community-acquired infections. MRSA strains have emerged worldwide and became resistant to a variety of antibiotics. The most important features of this bacterium are becoming colonization and able to expand clonally.

The aim of this study was to determine the molecular characteristics of 12 MRSA strains isolated from milk samples (n=90) and nasal samples of cows (n=56) with subclinical mastitis obtained from Adnan Menderes University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology between January-May 2010, and from nasal samples (n=35) of veterinarians and farm workers using pulsed field gel electrophoresis (PFGE), staphylococcal protein A (*spa*), multi locus sequence typing (MLST) and staphylococcal chromosome cassette *mec* (SCC*mec*) typing. SCC*mec* types of these strains were investigated by multiplex polymerase chain reaction (PCR). The *spa* genes encoding for protein A and 7 housekeeping genes (*arcC*, *aroE*, *glp*, *gmk*, *pta*, *tpi* ve *yqiL*) for MLST were amplified by PCR and sequenced. PFGE analysis of all 12 MRSA isolates produced four distinct pulsotypes designated as pulsotypes A-D. The pulsotype A (n=7) strains detected the most prevalent sequence type (ST) were ST 239, *spa* type t030 and SCC*mec* III except one. The pulsotype B strains (n=3) were ST1294, t459 and SCC*mec* III, the pulsotype C (n=1) strains were ST1940, t660, SCC*mec* III detected. The remaining pulsotype D (n=1) strains were ST737, t542, SCC*mec* II. *spa* type t030 which were the most common *spa* type in Turkish hospitals and east country. This clone, which is rare in USA and Europe, called as “Turkish Clone”. It was thought that the high amount of MRSA strains originated from hospitals would be humanosis. Two bovine milk and nasal swabs obtained from veterinarians who looked after the animal, infected with the same clone, a total of 7 strains of MRSA clonal propagation has shown that property. Consequently, it can be said that t030 and ST239 was the most common *spa* and MLST types which isolated from cow milk and nasal swabs and nasal swabs from workers of these farms in Aydın.

Key words: MRSA, PFGE, MLST, *spa*, SCC*mec*

KAYNAKLAR

Aanensen DM , Spratt BG. The multilocus sequence typing network: mlst. net. Nucleic Acids Research, 2005; 33: 728-733

Ak S, Horoz H, Ilgaz A. Trakya bölgesinde sığır mastitislerinden sorumlu bulaşıcı ve çevresel bakteriyel etkenler ve antibiyotik duyarlılıkları. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi.2000; 26: 353-365

Akan E. Bakteriler, Mantarlar-Ricketziyalar-Klamidyalar ve infeksiyonları “Tıbbi Mikrobiyoloji 2. Baskı Saray Tıp Kitapevleri 1993; 1-12

Akcam F.S, Tinaz B.G, Kaya O, Tigli A, Ture E, Hosoglu S. Evaluation of methicillin resistance by cefoxitin disk diffusion and PBP2a latex agglutination test in *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* and comparison of *mecA* with *femA*, *femB*, *femX* positivities. Microbiol Research In Press, Corrected Proof, (available online 3 May 2007)

Alen S, Koneman E, Janda W, Schreckenberger P, Winn W, Woods G, Procop G. The gram positive cocci: Part 1: *Staphylococci* and related organism. In: Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5. Baskı, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006; 539-576

Amorim ML, Faria NA, Oliveira DC, Vasconcelos C, Cabeda JC, Mendes AC Changes in the clonal nature and antibiotic resistance profiles of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with spread of the EMRSA-15 clone in a tertiary care Portuguese hospital. Journal of Clinical Microbiology. 2007; 45: 2881-2888

Andersson MD. DNA 6X Loading Dye. Cancer Center.

Erişim Adresi: [http:// www.mdandersson.org/education-and-research/departments-programs-and-labs/labs/dent-laboratory/protocols/dna-6x-loading-dye.html](http://www.mdandersson.org/education-and-research/departments-programs-and-labs/labs/dent-laboratory/protocols/dna-6x-loading-dye.html).

Erişim Tarihi: 02.06.2011

Anonim : Erişim Adresi: <http://www.spaserver.ridom.de/>

Erişim Tarihi: 03.06.2011

Anonim: Erişim Adresi: <http://www.mlst.net>

Erişim Tarihi: 28.04.2011

Arda M, İstanbulluoğlu E. Mastitise neden olan aerob, anaerob, mikoplazma ve mantarların izolasyonu, identifikasyonu, bunlara karşı etkili olan antibiyotik ve fungusitlerin saptanması. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakóltesi Dergisi. 1980; 15-29

Arias CA, Rincon S, Chowdhury. MRSA USA300 clone and VREF—a U.S.-Colombian connection New England Journal of Medicine 2008; 359: 2177–2179.

Armand-Lefevre L, Ruimy R, Andremont A. Clonal comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from healthy pig farmers, human controls and pigs. Emergence Infectious Diseases 2005; 11: 711-714

Aydın F, Leloğlu N, şahin M, Çolak A, Otlı S. Kars yöresi süt ineklerinde klinik ve subklinik mastitislere neden olan mikroorganizmaların identifikasyonları ve antibiyotiklere duyarlılıkları üzerine çalışmalar. Pendik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi. 1995; 26: 55-65

Aygün F, Hatipoğlu N, Somer A, Keser M, Tuğrul MZ, Salman N ve ark. Toplum Kökenli MRSA; Bir Olgu Sunumu. Ulusal Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi Poster Bildiriler 1. Bölüm, Çocuk Enfeksiyonları Dergisi, 2007; 1: 107-125

Baba T, Takeuchi F, Kuroda M. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. Lancet, 2002; 359:1819-1827

Bannerman TL. *Staphylococcus, Micrococcus* and other *catalase positive cocci* that grow aerobically. In Murray PR., Baron EJ., Jorgensen JH., Pfaller MA., Tenover FC., Tenover FC. Manual of Clinical Microbiology. 8. Baskı Washington DC,2003;384-404.

Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turek M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 1966; 445: 493

Barry AL, Lachiva RVF, Atchison FW. Identification of *Staphylococcus aureus* by simultaneous use of tube coagulase and thermonuclease tests. *Applied Microbiology*. 1973; 25(3): 496-497

Berger-Bachi B, Rohrer S. Factors influencing Methicillin resistant in *Staphylococci*. *Archives of Microbiology*. 2002;178:165-171

Berglund C, Ito T, Ikeda M, Xue Ma X, Bo So, and Hiramatsu K. Novel type staphylococcal cassette chromosome *mec* in a methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strain isolated in Sweden, *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*, 2008; 3512-3516

Beytut E, Aydın F, Özcan K, Genç O. Kars ili ve yöresindeki ineklerde mastitislerin patolojik ve bakteriyolojik olarak incelenmesi. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2002; 8: 111-122

Biçer AT. Hastane izolatu *Staphylococcus aureus* ve Koagulaz Negatif Stafilokok suşlarında Metisilin direncinin farklı yöntemlerle araştırılması. T.C. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Adana, 2009

Bilgehan H. *Staphylococcus*. Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. *Fakülteler Kitapevi Barış Yayınları*. İzmir. 2000, 240-266.

Bilgehan H. Klinik mikrobiyolojik tanı. *Fakülteler Kitapevi Barış Yayınları*, 3. Basım; 2004; 35-45.

Blanc DS, Petignat C, Wenger A, Kuhn G, Vallet Y, Fracheboud D. Changing molecular epidemiology of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in a small geographic area over an eight-year period. *Journal of Clinical Microbiology* 2007; 45: 3729- 3736

Bochev I, Russenova N. Resistance of *Staphylococcus spp.* strains isolated from goats with subclinical mastitis. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* 2005; 8(2): 109-118

Boothby J, Genigeorgis C, Fanelli MJ. Tandem coagulase / thermonuclease agar method for the detection of *Staphylococcus aureus*. Applied and Environmental Microbiology. 1979; 37(2): 298-302.

Boubaker BB, Abes RB, Abdallah HB. Evolution of a cefoxitin disk diffusion test for the routine detection of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Clinical Microbiology and Infection. 2004; 10: 762-765

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

Boyle-Vavra S, Daum SR. Community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Pantone-Valentine leukocidin. Laboratory Investigation. 2007; 87: 3-9

Bozca B, Coşkuner A, Avcı M, Biçer ÇK, Özgenç O. Stafilokoklarda metisiline direnç oranları ANKEM Dergisi. 2008; 22: 20-22

Bratu S, Landman D, Gupta J, Trehan M, Panwar M, Quale J. A population-based study examining the emergence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 in New York City. Ann Clinical Microbiol Antimicrobial. 2006; 30: 5-29.

Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA. The Staphylococci. In: Jawetz, Melnick and Adelberg's medical microbiology. 24th ed. New York: McGraw-Hill, 2007.

Brown DF, Edwards DI, Hawkey PM, Morrison D, Ridgway GL, Towner KJ. Joint Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy; Hospital Infection Society; infection control nurses association. Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Journal Antimicrobial Chemotherapy. 2005; 56(6): 1000-1018

Budimir A, Deurenberg RH, Plecko V, Vink C, Kalenic S, Stobberingh EE. Molecular characterization of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream isolates from Croatia. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2006; 57: 331-334

Carmen Lozano, Elena Gómez-Sanz, Daniel Benito, Carmen Aspiroz, Myriam Zarazaga and Carmen Torres *Staphylococcus aureus* nasal carriage, virulence traits, antibiotic resistance mechanisms, and genetic lineages in healthy humans in Spain, with detection of CC398 and CC97 strains. *International Journal of Medical Microbiology*. 2011; 300(6): 500-505

Cauwelier B, Gordts B, Descheemaecker P, Van Landuyt H. Evaluation of disk diffusion method with cefoxitin (30ug) for detection of . Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *European Journal Clinical Microbiology Infection Diseases*. 2004; 23: 389-392

Cefai C, Ashurst S and Owens C. Human carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* linked with pet dog. *Lancet* 1994; 344: 539- 540.

Cengiz T. *Staphylococcus*. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ustaçelebi S. *Güneş Kitabevi*. Ankara.1999; 339-347

Centers for Disease Control and Prevention. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin United States, *Morb. Mortal. Wkly. Rep* 2002; 51: 565–567.

Centers for Disease Control and Prevention. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* Pennsylvania, *Morb. Mortal. Wkly. Rep*. 2002; 51: 902.

Centers for Disease Control and Prevention. Community associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in pacific islanders—Hawaii, 2001–2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2004; 53: 767–70

Centers for Disease Control and Prevention. Laboratory detection of Oxacillin/ Methicillin- Resistant *Staphylococcus aureus*.

Erişim Adresi: [http:// www. cdc.gov/ncidod/dhqp/ar_lab_MRSA.html](http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/ar_lab_MRSA.html).

Erişim Tarihi: 26.05.2010

Centers for Disease Control and Prevention (CDCP). Antibiotic resistance.

Erişim Adresi: www.cdc.gov/ncidod/dhqp/ar_MRSA_ca_clinicians.html

Erişim Tarihi: 29.05.2011

Chambers HF. Methicillin-Resistant *Staphylococci*. *Clinical Microbiology Rew.*1988; 1: 173-186

Changtrakool P, Ito T, Ma XX, Kondo Y, Trakulsomboon S, Tiensasitorn C. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) 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

Chini V, Petinaki E, Meugnier H, Foka A, Bes M, Etienne J ve ark. Emergence of a new clone carrying Panton-Valentine leukosidin genes and Staphylococcal cassette chromosome *mec* type V among *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* in Greece. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 2008; 40: 368-372

Clinical and Laboratory Standards Institute. Antimikrobik duyarlılık için uygulama standartları; Edt Gür D. 18. Bilgi Eki, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını, Ankara Ocak 2002.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 15th informational supplement. Approved Standard MS100-S16. Wayne, PA 2006.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Seventeenth informational supplement. MS100-S17. Wayne, PA, 2007.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Nineteenth Informational Supplement. CLSI Document M100-S18 Pennsylvania, 2008; 28: 110-114.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Nineteenth Informational Supplement. CLSI Document M100-S19 Pennsylvania, 2009; 29: 52-59

Cookson BD, Robinson DA, Monk AB. Evaluation of molecular typing methods in characterizing a European collection of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains: the HARMONY collection, Journal Clinical Microbiology 2007;45(6):1830-7.

Cords BR, Tatini SR. Applicability of heat stable deoxyribonuclease assay for assessment of staphylococcal growth and presence of enterotoxin in cheese. Journal Dairy Science. 1973, 56: 1512-1519.

Crisostomo MIH, Westh A, Tomas M, Chung D C, Oliveira and H de Lencastre. The evolution of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: similarity of genetic backgrounds in historically early methicillin- susceptible and -resistant isolates and contemporary epidemic clones. Proceeding of the National. Academy of Science USA 1998; 9865-9870.

Cottagnoud P. Cellular and molecular aspect of drug of the future: meropenem Cellular and Molecular Life Science 2002; 59(11): 1928-1933

Çetinkaya Y, Ünal S. Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* infeksiyonları epidemiyoloji ve kontrol. Flora. 1996; 1;3(ek):3-16

Derbentli Ş. Cerrahi infeksiyonlarda dirençli gram pozitif bakteri sorunu. ANKEM Dergisi. 2004; 18: 215-221

Derbentli Ş. Stafilokoklarda antibiyotik direnci. ANKEM Dergi.2005; 19(Ek-2):54-60

Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA ve Stobbering EE. The molecular evolution of Methicillin- Resistant *Staphylococcus aureus*. Clinical Microbiology Infection 2007; 13: 122-235.

Deurenberg R, Stobbering EE. The evolution of *Staphylococcus aureus*. Infection, genetics and evolution 2008; 8: 747-763.

Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clinical Microbiology Review.2000; 13: 16-34.

Duijkeren E, Wolfhagen M, Box ATA, Heck M, Wannet WJB, Fluit AC. Human to dog transmission of Methicillin- Resistant *Staphylococcus aureus*. Emergings Infectious Disases, 2004; 10: 2235-2237

Durmaz R. Uygulamalı moleküler mikrobiyoloji. Nobel Tıp Kiyapevleri Ltd. Şti. İstanbul 2001; 139

Durupınar B. Antibiyotiklere dirençte yeni eğilimler. Klimik Dergisi 2001;14(2): 591-597

Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H ve Spratt BG. The evolutionary history of Methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA). Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 2002; 99: 7687-7692.

Ergon MC, Biçmen M, Gülay Z. Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi'ndeki dominant metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşunun moleküler yöntemlerle tiplendirilmesi Ankem Dergisi. 2010; 24(2):65-70.

Esel D, Doganay M, Alp E, Sumerkan B. Prospective evaluation of blood cultures in a Turkish University Hospital: epidemiology, microbiology and patient outcome. Clinical Microbiology and Infection. 2003; 9: 1038-1044.

Faria NA, Oliveira DC, Westh H. Epidemiology of emerging methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Denmark: a nationwide study in a country with low prevalence of MRSA infection, Journal Clinical Microbiology 2005;43(4):1836-1842.

Feßler A., Scott C. Kadlec K., Ehricht R., Monecke S. Schwarz S. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from cases of bovine mastitis. Journal Antimicrobial Chemotherapy 2010; 65: 619–625.

Feil EJ, Enright MC. Analyses of clonality and the evolution of bacterial pathogens. Current Opinion in Microbiology 2004; 7: 308-403.

Fey PD, Salim BS, Rupp ME. Comparative molecular analysis of community or hospital acquired Methicillin resistance *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobiology Agents Chemotherapy* 2003; 47: 196-203.

File TM. Methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA): focus on community-associated MRSA. *South African Journal of Epidemiology and Infection*, 2008; 23: 13-15.

Fluit AC, Schmitz FJ. European SENTRY Participant Group and J. Verhoef. Frequency of isolation of pathogens from bloodstream, nosocomial pneumonia, skin and soft tissue and urinary tract infections occurring in European patients. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases*, 2000; 20: 188-191.

Foster TJ. Höök M. Surface protein of *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology* 1998; 6(12): 484-488.

Fox LK, Gershman M, Hancock DD, Hunton C. Fomites and reservoirs of *Staphylococcus aureus* causing intramammary infections as determined by phage typing: The effect of milking time hygiene practices. *Cornell Veterinary* 1991; 81: 183-193.

François P, Renzi G, Pittet D. A novel multiplex Real Time PCR assay for rapid typing of major Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Elements. *Journal Clinical Microbiology* 2004; 42: 3309-3312.

Gao J, Stewart GC. Regulatory elements of the *Staphylococcus aureus* Protein A(*spa*) Promoter *Journal Bacteriology* 2004;186(12): 3738-3748.

Giannechini R, Concha C, Rivero R, Delucci I, Lopez MJ. Occurrence of clinical and sub-clinical mastitis in dairy herds in the west littoral region in Uruguay: *Acta Veterinaria Scandinavica*, 2002; 43: 221-230.

Gill SR, Fouts DE, Archer GL. Insight on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain

biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. Journal of Bacteriology, 2005;87: 2426-2438.

Goering RV and Winters MA. Rapid method for the epidemiological evaluation of gram-positive cocci by field inversion gel electrophoresis. Journal of Clinical Microbiology, 1992; 30: 577-580.

Gortel K., Campbell KL, Kakoma I, Whittam T, Schaeffer DJ, Weisiger RM. Methicillin-resistant among staphylococci isolated from dogs. American Journal of Veterinary Research 1999; 60(12): 1526-1530

Gottlieb T, Su WY, Merlino J et al. Recognition of USA300 isolates of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Australia. Medical Journal of Australia 2008; 189: 179–180.

Greene C, McDevitt D, Francois P, Vaudaux PE, Lew DP, Foster TJ. Adhesion properties of mutants of *Staphylococcus aureus* defective in fibronectin-binding proteins and studies on the expression of *fnb* genes. Molecular Microbiology 1995; 17(6):1143-1152.

Grisold AJ, Leitner E, Mühlbauer G, Marth E, Kessler HH. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and simultaneous confirmation by automated nucleic acid extraction and real time PCR. Journal Clinical Microbiology 2002; 40(7):2392-2397.

Gudding R. Differentiation of staphylococci on the basis of nuclease properties. Journal Clinical Microbiology 1983; 18(5): 1098-1101.

Gülay Z, Atay T, Küçüküven M, Yuluğ N. *Staphylococcus aureus* strains heterogeneously resistant to vancomycin at a hospital in Turkey. Program and Abstracts of Thirty-eighth Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Diego, CA, USA, 1998.

Gülay Z. Antimikrobiyal ilaçlara direnç. In: Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. 1 baskı. Ankara: Güneş Kitabevi 1999; 49: 91-108.

Gülay Z. Gram Pozitif bakteri enfeksiyonları direnç ve epidemiyoloji. *Ankem Dergisi*. 2008; 22(2): 276-286.

Güler L, Ok Ü, Gündüz K, Gülcü Y, Hadimli HH. Antimicrobial susceptibility and coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis cases in Turkey. *Journal Dairy Science* 2005; 88: 3149-3154.

Hackbarth C, Chambers HF. Methicillin-resistant Staphylococci: Genetics and mechanisms of resistance. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 1989; 33: 991-994.

Hadimli HH, Ateş M, Güler L, Kav K, Öncel T. Mastitisli süt ineklerinden izole edilen stafilkokların β -laktamaz aktiviteleri ve antibiyotiklere duyarlılıklar. *Veteriner Bilimi Dergisi* 2001; 17: 21-25.

Hallin M, Denis O, Deplano A, De Ryck R, Cre'vecoeur S, Rottiers S. Evolutionary relationship between sporadic and epidemic strains of healthcare-associated Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection*.2008; 14: 659-669.

Hanssen AM, Ericson Sollid JU. SCCmec in staphylococci. Genes on the move. *FEMS Immunology Medical Microbiology* 2006; 46: 8-20.

Hardy KJ; Hawkey PM, Gao F, Oppenheim BA. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in the critically ill. *British Journal Anaesthesia*. 2004; 92: 121-130.

Hasman H. , Moodley A., Guardabassi L., Stegger M., Skov RL. , Aarestrup FM. spa type distribution in *Staphylococcus aureus* originating from pigs, cattle and poultry. *Veterinary Microbiology* 2010; 141: 326–331.

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

Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet*, 1997; 350:1670-1673.

Hiramatsu K. Vancomycin-resistant *S. aureus*; A new model of antibiotic resistance. The Lancet Infectious Diseases 2001; 147- 155.

Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Trends in Microbiology, 2002; 9: 486-493.

Hoefnagels- Schuermans A, Peetermans WE, Struelens MJ, Van Lierde S, Van Eldere J. Clonal analysis and identification of epidemic strains methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by antibiotic and determination of Protein A gene and coagulase gene polymorphisms. Journal Clinical Microbiology 1997; 35: 2514- 2520.

Holden MT, Feil EJ, Lindsay JA. Complet genomes of two clinical *S. aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulance and drug resistance. Proceeding of the National Academy of Scences of USA, 2004; 101:9786-9791.

Hoşoğlu S. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) prensip ve uygulamalar. Uygulamalı Moleküler Biyoloji Kongresi Malatya Kurs Kitapçığı 2010.

Huber H, Koller S, Giezendanner N, Stephan R, Zweifel C. Prevalence and characteristics of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in humans in contact with farm animals, in livestock, and in food of animal origin, Switzerland, 2009. European Surveill 2010;15(16):19542.

Ikawaty R., Brouwer EC., Jansen MD., van Duijkeren E., Mevius D. Verhoef J., Fluit AC. Characterization of Dutch *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis using a multiple locus variable number tandem repeat analysis. Veterinary Microbiology 2009; 136: 277–284.

İnegöl E. 2009 yılı hastane enfeksiyon hızları. Adnan Menderes Üniversitesi Hastanesi Enfeksiyon Kontrol Komitesi Toplantı Tutanağı. 2010.

International Working Group on the Classification of Staphylococcal Casette Chromosome Elements (IWG-SCC). Classification of Staphylococcal Casette

Chromosome *mec* (SCC*mec*): Guidelines for reporting novel SCC*mec* elements. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009;12: 4961-4967.

Ito T, Katayama Y, Hiramatsu K. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. Antimicrobial Agent and Chemotherapy 1999; 43: 1449-1458.

Ito T, Katayama Y, Asada K. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2001; 45: 1323-1336.

Ito T, Ma XX, Takeuchi F, Okuma K, Yuzawa H, Hiramatsu K. Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2004; 48: 2637-2651.

Jevons MP. Celbenin resistant Staphylococci. Journal of Medical Biography, 1961; 1: 124-125.

Joklik VK., Willet HP., Amos DB., Wilfert CM. Zinsser Microbiology .1992; 401-406.

Jonsson K, Signal C., Muller HP, Lindberg M. Two different genes encode fibronectin binding protein in *Staphylococcus aureus*. The complete nucleotide sequence and characterization of the second gene. European Journal Biochemistry 1991;202(3): 1041-1048.

Jorgense JH, Turnidge JD. Susceptibility test methods: Dilution and disk diffusion methods In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds). Manual of clinical microbiology. 8th ed. Washington DC. ASM Press; 2003; 1108-1127.

Juhász- Kaszanyitzky Ě, Janosi S, Somogyi P, Dán Ě, Bloois LG, Duijkeren E, Wagenar JA. MRSA transmission between cows and humans. Emergins Infectious Disases, 2007; 13: 630-632.

Kaçmaz B, Akça G, Sultan N. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde elde edilen *Staphylococcus aureus*' larda metisilin direnç oranı.(Özet), XXX. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Antalya. Program ve Kitabı.2002; 1-38.

Kaszanyitzky EJ, Janosi S, Egyed Z, Agost G, Semjen G. Antibiotic resistance of staphylococci from humans, food and different animal species according to data of the Hungarian resistance monitoring system in. Acta Veterinaria Hungarica 2003; 51(4): 451-464.

Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A new class of genetic element, staphylococcal cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2000; 44: 1549-1555.

Kawamura Y, Hou XD, Sultana F. Distribution of *Staphylococcus* species among human clinical specimens and emenged description of *Staphylococcus caprae*. Journal of Clinical Microbiology, 1998;36: 2038- 2042.

Kaynarca S, Türkyılmaz S. Methicillin resistance and slime positivity of Staphylococci isolated from bovine mastitis. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 2010; 16: 567-572.

Todar K. *Staphylococcus* <http://www.bact.wisc.edu/Bact330/lecturestaph>, University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology 2005.

Kılıç A, Güçlü AÜ, Şenses Z, Bedir B, Aydoğan H, Başustaoğlu AC. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) characterization and panton-valentine leukocidin gene occurrence for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* in Turkey, from 2003 to 2006. Antonie van Leeuwenhoek, 2008; 94: 607-614.

Kırkan Ş, Göksoy EÖ., Kaya O. Identification and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci from bovine mastitis in the Aydın Region of Turkey. Journal Veterinary Animal Science. 2005; 29: 791-796.

Kim CH, Khan M, Morin DE, Hurley WE, Tripathy DN, Jr Kerhli M, Oluoch AO, Kakoma I. Optimization of the PCR detection of *Staphylococcus aureus* nuc gene in bovine milk. Journal Dairy Science. 2001; 84: 74-83.

Kireçci E, Çolak A. Kuru dönem başlangıcında subklinik mastitisli ineklerden izole edilen stafilocok suşlarında metisilin direnci. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 2002; 8(2):98-100.

Kluytmans- Vandenberg MF, Kluytmans JA. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: current perspectives. Clinical Microbiology Infection 2006;12: 9-15.

Kollef MH, Micek ST. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: a new community-acquired pathogen. Current Opinion in Infectious Disease, 2006; 19: 161-168.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM. The Gram positive cocci: Staphylococci and related organisms. Diagnostic Microbiology, 1997: 539-576.

Koneman EW, Allen SD, William MJ, Schreckenberger PC, Winn WC. Gram-positive cocci, Part I: Staphylococci and related gram-positive cocci. Winn WC Jr et al (editors). Color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 6th ed. Lippincott Williams and Wilkins, 2006: 623-671.

Korten V. Hastane enfeksiyonlarına yol açan bakterilerde direnç sorunu, Uzun Ö: Gram Pozitif Kok enfeksiyonları. sorunlar ve çözümler, Immunsuprese Hastalar; Güneş Kitapevi Ankara. 2003; 23-26.

Kurt D Reed, Mary E Stemper and Sanjay K Shukla. Pulsed- Field Gel Electrophoresis of MRSA. In Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* (MRSA) ProtocolsEbook MRSA protocol. Yinduo Ji. 2007; 321: 59-70.

Kuyucu N. Antibiyotik Direnci. Enf Dergi;1(Özel Sayı 1) 2007, 33-38.

Kuyuculuoğlu Y, Uçar M. Afyon Bölgesi süt ineklerinde subklinik ve klinik mastitislerin görülme oranları ve etkili antibiyotiklerin tespiti. Veteriner Hekim Mikrobiyoloji Dergisi. 2001; 1: 19-24.

Kwon NH, Park KT, Moon JS, Jung WK, Kim SH, Kim JM, Honk SK, Koo HC, Joo YS, Park YH. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) characterization and molecular analysis for methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* and novel SCC*mec* subtype IVg isolated from bovine milk in Korea. Journal Antimicrobial Chemotherapy 2006; 56: 624-632.

Lachica RVF, Genigeorgis C, Hoeprich PD. Metachromatic agar-diffusion methods for detecting stafilococcal nuclease activity. Applied Microbiology 1971, 21(4):585-587.

Laplana LM, Cepero MA, Ruiz J, Zolezzi PC, Calvo MA, Erazo MC. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* clinical isolates by pulsed-field gel electrophoresis, staphylococcal cassette chromosome *mec* type determination and dissemination of antibiotic resistance genes. International Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2007; 30: 505-513.

Larsen A, Stegger M, Goering R. Emergence and dissemination of the methicillin resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone in Denmark (2000–2005). Euro Surveill 2007; 12: Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx>.

Leonard FC, Markey BK. *Methicillin- Resistant Staphylococcus aureus* in animal: A review Veterinary Journal, 2008; 175: 27-36.

Leonard FC, Abbott Y, Rossney A, Quinn PJ. Methicillin- Resistant *Staphylococcus aureus* isolated from a veterinary surgeon and five dogs in one practice. Veterinary Record 2006; 158(5):155-159.

Levi K, Bailey C, Benneth A, Marsh P, Cardy DL, Towner KJ. Evaluation of an isothermal signal amplification method for rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from patient- screening swabs. Journal of Clinical Microbiology 2003; 41(7): 3187-3191.

Lilenbaum W, Nunes EL, Azeredo MA. Prevalence and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from the skin surface of clinically normal cats. *Letters in Applied Microbiology* 1998; 27(4): 224-228.

Lim TT, Coombs GW, Grubb WB. Genetic organization of *mecA* and *mecA*-regulatory genes in epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Australia and England. *Journal Antimicrobial Chemotherapy* 2002; 50: 819-824.

Lina G, Durand G, Berchich C, Short B, Meugnier H, Vandenesch F. Staphylococcal chromosome cassette evolution in *Staphylococcus aureus* inferred from *ccr* gene complex sequence typing analysis. *Clinical Microbiology and Infection*. 2006; 12: 175-184.

Lodise TP, McKinnon PS. Clinical and economic impact of Methicillin- Resistance in patient with *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Diagnostic Microbiology Infectious Disease*, 2005, 57: 113-122.

Loeffler A, Boag AK, Sung J, Lindsay JA, Guardabassi L, Dalsgaard A. Prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* among staff and pets in a small animal referral hospital in the UK. *Journal Antimicrobial Chemotherapy* 2005; 56: 692-697.

Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *New England Journal of Medicine*, 1998; 339: 520-532.

Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Investigation* 2003; 111: 1265-1273.

Ma X. X., T. Ito, C. Tiensasitorn, M. Jamklang, P. Chongtrakool, S. Boyle- Vavra, R. S. Daum and K. Hiramatsu. Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community- acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2000; 46: 1147-1152.

Mackie & McCartney: *Staphylococcus aureus* “JG Collee, JP Duguid, AG Fraser, BP Marmion(Eds): *Practical Medical Microbiology* 13 th Edition” Churchill, Livingstone 1989; 305-311.

Madigan MT, Martinco JM, Parker J. Procaryotic diversity the Archaea. Brock Biology of Microorganisms, (Ed: Corey, P.F.) 2000; 321-322.

Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M and Spratt BG. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 1998; 95: 3140-3145.

Martins A, Cunha M Methicillin- Resistant in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci: epidemiological and molecular aspects. Microbiology Immunology 2007;51(9): 787-795.

Maslow JN, Mulligan ME and Arbeit RD. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. Clinical Infection Diseases 1993; 17: 153-162.

Mason WJ, Blewins JS, Beenken K, Wibowo N, Ojha N, Smeltzer MS. Multiplex PCR protocol for the diagnosis of staphylococcal infection. Journal of Clinical Microbiology 2001; 39(9): 3332-3338.

Matushek MG, Bonten MJ and Hayden MK. Rapid preparation of bacterial DNA for pulsed-field gel electrophoresis. Journal of Clinical Microbiology 1996; 2598-2600.

McManus J. Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* reported in Hong Kong. Brazilian Journal of Microbiology, 1999; 318:626.

Mi-Na K, Pai CH, Woo JH. Vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* in Korea. Journal of Clinical Microbiology, 2000;38: 3879-3881.

Middleton JR, Fales WH, Luby CD, Oaks JL, Sanchez S, Kinyon JM, Wu CC, Maddox CW and Welsh RD. Surveillance of *Staphylococcus aureus* in Veterinary Teaching hospitals. Journal of Clinical Microbiology 2005;43: 2916- 2919.

Monecke S, Kuhnert P, Hotzel H. Microarray based study on virulence-associated genes and resistance determinants of *Staphylococcus aureus* isolates from cattle. *Veterinary Microbiology* 2007; 125: 128–140.

Monecke S, Jatzwauk L, Weber S, Slickers P, Ehrict R. DNA microarray-based genotyping of *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* strains from Eastern Saxony. *Clinical Microbiology and Infection*. 2008;14: 534-535.

Moon KJS, Lee AR, Kang HM, Lee ES, Kim MN, Paik YH. Phenotypic and genetic antibiogram of Methicillin- Resistant *Staphylococci* isolated from bovine mastitis in Korea. *Journal Dairy Science* 2007; 90: 1176-1185.

Moreillon P, Que Y, Glauser MP. *Staphylococcus aureus* including staphylococcal toxic shock. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practise of Infectious Diseases* 6. Baski, Elsevier Inc, 2005; 2321-2352.

Morgan M. Methicillin- Resistant *Staphylococcus aureus* in animal: zoonosis or humanosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2008; 10: 1093-1105.

Mulvey MR, Chui L, Ismail J, Louie L, Murphy C, Chang N, Alfa M and Canadian Committee for the Standardization of Molecular Methods. Development of a Canadian standardized protocol for subtyping methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001; 39:3481–3485.

Murakami K, Minamide W, Wada K, Nakamura E, Teraoka H, Watanabe S. Identification of methicillin-resistant strains of *Staphylococci* by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 1991; 29: 2240-2244.

Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. *Staphylococcus* and related organisms. Mosby Inc. Louis 2002; 202-216.

O'Brien FG, Lim TT, Winnett DC, Coombs GW, Pearson JC, Delgado A. Survey of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from two hospitals in El Paso, Texas. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005; 43: 2969-2972.

Okuma K, Iwakawa K, Turnidge JD. Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community *Journal of Clinical Microbiology* 2002; 40: 4289-4294.

Oliveira DC, Tomasz A ve Lencastre H. The evolution of pandemi clones of methicillin resistance *Staphylococcus aureus*: identification o two ancestral genetic backgrounds and the associated *mec* elements. *Microbiology Drug Resistant*, 2001; 7: 349-361.

Oliveira DC, Lencastre H. Multiplex PCR strategy for Rapid Identification of Structural Types and Variants of the *mec* element in methicillin resistance *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 2002; 46: 2155-2161.

Oliveria DC, Milheiriço C, Lencastre H. Redefining a structural variant of staphylococcal cassette chromosome *mec* SCCmec Type VI. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, October, 2006; 10: 3457-3459.

O'Rourke K. Methicillin resistance *Staphylococcus aureus*: an emerging problem in horses *Journal American Veterinary Medical Assocasion*, 2003; 13: 65-68.

Otter JA, Havill NL, Boyce JM et al. Comparison of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from teaching hospitals in London and the USA, 2004–2006: where is USA300 in the UK. *European Journal of Clinical Microbiology Infection Diseases* 2009; 28: 835–839.

Pak SI, Han HR, Akira S. Characterization of Methicillin resistance *Staphylococcus aureus* isolated from dogs in Korea. *Journal Veterinary Medical Science* 1999; 61(9):1013-1018.

Palmqvist N, Foster T, Tarkowski A, Josefsson E. Protein A is an virulence factor in *Staphylococcus aureus* arthritis and septic death. *Microbial Pathogenesis* 2002; 33:239-249.

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

Pereira SF, Henriques AO, Pinho MG, de Lencastre H. A role of PBP 1 in cell division of *Staphylococcus aureus*. Journal of Bacteriology. 2004; 154(10): 310.

Perez LRR, Antunes ALS, Barth AL, Azvedo PA. Variations of agar screen test for detection of methicillin resistance in staphylococci: focus on cefoxitin. European Journal of Clinical Microbiology Infection Disease. 2007; 26: 267-270.

Ploy M, Grelaud C, Martin C. First clinical isolate of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in French hospital. Lancet, 1998; 351: 1180-1212.

Pottumarthy S, Fritsche TR, Jones RN. Evaluation of alternative disk diffusion methods for detecting *mecA*-mediated oxacillin resistance in an international collection of staphylococci: Validation report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2005; 51: 57-62.

Qi W, Ender M, O'Brien F, Imhof A, Ruef C, McCallum N ve ark. Molecular epidemiology of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in Zurich, Switzerland (2003): prevalence of type IV SCCmec and a new SCCmec element associated with isolates from intravenous drug users. Journal of Clinical Microbiology. 2005; 43: 5164-5170.

Rich M, Robert L. Methicillin- Resistant *Staphylococcus aureus* isolates from companion animals. Veterinary Microbiology 2004; 154(10):310.

Rich M, Robert L, Kearns AM. Methicillin- Resistant *Staphylococcus aureus* isolates from companion animals. Veterinary Microbiology, 2005; 105: 313-314.

Rişvanlı A, Kalkan C. İneklerde stafilokokal mastitisler üzerine çalışmalar. Veteriner Bil. Dergisi 2002; 18: 51-56.

Roberson JR, Fox LK, Hancock DD, Gay CC, Besser TE. Sources of intramammary infections from *Staphylococcus aureus* in dairy heifers at first parturition. Journal of Dairy Science 1998; 81: 687-693.

Ruppitsch W, Stoger A, Schmid D et al. Occurrence of the USA300 community-acquired *Staphylococcus aureus* clone in Austria. Euro Surveill 2007; 12: pii=143294. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=3294>.

Said Salim B, Mathema B, Kreiswirth BN. Community-acquired Methicillin resistance *Staphylococcus aureus*: an emerging pathogen. Infection Control Hospital Epidemiology, 2003; 24: 451-455.

Seguin JC, Walker RD, Caron JP, Kloos WE, George CG, Hollis RJ, Jones RN and Pfaller A. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* outbreak in a Veterinary Teaching Hospital: potential human-to-animal transmission. Journal of Clinical Microbiology 1999; 37: 1459-1463.

Shibuya Y, Hara M, Higuchi W et al. Emergence of the community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone in Japan. Journal Infection Chemotherapy 2008; 14: 439-41.

Shitandi A, Anakalo G, Galgalo T, Mwangi M. Prevalence of bovine mastitis amongst small holder dairy herds in Kenya. Israel Journal of Veterinary Medicine. 2004; 59: 1-6.

Shopsin B, Gomez M, Montgomery SO. Evaluation of Protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of strains. Journal of Clinical Microbiology, 1999; 37: 3556-3563.

Shopsin B, Gomez M, Waddington M, Riehman M, Kreiswirth BN. The use of coagulase gene (*coa*) repeat region nucleotide sequences for the typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of Clinical Microbiology 2000; 38: 3453-56.

Shore A, Rossney AS, Keane CT, Enright MC, Coleman DC. Seven novel variants of the staphylococcal chromosome cassette *mec* in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Ireland. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2005; 49: 2070-2083.

Sipahi OR, Pullukçu H, Aydemir Ş, Taşbakan M, Tünger A, Arda B, Yamazhan T, Ulusoy S. Mikrobiyolojik kanıtlı hastane kökenli *Staphylococcus aureus* bakterimiyelerinde direnç patternleri 2001-2005 yıllarının değerlendirilmesi. *ANKEM Dergisi*, 2007; 21: 1-4.

Stapleton PD, Taylor PW. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Sci Prog*.2002; 85: 57-72.

Stemper ME, Shukla SK , Reed KD. Emergence and spread of community- associated methicillin- resistance in *Staphylococcus aureus* in rural Wisconsin, 1989-1999. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004; 42: 5673- 5680.

Strommenger B, Kettlitz C, Weniger T, Harinsen D, Friedrich AW, Witte W. Assignment of *Staphylococcus* isolates to groups by spa typing. SmaI macrorestriction analysis, and multilocus sequence typing. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006; 44: 2533-2540.

Swenson JM, Tenover FC. Result of disk diffusion testing with Cefoxitin correlate with presence of *mecA* in *Staphylococcus spp*. *Journal of Clinical Microbiology* 2005; 43: 3818-3823.

Tammy L Bannerman. Gram Positive Cocci, *Staphylococcus*, *Micrococcus* and other Catalase- Positive Cocci that grow aerobically. Patrick R Murray, Ellen Jo Baron, James H Jorgensen, Micheal A Pealler, Robert H Yolken (Eds). *Manual of Clinical Microbiology*, 8 th Edition ASM Press, Washington DC. 2003, 384-404.

Taponen S, Pyorala S. Coagulase-negative Staphylococci as cause of bovine mastitis not so different from *Staphylococcus aureus* *Veterinary Microbiology*, 2009; 134:29-36.

Tel OY, Keskin O, Zonturlu KA, Kaya NBA. Subclinical mastitis prevalence and determination of the antibiotics susceptibility in Şanlıurfa region. *FÜ Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*, 2009; 23: 101-106.

Tenover FC, Arbeit RD, Archer G. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 1994; 32:405-415.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 1995; 33: 2233-2239.

Tenover FC, Sigrid McAllister, Gregory Fosheim, Linda K McDougal, Roberta B Carey, Brandi Limbago, David Lonsway, Jean B Patel, Matthew J Kuehnert, Rachel Gorwitz. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from nasal cultures collected from individuals in the United States in 2001 to 2004. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008; 46(9): 2837-2841.

Tenover FC, Goering RV. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300: origin and epidemiology. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2009; 64: 441–446.

Tietz A, Frei R, Widmer AF. Transatlantic spread of the USA300 clone of MRSA. *N Engl Journal Medical* 2005; 353: 532–533.

Timbury MC, McCartney A, Thakker B. Notes on Medical Microbiology. Churchill Livingstone, Elsevier Limited, 2002;31-34 New York, USA.

Tristan A, Ying L, Bes M, Etienne J, Vandenesch F, Lina G. Use of multiplex PCR to identify *Staphylococcus aureus* adhesins involved in human hematogenous infections. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; 41: 4465-4467.

Todar K. *Staphylococcus* Todar's Online Textbook of Bacteriology.
Erişim Adresi; <http://www.textbookofbacteriology.net/staph.html>.

Turnidge JD, Ferraro MJ, Jorgensen JH. Susceptibility test methods: General considerations. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC (eds). Manual of Clinical Microbiology. 8th ed. Washington DC: ASM Press; 2003;1102-1107.

Tünger A. *Staphylococcus aureus*, mikrobiyoloji, patogenez ve epidemiyoloji. In: Ulusoy S, Usluer G, Ünal S. Gram pozitif bakteri infeksiyonları. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 2004; 9-68.

Tünger A. *Staphylococcus aureus* mikrobiyoloji, patogenez ve epidemiyoloji. In: Ulusoy S, Usluer G, Ünal S (Editörler) . Önemli ve sorunlu Gram pozitif bakteri infeksiyonları. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 2004; 9-22.

Tünger A, Çavuşoğlu C, Korkmaz M. Asya Mikrobiyoloji. Asya Tıp Kitapevi, İzmir, Türkiye 2005; s:6.

Türkyılmaz S, Tekbıyık S, Oryasin E, Bozdoğan B. Molecular epidemiology and antimicrobial resistance mechanisms of Methicillin- Resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk. Zoonoses Public Health, 2010; 57: 197-203.

Türkyılmaz S, Yıldız O, Oryasin E, Bozdoğan B. Contagious and environmental bacteria isolated from clinical and subclinical mastitis. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 2010.

Türütoğlu H., Ateşoğlu A, Salihoğlu H, Öztürk M. Marmara Bölgesi süt ineklerinde mastitise neden olan aerobik etkenler. Pendik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi 1995; 26: 125-137.

Ünal S. *Staphylococcus aureus*, Direnç mekanizmaları. In: Ulusoy S, Usluer G, Ünal. Gram pozitif bakteri enfeksiyonları. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 2004;24-38.

Ünal S. Toplumda kazanılmış metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*. Genetik özellikler. Ankem Dergisi, 2006; 20: 100-101.

Ünal N, İstanbulluoğlu E. İnsan ve sığır kökenli *Staphylococcus aureus* izolatlarının fenotipik ve genotipik araştırılması. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 2009; 56: 119-126.

Ünal N, Yıldırım M. İneklerin süt, meme başı derisi ve burun mukozalarından izole edilen stafilocok türlerinin antibiyotik direnç profilleri. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 2010; 16: 389-396.

Vainio A, Karde'n-Lilja M, İbrahim S, Kerttulq AM, Salmenlinna S, Virolainen A ve ark. Clonality of epidemic Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains in Finland as defined by several molecular methods. European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases. 2008; 27: 545-555.

Valentini P, Parisi G, Monaco M et al. An uncommon presentation for a severe invasive infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone USA300 in Italy: a case report. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2008; 7: 11.

Vangerhaeghan W, Cerpentier T, Adriaesen C, Vicca J, Hermans K, Butaye P. Methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 associated with clinical and subclinical mastitis in Belgian cows. Veterinary Microbiology 2010; 4743: 6.

Van Duijkeren E, Wolfhagen MJ, Box AT, Heck ME, Wannet WJ, Fluit AC. Human to dog transmission of methicillin resistance *Staphylococcus aureus*. Emerging Infectious Diseases 2004;10(12):2235-2237.

Van Duijkeren E, Ikawaty R, Broekhuizen-Stins MJ. Transmission of methicillin resistance *Staphylococcus aureus* strains between different kinds of pig farms. Veterinary Microbiology 2007; 126: 383-389.

Van Loo IHM, Huijsdens X, Tiemersma E. Emergence of methicillin resistance *Staphylococcus aureus* of animal origin in humans. Emergence Infectious Diseases 2007; 13: 1834-1838.

Vaudaux P, Pittet D, Haeberli A, et al. Fibronectin is more active than fibrin or fibrinogen in promoting *Staphylococcus aureus* adherence to inserted intravascular catheter. *Journal Infectious Diseases* 1993, 167:633-641.

Velasco D, Tomas MM, Cartelle M, Beceiro A, Perez A, Molina F et al. Evaluation of different methods for detecting methicillin (oxacillin) resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal Antimicrobial Chemotherapy* 2005; 55: 379-382.

Velazco E, Nieves B, Vindel A, Alviarez E, Gutierrez B, Bianchi G. Molecular study of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates at a neonatal high- risk unit in Merida, Venezuela. *Medical Science Monitor* 2008; 14(9): 25-31.

Voss A, Loeffen F, Bakker J, Klassen C, Wulf M. Methicillin resistance *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerging Infectious Diseases*; 2005; 11: 1965-1966.

Waller JR, Hodel SL, Nuti RN. Improvement of two toluidine blue O-mediated techniques for DNase detection. *Journal of Clinical Microbiology* 1985; 21(2): 195-199.

Weese JS, Archambault M, Willey BM, Dick H, Hearn P, Kreiswirth BN et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horse and horse personnel, 2000-2002. *Emerging Infectious Diseases*, 2005; 11: 430-435.

Weese JS, Rousseau J, Willey BM, Archambault M, McGeer A, Low DE. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horse at a veterinary teaching hospital: frequency, characterization and association with clinical disease. *Journal Veterinary Internal Medicine*, 2005; 20:182-186.

Weese JS, Rousseau J, Willey BM, Archambault M, McGeer A, Low DE. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses at a veterinary teaching hospital: frequency, characterization and association with clinical disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2006; 43: 15-22.

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

Willey BM, Kreiswirth BN, McGeer A, Rousseau ve ark. An outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections resulting from horse to human transmission in a veterinary hospital. *Veterinary Microbiology*, 2006; 114: 160-164.

Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop GW, Schreckenberger PC, Woods GL. Gram-positive cocci. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Darcy P. Lippincott Williams Wilkins. Baltimore 2006; 623-671.

Witte W, Braulke C, Strommenger B. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST8 ("USA300") in an HIV-positive patient in Cologne, Germany, February 2008. *Euro Surveill* 2008; 13:. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=8080>.

Wolz C, Goerke C, Landmann R, Zimmerli W, Fluckiger U. Transcription of Clumping factor A in attached and unattached *Staphylococcus aureus* in vitro and during device-related infection. *Infect immun* 2002; 70(6): 2758-2762.

Wulf MW, van Nes A, Skov R, Melchers WJG, Klaassen CHW, Voss A. Prevalance of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in veterinarians: an international study. *Clinical Microbial Infectious* 2008; 14: 29-34.

Yaşar N, Handan K, Atahan Ç, Şengül D. İstanbul Tıp Fakültesi' nde çeşitli örneklerden izole edilen suşlarda glikopeptid direncinin araştırılması. *Ankem Dergisi*, 2004;18:209-212.

Yavuz MK., Esendal ÖM. Mastitisli inek sütlerinden izole edilen stafilokokların tür düzeyinde identifikasyonu ve bazı özelliklerinin belirlenmesi. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi* 2002; 13: 19-27.

Yıldız O, Kırdar S, Gülcü B., Aktepe O, Karabiber N, Öncü S, Oktun Tatman M, Özyurt M, Şener AG, Coşkuner A, Çoban AY, Aslan U, Özkütük N, Bayramoğlu G, Güdücüoğlu H, Bozdoğan B. Molecular epidemiology of 397 methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from 12 hospitals in Turkey. 110. General Meeting American

Society for Microbiology, San Diego, California USA, San Diego Convention Center May, 2010; 23-27.

Zaoutis TE, Toltzis P, Chu J, Abrams T, Dul M, Kim J, McGowan KL, Coffin SE. Clinical and molecular epidemiology of community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infections among children with risk factor for health care-associated infection: Pediatric Infectious Diseases Journal 2001-2003; 25: 343-348.

Zhang M, McClure JA, Elsayed S. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome *mec* types I to V in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of Clinical Microbiology, 2005; 43: 5026-5033.

Zhang M, McClure JA, Elsayed S ve Conly JM. Novel staphylococcal cassette designated type VIII, harboring class A *mec* and type IV *ccr* gene complexes in a Canadian epidemic strain of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2009; 53: 531-540.

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Ankara'da doğdu. İlköğretim ve lise eğitimini Ankara'da tamamladı. Adnan Menderes Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nde 2008 yılında lisans eğitimi tamamladı. 2009 yılında Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca yardımlarını benden esirgemeyen, bana örnek ve destek olan danışman hocam Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ' a, çalışmalarımda desteğini gördüğüm başta Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Osman KAYA ve diğer Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri'ne, sahip olduğu engin bilgi ve tecrübelerini Adnan Menderes Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'ndeki öğrencilerle ve öğretim üyeleriyle paylaşan daima ışık olan ADÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Bülent BOZDOĞAN'a, tezim için materyal toplamama yardımcı olan Uzm.Vet. Hek. Seyhan KAYNARCA ve Uzm. Hemşire Emel İnegöl' e tez sürecim boyunca manevi desteğini eksik etmeyen; Uzm. Gıda Mühendisi Barış BATUM'a, Uzm. Mikrobiyolog Doktor Ilgın ERGEN'e, Vet. Hekim Hüseyin AYNUR'a, çalışmam boyunca koşulsuz yanımda olan sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim.