

**DİŞ ÇÜRÜKLERİNDEN STAPHYLOCOCCUS AUREUS
İZOLASYONU VE İDENTİFİKASYONU
NEVRA ÇİNE
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

T.C.
SİNOP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DİŞ ÇÜRÜKLERİNDEN STAPHYLOCOCCUS AUREUS
İZOLASYONU VE İDENTİFİKASYONU

NEVRA ÇİNE

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
DOÇ. DR. İSMET BERBER

SİNOP – 2012

T.C.
SİNOP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bu çalışma, jürimiz tarafından 11/06/2012 tarihinde yapılan sınav ile Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

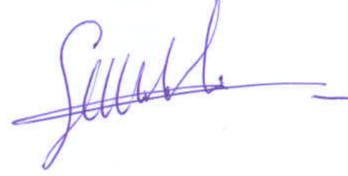
Başkan : Doç. Dr. İsmet BERBER



Üye : Doç. Dr. Hünkar Avni DUYAR



Üye : Yrd. Doç. Dr. Elif Tezel ERSANLI



ONAY :

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

26./06/2012



Doç. Dr. Hünkar Avni DUYAR
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

DİŞ ÇÜRÜKLERİNDEN STAPHYLOCOCCUS AUREUS İZOLASYONU VE İDENTİFİKASYONU

ÖZET

Staphylococcus aureus dünyadaki birçok ülkede en yaygın insan patojenlerinden birisidir. Bu çalışmada, Sinop ilindeki bazı diş polikliniklerine gelen hastalardan izole edilen 54 yerel ve 3 adet referans olmak üzere toplam 57 adet *S. aureus* suşu fenotipik özellikleri ve sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) kullanılarak elde edilen toplam hücre ve hücre dışı protein profillerinin nümerik analiziyle karakterize edildi.

Morfolojik ve fizyolojik özelliklerine göre, bütün yerel izolatların hareketsiz, spor oluşturmayan, Gram-pozitif, katalaz ve koagülaz pozitif, oksidaz negatif ve *S. aureus* türüne ait oldukları belirlendi. Bütün suşların 14 farklı antibiyotiğe karşı duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi kullanılarak test edildi. Antibiyogram sonuçlarına göre, suşlarda en yüksek direnç ampisilin (%83.6) ve polimiksin B (%43.6) antibiyotiklerine karşı belirlendi. Diğer taraftan, suşların hepsinin sülfametoksazol/trimetoprim, sefoperazon/sülbaktam, vankomisin ve imipenem antibiyotiklerine duyarlı oldukları bulundu.

Toplam hücre protein profilleri esas alınarak yapılan nümerik analiz *S. aureus* suşlarının benzerlik düzeyi %66.29 ve üzerinde iki major gruba ayrıldığını ortaya koydu. Ayrıca, suşların hücre dışı protein profilleri esas alınarak yapılan nümerik analizde ise benzerlik düzeyi %60.53 ve üzerinde iki major grup oluşturdu. Sonuç olarak, bu çalışma diş çürüklerinden izole edilen *S. aureus* suşlarının daha güvenilir identifikasyonu için morfolojik ve fizyolojik özellikleri esas alan konvansiyonel yöntemler ile toplam ve hücre dışı protein profillerinin nümerik analizinin birlikte kullanılmasının faydalı olacağını gösterdi.

Anahtar Kelimeler: *S. aureus*, Diş Çürüğü, İzolasyon, İdentifikasyon, Antibiyogram, SDS-PAGE, Protein Profili, Nümerik Analiz

IDENTIFICATION AND ISOLATION OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS FROM TOOTH DECAY

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is the most prevalent human pathogenic agent in many countries around the world. In the study, a total of 57 strains of *S. aureus* including 54 clinical isolates collected from some dental clinical sources in Sinop province and 3 reference strains were characterized by the phenotypic properties and the numerical analysis of whole-cell and extra-cellular protein profiles obtained by using sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).

According to the morphological and the physiological characteristics, all native isolates were non-motility, non-endospore forming, Gram-positive, catalase positive, coagulase positive and oxidase negative and they were consisted of *S. aureus* species. The susceptibility of all strains were tested against 14 standard antibiotics by using disc diffusion procedure. In accordance with the antibiogram results, it was determined that whole strains had the highest resistance against ampicillin (83.6%) and polymyxin B (43.6%). However, they were found susceptible to sulfamethoxazole/trimethoprim, sefoperazone/sulbactam, vancomycin and imipenem.

The numerical analysis of whole-cell protein profiles of *S. aureus* strains revealed 2 major clusters at similarity levels of 66.29% or above. Furthermore, the numerical analysis of extra-cellular protein profiles of the strains yielded 2 major clusters at similarity levels of 60.53% or above. In conclusion, the study indicated that together use of conventional methods based on the morphological and the physiological properties and the numerical analysis of whole-cell and extra-cellular protein profiles might be useful for the more reliable identification of *S. aureus* strains isolated from tooth decay.

Key words: *S. aureus*, Tooth Decay, Isolation, Identification, Antibiogram, SDS-PAGE, Protein Profiles, Numerical Analysis

TEŞEKKÜR

Bilimin her şeyden önce sabır ve titizlik isteyen bir yol olduğunu göstererek başlayan ve çalışmalarına engin bilgisi ve manevi desteğiyle katkıda bulunan danışman hocam Doç. Dr. İsmet BERBER'e, katkılarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Yunus Emre DİNÇASLAN'a ve Yrd. Doç. Dr. Elif TEZEL ERSANLI'ya,

İzolatların toplanmasında yardımcı olan Gerze Devlet Hastanesi Diş Polikliniği çalışanları; Dt. Belgin KALAFAT'a ve Dt. Mehmet Bora ÇİNE'ye, Sinop Ağız ve Diş Sağlığı Merkezi çalışanları Dt. Bahar Aygün BİÇER'e ve Dt. Elif MACİT'e, çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Nevin BOZKURT ve Cumhuriyet AVŞAR'a,

Yoğun çalışma dönemim boyunca sevgi ve anlayışıyla yanımda olan eşim Dt. Mehmet Bora ÇİNE'ye ve her zaman desteklerini yanımda hissettiğim aileme ve bebeğim sana, bir sürpriz yaparak hayatımıza girdiğin ve beni mutluluklar içinde bırakıp daha da güç kazanmamı, azimli olmamı sağladığın için

TEŞEKKÜRLER

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜRLER	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	vi
ŞEKİLLER VE ÇİZELGELER LİSTESİ	vii
EKLER LİSTESİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Stafilocokların Genel Özellikleri	5
2.2. <i>Staphylococcus aureus</i> ve Tür Özellikleri	7
2.2.1 Virulans ve Patojenite	8
2.2.1.1. Hücre Duvarı	9
2.2.1.2. Kapsül	9
2.2.1.3. Yüzey Proteinleri	10
2.2.1.4. Toksinler	10
2.2.1.5. Enzimler	11
2.2.2. Epidemiyoloji	12
2.2.3. Antibiyotik Direnç Özellikleri	14
2.2.4. İdentifikasyon ve Karakterizasyon	18
3. MATERYAL ve YÖNTEM	22
3.1. Materyal	22
3.1.1. İzolatların Toplanması	22
3.1.2. İzolatların Teşhisi ve Analizi	22
3.2. Yöntem	22
3.2.1. Suşların Teşhisi	22
3.2.1.1. Gram Boyama	23
3.2.1.2. Karbonhidrat Testleri	23
3.2.1.3. Glikozun Anaerobik Fermantasyonu	24
3.2.1.4. Gliserin ve Eritromisin İçeren Besiyerinde Gelişme	24

3.12.1.5.	Katalaz Testi	24
3.2.1.6.	Oksidaz Testi	25
3.2.1.7.	Voges-Proskauer testi	25
3.2.1.8.	Metil Red Testi	26
3.2.1.9.	Beta-laktamaz Testi	26
3.2.1.10.	Lesitinaz Testi	26
3.2.1.11.	Hemoliz Testi	26
3.2.1.12.	Nutrient Agar'da Pigmentasyon	27
3.2.1.13.	Üreaz Testi	27
3.2.1.14.	Jelatinaz Testi	28
3.2.1.15.	Koagülaz Testi	28
3.2.1.16.	Basitrasin Hassasiyet Testi	28
3.2.1.17.	Metisilin Hassasiyet Testi	28
3.2.1.18.	Polimiksin B (300 U) Hassasiyet Testi	28
3.2.1.19.	Antibiyotik Duyarlılıkları Testi	29
3.2.1.20.	DNaz Testi	30
3.2.1.21.	Elektroforez İçin Örneklerin Hazırlanışı	30
3.2.1.22.	SDS-PAGE'in Yapılışı	31
3.2.1.23.	Protein Profillerin İstatistiksel Analizi	32
4.	BULGULAR	33
4.1.	<i>Staphylococcus aureus</i> İzolasyonu ve İdentifikasyon Bulguları	33
4.2.	Antibiyogram Bulguları	37
4.3.	SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforez (PAGE) Bulguları	39
4.4.	<i>Staphylococcus aureus</i> Suşları Arasındaki Kümeleme Analiz Bulguları	41
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ	44
6.	KAYNAKLAR	51
	EKLER	63
	ÖZGEÇMİŞ	77

SEMBOLLER VE KISALTMALAR

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ADSM	Ağız Diş Sağlığı Merkezi
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DNA	Deoksiribonükleik Asit
GDH	Gerze Devlet Hastanesi
GISA	Glikopeptid-Orta Duyarlı <i>Staphylococcus aureus</i>
KNS	Koagulaz Negatif <i>Staphylococcus aureus</i>
MRSA	Metisilin Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	Metisilin Duyarlı <i>Staphylococcus aureus</i>
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NNIS	National Nosocomial Infection Surveillance
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
RAPD-PAGE	Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA Analizi
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	Ribonükleik Asit
RS-PCR	Reverse Transcription-PCR
SCC	Staphylococcal Cassette Chromosome
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
TSST-1	Toksik Şok Sendromu Toksini-1
VISA	Vankomisine Orta Duyarlı <i>Staphylococcus aureus</i>
YBÜ	Yoğun Bakım Ünitesi
µg	Mikrogram
dk	Dakika
kDa	Kilodalton
L	Litre
mg	Miligram
ml	Mililitre
sn	Saniye

ŞEKİLLER ve ÇİZELGELER LİSTESİ

ŞEKİLLER	Sayfa No
Şekil 2.1. <i>Staphylococcus aureus</i> 'un koloni morfolojisi	8
Şekil 2.2. <i>Staphylococcus aureus</i> 'un virülens faktörleri	8
Şekil 3.1. <i>Staphylococcus aureus</i> 'un mikroskop görüntüsü	23
Şekil 3.2. VP test sonucu	26
Şekil 3.3. Üreaz test sonuçları	27
Şekil 3.4. Antibiyogram sonuçları	29
Şekil 3.5. Toplam hücre protein bantlarının molekül ağırlıklarının tespitinde kullanılan standart eğri	31
Şekil 3.6. Hücre dışı protein bantlarının molekül ağırlıklarının tespitinde kullanılan standart eğri	32
Şekil 4.1. Hastaların yaş gruplarına göre dağılımı	33
Şekil 4.2. 15 adet <i>S. aureus</i> suşunun SDS-PAGE ile elde edilen toplam hücre protein profilleri	40
Şekil 4.3. 15 adet <i>S. aureus</i> suşunun SDS-PAGE ile elde edilen hücre dışı protein profilleri	41
Şekil 4.4. 15 adet <i>S. aureus</i> suşunun toplam hücre protein profillerini esas alan ve unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA) metodu kullanılarak oluşturulan dendrogram	42
Şekil 4.5. 15 adet <i>S. aureus</i> suşunun hücre dışı protein profillerini esas alan ve unweighted pair-group metod using arithmetic averages (UPGMA) metodu kullanılarak oluşturulan dendrogram	43

ÇİZELGELER

Sayfa No

Çizelge 4.1.	İncelenen örneklerin alındığı bölgeler, yaş ve cinsiyet bilgileri	34
Çizelge 4.2.	<i>Staphylococcus aureus</i> suşlarının biyokimyasal test sonuçları	35
Çizelge 4.3.	<i>Staphylococcus aureus</i> izolatların karbonhidrat fermentasyon sonuçları	36
Çizelge 4.4.	Antibiyotik duyarlılık test sonuçları	37
Çizelge 4.5.	<i>Staphylococcus aureus</i> suşlarının antibiyotik duyarlılıkları	38

EKLER LİSTESİ

	Sayfa No
EK-1 Suşların Tanısında Kullanılan Besi Yerleri	63
EK-2 Poliakrilamid Jel Elektroforezinde Kullanılan Tampon ve Çözeltiler	69
EK-3 Araştırmada Kullanılan Boya ve Diğer Çözeltiler	73
EK-4 Antibiyotik Duyarlılık Testinde Kullanılan Standart Zon Çapları	76

1. GİRİŞ

Diş ve dişeti enfeksiyonları genellikle bakteriler tarafından oluşturulan enfeksiyonlardır. Periodontal flora oldukça karmaşıktır ve hala tam olarak aydınlatılmamıştır. Birçok araştırmacı periodontal hastalıkların ana etiyolojik faktörünün bakteriyel plak olduğunu ifade etmektedir (Serindağ, 2007).

Antony Van Leeuwenhoek 1683 yılında el yapımı mikroskobuyla dental plaktaki bakterilerin çizimini yapmıştır (Theilade, 2003; Çalışkan, 2006). 200 yıl sonra Willoughby D. Miller hastalıklı pulpada bakteriyi belirleyen ilk araştırmacı olması ve dental mikrobiyolojinin temeli olan, ‘insan ağzının mikroorganizmaları’ isimli eseri nedeniyle oral mikrobiyolojinin babası olarak tanımlanmıştır (Miller, 1973; Çalışkan, 2006). Ağızın yerel bakterileri; çürük, travma ve yetersiz koroner restorasyonlarda oluşan mikrosızıntı yoluyla ulaştığı pulpada iltihaplanma veya nekroza neden olur. Nekrotik pulpadaki bakteriler akut veya kronik periapikal enflamasyona yol açarlar.

Diş çürüğü ve dişeti enfeksiyonları, en yaygın kronik hastalıklardandır. Diş çürüğünün oluşumu karyojenik bakteriler, yatkın diş yüzeyi ve bakteri gelişimini sağlayacak besin kaynağı faktörlerine bağlıdır (Çakır ve ark., 2010). Diş çürüğü; kalsifiye dokuların yıkımı ve diş minesinin bölgesel çözünmesiyle sonuçlanan bir enfeksiyondur. Çürük; diş minerali ve plak arasındaki fizyolojik dengenin bozulmasıyla oluşur. Diş çürüğü etkeni bakteriler, enfeksiyona bağlı olarak hastalığın ilerlemesine neden olurlar. Çürük lezyonları, asidik ortam üretebilme yeteneği olan çok sayıda bakterinin diş yapısını demineralize etmesiyle oluşur. Diş plağı, diş yüzeyine yapışan çok sayıda bakteriden meydana gelir. Bu bakteriler, enerji sağlamak için çeşitli karbonhidratları parçalar ve yan ürün olarak organik asit üretirler. Bu asitler, dişin kristal yapısının çözünmesi ile çürük lezyonu oluşmasına sebep olur. Çürük aktivitesindeki artış, bakteri aktivitesinin yüksek ve diş yüzeyindeki plak pH’nın düşük olduğunu gösterir. Çürüğün başlamasında bakterilerin rolü çok büyüktür. İnsan ve hayvan modelleri kullanılarak yapılan çalışmalar; bakteri enfeksiyonu olmayan dişlerde çürük oluşmadığı, çürüğün azalmasında antibiyotiklerin etkili olduğu, ağız bakterileri in vitro olarak mineyi demineralize ederek doğal çürüğe benzer lezyonlar oluşturabildiği ve farklı diş çürüklerinden spesifik bakteriler izole edilebileceğini göstermiştir (Çakır ve ark., 2010).

Diş yüzeyine yerleşen mikroorganizmalar periodontal hastalıkların etiolojisinde etkin role sahiptirler. Bu mikroorganizmalar ya diş yüzeyinde ya da yumuşak doku ile diş arasında serbest halde bulunan subgingival plağa yerleşik bulunurlar. Plakta bulunan bakteri tipleri kişiye, ağızda bulunduğu bölgeye ve plağın yapısına göre değişiklik gösterir.

Ağız bakterileri, birçok türü içeren kompleks topluluklardan oluşan yapışkan bir matriks halinde sıkıca paketlenmiş hücre kitlesi yapısındadır. Yaklaşık 200–300 bakteri türü, maya ve protozoon insan ağız boşluğunda doğuştan yer alır. Plağı oluşturan karmaşık bakteri topluluğunun metabolik aktivitesi, sert ve yumuşak dokulardaki hastalığın varlığını ya da yokluğunu belirler. Çürüğe neden olan organizmalar karyojeniktir. Bir dişin çürüme eğiliminin derecesi, onun karyojenik potansiyeli olarak tanımlanır (Çakır ve ark., 2010).

Yumuşak, mineralize olmamış, yarı saydam, yapışkan materyalin diş yüzeyinde birikmesi plak olarak adlandırılır. Bu tanımlı bakteri plağı olarak yapmak daha doğru olur çünkü tamamen bakteriler ve onların ürünlerinden oluşur. 1 mg bakteri plağında 200 milyondan fazla bakteri bulunur. Plak, sadece yiyecek artıklarının yapışmasından veya fırsatçı mikroorganizmaların gelişigüzel birikmesinden oluşmaz. Plağın diş üzerinde birikimi, oldukça organize ve düzenli olaylar zinciridir (Çakır ve ark., 2010).

Epidemiyolojik çalışmalar periodontitis gibi oral enfeksiyonların solunum yolu hastalıkları, kardiovasküler ve inme gibi sistemik hastalıklar için büyük bir risk olabileceğini göstermiştir (Li ve ark., 2000; Souto ve ark., 2006). Periodontal hastalıklar dental biyofilmdeki karmaşık bir mikrobiyota ile ilişkili bakteriyel enfeksiyonlardır. Diş vücuttaki dökülmeyen (non-shedding) tek yüzeydir ve özellikle periodontitis bulunduğu bakteriyel yüzeyler dental biyofilmdeki her mg başına 10^{11} 'den fazla mikroorganizmaya sahip olabilir (Souto ve ark., 2006).

Biyofilmler doğada bakteriyel büyümenin en yaygın şeklidir ve toplumdaki klinik ve dental enfeksiyonlar açısından önemlidir (Ansari ve ark., 2011). *Staphylococcus aureus* oldukça yaygın enfeksiyonların nedeni olan önemli insan patojenidir. Son 25 yılda, toplum ve hastane kaynaklı *S. aureus* enfeksiyonlarında önemli bir artışın olduğu bildirilmektedir (Steinberg ve ark., 1996; Ansari ve ark., 2011). *S. aureus*, biyofilmlerde fırsatçı bir patojendir ve pek çok enfeksiyonun nedenidir (Götz ve ark., 2006; Ansari ve ark., 2011).

Candida spp. ve *Staphylococcus* spp. genellikle insan ağız boşluğunda bulunur. Ancak bazı durumlarda, örneğin, penisilin ve eritromisin sistemik uygulaması altındaki periodontitisli hastalarda, bu mikroorganizmalar fırsatçı patojen olarak bulunabilir ve süperenfeksiyon üretirler (Helovuo ve ark.,1993; Martins ve ark., 2002).

Stafilokoklar ağız boşluğundan izole edilebilmektedir (Sanchez-Cordero ve ark.,1979; Rams ve ark.,1990b; Slots ve ark., 1990; Jackson, 1998; Jackson ve ark., 1999; Murdoch ve ark., 2004). Yine de onlar yerel oral bakteriler olarak nitelendirilmez ve genellikle geçiş organizmalar olarak kabul edilirler (Dahlen ve ark.,1992; Dahlen ve Wikström, 1995; Murdoch ve ark., 2004). Stafilokoklar ve kronik periodontitis hastalığı (Dahlen ve Wikström, 1995; Murdoch ve ark., 2004) arasında nedensel bir ilişkinin varlığı net olmamasına karşın, bu cinse ait türler periodontitis hastaların subgingival alanlarından izole edilmektedir (Rams ve ark.,1990a,b; Slots ve ark.,1990; Dahlen ve Wikström, 1995; Murdoch ve ark., 2004).

Stafilokoklar genelde ağız boşluğundan izole edilmez ve geçici mikrobiatanın bir parçası kabul edilirler. Yine de ağız mikroflorasındaki değişimle, bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde, bu mikroorganizmalar yüksek miktarda bulunur. Periodontal hastalıklı kişilerin ağız boşluğunda fırsatçı bakterilerin olası rezervlerini temsil ederler (Loberto ve ark., 2004). *S. aureus* çok sayıda virulans faktörlerine sahiptir ve farklı anatomik bölgelerde enfeksiyonlara neden olan patojenik bir türdür. *S. aureus*, ağız boşluğunda geçici mikroorganizmalar içinde görüldüğünden genellikle diş ve çevre dokularından nadiren izole edilmiştir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar; *S. aureus* suşlarının çoğunun, tedavi amacıyla kullanılan antibiyotiklere karşı hızla direnç kazandıklarını ve bu bakterilerin neden oldukları hastalıkların tedavisinin giderek zorlaştığını göstermektedir. Bu nedenle *S. aureus* türüne ait insan patojeni suşların tanısı ve epidemiyolojisi gerek dünyada gerekse ülkemizde çok önemli bir konuma gelmiştir (Alan, 2007).

Staphylococcus aureus türüne ait suşların ayırt edilmesinde morfolojik ve fizyolojik özelliklerin esas alındığı biyotiplendirme, serotiplendirme, kapsüler tiplendirme, antibiyogram testleri, faj tiplendirme gibi geleneksel metod kullanılmakla birlikte bu metodlar bazen hatalı sonuçların ortaya çıkmasına yol açabilmektedir (Ieven ve ark., 1995; NNIS, 2003; Berber ve ark., 2003; Berber ve ark., 2010). Bu nedenle, *S. aureus* türüne ait suşların ayırım ve karakterizasyonunda biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri esas alan klasik yöntemlere ilaveten çeşitli moleküler teknikler de kullanılmaktadır. Bu teknikler arasında, Pulsed Field Gel Elektrophoresis (PFGE), Nested

(yuvalanmış) PCR, Multipleks PCR analizleri, ribotiplendirme, Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD-PCR) analizi, ribozomal DNA polimorfizm analizi, klinik örneklerden ve diğer kaynaklardan izole edilen patojenik *S. aureus* suşlarının karakterizasyonu ve identifikasyonunda kullanılmaktadır. Öte yandan, bu metodların birçoğu, oldukça zahmetli ve DNA restriksiyon profillerinin yorumlanması zor olabilmektedir. Ayrıca, laboratuvarlararası standardizasyon hala problemdir (Belkum ve ark., 1997; Alli ve ark., 2007; Berber ve ark., 2010).

Protein elektroforezi bakterilerin sınıflandırılmasında ve teşhisinde önemli yere sahiptir. Birçok araştırmacı, çeşitli mikroorganizmaların tür ve tür altı düzeyde karakterizasyonunda hücresel proteinlerin sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) başarı bir şekilde kullanmışlardır.

Bu çalışmada, Sinop merkez ve ilçelerindeki diş kliniklerine gelen hastaların diş çürükleri ve dişetinden *S. aureus* izolasyonu, fenotipik karakterizasyonu, antibiyotik duyarlılıkları, toplam hücre ve hücre dışı protein profillerine göre ayrımı amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Stafilocokların Genel Özellikleri

Staphylococcus cinsi *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*'ye göre *Micrococaceae* ailesi içerisinde *Stomatococcus*, *Planococcus* ve *Micrococcus* cinsleri ile birlikte gruplandırılmaktadır. Bu cinse mensup 41 farklı tür bulunmaktadır (Bannerman 2003, Ünal 2007).

"*Staphylococcus*" adı Yunanca "üzüm salkımı" anlamına gelen "staphylé" teriminden gelmektedir (Bauer ve ark., 1974; Üslü, 2007). *Staphylococcus*, ilk kez 1878 yılında Robert Koch tarafından irinde görülmüş, 1881 yılında İskoçyalı cerrah Alexander Ogston tarafından yaralarda saptanmış ve 1884 yılında ilk kez Rosenbach tarafından izole edilmiş son derece tehlikeli enfeksiyonlara neden olan sporsuz bakterilerdir (Zinsser, 2005; Üslü, 2007).

Karşılaştırılmalı 16S rRNA çalışmaları esas alındığında *Staphylococcus* cinsi Firmicutes filumuna aittir. *Staphylococcus* cinsi monofletiktir ve diğer yakın cinslerden %93.4-95.3 16S rRNA dizi benzerlikleri ile çok iyi ayrılır. Genus içerisinde benzerlik seviyesi (< %96.5) önemli derecede yüksektir. DNA-DNA hibridizasyon çalışmalarına göre *Staphylococcus* türleri 3 gruba ayrılır (Schleifer ve Bell, 2009). Birinci grup, koagulaz negatif-novobiosin duyarlı türler: *S. epidermidis* (*S. capitis*, *S. caprae*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. huminis*, *S. saccharolyticus*, *S. warneri*), *S. simulans* (*S. carnosus*, *S. simulans*); ikinci grup, koagulaz negatif-novobiosin dirençli türler: *S. saprophyticus* (*S. cohnii*, *S. saprophyticus*, *S. xylosus*), *S. sciuri* (*S. lentus*, *S. sciuri*, *S. vitulinus*); üçüncü grup, koagulaz pozitif-novobiosin duyarlı türler: *S. intermedius* (*S. intermedius*, *S. delphini*), *S. aureus* (*S. aureus*, *S. aureus* subsp. *anaerobius*)'dur.

Stafilokoklar 0.5-1.5 µm çapında, yuvarlak, düzgün veya düzgün olmayan kümeler oluşturan Gram-pozitif hareketsiz bakterilerdir. Kokların şeklinin tam yuvarlak olması ve bakterilerin birbirine benzer görünümde olması stafilokoklar için karakteristiktir (Bilgehan, 1992; Akıner, 2006). Genellikle kapsülsüz ya da kapsül formları sınırlıdır. Hücre duvarı içerikleri peptidoglikan ve teikoik asittir. Peptidoglikanda bulunan diamin asit, (peptidoglikan grup A3) L-lizindir (Götz ve ark., 2006; Schleifer ve Bell, 2009).

Stafilokoklar, bazen 3-4 bakteriden ibaret tetrat ya da kısa zincirler şeklinde bulunabilir. Bu görünümleri ile streptokoklara çok benzeyen stafilokoklar katalaz testinin pozitif olmasıyla ayırt edilir (Bilgehan, 1992; Akıner, 2006).

Staphylococcus aureus subsp. *anaerobius* ve *S. saccharolyticus* haricinde aerobik koşullar altında daha hızlı gelişim gösterir. Genellikle katalaz pozitif, oksidaz negatiftir ve 18-40°C'de %10 NaCl bulunan ortamlarda gelişim gösterebilirler. Kemoorganotroflardır. Anaerobik koşullar altında glukozdan L-ve/veya D-laktik asit üretebilirler. Karbonhidrat ya da aminoasitleri karbon ve enerji kaynağı olarak kullanırlar (Schleifer ve Bell, 2009).

Stafilokoklar ve mikrokoklar birkaç açıdan farklılık gösterir (i) glikozdan anaerobik asit üretimi (stafilokok türlerinde pozitif, mikrokoklarda negatif), (ii) mililitre başına 0.4 µg eritromisin bulunan ortamda gliserolden aerobik olarak asit üretimi (stafilokoklarda pozitif, mikrokoklarda negatif) (iii) selektif ortamda gelişme (örneğin; Schleifer ve Kramer'in besiyeri, stafilokoklar için) (iv) sınırlama olmayan besiyerinde gelişim oranı ve koloni morfolojisi (v) sitokrom-c'nin varlığını belirlemede oksidaz testi (stafilokok türleri negatif; mikrokok türleri pozitif) (Kloos ve Jorgensen, 1985).

Basit besi yeri dahil birçok besi yerinde üreseler de kanlı besi yerinde üremeleri daha iyidir (Kloos ve Bannerman, 1995). Koloni morfolojisi tür ve suşların teşhisinde kullanışlı bir karakter olabilir. Hücre zarında bulunan ve karotenoid yapısında olan pigmentleri sayesinde, altın sarısı renkten, porselen beyazı rengine kadar farklılıkta koloniler oluşturabilirler (Baron ve ark., 1994; Akıner, 2006).

Beslenme ihtiyaçları çeşitlidir. Birçok tür, aminoasitler ve B grubu vitaminleri gibi organik azot kaynaklarına ihtiyaç duyar (Schleifer ve Bell, 2009). Lizostafin ile lizize duyarlıdır ancak lizozim ile lizize dirençlidir. Lizostafin bir glisin glisin endopeptidazdır ve stafilokokkal peplidoglikanda bulunan pentaglisin karşılıklı köprülerini yıkar. Bazı türler novobiyosine dirençlidir. Genellikle furazolidone ve nitrofurana duyarlı, eritromisin ve basitrasine dirençlidir. Sıklıkla fenoller ve türevleri gibi antibakteriyallere duyarlıdır (Schleifer ve Bell, 2009).

Doğal populasyonları sıcakkanlı hayvanların deri, deri bezleri ve müköz membranlarıdır. Bazı türler insan ve hayvanlarda fırsatçı patojendir (Schleifer ve Bell, 2009). Stafilokok türleri; koloni morfolojisi, koagülaz üretimi, oksijen ihtiyacı, hemoliz, novobiyosin direnci, aseton üretimi, karbonhidratlardan aerobik asit üretimi, enzim aktiviteleri esas alınarak teşhis edilebilir (Kloos ve Jorgensen, 1985).

Stafilokoklar antijenik özelliklere sahip 30'dan fazla maddeye sahiptirler. Stafilokokların antijenik özelliklerinden birisi hücre duvarında bulunan ve aşırı duyarlılık reaksiyonlarında rol oynayan teikoik asittir. Stafilokokların kültür süzüntülerinden, eritrosit ve çeşitli hücreleri parçalayan ve deney hayvanları üzerinde öldürücü etkisi olan ekzotoksin niteliğinde maddeler izole edilmiştir (Bilgehan, 1992; Akıner, 2006).

Stafilokokların her yerde bulunabilmelerinden dolayı, tip ve gruplar içinde suşları ayırt etmek istenir. Hastane enfeksiyonları veya stafilokokkal besin zehirlenmelerin kaynağının keşfini sınıflandırma belirler. Serolojik tiplendirme, biokimyasal reaksiyonlar, antibiyotik duyarlılıkları, bakteriyofaj tiplendirme, plazmid profillerini içine alan bir çeşit teknoloji kullanılmaktadır. Serolojik tiplendirme özel antiserumların hazırlanmasındaki zorluklardan dolayı günümüzde birkaç Avrupa laboratuvarı haricinde nadiren kullanılır. Biyotiplendirme öncelikle koagulaz negatif türlerde kullanılır. Çünkü *S. aureus* suşları biyokimyasal olarak nispeten homojendir. Antibiyogramlar, laboratuvarlarda kesinliği yüksek prosedürler olduğunun kabulünden beri kullanılmaktadır. Epidemiyolojik açıdan önemli kabul edilen bakteriyofaj tiplendirme, 1952'den beri yaygınlaşmıştır. Agaroz jel elektroforez ile plazmid profillerinin belirlenmesi stafilokokların klonal popülasyonları veya suşların identifikasyonunda gelecek vaadeden metot olmuştur (Kloos ve Jorgensen, 1985).

2.2. *Staphylococcus aureus* ve Tür Özellikleri

Hareketsiz, spor oluşturmayan, Gram-pozitif koklardır. Düzgün çiftler ve kümeler oluşturur. Fakültatif anaerobtur. %10'luk NaCl içeren ortamda iyi gelişirken %15 NaCl içeren ortamda zayıf gelişim gösterirler. Alkalen fosfataz, katalaz, koagulaz, ısıya dayanıklı nükleaz, hemoliz ve hiyaluronidaz reaksiyonları pozitifdir. Oksidaz, beta-galaktozidaz, beta-glukuronidaz reaksiyonları negatifdir. Aerobik koşullarda fruktoz, maltoz ve sükrozdan asit üretirler. Ancak, arabinoz, sellobiyoz, melezitoz, rafinoz, salisin, ksilozdan asit üretemezler. Novobiyosine duyarlıdırlar. Peptidoglikan tipi L-Lys-Gly_{5,6}'dır. Teikoik asit içerikleri ribitol ve N-asetilglukozamindir (Götz ve ark., 2006; Schleifer ve Bell, 2009).

Koagulaz pozitif tek stafilokoktur. *S. aureus* basit besi yerinde ürese de kanlı besi yerinde daha iyi çoğalır ve koloniler etrafında tam hemoliz meydana getirir. 37°C'de pH 7.4'de iyi ürer. Jeloz besi yerinde ürer ve yuvarlak kenarlı mat, kabarık,

parlak yüzeyli, S tipinde ve 1-2 mm çapında koloniler yapar (Şekil 2.1). *S. aureus* altın sarısı pigment oluşturur. Kolonilere altın sarısı rengini karotenoid pigmentleri vermektedir (Bilgehan, 1990; Elçi, 2004; Akıner, 2006).

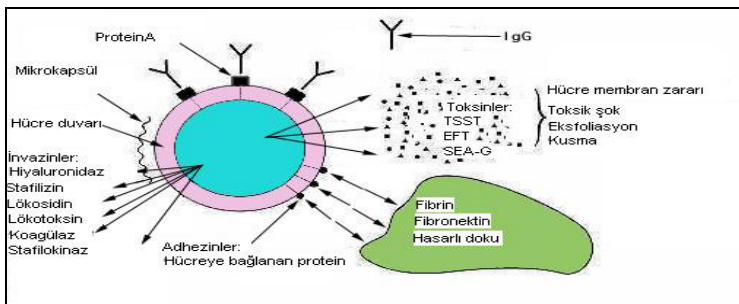


Şekil 2.1. *Staphylococcus aureus*'un koloni morfolojisi (Üslü, 2007)

Staphylococcus aureus'u diğer stafilocoklardan ayırmak için koagulaz, mannitol fermantasyonu ve deoksiribonükleaz testleri kullanılır. Bu testlerin pozitif sonuç vermesi bakterinin *S. aureus* olduğunu gösterir (Kloos ve Schleifer, 1975; Güneş 2008).

2.2.1. Virulans ve Patojenite

Staphylococcus aureus virülansı en yüksek olan stafilocok türüdür. Ancak enfeksiyon, mikroorganizmanın virülansı ile konak savunma sisteminin oluşturacakları dengeye bağlıdır. Stafilocokların virülansında rol oynayan faktörler (Şekil 2.2) hücre duvar yapıları, kapsül, yüzey proteinleri, toksinleri ve enzimleridir (Kutlu, 2006).



Şekil 2.2. *Staphylococcus aureus*'un virulans faktörleri (Todar, 2006)

2.2.1.1. Hücre Duvarı

Stafilokokların hücre duvarı kimyasal bileşimi ve yapısı diğer Gram-pozitif bakterilere benzer. Peptidoglikan, teikoik asit ve proteinden oluşur. Bütün stafilokoklardaki peptidoglikanın karakteristik özelliği, peptid alt birimlerinin 3 pozisyonunda diamino asit gibi L-lizin ile grup 3A peptidoglikanın bulunuşu ve glisince zengin interpeptid köprüleridir (Schleifer ve Bell, 2009). Kuru ağırlığının yaklaşık %50'sini peptidoglikan tabaka oluşturmaktadır. Stafilokoklar için vücudun önemli savunma mekanizmalarından biri lizozim enziminin hedefi olan hücre duvarındaki peptidoglikan tabakasıdır. Makrofajlardan sitokin salınımını uyarır, komplemanın aktivasyonuna yol açar ve trombosit kümeleşmesine neden olur. Ayrıca, monositlerden interlokin-1 salınımını uyararak polimorfonükleer lökositlerin infeksiyon bölgesine toplanmalarına ve sonuçta apse oluşumuna da yol açar. Stafilokoklarda peptidoglikana ek olarak teikoik asit de bulunur. Bunlar peptidoglikana kovalent olarak bağlanmış fosfodiester grup tekrarlarını içeren suda çözünen polimerlerdir (Schleifer ve Bell, 2009). Mukozalarda bulunan özgül reseptörleri (fibronektin, fibrinojen, iaminin, trombospondin, elastin, kollajen, vitronektin, siyaloprotein) ile birleşerek stafilokokların konağa aderansını sağlar (Tünger, 2004; Kutlu, 2006; Güneş, 2008). Teikoik asitler bulundukları yere göre 2 kısma ayrılır. Bunlar; hücre duvarı ve membran teikoik asitleridir. Duvar teikoik asitlerinden N-asetil glukozamin (GlcNAc) rezidüleri içeren ve polisakkarit A olarak da adlandırılan ribitol teikoik asit *S. aureus*'ta bulunur (Güneş, 2008).

2.3.1.2. Kapsül

Bazı bakterilerde hücre duvarının etrafında polisakkarit yapıda kapsül bulunmaktadır. Stafilokoklarda diğer bakterilerdekine benzer ışık mikroskobu ile görülebilen bir kapsül yoktur. Ancak antikorlarla işaretlendikten sonra elektron mikroskobu ile görülebilen mikrokapsül vardır. Mikrokapsülün fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir. Hücre dışı ortamda ve kompleman yokluğunda fagositozu engelleyebildiği gösterilmiştir (Foster, 2003; Ünal, 2007). Bugüne kadar tanımlanan 11 kapsüller serotip içinde insan infeksiyonlarının %75'inden sorumlu olanlar tip 8 ve 5'tir (Güneş, 2008).

Stafilokoklarda kapsül gibi hücreye sıkıca bağlanmayan ve hücre etrafında gevşek yapıda bulunan bir salgı tabakası vardır. Salgı tabakası, monosakkarit ve küçük peptidlerden meydana gelmekte ve stafilokokların çoğunluğunda genetik ve çevre faktörlerine bağlı olarak oluşturulmaktadır. Bu tabaka dokulara veya vücuda yabancı katater, graft, eklem protezleri ve kalp kapakçığı protezlerine bağlanmayı kolaylaştırmaktadır (Ünal, 2007).

2.3.1.3. Yüzey Proteinleri

Protein A, elastin, kollajen, fibronektin bağlayan proteinler ve “clumping” (kümeleşme) faktör, kimyasal yapıları ve hücre duvarı yerleşimleri birbirlerine benzeyen stafilotoksik yüzey proteinleridir. Bu proteinler stafilokokların konak dokularda kolonize olmasında en önemli faktörlerdendir. Bu proteinlerin prototipi olan protein A’nın en önemli özelliği, IgG₃ dışındaki tüm IgG ve IgA₂ ile bazı IgM’lerin Fc reseptörleri ile birleşebilmesidir. Bu nedenle protein A’nın antikompleman ve antifagositer etkinliği vardır (Cengiz, 1999; Tünger, 2004; Güneş, 2008).

2.3.1.4. Toksinler

Staphylococcus aureus, konak hücre morfolojisini ve/veya fonksiyonunu etkileyen çok sayıda ekstraselüler toksin üretebilir. Bunlardan bir kısmı toksik etkilerini enzimatik aktivite ile gösterirken, diğerleri süperantijen özellikleri nedeniyle sitokin salınımını uyarır (Kutlu, 2006).

Stafilokoklar, çok farklı tipte protein yapıda toksinler üretirler. Bu toksinlerden bazıları in vitro koşullarda eritrosit membranlarına zarar vererek hemolize neden olurlar (Foster, 2003; Ünal, 2007). *S. aureus*, antijenik özelliklerine, hayvan eritrositleri üzerinde hemolitik etki yapıp yapmamalarına, hemoliz için gerekli ısı derecesine ve toksisite derecesine göre dört tip hemolizin üretir (Bilgehan, 1990).

Alfa toksin, *S. aureus*’ların membrana zarar veren en etkili toksinidir. İlk kez 1900’de Kraus ve Clairmont tarafından tanımlanmıştır (Ünal, 2007). Hemolitik, dermonekrotik, lizozom parçalayıcı ve doku kültürlerinde sitolitik etkileri vardır. Tavşan eritrositleri için hemolitik aktivitesi en fazladır, insan eritrositlerine fazla bir etkisi yoktur. Beta toksin, ilk kez 1935’te Glenny ve Stevens tarafından tanımlanmıştır.

Stafilokok sfingomyelinazıdır. En iyi koyun, daha az olarak insan ve tavşan eritrositlerini eritir (Kutlu, 2006).

Gama toksin, insan eritrositleri üzerinde orta derecede etkili olan iki komponentli bir hemolizindir. Özellikle stafilokoklara bağlı kemik enfeksiyonlarında kanda bu toksine karşı antikor düzeyinin yüksek bulunması, bu toksinin bu hastalıkta etkili olduğunu düşündürmektedir (Waldvogel, 1999; Akıner, 2006). Delta toksin, 1947 yılında Williams ve Harper tarafından tanımlanan çok küçük peptidlerdir. Biyolojik etkinliği geniş olup, eritrosit, lökosit, makrofaj, lenfosit ve trombositleri hasara uğratan bir proteindir. Bu sitolitik toksinlerden alfa ve delta toksin, insanlarda hastalık oluşturan *S. aureus* suşlarında en çok bulunanlardır. *S. aureus* suşlarının %95'inde bunlardan biri, %82'sinde her ikisi birlikte bulunur (Kutlu, 2006).

Lökosidin toksini, birbirinden ayrı S (Slow) ve F (Fast) adındaki iki protein komponentinden oluşur. Fagositozdan bakteriyi korur. Lökosit membranının permeabilitesini arttırarak lizise uğratar, bunun için F ve S komponentlerinin ikisinin birlikte etki etmesi gerekir (Coşgun ve Ulaş, 1999).

Enterotoksinler, *S. aureus* ve *S. epidermidis*'de bulunur. Mide ve doedonum enzimlerine dayanıklıdır. 100°C'de 30 dakika yaşayabilir. Enterotoksin A, C ve D süt ürünleri ile geçerek zehirlenmelere yol açarken, enterotoksin B, stafilotoksin pseudomembranöz enterokolite yol açar (Coşgun ve Ulaş, 1999). Eksfoliyatif toksin, epidermolitik toksin ya da eksfoliyatif toksin olarak da bilinir. Yeni doğanlarda haşlanmış deri sendromuna yol açar. *S. aureus* tarafından ve özellikle de bakteriofaj II tarafından oluşturulur.

Toksik şok sendromu toksini ilk defa 1978'de Todd ve arkadaşların tanımladığı birden fazla sistemi etkileyen bir hastalıktır. *S. aureus*'un ürettiği toksik şok sendromu toksini-1 (TSST-1) neden olmaktadır. Ateş, kusma, hipotansiyon, ishal ve letal şoka yol açar (Schlievert ve ark., 2004).

2.3.1.5. Enzimler

Stafilokoklar tarafından üretilen enzimler komşu dokulara yayılmayı kolaylaştırarak enfeksiyon patojenitesinin artmasında rol oynarlar.

Katalaz enzimi, bakteri fagositleri tarafından hücre içine alındıktan sonra oluşturulan toksik hidrojen peroksidi yıkarak su ve oksijene dönüşümünü katalizleyen enzimdir. Stafilokokların streptokoklardan ayırımında kullanılır. Bakteriler bu enzim

sayesinde fagositlerin içinde öldürülmeye karşı direnç kazanır (Kutlu, 2006; Akıner, 2006; Güneş, 2008).

Koagulaz enzimi, bakteri tarafından dış ortama salınan (serbest koagulaz) ve bir miktarı da bakteri hücre duvarına bağlı halde bulunan (bağlı koagulaz/clumping faktör) bir enzimdir. Fibrinojeni fibrine dönüştürerek plazmayı koagule eder. Bakteri serbest koagulaz enzimi sayesinde çevresini fibrin tabakası ile sararak savunma elemanlarından korunur. Bağlı koagulaz ile de kümeler halinde bir arada dururlar (Selçukbiricik, 2005). Filtreden geçebilen ısıya dayanıklı bir enzimdir. *S. aureus*'un diğer stafilokoklardan ayırımını sağlar.

Lipaz enzimi vücudun yağlı bölgelerindeki lipidleri hidrolize ederek mikroorganizmanın kutanöz ve subkutanöz dokulara girmesini sağlar. *S. aureus* suşlarının hemen hepsi, koagulaz negatif stafilokokların ise %30'dan fazlası çeşitli lipazlar oluşturur. Fronkül, karbonkül ve bül oluşumundan sorumlu enzimdir (Çoşkun ve Ulaş, 1999).

Hiyalüronidaz enzimi yayılma faktörü olarak da bilinir. *S. aureus* suşlarının %90'nı tarafından salgılanır. Bağ dokusunun yapısındaki hiyalüronik asitin depolimerizasyonunu sağlayarak stafilokokların doku içerisinde yayılmasını kolaylaştırırlar (Bilgehan, 1994; Coşgun ve Ulaş, 1999; Akıner, 2006). Deoksiribonükleaz DNA'yı hidrolize eden bir enzimdir. *S. aureus* türüne ait suşların %90-96'inde bulunan ısıya dayanıklı bir fosfodiesterazdır.

Beta-laktamazlar (Penisilinaz) penisilin grubu antibiyotiklerdeki beta-laktam halkasının hidroksil grubunu parçalayarak etkisiz hale getirir. Bunun sonucunda bakteriler hücre duvarı sentezini durduran beta-laktam grubu antibiyotiklere karşı dirençli hale geliriler. Bu enzimin salgılanmasını sağlayan genler, plazmid ve transpozonlarla aktarılır (Bilgehan, 1994; Güneş, 2008). Stafilokinazlar, stafilokok türleri tarafından oluşturulan fibrinolizinlerdir, fibrini parçalayarak enfeksiyonun dokulara yayılmasına neden olurlar (Foster, 2003; Ünal, 2007).

2.2.2. Epidemiyoloji

Staphylococcus aureus'un doğal kaynağı insandır. Yenidoğan döneminde *S. aureus* kökenleri; göbek çevresi, perianal bölge, deri ve bazen de gastrointestinal sistemde kolonize olurlar. Sonraki dönemlerde daha çok burunda kolonize olurlar.

Sağlıklı erişkinlerde kolonizasyon oranı, %10-20 kalıcı olmak üzere %30-50 arasında değişmektedir (Waldvogel, 2000).

Hastane enfeksiyonu etkeni olan *S. aureus* suşlarının en önemli kaynağı hastane personeli, hastaya refakat eden aile bireyleri ya da suşlarla enfekte veya kolonize olmuş hastalardır. Bulaşmada eller en önemli geçiş yolunu oluşturmaktadır. Kolonizasyon en sık burunda saptanmakla beraber nazofarinkte, vaginada, nadir olarak rektum ve perinede de görülmektedir (Craven ve ark., 1981; Gül ve ark., 2004). Burunda *S. aureus* taşıyıcılığı oldukça karmaşık ve halen birçok değişkeni çözilememiş bir durumdur. Ancak *S. aureus* taşıyanların bu bakteriye bağlı enfeksiyonlara çok daha açık olduğu gösterilmiştir (Kluytmans ve ark., 1997; Talay ve ark., 2007). Stafilokoklar fibrinojen, fibronektin, trombositler gibi maddeleri reseptör olarak kullanarak burunda kolonize olurlar. Çok yakında aspirin kullanımıyla burunda *S. aureus* taşıyıcılığının azalabileceği, çünkü aspirinin reseptör madde salınımını azaltabileceği gösterilmiştir (Karatay ve ark., 2006; Talay ve ark., 2007).

Staphylococcus aureus çeşitli enfeksiyonlardan sorumludur (Casey ve ark., 2007; Schleifer ve Bell, 2009). 1950-1960 yıllarında dünya genelinde yatan hastalarda nozokomiyal bir patojen olarak oldukça yüksek morbitide ve mortaliteye neden olmuştur. *S. aureus*'un neden olduğu insan enfeksiyonları arasında; fronkül, karbonkül, impetigo, toksik deri sendromu, pnömoni, osteomyelitis, akut endokarditis, myokarditis, perikarditis, bakteriyemi, toksik şok sendromu, kas, deri, ürogenital hat, merkezi sinir sistemi ve çeşitli iç organlarda abseler yer alır (Livermore, 2000; Casey ve ark., 2007; Schleifer ve Bell, 2009). *S. aureus* kaynaklı beyin abseleri çok nadirdir ancak açık ya da kapalı travma veya operasyon sonrasında gelişebilmektedir (Jensen ve ark., 1993; Casey ve ark., 2007). Ayrıca stafilokokkal enterotoksinler besin zehirlenmelerine de neden olur. Metisilin-dirençli *S. aureus* (MRSA) suşları, 1980'lerde hastanelerde klinik ve epidemiyolojik bir problem olmuş ve bu suşlar hastane dışında toplumda da yayılmıştır (Schleifer ve Bell, 2009).

Stafilokoklar insanlarda müközal membranlar, salgı bezleri ve deride mevcut olan önemli bir bakteri grubudur. Deri üzerinde geçici ya da yerli mikroorganizmalar olarak yer alır. *S. aureus* özellikle yetişkinlerde burun deliklerinde bulunur. Nazal boşluklarda bulunma oranı hastane dışı yetişkin insan popülasyonunda %10-40 arasındadır (Schleifer ve Bell, 2009).

1986-1997 yılları arasında Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'ndeki hastanelerin Yoğun Bakım Ünitelerinde (YBÜ) bakteriyemi etkenleri arasında ilk üç

sırayı koagülaz-negatif stafilokoklar (KNS) (%33.5), *S. aureus* (%13.4) ve enterokoklar (%12.8) almaktadır. Nozokomiyal pnömonilerde en sık etkenler sıralamasında *S. aureus* (%17.4) ve *Pseudomonas aeruginosa* (%17.4) ilk sırayı paylaşırlarken, cerrahi alan enfeksiyonlarında da ilk üç sırada enterokoklar, KNS'ler ve *S. aureus*'un yer aldığı bildirilmektedir (NNIS, 1999; Anonim, 2002).

İngiltere'de 1997-2005 yılları arasında cerrahi alan enfeksiyonlarının %53'ünün sebebi stafilokoklarıdır (Health Protection Agency, 2006; Casey ve ark., 2007). İngiltere'de 1997-2000 yılları arasında hastane kaynaklı bakteriyemilerin %26'sının sebebi *S. aureus* türüne ait suşlar olduğu bildirilmiştir (NINSS, 2002).

Staphylococcus aureus, son yıllarda yaygın morbidite, komplikasyon ve mortalite ile önemli bir bakteriyemi sebebi olarak görülmüştür. 2002-2004 yılları arasında Birleşmiş Milletler hastanelerinde pnömonia kültürü pozitif 4543 hasta ile yapılan bir çalışmada %8.9 toplum-kaynaklı pnömonia, %26.5 sağlık-kaynaklı pnömonia, %22.9 hastane-kaynaklı pnömonia ve %14.6 ventilator-ilışkili pnömonia vakasında MRSA tespit edilmiştir (Kollef ve ark., 2005; Rubinstein, 2008).

Akdeniz ve Atatürk Üniversiteleri'nde yoğun bakım enfeksiyonu etkenleri arasında *S. aureus* ilk sırada yer almaktadır (Tekeli, 2002). *S. aureus* angular dudak iltihabı (MacFarlane ve Helnarska, 1976) parotis bezi iltihabı (Goldberg, 1981), stafilokokkal mükoza iltihabı (Bagg ve ark., 1995) gibi bazı oral enfeksiyonların kısmen nedenidir. Dahası stafilokoklar özellikle çocuk (Miyake ve ark., 1991) ve yaşlı (Bagg ve ark., 1995) hasta gruplarında, eklem romatizması (Jacobson ve ark., 1997) gibi sistemik hasta gruplarında sıklıkla ağız boşluğundan izole edilebilir (Smith ve ark., 2003).

Staphylococcus aureus enzimlerinin özelliği nedeniyle apse, flegmon gibi lokal süpuratif lezyonlarla seyreden piyogen enfeksiyonlara ve ekzotoksinlerin neden olduğu toksik tablolara yol açar (Selçukbiricik, 2005).

2.2.3. Antibiyotik Direnç Özellikleri

Antibiyotiklerin bulunmasından önce *S. aureus* ilişkili bakteriyemilerin %82'si ölüm ile sonuçlanmıştır (Cui ve Hiramatsu, 2003; Bhalakia, 2006). 1941'de penisilinin kullanıma başlanması ile bütün suşlar bu antibiyotiğe duyarlı iken daha sonraları beta-laktamaz enziminin varlığını bozan direnç gelişimine neden olmuştur (Neu, 1992). Daha sonra beta-laktamazlardan etkilenmeyen penisilinler (metisilin gibi),

sefalosporinler ve vankomisini içeren yeni etkili antibiyotikler geliştirilmiştir. 1960-1970’li yıllarda, MRSA suşlarındaki artışı MRSA kaynaklı enfeksiyonlarda beta-laktam içeren antibiyotiklerin etkisinin azalmasına neden olmuştur. *S. aureus*’un çeşitli antibiyotiklere karşı geliştirdiği direnç mekanizmasından dolayı vankomisin enfeksiyonlarda kullanılan tek antibiyotik olmuştur (Bhalakia, 2006; Cui ve Hiramatsu, 2003).

MRSA’ların neden olduğu enfeksiyonlar hastane ve toplum kaynaklı olabilmektedir (Boyce, 1998; Alli ve ark., 2007). MSRA’lar stafilokokkal enfeksiyonların tedavisinde kullanılan bir çok antibiyotiğe karşı direnç geliştirmektedirler (Alli ve ark., 2007).

MRSA’ların İngiltere’de ilk kez 1961 yılında rapor edilmesinden sonra 1980 öncelerinde hastanelerde önemli klinik ve epidemiyolojik problem haline gelmiştir (Jevons, 1961). Avrupa’nın merkez ve güneyindeki 15 ülke arasında dağılan 15 üniversite hastanesinden izole edilen 3015 *S. aureus* suşunu içeren bir çalışmada, bütün izolatların %25’inin MRSA olduğu, en yüksek yayılım %54 ile Portekiz ve %43-58 arası İtalya’da, en düşük oran İsviçre ve Hollanda’daki hastanelerde görülmüştür (Fluit ve ark., 2001).

Türkiye’de klinik örneklerden izole edilen *S. aureus* suşlarında metisilin direncinin %23-71 arasında değiştiği ancak yoğun bakım ünitelerinde bu oranın %68-90 arasında olduğu belirtilmektedir. Berber ve ark., tarafından yapılan çalışmada MRSA suşlarında birçok antibiyotiğe karşı yüksek oranda direnç saptanmasına karşı, suşların hiçbirinde vankomisin dirençliliği tespit edilmemiştir. Bu durum MRSA enfeksiyonlarında tedavide tek seçeneğin glikopeptid antibiyotikleri olduğunu göstermektedir (Berber ve ark., 2008). Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon, Kalp Damar Cerrahisi ve Nöroşirürji kliniklerinin YBÜ’lerinde metisilin direnci %80’in üzerinde bulunmuştur (Anonim, 2000).

Antibiyotiklerin çoğuna dirençli *S. aureus* izolatlarının ortaya çıkışı ve tüm dünyada hızlı yayılışı stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde önemli bir sorun oluşturmıştır (Hiramatsu ve ark., 2001; Ergon ve ark., 2010). Tedavide problem yaratan direnç özellikleri içerisinde kuşkusuz en önemlisi metisilin direncidir. Son 10 yıl içinde, metisilin direncinin, metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA) suşlarının “Staphylococcal Cassette Chromosome” *mec* (SCC*mec*) adlı genetik elemanı edinmeleri ile geliştiği ortaya çıkarılmıştır. Gerçekte SCC’ler, stafilokok türleri arasında bir genetik

aktarım aracı olan genomik bir adadır. SCC mec ise, metisilin direnci taşıyan özel bir SCC tipidir (Katayama ve ark., 2000; Oliveira, 2002; Hiramatsu, 2001; Alli ve ark., 2007; Ergon ve ark., 2010).

Berber ve ark., (2008) tarafından yapılan çalışmada, *S. aureus* olarak tanımlanan 81 suştan 46'sının (%56.7) metisiline duyarlı ve 35'inin (%43.3) metisiline dirençli olduğunu bildirilmiştir. Yine bu çalışmada MRSA suşlarının antibiyotiklere direnç oranları; vankomisin %0, siprofloksasin % 54, sülbaktam-ampisilin %60, penisilin G %85, amoksasilin/klavulanik asit %60, ampisilin %88.6, kloromfenikol %14.3, trimetoprim/sülfametoksazol %60, amikazin %45, gentamisin %60 ve eritromisine %20 şeklinde belirlenmiştir.

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde (DEÜ) 2003-2009 yıllarında yatan hastaların kültürlerinden üreyen *S. aureus* izolatlarının %50'sinin metisiline dirençli olduğu saptanmıştır (Ergon ve ark., 2010).

2003-2004 yıllarında DEÜ'de yatan hastalardan alınan kan kültürlerinden izole edilen *S. aureus* izolatları arasında en sık görülen antibiyogram profilini taşıyan 9 MRSA suşu seçilmiştir. İzolatların tümü vankomisin, trimetoprim/sülfametoksazol duyarlı ve oksasilin, eritromisin, gentamisin ve siprofloksasin dirençli bulunmuştur (Ergon ve ark., 2010).

Arıdoğan ve ark., (2004) İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Acil Mikrobiyoloji Laboratuvarına 2002 yılında gelen çeşitli klinik örneklerden izole edilen 114 *S. aureus* suşunu incelenmişler %41'ini MRSA ve %59'unu MSSA olarak tanımlamışlardır. MRSA suşlarının 20'sinde (%34) gentamisin, ofloksasin, klindamisin ve eritromisin antibiyotiklerinin tümüne direnç belirlenmiştir; MSSA suşlarında ise bu oran %2 olarak saptanmıştır. Trimetoprim/sülfametoksazol direnci MRSA ve MSSA suşlarında sırasıyla %7 ve %11, gentamisin direnci %76 ve %7, eritromisin direnci %64 ve %19 olarak bulunmuştur.

Üslü (2007) yaptığı çalışmada MSSA suşlarının amoksisilin-klavulanik asit'e %59, penisiline %94, tetrasikline %41, streptomisin ve sülbaktam/ampisiline %6 eritromisin, gentamisin, rifampisin ve vankomisine %0 direnç; MRSA suşlarının ise amoksisilin/klavulanik asit, gentamisin, penisilin ve tetrasikline %100, streptomisine %97, sülbaktam/ampisiline %50, eritromisine %70, rifampisine %86, vankomisine %0 direnç gösterdiklerini belirlemişlerdir.

Sağlık Bakanlığı Ankara Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nden izole edilen 214 stafilokok örneğinin %38'si koagülaz pozitif

bulunmuştur. Bunlardan %42'si MRSA ve %59'u MSSA'dır. MRSA'ların sülfametaksazol/trimetoprim, teikoplanin ve vankomisin haricindeki antibiyotiklere direnç oranları yüksek bulunurken, MSSA'ların %90 oranıyla penisiline ve çok düşük oranlarda siprofloksasin ve gentamisine dirençli oldukları belirlenmiştir. Sağlık Bakanlığı Ankara Dışkapı Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesinden izole edilen 218 stafilokok örneğinden %13'ü koagülaz pozitif, bunların %30'u MRSA ve %70'i MSSA olarak bulunmuştur (Akıner, 2006).

Metisiline dirençli stafilokok suşlarının tüm beta-laktam antibiyotiklere ve beta laktam/beta laktamaz inhibitör kombinasyonlarına direnç gösterdiği bilinmektedir. Aynı zamanda bu bakterilerin genellikle makrolidlere, aminoglikozidlere, kinolonlara, trimetoprim/sülfametoksazole de dirençli olduğu belirtilmektedir (Verhoef ve Schmit, 1999; Arıdoğan, 2004).

Çelen ve ark., (2005) tarafından yapılan çalışmada hastanede yatan hastaların çeşitli klinik örneklerinden izole edilen toplam 125 *S. aureus* suşunun %44.8'i metisiline duyarlı iken %55.2'si metisiline dirençli bulunmuştur.

Metisiline dirençli stafilokokların neden olduğu ciddi infeksiyonların tedavisinde vankomisin yıllardır ilk ve tek seçenek olarak kalmıştır. 1997 yılında önce Hiramatsu tarafından Japonya'da, daha sonra Centers for Disease Control and Prevention (CDC) tarafından ABD'de vankomisine duyarlılığı azalmış (MİK = 8 mg/L) ilk *S. aureus* kökenleri bildirilmiştir (Hiramatsu ve ark., 1997; CDC, 1997). Bu kökenler vankomisin-intermediate *S. aureus* (VISA) veya glikopeptid-intermediate *S. aureus* (GISA) olarak adlandırılmışlardır. Ne yazık ki, 2002 yılının ikinci yarısında ABD'de arka arkaya iki vankomisin dirençli *S. aureus* (MİK > 32 mg/L) kökeni bildirilmiş ve böylece bu tür bakterilerle oluşan infeksiyonların tedavisinde elimizdeki son silah da etkisiz hale gelmiştir (CDC, 2002).

Vankomisininin sık kullanımına paralel olarak *S. aureus*'ta gözlenen azalmış glikopeptid duyarlılığının Avrupa'da, Japonya'dakine benzer şekilde, %1.3-20'ye ulaşabileceği belirtilmektedir. Bu nedenle MRSA'larda vankomisin kullanımına alternatif olarak tedavide fusidik asit-rifampisin veya fusidik asit-trimetoprim gibi ilaç kombinasyonları önerilmiştir (Geisel ve ark., 2001; Çelen ve ark., 2005).

2.2.4. İdentifikasyon ve Karakterizasyon

Mikroorganizmaların biyokimyasal ve morfolojik özelliklerinden yararlanılarak cins ve tür düzeyinde tanımlama yapılabilmektedir. Patojenik bakterilerin tür düzeyinde tanınması hastalığın epidemiyolojisini aydınlatmak açısından mutlaka gereklidir. Ancak morfolojik özellikler ve klasik metotlar bazen tür, genellikle tür altı düzeyde tanı için yetersiz kalmaktadır. Bunun için moleküler yöntemler kullanılmaktadır (Alan, 2007).

Staphylococcus aureus suşlarının tiplendirilmesinde kullanılan yöntemler geleneksel ve moleküler yöntemler olmak üzere ikiye ayrılır. Konvansiyonel yöntemler, genetik bilginin ekspresyonu ile ortaya çıkan özelliklere göre mikroorganizmaların birbirleri ile ilişkili olup olmadığını ortaya koymaktadır. Bu yöntemler arasında biyotiplendirme, antimikrobiyal duyarlılık testleri, faj tiplendirme, kapsüler serotiplendirme gibi klasik yöntemler yer alır. Biyotipik özelliklerden klasik olarak sınıflandırılmada ve çoğu klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında rutin olarak türlerin identifikasyonunda yararlanılmaktadır. Antibiyotik direnç fenotiplerindeki değişiklikler nedeniyle antibiyotik tiplendirmesinin epidemiyolojik olarak değeri sınırlıdır. Epidemiyolojik çalışmalarda bakteriler değişik bakteriyofajlara olan duyarlılık ve dirençlerine göre tiplendirilmektedir. Stafilokoklarla ilgili tiplendirme sistemleri arasında sadece faj tiplendirilmesi standardize edilmiştir. 'International Subcommittee on Phage Typing of Staphylococci' tarafından günümüzde kullanımı önerilen 23 adet standart faj vardır. *S. aureus*'un epidemiyolojik analizinde bakteriyofaj tiplendirmenin yaygın kullanımı 1940'lı yıllarda olmuştur. Faj tiplendirmenin dezavantajı stok fajların ve kontrol suşlarının ancak referans laboratuvarlarında bulunması, zayıf tekrarlanabilirlik ve ayırım gücüdür (Schlichting ve ark., 1993; Demirpek, 2006). Fenotipik farklılıkları ortaya koyan tiplendirme yöntemlerin dezavantajı mikroorganizmaların fenotipik özelliklerinin değişmesidir.

Moleküler tiplendirme yöntemleri epidemiyolojik olarak ilişkisiz izolatlar arasındaki genetik farklılıkları ortaya koyarlar. Moleküler yöntemler arasında; plazmid tiplendirme, PFGE (Ichiyama ve ark., 1991; Linhardt ve ark., 1992; Prevost ve ark., 1992; Tenover ve ark., 1994; Zshöck ve ark., 2000; Buzzola ve ark., 2001), PCR analizi (Maslow ve ark., 1993), Randomly Fragmented Leght Polymorphism (RFLP) (Tenover ve ark., 1994), toplam hücre içi ve hücre dışı proteinlerin SDS-PAGE ve Native-PAGE ile analizi (Costas ve ark., 1989; Berber ve ark., 2003; Berber ve ark., 2010) ve 16S

rRNA dizi analizi (Ash ve ark., 1991; Berber ve Cokmus; 2001; Berber, 2004) gibi yöntemler yer alır.

Plazmid profil analizi teknik olarak basittir ve *S. aureus*'larda kullanılan DNA'ya dayalı ilk tiplendirme yöntemidir. Bu yöntemde öncelikle plazmid DNA'sı eksrakte edilir ve daha sonra rutin agaroz jel elektroforezi ile bakterilerin taşıdığı plazmidlerin sayısı ve büyüklükleri belirlenir (Demirpek, 2006).

DNA moleküllerinin analizinde çok değişik yöntemler kullanılmakla birlikte tüm laboratuarlarda rutin olarak yararlanılan en basit yöntemlerden biri jel elektroforezidir. Yöntemin avantajları basit ve hızlı olması, ayrıca diğer yöntemlerle yeterli düzeyde ayıramayan DNA fragmentlerinin ayrılabilmesini sağlamaktır. Geliştirilmiş elektroforetik teknikler içinde nükleik asitler için en çok kullanılanı agaroz jel elektroforezi olmakla birlikte Pulsed-Field Gel elektroforezi (PFGE) son yıllarda geniş kullanım alanı bulmaktadır. PFGE agaroz jel elektroforezi ile ayıramayan megabaz büyüklüğündeki DNA parçalarını ayırmasını yapmak mümkündür. Bir salgından elde edilen epidemiyolojik olarak ilişkili izolatların tanınmasında PFGE'nin yüksek etkinlik ve ayırım gücüne sahip olduğu bilinmektedir. MRSA'ların tiplendirilmesinde PFGE diğer yöntemlerden daha etkili bulunmuştur (Temizkan ve Arda, 2008).

Stafilokokların tiplendirilmesinde standart kabul edilen PFGE uzun zaman ve teknik ekipman gerektiren bir yöntem olmasından dolayı yeni tekniklerin arayışına neden olmuştur. Bunların en yenisi polimeraz zincir reaksiyonlarına dayalı tekniklerdir (Demirpek, 2006). Polimeraz zincir reaksiyonu, spesifik bir DNA parçasının kopyalarının primerler tarafından yönlendirilerek, enzimatik olarak sentezlenmesi şeklinde tanımlanan in vitro bir yöntemdir. 1980'li yılların ortasında Cetus firması araştırmacıları tarafından geliştirilmesinin ardından temel moleküler biyolojik araştırmalarda ve birçok hastalığın DNA temeline dayalı tanısı için de klinik tıpta hızla kullanılmaya başlanmıştır (Temizkan ve Arda, 2008). Rutin klinik muayeneler hastalık ajanlarının izolasyonu ve idendifikasyonunda oldukça zaman almakta ve bazen yanlış pozitif ve negatif sonuçlar vermektedir. PCR analizi bu gibi olgularda büyük kolaylık sağlamaktadır. Klonlama, genetik tiplendirme ve dizileme gibi amaçlarla çeşitli PCR çeşitleri geliştirilmiştir. Bunlar arasında; Nested-PCR, Anchored-PCR, Revers-PCR, Asimetrik PCR, Inverse-PCR, Multipleks-PCR, RAPD-PCR yer alır. MRSA tiplendirilmesinde kullanılan modifikasyonlar; koagulaz geninin PCR-RFLP ile

incelenmesi, Protein A geninin PCR-RFLP ile incelenmesi, arbitrarily Primed PCR ve rep-PCR yöntemidir (Demirpek, 2006).

Bakteriyel sınıflandırma ve karakterizasyonda protein elektroforezleri geniş yer tutar. Bakteri genomundaki bütün nükleotid dizilerden sonra bir hücre hakkında ikinci düzey bilgi hücresel proteinlerce sağlanır ve farklı tipteki elektroforez tipleri bu düzeydeki yakınlığı keşfetmek için kullanılır. SDS-PAGE ile toplam hücre protein profilleri analizleri son zamanlarda bakterilerin identifikasyonunda kullanışlı bir metot olarak kabul edilmektedir (Berber ve ark., 2003).

Berber ve ark., (2003) tarafından yapılan çalışmada farklı türlere ait toplam 50 stafilokok suşlarının karakterizasyonu sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezinin (SDS-PAGE) kullanıldığı toplam hücre ve hücre dışı protein bantları ile sağlanmıştır. Sonuçlar stafilokok suşlarının izolasyonunda ve epidemiyolojik bilgilendirmede elektroforetik metodun faydalı olduğu göstermiştir.

Ergon ve ark., (2010) tarafından yapılan çalışmada, 2003-2004 yıllarında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde hakim olan metisilin dirençli MRSA klon/klonlarının dünyada iyi bilinen klonların bazıları ile ilişkisinin DNA *Sma* I makrorestriksiyon analizi, ribozomal-spacer RS-PCR, multipleks PCR ile SCC*mec* tipi belirlenmesi, multiloküs sekans tiplendirme ve *spa* tiplendirme yöntemleri ile araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada, MRSA izolatları arasında PFGE ile dört farklı patern saptanmasına rağmen esas olarak bir klonal tip ve bunun bir alt tipinin hakim olduğu görülmüştür. Biri dışında tüm MRSA izolatları, RS-PCR ile PR 109 paternine benzer bir ribozomal ara bölge paterne sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca multipleks PCR kullanılarak SCC*mec* tipleri incelendiğinde *mecA* bandı tüm izolatlar ve kontrollerde saptanmıştır.

Nema ve ark., (2007) tarafından yapılan çalışmada, *S. aureus* izolatları toplam hücre protein profilleri, 16S rDNA RFLP, RAPD ve 16S rDNA gen dizi analizleri kullanılarak karakterize edilmiştir. İzolatların toplam hücre protein özütlerinin SDS-PAGE profilleri %78.9'dan fazla benzerlik göstermiştir. Bu teknoloji tek başına izolatlar arasındaki benzerlikleri kesin olarak kabul etmek için kullanışlı değildir. Bunun için diğer metotlarla birlikte kullanılmasının daha yararlı olduğu rapor edilmiştir (Malik ve ark., 2003; Sazakli ve ark., 2005). 16S rDNA analizinde izolatların hepsinde benzer diziler görülmüştür. RAPD-PCR suş düzeyinde organizmaların sınıflandırılmasında kullanılan yararlı bir teknolojidir ve önceleri birkaç çalışmacı

tarafından sadece *S. aureus* (Grundmann ve ark., 2002; Olorunfemi ve ark., 2005) suşları için değil, diğer türler için de kullanılmıştır.

Poyart ve ark., (2001) *sodA* genine dahil bir fragmenti çoğaltmak için bir çift dejenere primer belirlemiş ve bu metodla stafilocok türlerinin bir çoğu ayırt edilmiştir. Kwok ve Chow (2003) stafilocok türlerinin taksonomik ve filogenik çalışmalar *hsp60* geninin ve Drancourt ve Raoult (2002) *rpoB* geninin kullanışını belirlemiştir. Bu genler stafilocok türleri arasındaki farklılıkları da 16S rDNA geninden daha ayrıntılı hedeflerdir ancak bu metodlar PCR ürünü dizilere ihtiyaç duymaktadır.

Martineau ve ark., (1998) *S. aureus* ve *S. epidermidis* türlerinin identifikasyonunda multipleks PCR geliştirmiştir. Mason ve ark., (2001) oksasilin-dirençli stafilocokların belirlenmesinde ve koagulaz negatif stafilocoklardan *S. aureus* türlerinin ayrımında ve diğer cinslerden stafilocokların ayrımında multipleks-PCR kullanılabileceğini rapor etmişlerdir (Morot-Bizot ve ark., 2004).

Staphylococcus aureus hem toplum hem de hastane kaynaklı enfeksiyonlara neden olan önemli bir patojendir. Antibiyotiklere karşı geliştirdikleri direnç mekanizmaları sayesinde neden oldukları hastalıkların tedavisi her geçen gün daha da zorlaşmaktadır. Suşların doğru teşhisi, tedavi süresini kısaltmakta ve maliyetini düşürmektedir. *S. aureus* izolatların tanısında fenotipik yöntemlerin yanında moleküler yöntemlerinde kullanılması daha kısa sürede kesin sonuç almayı sağlamaktadır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. İzolatların Toplanması

Bu çalışmanın materyallerini; Sinop Ağız Diş Sağlığı Merkezi ve Gerze Devlet Hastanesine gelen hastaların periodontal doku ve diş çürüklerinden izole edilen 54 adet *S. aureus* izolatu ve 3 adet referans suş (ATCC 25923, ATCC 6538, RSHM) oluşturdu. Hastaların tıbbi geçmişine bakılmaksızın periodontal doku ve diş çürüklerinden steril eküvyonlar (GBL, EN ISO 9001/2000) ile alınan örneklerden aynı gün içerisinde Mannitol Salt Agar besiyeri yerine ekimler yapıldıktan sonra 37°C'de 24 saat geliştirildi. Gelişen kolonilerden Gram boyama yapıldı ve Gram-pozitif kok olarak görülen koloniler Müller Hilton Agar ve yatık Müller Hilton Agar besiyerinde bir gece geliştirilerek saf stok kültürleri hazırlandı. Stok kültürler 2 ayda bir pasaj yapılmak suretiyle kültürlerin devamlılığı sağlandı.

3.1.2. İzolatların Teşhisi ve Analizi

İzolatların teşhisinde kullanılan besiyerleri EK-1'de, Poliakrilamid Jel Elektrophoretisinde kullanılan tampon ve çözeltiler EK-2'de, kullanılan boya ve çözeltiler EK-3'de, antibiyogram testinde kullanılan standart değerler EK-4'te verildi.

3.2. Yöntem

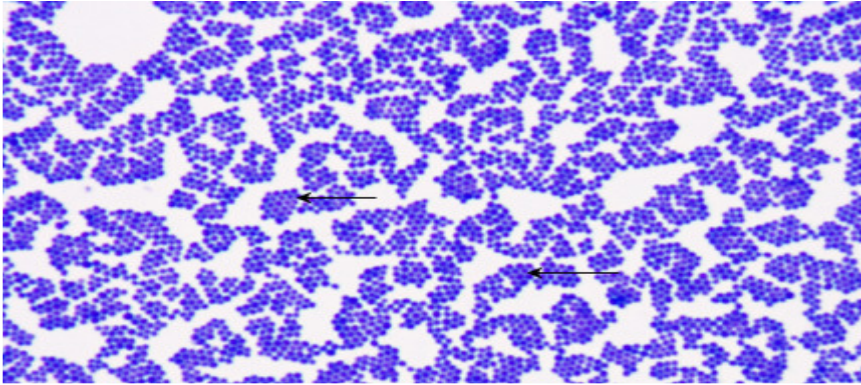
3.2.1. Suşların Teşhisi

Belirlenen hastanelere gelen hastalardan alınan; diş doku ve diş çürüğü kültürlerinden steril eküvyon kullanılarak alınan sürüntülerden Mannitol Salt Agar besiyeri yerine ekimler yapıldı. İncelenen suşlara, Gram boyama, katalaz, oksidaz, basitrasın hassasiyeti, hemoliz, koagulaz, glisin ve eritromisin içeren agarda gelişme, %10 NaCl içeren Nutrient Broth'da gelişme, polimiksin B dirençliliği, Nutrient Agar'da pigmentasyon, DNaz, üreaz, jelatinaz, β laktamaz, Voges-Proskauer ve Metil-Red testi,

lesitinaz, nitrat redüktaz, glikoz, maltoz, süktroz, mannoz, laktoz, ksiloz, trehaloz, fruktoz, galaktoz, sorbitol, glikozun anaerobik fermentasyonu ve mannitolün anaerobik fermentasyonu testleri uygulandı (Götz ve ark., 2006; Schleifer ve Bell, 2009).

3.2.1.1. Gram Boyama

Temel olarak morfolojik inceleme için yapıldı. Bir gecelik Müller Hinton Agar besi yerinde gelişen kültürlerden steril bir öze ile örnek alınarak bir damla serum fizyolojik bulunan lam üzerinde homojen bir şekilde yayıldı, havada kurutuldu ve alevden geçirilerek fikse edildi. Preparat üzerine sırasıyla kristal viyole boyası damlatılarak 1 dakika, iyot solüsyonu damlatılarak 1-2 dakika muamele edildi. Lam steril su ile yıkandı ve yaklaşık 30 saniye kadar alkol ile deklorize edildi ve tekrar saf su ile yıkandı. Son olarak safranin çözeltisi damlatılıp 1 dakika beklendi. Lam saf su ile yıkandıktan sonra havada kurutuldu. Lam üzerine bir damla immersiyon yağı damlatılıp 100x büyütme güçlü objektifte incelendi (Leica DM 500, Germany). Mor renkte görünenler Gram-pozitif olarak değerlendirildi.



Şekil 3.1. *Staphylococcus aureus*'un mikroskop görüntüsü (100x)

3.2.1.2. Karbonhidrat Testleri

Bu test, mikroorganizmaların çeşitli spesifik karbonhidratları ayrıştırma yeteneklerini belirlemek amacıyla yapıldı. Mikroorganizmalar karbonhidratları, kendileri tarafından sentezlenen hidrolaz enzimleri yardımı ile ayrıştırırlar. Ancak bu yetenek mikroplar arasında oldukça fazla değişiklik gösterdiği gibi, bir türe ait mikroorganizmalar arasında da ayrı fermentasyon özelliği gösteren variant suşlar da meydana çıkmaktadır. Bu nedenle bakterilerin identifikasyonunda sıklıkla kullanılır.

Herhangi bir besi yerinde bulunan şekerin bakterilerce fermentasyonu sonucunda asit oluşup oluşmadığı besi yerinde bulunan pH indikatörünün asidite ile birlikte renklerinin değişmesiyle anlaşılır.

Bu testler için; bileşiminde pepton, test edilecek karbonhidrat ve pH indikatörü olan besi yeri kullanıldı. Bu amaçla en yaygın kullanılan Fenol Red Broth Base besi yeridir. Besi yeri distile su içinde eritilip tüplere 5 ml dağıtılıp 121°C’ de 20 dk steril edildi (Tuttnauer, 3850 MLV, Israel). Tüplere test edilecek bakteri ilavesinden sonra 37°C’de 24 saat inkübasyona (Nüve EN 500, Türkiye) bırakıldı. Karbonhidratları karbon kaynağı olarak kullanan izolatlar asitik ürünler açığa çıkacağından pH indikatörü olan Fenol Red kırmızı renginden sarıya dönecektir. Sarı renge dönen tüplerde sonuç pozitif olarak değerlendirildi.

Bu çalışmada; glikoz, laktoz, maltoz, mannoz, ksiloz, trehaloz, fruktoz, galaktoz, sükroz ve sorbitol kullanıldı.

3.2.1.3. Glikozun Anaerobik Fermantasyonu

Glikozon anaerobik fermentasyonu için; glikoz içeren broth besi yeri 5 ml olarak şekilde tüplere taksim edildi ve 121°C’de 15 dk steril edildi. BHA’da bir gece geliştirilen kültürlerden bir koloni alınarak glikoz içeren sıvı besi yerine pasaj yapıldı. Üzerine steril parafin ya da 1 ml gliserol ilave edildi. Böylelikle anaerobik ortam oluşturuldu. Ekim yapılan tüpler 37°C’de 24-72 saat geliştirildi. Sarı renk oluşturan tüplerdeki izolatlar pozitif olarak değerlendirildi. Sonuçların daha iyi değerlendirilebilmesi için bir tüpe herhangi bir ekim yapılmadı.

3.2.1.4. Gliserin ve Eritromisin İçeren Besi Yerinde Gelişme

Gliserol (%1), 0.4 µg/ml eritromisin ve indikatör olarak bromkresol mavisi içeren agar bazlı besi yerine BHA besi yerinde bir gece geliştirilen kültürlerden birkaç koloni çizgi ekim yapıldı. 3 günlük inkübasyondan sonra ekim çizgisi boyunca gözlenen sarı renk oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirildi.

3.2.1.5. Katalaz Testi

Bu test, pek çok fakültatif ve aerobik mikroorganizmalarca üretilen katalaz enzimini belirlemek amacıyla yapıldı. Bu enzim toksik olan hidrojen peroksidi su ve oksijene ayırıştırır. BHA'da bir gece geliştirilen kültürlerden bir koloni lam üzerine yayıldı ve üzerine %3'lük Hidrojen Peroksit damlatıldı. Gaz kabarcıkları gözlemlendi. Hızla başlayan ve kısa sürede kaybolmayan kabarcıklar pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi. 20-30 saniye sonra oluşan birkaç küçük kabarcık şeklinde gözlenen ve hemen kaybolanlar negatif sonuç kabul edildi.

3.2.1.6. Oksidaz Testi

Bu test, sitokrom-c oksidaz enziminin varlığı belirlemek amacıyla yapıldı. Bu enzim demir içeren bir hemoproteindir ve aerobik solunuma katılır. Bu amaç için %1'lik tetrametil-p-fenildiamin dihidroklorür çözeltisi hazırlandı. Bir parça filtre kağıdı bu solüsyona emdirildi. BHA'da bir gece geliştirilmiş örnekler bir öze yardımıyla kağıt üzerine yaydırıldı ve 10 sn içinde bakteri kolonisinin temas ettiği yüzeyin koyu mavi renk alması pozitif sonuç olarak değerlendirildi. 60 sn sonucundaki renk değişimlerinde test tekrarlandı. Nikel, krom, platin öze metal yüzeyinde oluşan oksitler testin sonucunun yanlış değerlendirilmesine neden olacağından yerine ağaçtan yapılmış kürdanlar kullanıldı.

3.2.1.7. Voges-Proskauer Testi

Bu test butilen glikol üretimine aracılık eden aseton veya asetil metil karbonil varlığını tespit etmek için yapıldı. MR-VP broth besi yeri tüplere 5'er ml taksim edildikten sonra steril edildi. Bir gecelik bakteri kültürleri tüplere pasaj yapılarak 1-7 gün inkübasyona bırakıldı. Daha sonra tüplere 3 ml %5'lik alfa-naftol solüsyonundan ve 1 ml %40'lik potasyum hidroksit (KOH) solüsyonundan damlatıldı. 10-15 dakika içerisinde kırmızı renk oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirildi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. VP test sonucu (soldaki pozitif sonuç)

3.2.1.8. Metil Red Testi

Bu test karbonhidratlardan ileri seviyede ($\text{pH} \leq 4.4$) asit oluşumunu tespit etmek için kullanıldı. MR-VP broth besi yeri 5'er ml tüplere taksim edildikten sonra steril edildi. Bir gece geliştirilen kültürlerden pasaj yapıldı ve en az 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası tüplere 5'er damla metil red ayırıcı damlatıldı. Kırmızı renk oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirildi.

3.2.1.9. Beta-Laktamaz Testi

Fosfat tamponundan hazırlanan penisilin G (6 mg/ml) çözeltisinden 100 µl steril ependorf tüplerine taksim edildi. Bir gece BHI agarda geliştirilen kolonilerden ependorf tüplerine pasaj yapıldı ve 1 saat oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra üzerine iki damla %1'lik nişasta solüsyonundan ve bir damla iyot çözeltisinden damlatıldı. 10 dk içerisinde mavi rengin kaybolması pozitif sonuç olarak değerlendirildi.

3.2.1.10. Lesitinaz Testi

Yumurta sarısı içeren kanlı agar bazı besiyerine bir gecelik BHA kültürlerinden ekim yapıldı ve 5 gün inkübasyona bırakıldı. Koloni etrafında bulanık zon oluşması pozitif sonuç olarak değerlendirildi.

3.2.1.11. Hemoliz Testi

Bazı bakteriler sahip oldukları çeşitli tipteki hemolizin enzimleri ile kandaki hemoglobini farklı derecelerde hemoliz etme yani parçalama yeteneğine sahiptirler.

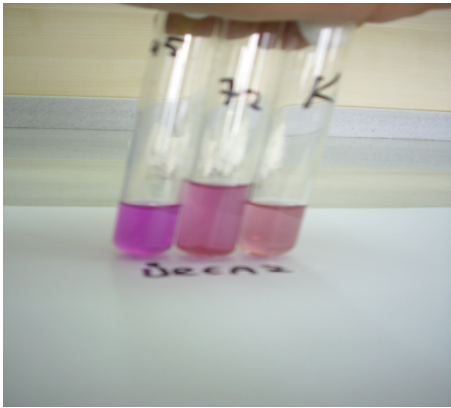
Bakterilerin bu özelliği kanlı agar besiyeri yerinde test edilmektedir. Aksi belirtilmemişse koyun kanı kullanımı esastır. TSA besiyeri yerine %5'lik olacak şekilde koyun kanı ilave edilerek kanlı agar besiyeri hazırlanır. BHA'da gelişen koloniler bu besiyeri çizgi ekim ile inoküle edilir. Bir günlük inkübasyon sonunda koloni etrafında düzgün bir hatla çevrilmiş temiz ve berrak zon oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirilir.

3.2.1.12. Nutrient Agar'da Pigmentasyon

Nutrient Agar besiyeri yerine bir gecelik BHA'da gelişen örneklerden çizgi ekim yapılır. Bir günlük inkübasyon sonrası besiyerinde pigmentasyon gösteren örnekler pozitif olarak değerlendirilir.

3.2.1.13. Üreaz Testi

Bazı bakteriler sentezledikleri üreaz enzimi ile üreyi hidrolize ederek amonyak oluştururlar ve pH'da yükselme meydana gelir. Bu test için üreaz besiyeri kullanılır. Besiyeri distile su içerisinde eritildikten sonra membran filtre (Sartorius) ile steril edilip steril tüplere alınır. Bir gecelik kültürlerden ekim yapılarak 48 saat inkübasyona bırakılır. Üreyi kullanan izolatların gelişimi sonucu amonyak oluşumu ortamın alkali olmasına neden olur ve besiyerinin rengi değişir. Renk değişiminin olduğu örnekler pozitif değerlendirilir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Üreaz test sonuçları

3.2.1.14. Jelatinaz Testi

Mikroorganizmaların proteolitik aktivitesinin veya proteinaz üretip üretmediklerini anlamak için yapıldı. Bu test için Nutrient Jelatin Besi yeri kullanıldı. Bu besi yeri Nutrient Broth'a jelatin karıştırılmasıyla hazırlandı. Besi yeri tüplere 5 ml taksim edilerek 121°C'de 15 dk steril edildi. Sterilizasyondan sonra tüpler dik vaziyette bekletilerek besi yerinin katılaşması sağlandı. Besi yerine ucu doğrultulmuş özelerle dik ekim yapıldı. 37°C'de 7-15 gün inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda tüpler buzdolabına kaldırıldı. 3-5 saat beklendikten sonra besi yerinde sıvılaşma gözlene tüpler pozitif olarak kabul edildi.

3.2.1.15. Koagulaz Testi

Bu test, insan ya da tavşan plazması kullanılarak yapılır. Plazma steril tüplere 1 ml taksim edildi. Bir gecelik BHI agar besi yerinde kültürlerden tek koloni tüplere aşılandı. 1 saatlik aralıklarla koagülasyon gözlemlendi. Tüp incelenirken çalkalanmadan hafifçe eğildi, plazmada koagülasyon gözlenmesi pozitif sonuç olarak değerlendirildi.

3.2.1.16. Basitrasin Hassasiyet Testi

Bir gece Nutrient Broth besi yerinde geliştirilen kültürler steril eküvyonlar ile Triptik Soy Agar besi yerine ekim yapıldı. Besi yerinin yüzeyi kuruyunca 0.04 µg/ml basitrasin diskleri yerleştirildi. Bir gece inkübasyondan sonra zon çapları ölçüldü. Zon çapları 12 mm ve daha fazla olan örnekler basitrasine hassas kabul edildi (Hèbert ve ark., 1988).

3.2.1.17. Metisilin Hassasiyet Testi

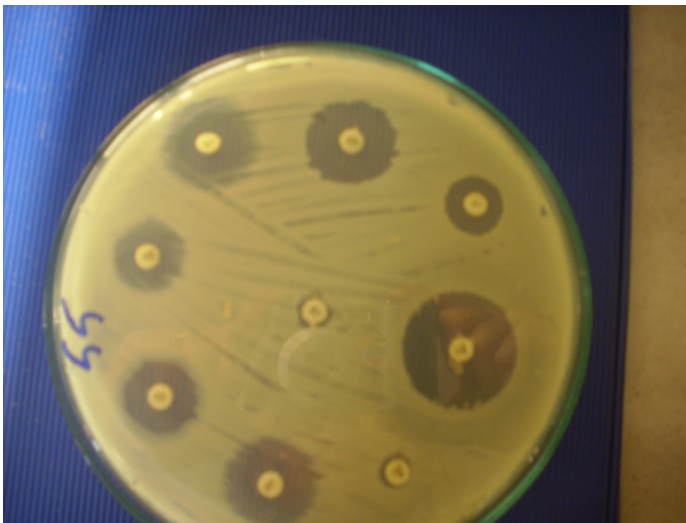
Bir gece Nutrient Broth besiyerinde geliştiren örnekler %4 NaCl içeren MHA besiyerine steril eküvyon ile inoküle edildi. Besi yeri yüzeyi kuruyunca 5 µg/ml oksasilin diskleri yerleştirildi. 37°C'de 2 saat inkübasyondan sonra zon çapları ölçüldü. Zon çapı 9 mm ve daha küçük olan suşlar dirençli olarak kabul edildi.

3.2.1.18. Polimiksin B (300 U) Hassasiyeti

Bir gece Triptik Soy Broth besi yerinde geliştirilen kültürler steril eküvyon ile MHA besi yerine inoküle edildi. Besi yerinin yüzeyi kuruyunca polimiksin B diskleri yerleştirildi ve 37°C’de 24 saatlik inkübasyondan sonra zonlar ölçüldü. Zon çapı 10 mm ve daha küçük olan örnekler dirençli kabul edildi (Hèbert ve ark., 1988).

3.2.1.19. Antibiyotik Duyarlılık Testi

Bu çalışmada izolatların antibiyotiklere duyarlılıkları, National Committee for Clinical Laboratory Standarts (NCCLS) M2-A6 önerileri doğrultusunda Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılarak belirlendi (Anonim, 1996; Berber ve ark., 2008). Nutrient Broth besi yerinde geliştirilen örneklerden MHA besi yerine steril eküvyonla ekim yapıldı. Oda sıcaklığında kuruması için 10-15 dk bekletildikten sonra antibiyotik diskleri agar yüzeyine belirli aralıklarla yerleştirildi. 37°C’de 24 saat inkübasyondan sonra diskler etrafında oluşan zonların çapları milimetrik bir cetvel yardımıyla ölçülerek Clinical and Laboratory Standarts Institute (CLSI) tarafından önerilen değerler esas alınarak değerlendirildi (Şekil 3.4). Araştırmada; ampisilin, sülfametoksazol/trimetoprim, siprofloksasin, amoksisilin/klavulanik asit, imipenem, vankomisin, seftazidim, klindamisin, tetrasiklin, streptomisin, sülbaktam/sefoperazon standard antibiyotik diskleri kullanıldı.



Şekil 3.4. Antibiyogram (disk difüzyon yöntemi) sonuçları

3.2.1.20. DNaz Testi

İncelenecek bakteri kültürlerinden DNaz agar üzerine nokta şeklinde ekim yapıldı. 37°C’de 2-3 gün geliştirildikten sonra besi yeri üzerine 1N HCL damlatıldı. Birkaç dk çalkalandıktan sonra bakteri kolonisinin çevresinde şeffaf bir zonun oluşması pozitif sonuç olarak değerlendirildi.

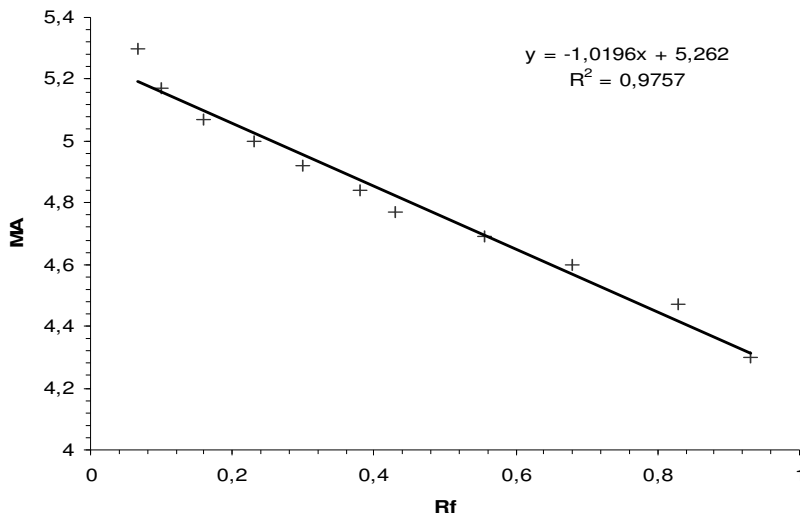
3.2.1.21. Elektroforez için Protein Örneklerinin Hazırlanışı

Toplam hücre proteinlerin ekstraksiyonu için Laemmli (1970)’nin modifiye yöntemi olan ve Berber ve ark. (2003) tarafından geliştirilen yöntem kullanıldı. İzole edilen *S. aureus* suşları arasından seçilen 15 tanesi 24 saat BHA’da geliştirilerek aktive edildi. Gelişen örneklerden 5’er ml BHI broth besi yeri içeren tüplere bir öze dolusu aşılama yapılarak 37°C’de 24 saat geliştirildi. Bu süre sonunda gelişen örneklerden 1.5 ml temiz bir ependorf tüpüne alındı. 12.000 rpm’de 5 dk santrifüj (Hanil Science Industrial, HM-150 IV, Japan) edildi. Süpernatant fazı atılarak pellet üzerine 100 µl serum fizyolojik ilave edilerek 3 kez yıkandı. Yıkama işlemi sonrası kalan pellet üzerine 20 µl örnek tamponu (sample buffer) ilave edildi. Daha sonra 80°C’de 5 dk kaynatılarak çözünür proteinler ekstrakte edildi. Örnekler elektroforez yapılıncaya kadar -20°C’de saklandı.

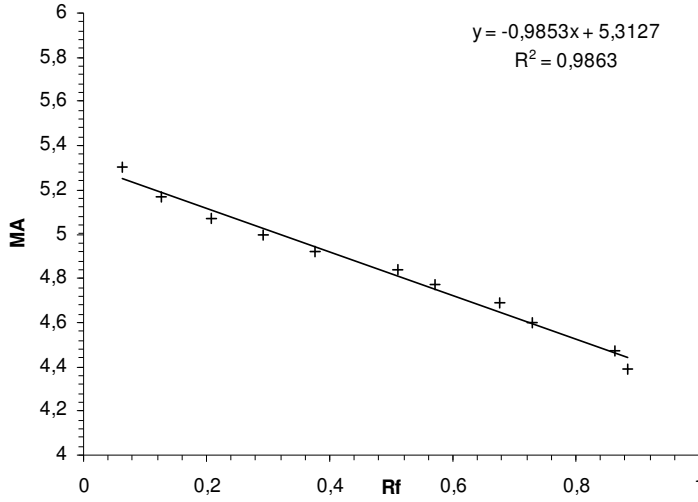
Hücre dışı proteinlerin ekstraksiyonu için Wessel ve Flugge (1984)’nin yöntemi kullanıldı. Gelişen bakteri kültürlerinden uygun miktarda örnek alınıp 12.000 rpm’de santrifüj edildi. Üstte kalan süpernatant kısmından 500 µl alınıp 0.45 µm çaplı membran filtreden (Sartorius) geçirilerek steril ependorf tüplerine transfer edildi. Elektroforez işlemine kadar -70°C’de saklandı. Hücre dışı proteinlerin ekstraksiyonu için süpernatant steril ependorf tüplerine aktarılacak üzerine 400 µl metanol, 200 µl kloroform ve 300 µl distile su ilave edilip 5 dk 10.700 rpm’de santrifüj edildi. Daha sonra üst faz atılıp 300 µl metanol eklenerek 10.700 rpm’de tekrar santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak çökelmiş proteinler oda sıcaklığında kurutuldu. Örneklerin üzerine 25 µl örnek tamponu ilave edilerek 80°C’de 5 dk kaynamış suda bekletilerek hücre dışı proteinler ekstrakte edildi.

3.2.1.22. SDS-PAGE'ın Yapılışı

Ekstrakte edilen toplam hücre ve hücre dışı proteinleri 1mm kalınlığında (%4'lük yığma ve %10'luk ayırıcı) jelde yürütüldü. Yürütme işlemi dikey elektroforez tankında (Thermo Scientific, OWL P8DS, USA) yığma jel boyunca 10 mA ve ayırma jel boyunca 15 mA sabit akım uygulanarak bromfenol blue çizgisi jelin altına ulaşıncaya kadar gerçekleştirildi (Laemmli, 1970). Jel tanktan çıkarılıp boyanması için 6 saat boyama çözeltisinde bırakıldı. Bu süre sonunda protein bantlarının görünür hale gelmesi için 20 dk boya çıkarma çözeltisinde bekletilip jel saklama çözeltisine alınarak saklandı. Belirlenen protein bantlarının molekül ağırlıkları, molekül ağırlığı bilinen (PageRuler™ Unstained Protein Ladder, Fermentas SM0661) standart protein bantları ile elde edilen standart eğrilere göre belirlendi (Şekil 3.5 ve Şekil 3.6).



Şekil 3.5. Toplam hücre protein bantlarının molekül ağırlıklarının tespitinde kullanılan standart eğri; her bir standart proteinin molekül ağırlığının (MA) $\log_{10}$ değeri ile, relatif hareketinin (Rf) karşılaştırılması ile elde edildi.



Şekil 3.6. Hücre dışı protein bantlarının molekül ağırlıklarının tespitinde kullanılan standart eğri; her bir standart proteinin molekül ağırlığının (MA) $\log_{10}$ değeri ile, relatif hareketinin (Rf) karşılaştırılması ile elde edildi.

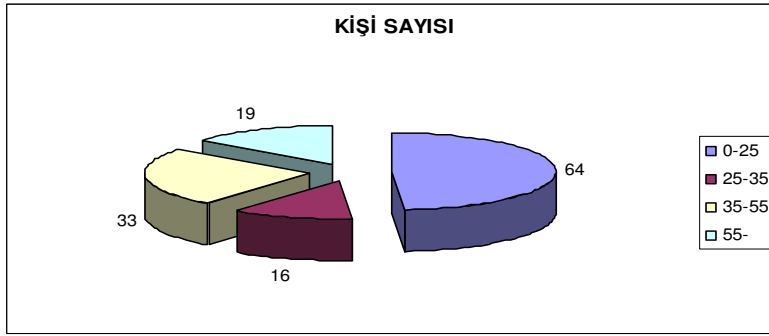
3.2.1.23. Protein Profillerinin İstatistiksel Analizi

Jeller, yüksek çözünürlükte bir tarayıcı (HP Scanjet, G2410) kullanılarak taramıp bilgisayar ortamına aktarıldı. Her bir bandın molekül ağırlığı Total Lab 1D Manual R11.1, UK programı kullanılarak hesaplandı. Kümeleme analizi için veriler 1 (var) 0 (yok) şeklinde kodlandı. Bilgisayar ortamına aktarılan veriler MINITAB versiyon 14.20 (Minitab Inc. Pennsylvania, USA) programında değerlendirildi. Hücre içi ve hücre dışı protein profilleri esas alınarak suşlar arasındaki benzerlikler unweighted pair-group metod using arithmetic averages (UPGMA) metoduyla hesaplanarak dendrogramlar oluşturuldu.

4. BULGULAR

4.1. *Staphylococcus aureus* İzolasyonu ve İdentifikasyon Bulguları

Bu çalışmada, 02.06.2011 ve 02.06.2012 tarihleri arasında Sinop ilindeki hastanelerin diş kliniklerine başvuran 132 hastanın diş çürükleri ve dişetinden steril eküvyon ile alınan örnekler incelendi (Çizelge 4.1). Hastaların 62'si erkek ve 69'u bayan olup yaş gruplarına göre dağılımı Şekil 4.1'de verilmektedir. Şekil 4.1'e göre, araştırmada 0-25 yaş arası 64 hasta, 25-35 yaş arası 16 hasta, 35-55 yaş arası 33 hasta ve 55 üstü 19 hasta bulunduğu ve hastaların yaş ortalamasının 30 olduğu belirlendi.



Şekil 4.1. Hastaların yaş gruplarına göre dağılımı

Steril eküvyonlar kullanılarak 132 hastadan alınan örneklerden MSA besi yerine ekimler yapıldı. Gelişmenin görüldüğü 92 numuneye Gram boyama ve biyokimyasal testler yapıldı. Yapılan biyokimyasal test sonuçlarına göre 54 suş *S. aureus* olarak tanımlandı.

Test sonuçları Çizelge 4.2'de verildi. Suşların tamamı Gram-pozitif, katalaz pozitif, oksidaz negatif olup MSA'da sarı pigmentasyon gösterdi. Ayrıca suşların %87.6'ı mannitolü parçalama ve %90.9 NA'da pigmentasyon, %94.5'i %10 NaCl içeren NB'da gelişme, %94.3'ü gliserin ve eritromisin içeren agarda gelişme, %96.3'ü glikoz anaerobik gelişme gösterdi. Suşların %78.1'i hemoliz, %72.7'si DNaz, %30.9'u jelatinaz, %36.3'ü koagulaz, %65.4'ü lesitinaz, %41.8'i beta-laktamaz, %56.3'ü VP ve MR, %92.7'i nitrat testlerinde pozitif sonuç gösterdi. Suşların %5.4'ü metisiline dirençli, %94.5'i basitrasine dirençli olarak belirlendi.

Çizelge 4.1. İncelenen örneklerin alındığı bölgeler, yaş ve cinsiyet bilgileri

Suşlar	Cinsiyet	Yaş	Alındığı bölge	Hastane
5	By	6	Çürük	ADSM
12	By	7	Çürük	GDH
13	Byn	7	Abse	GDH
16	Byn	8	Çürük	GDH
18A	By	7	Çürük	GDH
18B	By	7	Çürük	GDH
20	By	7	Abse	ADSM
23	By	9	Çürük	GDH
25	Byn	9	Çürük	GDH
27	By	10	Çürük	GDH
28	By	10	Çürük	GDH
31	By	13	Çürük	GDH
32	By	13	Çürük	GDH
33	By	13	Çürük	GDH
40	Byn	11	Çürük	GDH
45	Byn	9	Çürük	GDH
46A	Byn	50	Dişeti	ADSM
47A	By	67	Dişeti	GDH
49	Byn	41	Dişeti	GDH
50	Byn	26	Dişeti	ADSM
51	By	48	Dişeti	GDH
52	Byn	50	Dişeti	ADSM
53	Byn	40	Dişeti	GDH
57	Byn	49	Dişeti	GDH
63	Byn	38	Dişeti	ADSM
64	Byn	55	Dişeti	GDH
66	Byn	46	Çürük	GDH
70	Byn	56	Dişeti	GDH
73	By	55	Dişeti	GDH
74	By	67	Dişeti	GDH
76	By	62	Dişeti	ADSM
78	By	57	Dişeti	GDH
92	By	76	Dişeti	GDH
93A	Byn	15	Çürük	GDH
98B	By	38	Çürük	GDH
100	Byn	37	Dişeti	GDH
103	By	33	Dişeti	ADSM
106	Byn	9	Dişeti	GDH
108	By	26	Dişeti	GDH
109	By	19	Dişeti	ADSM
110	By	35	Dişeti	ADSM
111A	Byn	47	Dişeti	GDH
112A	Byn	41	Dişeti	GDH
115A	Byn	78	Dişeti	ADSM
120	By	12	Dişeti	GDH
121A	By	11	Dişeti	GDH
121B	By	11	Çürük	GDH
122A	By	12	Dişeti	GDH
124	Byn	11	Dişeti	GDH
127	Byn	12	Dişeti	GDH
128	Byn	13	Dişeti	ADSM
129	By	13	Dişeti	GDH
130A	By	13	Dişeti	GDH
130B	By	13	Dişeti	GDH

By: bay; Byn: bayan, GDH: Gerze Devlet Hastanesi; ADSM: Ağız Diş Sağlığı Merkezi

Çizelge 4.2. *Staphylococcus aureus* suşlarının biyokimyasal test sonuçları

Suşlar	Gram boyama	MSA pigmentasyon	Mannitolü parçalama	NA pigmentasyon	Katalaz	Hemoliz	DNaz	% 10 NaCl gelişim	Jelatinaz	Üreaz	Koagulaz	Lesitinaz	Beta-laktamaz	Metisilin hassasiyeti	Basitrasin hassasiyeti	VP testi	MR testi	Glik. Erit. gelişme	Nitrat testi	Oksidaz testi	Glikoz anaerobik geliş.
5	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	S	R	+	+	+	+	-	+
12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	S	R	-	+	+	+	-	+
13	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	S	R	-	+	+	+	-	+
16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	S	R	-	+	+	+	-	+
18A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	S	R	+	+	+	+	-	+
18B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	S	R	-	-	+	+	-	+
20	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	S	R	+	+	+	+	-	+
23	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	S	R	+	-	+	+	-	+
25	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	S	R	+	+	+	+	-	+
27	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	S	R	+	+	+	+	-	+
28	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	S	R	+	-	+	+	-	+
31	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	S	R	+	+	+	+	-	+
32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	S	R	+	+	+	+	-	+
33	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	S	R	+	+	+	+	-	+
40	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	S	R	+	+	+	+	-	+
45	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	S	R	+	-	+	+	-	+
46A	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	R	R	+	+	+	+	-	+
47A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	S	R	+	-	+	+	-	+
49	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	S	R	+	+	+	+	-	+
50	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	S	R	+	+	+	+	-	+
51	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	R	R	+	+	+	+	-	+
52	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	S	R	+	-	+	+	-	+
53	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	S	R	+	+	+	+	-	+
57	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	S	R	-	-	+	+	-	+
63	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	S	R	+	-	-	+	-	+
64	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	S	R	+	-	+	+	-	+
66	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	S	R	+	-	+	+	-	+
70	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	S	R	+	-	+	+	-	+
73	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	S	R	+	-	+	+	-	+
74	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	S	R	-	+	+	+	-	+
76	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	S	R	+	+	+	+	-	+
78	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	S	R	+	-	+	+	-	+
92	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	S	R	+	-	+	+	-	+
93	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	R	R	+	-	+	+	-	+
98B	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	S	S	+	-	+	+	-	+
100	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	S	S	+	-	+	+	-	+
103	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	S	R	-	+	+	-	-	+
106	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	S	R	-	+	+	+	-	+
108	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	S	R	-	-	+	+	-	+
109	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	S	R	-	-	+	+	-	+
110	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	S	R	+	+	+	+	-	+
111A	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	S	R	-	+	+	+	-	+
112A	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	S	R	-	-	+	+	-	+
115A	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	S	R	-	+	+	+	-	+
120	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	S	R	-	-	+	+	-	+
121A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	S	R	-	-	+	+	-	+
121B	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	S	R	-	-	+	-	-	+
122A	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	S	R	-	+	+	+	-	+
124	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	S	R	-	+	+	+	-	+
127	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	S	R	-	+	+	+	-	+
128	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	S	R	-	-	+	+	-	+
129	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	S	R	-	+	+	+	-	+
130A	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	S	R	-	+	+	-	-	-
130B	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	S	R	-	-	-	-	-	-
25923	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	S	R	-	+	+	+	-	+
6538	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	S	R	+	-	+	+	-	+
RSHM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	S	R	-	+	+	+	-	+

(-); olumsuz, (+); olumlu, (S); duyarlı, (R); dirençli

Çizelge 4.3. *Staphylococcus aureus* izolatların karbonhidrat fermentasyon sonuçları

Suşlar	Fruktoz	Galaktoz	Mannoz	Laktoz	Arabinoz	Ksiloz	Maltoz	Sükroz	Trehaloz	Glikoz	Sorbitol
5	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
12	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
13	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
16	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
18A	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
18B	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
23	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
25	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
27	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+
28	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-
31	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
32	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
33	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
40	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
45	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
46A	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
47A	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
49	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
50	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
51	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
52	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
53	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-
57	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-
63	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-
64	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
66	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-
70	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-
73	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
74	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-
76	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
78	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-
92	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
93	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
98B	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
100	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
103	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
106	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+
108	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-
109	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-
110	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
111A	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-
112A	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-
115A	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
120	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+
121A	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-
121B	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-
122A	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-
124	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-
127	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+
128	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
129	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-
130A	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+
130B	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+
25923	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
6538	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
RSHM	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-

(-) olumsuz; (+) pozitif

Yapılan karbonhidrat testlerine ait sonuçlar Çizelge 4.3'te verildi. Test sonuçlarına göre suşların %41.8'inin fruktoz, %36.3'ünün galaktoz, %52.7'sinin mannoz, %29'unun laktoz, %25.4'ünün arabinoz, %47.2'inin maltoz, %67.2'inin sükroz, %32.7'sinin trehaloz, %74.5'inin glikoz ve %30.9'unun sorbitolü kullanabildiği görüldü.

4.2. Antibiyogram Bulguları

Bu çalışmada, 54 yerel ve 3 adet referans olmak üzere toplam 57 adet *S. aureus* suşunun 14 farklı antibiyotiğe karşı duyarlılıkları National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) M2-A6 önerileri doğrultusunda Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılarak belirlendi. Her suşa karşı belirlenen zon çapları CLSI tarafından önerilen değerler (EK-4) esas alınarak değerlendirildi (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.5'de görüldüğü gibi, bütün suşlarda en yüksek direnç ampisilin (%83.6) ve polimiksin B (%43.6)'ye karşı tespit edilirken, siprofloksasin, sülfametoksazol/trimetoprim, sefoperazon/sülbaktam, amoksisilin/klavulanik asit, vankomisin ve klindamisin antibiyotiklerine direnç kaydedilmedi.

Çizelge 4.4. Antibiyotik duyarlılık test sonuçları (%)

Kullanılan antibiyotikler	R	I	S
Siprofloksasin	-	1.8	98.1
Sülfametoksazol/trimetoprim	-	-	100
Sefoperazon/sülbaktam	-	-	100
Amoksisilin/klavulanik asit	3.6	-	96.3
Eritromisin	12.7	16.3	70.9
Vankomisin	-	-	100
Klindamisin	7.2	1.8	90.9
Streptomisin	3.6	10.9	85.4
Tetrasiklin	10	1.8	87.2
İmipenem	-	-	100
Ampisilin	83.6	-	16.3
Novobiyosin	12.7	1.8	85.4
Seftazidin	10.9	12.7	70.3
Polimiksin B	43.6	-	56.3

R: dirençli, I: orta dirençli, S: duyarlı

Çizelge 4.5. *Staphylococcus aureus* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları

Suşlar	Siprofloksasin	Sülfametoksazol/trimetoprim	Sefoperazon/sülbaktam	Amoksisilin/klavulanik asit	Eritromisin	Vankomisin	Klindamisin	Streptomisin	Tetrasiklin	İmipenem	Ampisilin	Novobiyosin	Seftazidim	Polimiksin B
5	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S
12	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R
13	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
16	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S
18A	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R
18B	S	S	S	S	I	S	S	I	S	S	S	S	S	S
20	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	I	S
23	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S
25	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
27	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S
28	S	S	S	S	I	S	R	S	I	S	R	S	S	S
31	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
32	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	R
33	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	R	S	S	S
40	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
45	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R
46A	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S
47A	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	I	R
49	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	R	S	S	S
50	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R	S	R	R
51	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S
52	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R
53	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	R	S	S	R
57	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	R	S	R	S
63	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
64	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
66	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
70	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	R	S
73	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	R	S	S	R
74	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R
76	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S
78	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S
92	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
93	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	I	S
98B	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S

Devamı arkada

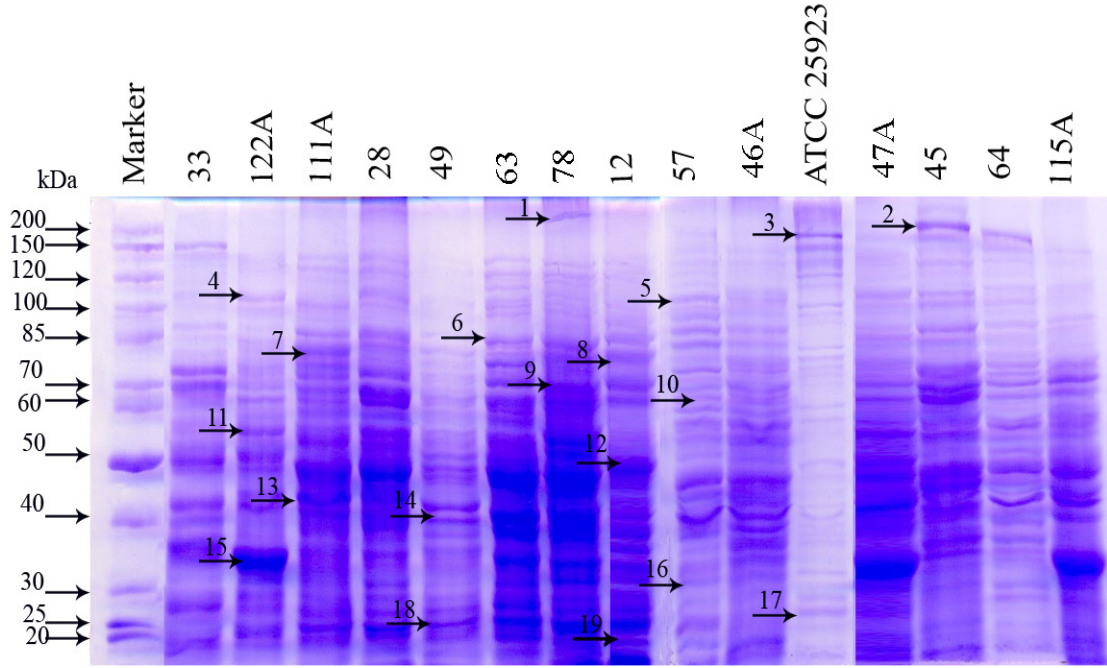
Çizelge 4.5'in Devamı

Suşlar	Siprofloksasin	Sülfametoksazol/trimetoprim	Sefoperazon/sülbaktam	Amoksisilin/klavulanik asit	Eritromisin	Vankomisin	Klindamisin	Streptomisin	Tetrasiklin	Imipenem	Ampisilin	Novobiyosin	Seftazidim	Polimiksin B
100	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	R	S	R	R
103	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R
106	S	S	S	S	I	S	S	S	R	S	R	S	S	S
108	S	S	S	S	I	S	S	S	R	S	R	S	I	S
109	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	R	S	I	R
110	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	R	S	I	R
111A	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S
112A	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R
115A	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	S	R
120	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R
121A	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	I	R
121B	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	I	S	S
122A	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R
124	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R
127	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S
128	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	R	S	S	R
129	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	R	S	S	R
130A	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S
130B	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S
25923	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R
6538	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	R
RSHM	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	I	S

R: dirençli, I: orta dirençli, S: duyarlı

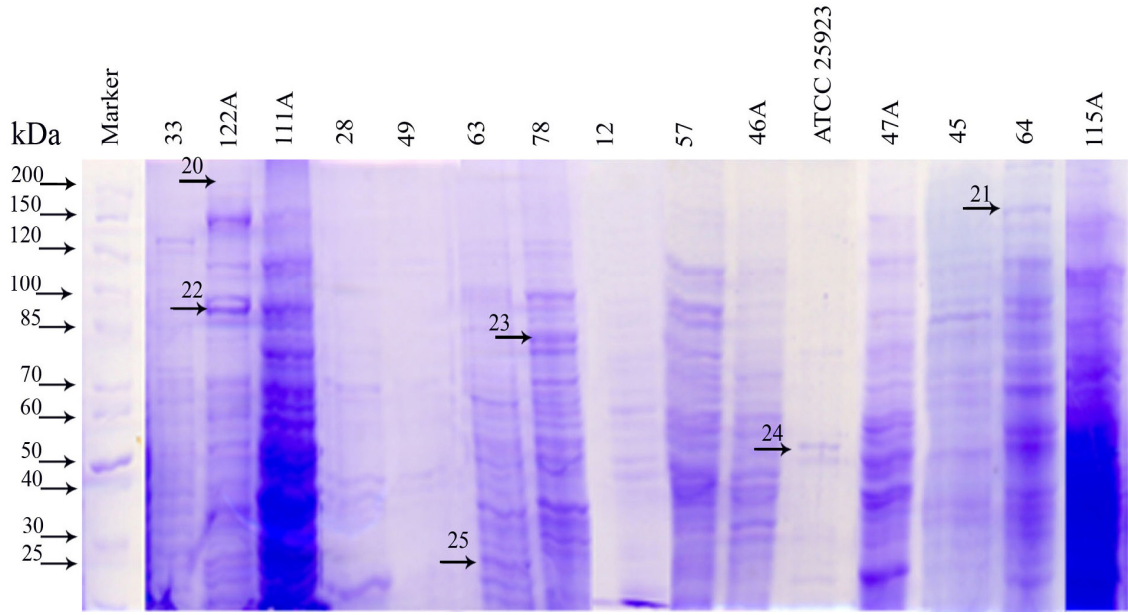
4.3. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforez (PAGE) Bulguları

Araştırmamızda, 54 adet *S. aureus* suşu içerisinde seçilen 14 izolat ve 1 referans suşun SDS-PAGE tekniği kullanılarak elde edilen toplam hücre protein profilleri ve hücre dışı protein profilleri Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'de verildi.



Şekil 4.2. 15 adet *S. aureus* suşunun SDS-PAGE ile elde edilen toplam hücre protein profilleri

Her bir suşun yüksek (200-70 kDa) ve düşük (60-15 kDa) molekül ağırlığındaki toplam hücre protein profilleri arasında benzerlik seviyesinin yüksek olduğu belirlendi. Özellikle 4 (111 kDa), 5 (110 kDa), 7 (84 kDa), 8 (kDa), 9 (kDa), 10 (66 kDa), 13 (41 kDa), 16 (kDa) ve 19 (20 kDa) ile işaretlenen bantların bütün suşlarda ortak oldukları saptandı. Ayrıca, suşlar arasında bazı minör bant farklılıkları da görüldü. Örneğin, 200 kDa'dan daha yüksek molekül ağırlığına sahip ve 1 ile gösterilen protein bandı ATCC 25923, 45 ve 78 numaralı suşlarda; 2 (160 kDa) ile gösterilen protein bandı ATCC 25923, 45 ve 64 numaralı suşlarda görüldü. 11 (57 kDa) ile gösterilen protein bandı 12 ve ATCC 25923; 17 (23 kDa) ile gösterilen protein bandı ise 33, 46A ve 57 ile numaralı suşlar hariç diğer bütün suşlarda tespit edildi. Ayrıca, 15 (29 kDa) ile işaretlenen protein bandı 47A, 115A ve 122A'da görüldü.



Şekil 4.3. 15 adet *S. aureus* suşunun SDS-PAGE ile elde edilen hücre dışı protein profilleri

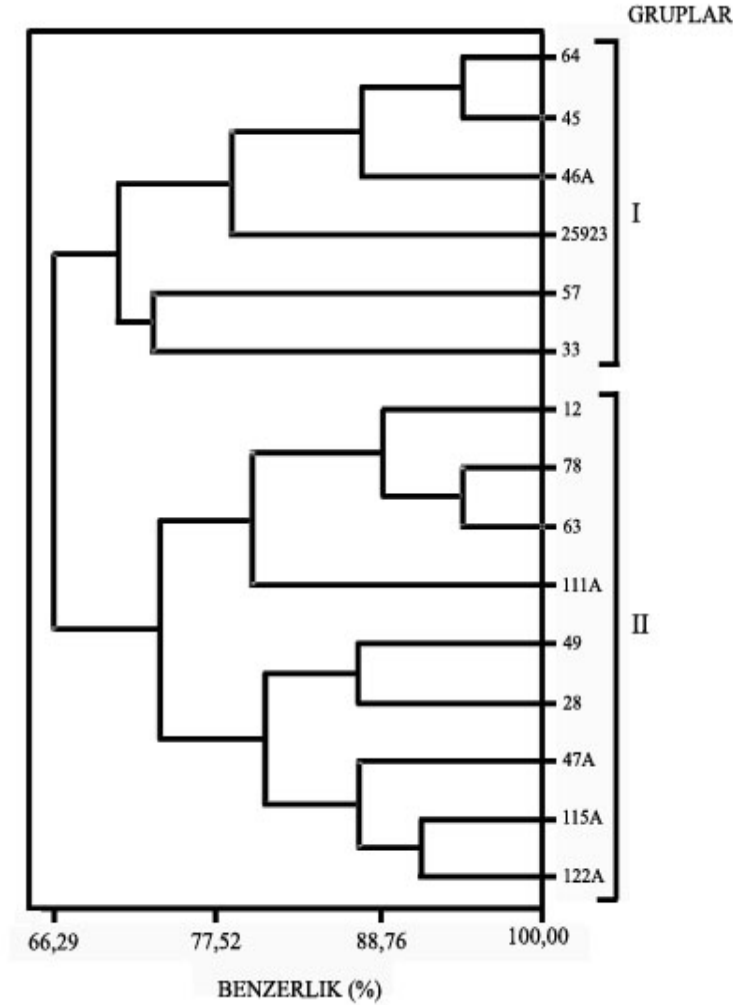
Staphylococcus aureus suşları için hücre dışı protein profilleri (Şekil 4.2) arasında da bazı farklılıklar tespit edildi. Örneğin, 20 ile gösterilen 200 kDa molekül ağırlığındaki protein bandı 115A ve 122A suşlarında görüldü. Diğer taraftan, 21 (158 kDa) numaralı protein bandı 23, 47A, 57, 64, 111A ve 122A; 22 (83 kDa) ile işaretlenen protein bandı ise 45, 47A 64, 78, 111A ve 115A numaralı suşlarda saptandı. 24 (45 kDa) ve 25 (26 kDa) ile kodlanan protein bandları ise 28 ve 48 suşlar haricinde diğer bütün suşlarda görüldü.

4.4. *Staphylococcus aureus* Suşları Arasındaki Kümeleme Analiz Bulguları

Araştırmada, 14 yerel ve 1 referans suş olmak üzere toplam 15 adet *S. aureus* suşunun SDS-PAGE ile elde edilen toplam hücre ve hücre dışı protein profilleri jel üzerinde çıplak gözle incelendi. Toplam hücre profilleri için 27 ve hücre dışı profilleri için 20 farklı dominant protein bandı ikili veri şeklinde (1, var; 0, yok) bilgisayar ortamına aktarıldı ve MINITAB versiyon 14.20 programında değerlendirildi.

Toplam hücre ve hücre dışı protein profilleri esas alınarak suşlar arasındaki benzerlikler unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA) metoduyla hesaplanarak dendrogramlar oluşturuldu (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6).

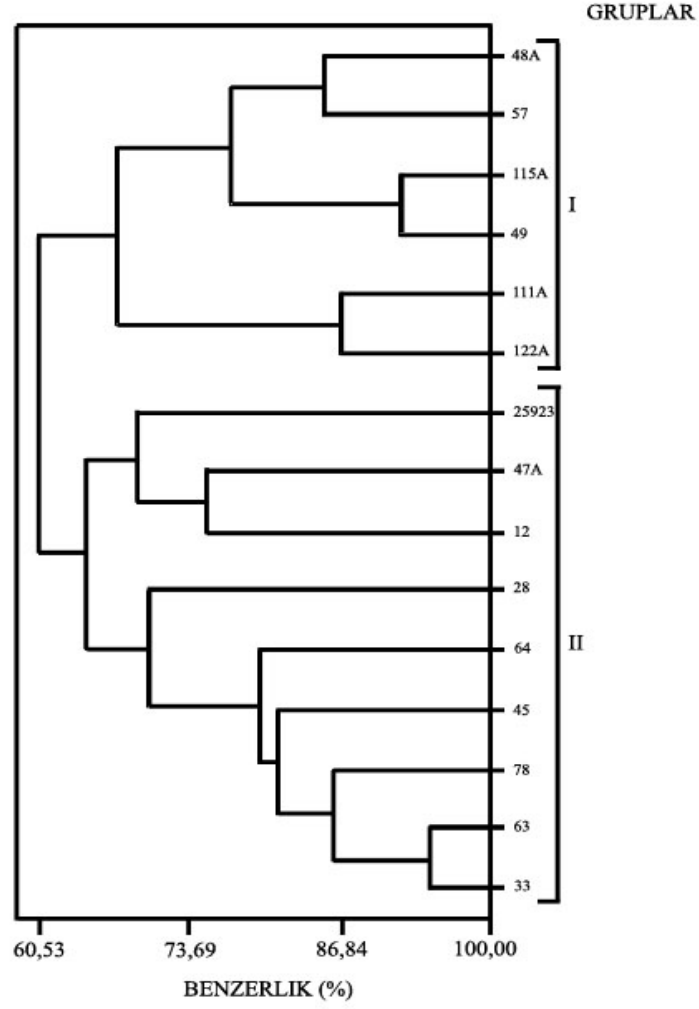
Staphylococcus aureus suşlarının toplam hücre protein profilleri benzerlik düzeyi %66.29 ve üzerinde 2 major gruba ayrıldı (Şekil 4.5). Birinci grup toplam 6 suş (33, ATCC 25923, 45, 46A, 57 ve 64) içermekte olup kendi içerisinde benzerlik düzeyi %70,78 ve üzerinde iki alt gruba ayrıldı. İkinci grup ise toplam 9 suş (12, 28, 47A, 49, 63, 78, 111A, 115A ve 122A) içermekte olup yine kendi içerisinde benzerlik düzeyi %73.30 ve üzeri iki alt gruba ayrıldı.



Şekil 4.4. 15 adet *S. aureus* suşunun toplam hücre protein profillerini esas alan ve unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA) metodu kullanılarak oluşturulan dendrogram

Staphylococcus aureus suşlarının hücre dışı protein profilleri esas alınarak yapılan nümerik analiz ise benzerlik düzeyi %60.53 ve üzerinde olan iki major grubu ortaya koydu (Şekil 4.5). Birinci grup toplam 6 suş (48A, 49, 57, 111A, 115A ve 122A) içermekte olup kendi içerisinde benzerlik seviyesi %66.69 ve üzerinde iki alt gruba

ayrıldı. İkinci grup ise 9 suş (12, 28, 33, 45, 47A, 63, 64, 78 ve ATCC 25923) içermekte olup benzerlik seviyesi %64.23 ve üzerinde iki alt gruba ayrıldı.



Şekil 4.5. 15 adet *S. aureus* suşunun hücre dışı protein profillerini esas alan ve unweighted pair-group metod using arithmetic averages (UPGMA) metodu kullanılarak oluşturulan dendrogram

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Dental çürükler ve periodontal hastalıklar; dünyada en yaygın kronik oral hastalıklardır. Periodontal hastalık konak ve bakteri plağı arasındaki karmaşık etkileşimin klinik bir sonucudur. Subgingival plakta yüzlerce çeşit bakteri bulunmakla birlikte sınırlı sayıda bakterinin major patojenik rolü vardır (Dahlén, 2006; Serindağ, 2007). Dental hastalıkların birçoğunun nedeni, biyofilm üreten ve antibiyotik direncinden dolayı farklı oral mikroorganizmalardır. *S. aureus* fırsatçı bir patojendir ve sağlıklı çocuk ve yetişkinlerin yaklaşık olarak %30-50'i *S. aureus* taşıyıcısıdır.

Bu çalışmada, Sinop ilindeki diş polikliniklerine gelen 132 hastanın diş çürükleri ve diş etinden izole edilen 54 adet (%41) *S. aureus* suşunun; biyotiplendirmesi, antibiyotik duyarlılıkları, SDS-PAGE yöntemi ile toplam hücre ve hücre dışı protein profillerine göre ayrımı yapıldı. Yapılan testlerin sonuçlarına göre izolatların %5.4'ü MRSA, %94.5'i MSSA; %36.3 koagulaz pozitif ve %63.6'ı koagulaz negatif olarak belirlendi.

Stafilokoklar, ağız boşluğunda geçici mikroorganizmalar olarak değerlendirilmektedir. Dil haricinde, mukozal yüzeylerden izolasyonuna uygun minimal literatür mevcuttur. Murdoch ve ark., (2004) ağız boşluğundan izole edilen stafilokok türlerinin büyük kısmının koagulaz negatif olduğunu, periodontal hastalardan %7.1 ve kontrol gruplarından %3.6 *Staphylococcus aureus* izole ettiğini rapor etmektedirler. Çalışmamızda izole edilen *S. aureus* suşlarının %63.6 koagulaz negatif olarak tespit edilmiş olup bu sonuç Murdoch ve ark. bulgularıyla uyumludur.

Subgingival alanda stafilokok türlerin varlığı dikkate alındığında literatürde farklılıklar mevcuttur. Rams ve ark., (1990b) yetişkin periodontitis hastaların %50.4'ünden bazı stafilokok türlerini ve Dahlen ve Wikström (1995) ise hastaların %54.4'ünden *S. epidermidis* izole etmişlerdir.

Loberto ve ark., (2004) 88 kronik periodontitisli hastanın 33 tanesinin (%37.50) subgingival plağından, 54'ünün (%61.36) ağız boşluğundan ve 24 tanesinin de (%27.27) her iki alanından stafilokok izole etmişler. Ayrıca, subgingival plaktan %4.55 ve oral kaviteden %22.7 oranında *S. aureus* tanımlamışlardır.

İngiltere'de yapılan bir çalışmada 1998-2000 yılları arasında toplanan 5.005 örnekten 1.017 tanesi *S. aureus* olarak tanımlanmış ve suşların %95'i MSSA ve %5'i MRSA olarak bulunmuştur. Bu oran bizim çalışmamızda belirlediğimiz %5.4 MRSA ve %94.5 MSSA değerine oldukça yakındır. MSSA örnekleri genellikle diş hastanelerinin

oral ilaç kliniklerindeki hastalardan izole edilirken, MRSA örnekleri, bakımevleri, huzur evleri ve genel diş uygulamalarından izole edilmiştir. Ayrıca yaş ile *S. aureus* arasında artan bir oranın olduğu (özellikle 70'in üstündeki yaş gruplarında) bulunmuştur (Smith ve ark., 2003). Bu çalışma şimdiye kadar savunulan genel durumun aksine ağız boşluğundan da *S. aureus* izolasyonu yapılabildiğini desteklemektedir.

Nemoto ve ark., (2008) sağlıklı yetişkin bireylerin ağız boşluğundan stafilokok varlığını ve bu bakterilerin nazal-oral trafikteki rollerini araştırmışlar ve tükürükte %83.9, dental plakta %73.2 stafilokok izolasyonu yapmışlardır. Toplam 99 *S. aureus* suşunun %46.4'ü tükürükten, %33.9 dental plaktan izole edilmiştir. Ayrıca oral stafilokok pozitif kişilerden alınan nazal sürüntü örneklerinin %44.4'ünde *S. aureus* izole edilmiştir. Stafilokoklar nazal floranın yaygın üyelerindendir (Güçlü ve ark., 2007), böylece ağıza geçebilir ayrıca deri florasından da kontaminasyon mümkün olmaktadır.

Brezilya'daki dental kliniklerde 25-50 yaş arası 68 kişi ile çalışılmış ve 65 kişiden *Staphylococcus* spp. izole edilmiştir. Ayrıca, 24 koagülaz pozitif örnekten 9 tanesi *S. aureus* olarak bulunmuştur (Martins ve ark., 2002).

Çalışmamızdaki sonuçlar önceki çalışmalarla kıyaslandığında oldukça yakın sonuçlar gözlenmiştir. Percival ve ark., (1991)' 20-39 yaş arası sağlıklı kişilerin dental plaklarından %17, tükürükten %60; Murdoch ve ark., (2004) sağlıklı kişilerden %43; Rams ve ark., (1990a) gingivitis ve periodontitisli kişilerden %50 oranında stafilokok izole etmiştir. Çalışmamızda %41 oranında *S. aureus* izolasyonu yapılmıştır.

Bazı çalışmalarda burun deliklerinin stafilokok türlerinin bulunabildiği yerler olduğu bildirilmektedir (Parras ve ark., 1995). Suzuki ve ark., 1997'de ağız boşluğunun *S. aureus*'un kaynağı olabileceğini belirtmektedir. Knighton (1965), diş hekimliği öğrencilerinin burun ve ağız boşluklarından koagülaz pozitif stafilokokların bulunuşunu çalışmış ve kişilerin %47.50'inin tükürüğünden, %41.7'inin burun boşluklarından bu mikroorganizmaları izole etmiş ve oral kavitede bulunan patojenik stafilokokların burun boşluğundakiler kadar önemli olduğu sonucuna varılmıştır. Piochi ve Zelante (1973), tükürük örneklerinde %35 ve ağız boşluğunda %13.9 *S. aureus* belirlemiştir.

Souto ve ark., (2006) sağlıklı periodontal alanlar ve kronik periodonditis lezyonlarındaki subgingival plakta bulunan patojenik bakterilerin bulunuşu ve miktarları belirlemek için yaptıkları çalışmada subgingival plaklarda oldukça yaygın 11 patojenik bakteri türü belirlemiştir. Toplam 600 subgingival plak örneğinden en çok

bulunan türlerin *Corynebacterium diphtheriae*, *Enterococcus faecalis*, *S. aureus*, *Acinetobacter baumannii* ve *Escherichia coli* olduğunu tespit etmişlerdir.

Bu çalışmada test edilen suşların biyokimyasal test sonuçları Çizelge 4.2’de verilmiştir. Suşların tamamı Gram pozitif, katalaz pozitif, oksidaz negatif olarak belirlendi ve MSA’da sarı pigmentasyon gösterdi. Ayrıca, suşların %87.6’sı manitolü parçalama ve %90.9 NA’da pigmentasyon, %94.5’i %10 NaCl içeren NB’da gelişme, %94.3’ü gliserin ve eritromisin içeren agarda gelişme, %96.3’ü glikoz içeren besi yerinde anaerobik gelişme göstermiştir. Suşların %78.1’i hemoliz, %72.7’si DNaz, %30.9’u jelatinaz, %36.3’ü koagulaz, %65.4’ü lesitinaz, %41.8’i beta-laktamaz, %56.3’ü VP-MR ve %92.7’i nitrat testlerinde pozitif sonuç göstermiştir. Alan (2007) tarafından yapılan çalışmada *S. aureus* suşlarının tamamı; Gram boyama, katalaz, oksidaz, basitrasine dirençliliği, %10 NaCl içeren ortamda gelişme, NA’da pigmentasyon testlerinde ayrıca suşların %93’ü gliserin ve eritromisin içeren agarda gelişme, %24.4 jelatinaz, %78’i beta-laktamaz testlerinde pozitif sonuç belirlenmiştir. Arslan (2003) yaptığı çalışmada *S. aureus* suşlarının tamamının katalaz, oksidaz, koagulaz, MSA’da pigmentasyon, manitolü parçalama testlerinde pozitif sonuç gösterdiğini belirlemiştir. Üslü (2007) tarafından yapılan çalışmada suşların tamamı Gram boyama, beta-hemoliz, manitol fermentasyonu, katalaz, koagulaz, DNaz testlerinde pozitif sonuç vermiştir. Bu çalışmada incelenen suşlara ait sonuçlar yapılan diğer çalışmalarla paralellik göstermektedir.

Araştırmamızda yapılan karbonhidrat fermantasyon test sonuçlarına ilişkin bulgular Çizelge 4.3’de verilmiştir. Test sonuçlarına göre, *S. aureus* suşların %41.8’in fruktoz, %36.3’ü galaktoz, %52.7’mannoz, %29’u laktoz, %25.4’i arabinoz, %47.2’i maltoz, %67.2’i sükroz, %32.7’i trehaloz, %74.5’i glikoz ve %30.9’u sorbitolü kullanabildiği belirlendi. Saçılık (1998) yaptığı çalışmada stafilokokların glikoz, manitol, mannoz karbonhidratlarını %100; laktozu %91.7 oranında kullandıklarını ancak ksiloz, rafinoz ve arabinoz karbonhidratlarını kullanamadıklarını tespit etmiştir. Kloos ve Jorgensen (1985) *S. aureus* suşlarının maltoz, trehaloz, manitol, sükroz, mannoz, laktoz ve fruktozu kullanabildikleri ancak rafinoz, sellobiyoz ve ksilozu kullanamadıklarını; Schleifer ve Bell (2009) *S. aureus* suşlarının fruktoz, maltoz, sükrozu kullanabildiklerini, galaktoz, laktoz, mannoz ve riboza değişken olduklarını, sellobiyoz, ksiloz ve arabinozu kullanamadıklarını belirtmişleridir. Bu çalışmadaki suşların karbonhidrat test sonuçları önceki çalışma sonuçlarıyla paralellik göstermektedir

Yapılan antibiyogram test sonuçlarına ilişkin bulgularımız Çizelge 4.1’de verilmiştir. Test sonuçlarına göre *S. aureus* izolatların en dirençli oldukları antibiyotiklerin %94.5 basitrasin, %83.6 ampisilin ve %43.6 polimiksin B olduğu; en duyarlı oldukları antibiyotiklerin %100 trimetoprim/sülfametoksazol, vankomisin ve sefoperazon/sülbaktam, %98.1 siprofloksasin, %85.4 novobiyosin ve %90.9 klindamisin olduğu bulundu.

Bayar ve ark., (2008) boğaz kültüründen izole ettikleri 27 *S. aureus* suşunun siprofloksasine %100 duyarlı oldukları ve basitrasine %100 dirençli olduğunu tespit etti. Ayrıca novobiyosine %100, metisiline %10, ampisiline %70, eritromisine %50, tetrasikline %100, amoksisiline %20 dirençli olduğu bulundu. Bizim çalışmamızdaki sonuçlar bu oranlarla benzerlik göstermektedir.

Ansari ve ark., (2011) çalışmalarında biyofilm üretimi pozitif olan *S. aureus* izotlarının antibiyotik duyarlılıklarını; %98 ampisilin, %79 klindamisin, %77 vankomisin, %77 tetrasiklin, %71 sefalektin, %47 sefokzidim olarak bulunmuştur. Murdoch ve ark., (2004) oral stafilocok izolatların %70’i penisiline, %18’i fusidik asite, %3’ü metisiline, %2.5’den azı tetrasiklin, teikoplanin ve agumentine dirençli olduğu ancak klindamisin. gentamisin ve vankomisine karşı hassas olduklarını bildirmişlerdir.

Berber ve ark., (2008) yaptıkları çalışmada *S. aureus* olarak tanımlanan 81 suştan 46’sının (%56.7) metisiline duyarlı ve 35’inin (%43.3) metisiline dirençli olduğunu bildirilmiştir. Yine bu çalışmada MRSA suşlarının antibiyotiklere direnç oranları; vankomisine %0, siprofloksasine % 54, sülbaktam-ampisilin %60, penisilin G %85, amoksisilin/klavulanik asit %60, ampisilin %88.6, kloromfenikol %14.3, trimetoprim/sülfametoksazol %60, amikazin %45, gentamisin %60 ve eritromisine %20 şeklinde belirlenmiştir.

Alan (2007) çalışmasında hastanelere gelen hastalardan alınan örneklerden 41 *S. aureus* izolatının en duyarlı oldukları antibiyotiklerin vankomisin (%100) ve kloromfenikol (%92.6) olduğu; en dirençli oldukları antibiyotiklerin ise %100 basitrasin, %95.12 seftazidin, %87.8 penisilin, %58.5 gentamisin ve %19.5 eritromisin olduğunu bildirmektedir. Ülkemizde yapılan başka bir çalışmada metisiline %20.6, eritromisine %87.2, penisiline %85.8, ampisiline %73.8, kloromfenikole %28.4, ampisilin/sülbaktam %9.9 ve siprofloksasin %9.2 dirençlilik tespit edilmiştir (Özkalp ve Baybek, 2003).

Gül ve ark., (2004) 217 hastane personelinin el ve burundan izole edilen *S. aureus* suşlarında penisiline %95, eritromisine %24, klindamisine %14, trimetoprim/sülfametoksazole %24 ve vankomisine %0 direnç saptanmıştır.

Yetkin ve ark., (2006) yoğun bakımda yatan hasta ve hastane personelinden 16 MRSA ve 70 MSSA izole etmişlerdir. İzole edilen MRSA'larda eritromisine %56, klindamisine %62, siprofloksasine %25, tetrasikline %0, trimetoprim/sülfametoksazole %94 duyarlılık; MSSA'larda ise eritromisin %87, klindamsin %94, siprofloksasin %97 tetrasiklin %4, trimetoprim/sülfametoksazole %100 karşı duyarlılık tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda izole edilen suşların birçok antibiyotiğe karşı duyarlı olduğu, buna karşın MRSA oranının beklenenden daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bu durumun hastalardan örnek alınırken tıbbi geçmişine bakılmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

İnsan ve hayvanlardan izole edilen bakterilerin moleküler tekniklerle incelenmesi birçok enfeksiyonun moleküler epidemiyolojisine katkıda bulunmaktadır. Bu teknikler arasında en çok kullanılan yöntemlerden birisi, proteinlerin elektroforetik bant profillerinin SDS-PAGE yöntemi ile analizidir (Arslan, 2003).

Çalışmamızda seçilen 15 *S. aureus* suşunun SDS-PAGE yöntemi kullanılarak elde edilen toplam hücre ve hücre dışı protein profillerine göre karşılaştırılması yapılmıştır. SDS-PAGE analizine göre suşların hepsinin yüksek düzeyde benzer protein profillerine sahip olmalarına rağmen bazı bant farklılıklarının olduğu tespit edilmiştir. Toplam hücre protein profilinde, 23, 29, 57, 160 kDa molekül ağırlığına sahip bantların suşlar arasında farklılık gösterdiği gözlemlenmiştir. Öte yandan, hücre dışı protein profillerinde de bazı minor farklılıkların olduğu belirlenmiştir. Özellikle 26, 45, 83, 158 ve 200 kDa molekül ağırlığındaki protein bantlarının suşlar arasında farklılıklar gösterdiği tespit edilmiştir.

Berber ve ark., (2010) *S. aureus* suşlarının her birinin toplam hücre protein profillerinde 10 major protein bandı belirlemiştir. Toplam hücre proteinlerinin SDS-PAGE analizi, araştırmadaki bütün *S. aureus* suşları arasında yüksek molekül ağırlığında (> 60 kDa) major benzerlikleri ve bununla beraber hem yüksek (70-100 kDa) molekül ağırlıkta hem de düşük molekül ağırlıkta (< 60 kDa) farklı proteinleri göstermiştir. Kumar ve ark., (2005) yaptıkları çalışmada *S. aureus* türü olarak tespit edilen suşların SDS-PAGE ile elde ettikleri protein profillerinde, 110 ve 98 kDa molekül ağırlığına sahip belirgin bantlar bulunduğunu tespit etmişlerdir. Gülbandır, (2006) SDS-PAGE ile farklı kaynaklardan izole ettikleri *S. aureus* suşlarının protein

profillerini belirlemiş ve bant oluşumlarının standart suş ve marker ait bantlarla uyumlu olduğunu gözlemlemiştir. Ayrıca bazı kısımlarda molekül ağırlığı aynı ya da yakın olan bantlar arasında ayırım yapamamıştır.

Arslan ve ark., (2009) 77 adet *S. aureus* ve 37 *S. intermedius*'un SDS-PAGE ile toplam hücre protein profillerinin analizinde suşlar arasındaki genetik uzaklığı %0-96 arasında değiştiğini belirlenmiştir. Molekül ağırlıkları 14.4-116 kDa arasında 17-47 farkı bant elde edilmiştir. Aslantaş ve ark., (2006) Hatay bölgesindeki subklinik inek mastitislerinden izole edilen toplam 50 *S. aureus* suşlarının SDS-PAGE ile analizinde moleküler ağırlığı 14.4-116 kDa arasında değişen 17-49 bant elde etmişler ve 3 suş dışında protein profillerinde çok büyük farklılıklara rastlamamışlardır.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, önceki çalışmalar ile kıyaslandığında benzerlik göstermektedir. *S. aureus* suşları arasında benzerlikler bulunmakla birlikte protein bantları arasında farklıklar az miktardadır. Ayrıca jel üzerindeki bazı bölgelerde yakın molekül ağırlığına sahip bantların olması suşlar arasında ayırım yapmayı zorlaştırmaktadır.

Çalışmamızda, SDS-PAGE tekniği ile elde edilen toplam hücre ve hücre dışı protein profilleri esas alınarak UPGMA göre dendogramlar oluşturuldu. *S. aureus* izolatlarının toplam hücre protein profilleri benzerlik düzeyi %66.29 ve üzerinde (Şekil 4.5) iki gruba ayrıldı. Birinci grup 6 suşu içermekte olup kendi içerisinde benzerlik düzeyi %70,78 ve üzeri iki alt gruba ayrıldı. İkinci grup 9 suşu içermekte olup kendi içerisinde benzerlik düzeyi %73.30 ve üzeri iki alt gruba ayrıldı. Hücre dışı protein profilleri esas alınarak yapılan nümerik analizde, benzerlik düzeyi % 60.53 ve üzerinde olan iki alt gruba ayrıldı. Birinci grup kendi içerisinde %66.69 ve üzeri ikinci grup 64.23 ve üzeri benzerlik gösterdi.

SDS-PAGE giderek artan sıklıkta hem tür hem de cins hatta tip düzeyinde bakteriyel sistematikte ilgi görmektedir (Osmanağaoğlu ve ark., 2000). Bu teknik *S. aureus* identifikasyonunda başarı bir şekilde kullanılmaktadır. SDS-PAGE yönteminin nümerik analizle desteklenmesi *S. aureus* suşlarının evrim ve epidemiyolojik çalışmalarına ilave katkı sağlamaktadır (Costas ve ark., 1989). Aslantaş ve ark., (2006) *S. aureus*'un toplam hücre protein profilleri arasındaki benzerliği gösteren dendogramda iki ana grup bulunmuş ve *S. aureus* suşları arasında ortalama benzerlik %6-69 göstermiştir. Küçük farklıklar bulunmasına rağmen suşların çoğu benzer olduğu sonucuna varılmıştır. Arslan ve ark., (2009) yapılan çalışmada *S. aureus* suşlarının protein analizi sonucu oluşan dendogramda izolatlar arası ortalama uzaklık %0-73

göstermiştir. Berber ve ark., (2003) yaptıkları çalışmada 15 farklı stafilokok suşunun toplam hücre ve hücre dışı protein profilleri SDS-PAGE’de yürütülerek elde edilen bant profillerinin dendogramına göre stafilokok türlerini karakterize etmişler ve farklı türler arasında farklı bölgelerde protein bantları tespit etmişlerdir. Ancak SDS-PAGE metodu ile elde edilen bu farklı protein bantlarının stafilokok türlerinin ayırımında yeterli bir rol oynamadığı belirlemişlerdir. Çünkü tüm hücre dışı ve toplam hücre protein profilleri analizinde stafilokok türleri arasında %90 oranında benzer bant profillerinin olduğunu tespit etmişlerdir.

Biz bu çalışmada, diş çürükleri ve diş etinden *S. aureus* izolasyonu yapılabileceği, *S. aureus* türlerinin kendilerine yakın olan türlerden fenotipik, biyokimyasal ve antibiyotik dirençlilik testleriyle ayrılabilceği ancak tür altı seviyede ayırım için yeterince bilgi vermediği belirledik. Antibiyogram test sonuçlarına göre *S. aureus* suşlarının birçok antibiyotiğe karşı dirençli olduğu, duyarlı görüldüğü antibiyotiklere bile direnç geliştirmeye başladığı gözlenmiştir. Biyokimyasal testlere ek olarak suşlar arasında daha iyi ayırım yapabilmek adına protein profillerini belirlemek için SDS-PAGE kullanılmıştır ve protein bantları arasında benzerlik düzeyi yüksek bulunurken bazı minor farklıklar da tespit edilmiştir. *S. aureus* suşlarının identifikasyonunda SDS-PAGE yöntemi yararlı bir yöntem olmakla birlikte molekül ağırlığı yakın bantların varlığı suşların ayırımında yeterli olmakla birlikte bilgi sağlamamaktadır.

Staphylococcus aureus hem hastane kaynaklı hem de toplum kaynaklı enfeksiyonlarda baş sıralarda yer almaktadır. Bu nedenle suşların hızlı ve doğru tanısı salgınların kontrol altına alınmasında ve tedavi masraflarının azalmasında önemlidir. Rutin klinik muayenelerde hastalık ajanlarının izolasyonu ve identifikasyonu zaman almakta, yanlış sonuçlar elde edilebilmekte ve bazen de herhangi bir etken ayırlanamamaktadır. Bu durumlarda bir ya da birden fazla moleküler tekniğin eş zamanlı kullanımı kesin tanıda faydalı olacağı düşünülmektedir. Bu çalışma, Sinop ilindeki diş polikliniklerine gelen hastaların diş çürükleri ve diş etinden *S. aureus* izolasyonu konusunda yapılan ilk çalışmadır. Sonuçlarımız, *S. aureus*’un insan vücudunun birçok farklı bölgesinden olduğu gibi diş eti ve diş çürüklerinden de izole edilebileceğini doğrulamaktadır. Araştırmamızda, hastaların tıbbi geçmişine bakılmadan örnekleme yapıldığı için MRSA oranı beklenenden düşük çıkmıştır. Ayrıca, bu çalışmanın sonuçları özellikle ilköğretim çağındaki çocuklarda diş fırçalama alışkanlığı ve yeterli ağız hijyeninin olmadığını göstermektedir.

6. KAYNAKLAR

- Akiner, E.G. 2006. Klinik materyallerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarında metisilin ve vankomisin dirençliliklerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 91s.
- Alan, N. 2007. Van ilindeki kliniklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* izolatlarının fenotipik özellikleri, plazmid DNA ve protein profillerine göre karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Van, 63 s.
- Alli, O.A.T, Akinloye, O., Rowley D.A., Butcher P.D. 2007. A comparative assessment of ribozomal DNA polymorphisms in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) epidemiology. Afr. J. Biomed Res., Vol., 10: 117-125.
- Anonim. 1996. Performance standarts for antimicrobial disk susceptibility test. Approved Standard M2-A6. National Committee For Clinical Laboratory Standarts (NCCLS), Villanova, PA.
- Anonim. 2000. www.yogunbakimdergisi.org/fulltext.aspx?issue_10&ref_ind_id=9
- Anonim. 2006. http://www.hpa.org.uk/infection/topic_az/surgial_site.
- Ansari, A.A., Baqai, R., Memon., M.R., Aziz, M., Khan, M.K. 2011. Biofilm formation and isolation of *Staphylococcus aureus* from blood cultures of dental patients undergoing oral surgical procedures. J. Pak. Dent. Assoc., 20: 154-158.
- Arıdoğan, A., Atasever, L., Bal, Ç. 2004. Klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarının antibiyotiklere dirençleri. Türk Mikrobiol. Cem. Derg., 34: 20-23.
- Arslan, E. 2003. Mastitisli ineklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarının plazmit DNA ve protein profili analizleri. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya, 78 s.
- Arslan, E., Çelebi A., Açık L., Uçan U.S. 2009. Characterization of coagulase positive *Staphylococcus* species isolated from bovine mastitis using protein and plasmid patterns. Turk. J. Vet. Anim. Sci., 33(6): 493-500.
- Ash, E., Farrow, J.A.E., Wallbanks, S., Collins, M.D. 1991. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunits-ribozomal RNA sequences. Letters Appl. Microb., 13: 2002-2006.

- Aslantaş, Ö., Öztürk, F., Çelebi A., Açık L., Ergün, Y. 2006. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from subclinic bovine mastitis by protein patterns, antibiotic resistance and plasmid profile. Ankara Üni. Vet. Fak. Derg., 53: 47-51.
- Bagg, J., Sweeney, M.P., Harvey-Wood, K., Wiggins, A. 1995. Possible role of *Staphylococcus aureus* in severe oral mucositis among elderly dehydrated patients. Microbiol. Ecol. Health Dis., 8: 51-56.
- Bannerman, T.L. 2003. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and Other Catalase-Positive Cocci That Grow Aerobically In Manual of Clinical Microbiology. (Eds). Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Pfaller, M.A., Tenover, R.H., 8rd ed, ASM press, Washington USA. pp: 384-404.
- Baron, E.J., Peterson, L.R., Tenover, S.M. 1994. Diagnostic Microbiology, St Louis, C.V. Mosby, pp. 312-332.
- Bauer, J.D., Ackermann, P.G., Tenover, G. 1974. Clinical Laboratory Methods. 8th Ed. Mosby, St Louis, pp. 15-72.
- Bayar, S., Hocaoglu, Z., Dıgırak. 2008. Boğaz kültüründen izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarının bazı fizyolojik, biyokimyasal özellikleri ve antibiyotik duyarlılıklarının incelenmesi. KSU J. Sci. Eng., 11(1).
- Belkum, A.V., Leeuwen, W.V., Vekooijen, R., Sacilik, S.C., Cokmuş C., Verbrugh, J. 1997. Dissemination of a single clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among Turkish hospitals. J. Clin. Microbiol., 35: 978-981.
- Berber, I. and Cokmus C. 2001. Characterization of *Bacillus sphaericus* strains by Native-PAGE. Bull of Pure and Appl Sci., 20(1): 17-21.
- Berber, I., Cokmus, C., Atalan, E. 2003. Characterization of *Staphylococcus* species SDS-PAGE of whole-cell and extracellular protein. Microbiology, 72: 54-59.
- Berber, I. 2004. Characterization of *Bacillus* species by numerical analysis of their SDS-PAGE protein profiles. J. Cell Mol. Biol., 3: 33-37.
- Berber, İ., Alan, N. ve Önlü, H. 2008. Klinik örneklerden izole edilen metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MDSA) suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. Y.Y.Ü Fen Bilimleri Derg., 13(1): 35-38.
- Berber I., Alan N., Ekin, S., Onlu, H. 2010. Use of the different polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) methods in the characterization of human pathogenic *Staphylococcus aureus* strains. Asian J. Chem., 22(4): 3173-3185.

- Bhalakia, N. 2006. Isolation and plasmid analysis of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Young Investig., 16: 4.
- Bilgehan, H. 1990. Klinik Mikrobiyoloji, Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. Barış Yayınevi, İzmir, 184-204 s.
- Bilgehan, H. 1992. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Barış Yayınları, Bornova, 448-458 s.
- Bilgehan, H. 1994. Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji Ve Bakteri Enfeksiyonları, Bornova, 188-211 s.
- Boyce, J.M. 1998. Are the epidemiology and microbiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* changing? JAMA, 279: 1513-23.
- Buzzola, F.R., Quelle, L., Gomez, M.I., Catalano, M., Steele-Moore, L., Berg, D., Gentilini, E., Denamiel, G., Sordelli, D.O. 2001. Genotypic analysis of *Staphylococcus aureus* from milk of dairy cows with mastitis in Argentina. Epidemiol. Infect., 126: 445- 452.
- Casey, A.L., Lambert, P.A., Elliott, T.S.J. 2007. Staphylococci. Int. J. Antimicrob. Agent., 3: 23-32.
- CDC, 2002. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin-United States. MMWR. 51:565-7.
- Cengiz, A.T. 1999. *Staphylococcus*. Ustacelebi, Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji Kitabı. Güneş Kitabevi, Ankara, 339-346 s.
- Costas, M., Cookson, B.D., Talsania, H.G., Owen, R.J. 1989. Numerical analysis of electrophoretic protein patterns of methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol., 27: 2574-2581.
- Coşgun, A., Ulaş, M.M. 1999. Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 35 s.
- Craven, D.E., Reed, C., Kollisch, N. 1981. A large outbreak of infections caused by a strain of *Staphylococcus aureus* resistant to oxacillin and aminoglycosides. Amer. J. Med., 53-71.
- Cui, L., Hiramatsu, K. 2003. Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*. In: A.C. Fluit, F.J. Schmitz (Eds.), MRSA Current Perspectives. Caister Academic Press., pp. 187-212.
- Çakır, F.Y., Gürcan S., Atar, N. 2010. Çürük mikrobiyolojisi. Hacettepe Diş Hekimliği Fak. Derg., 34(3-4): 78-91.
- Çalışkan, M.K. 2006. Endodontide Tanı ve Tedaviler. Nobel Tıp Kitabevleri, 157-178 s.

- Çelen, M.K., Ayaz C., Özmen E., Geyik, M.F., Hoşoğlu S. 2005. Klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarının fusidik asit direnci. Klinik Derg., 18(3): 114-116.
- Dahlén, G. 2006. Microbiological diagnostics in oral diseases. Acta Odontol. Scand., 64(3): 164-8.
- Dahlén, G., Jonsson, R., Öhman S.C. 1992. Infection of oral mucosa and submucosas. In: Slots J., Taubman M.A. eds. Contemporary Oral Microbiology and Immunolog. Mosby Year Book Inc. USA, pp. 476-477.
- Dahlén, G., Wikström, M. 1995. Occurrence of enteric rods, Staphylococi and *Candida* in subgingival samples. Oral Microbiol. Immunol., 10: 42-46.
- Demirpek, U. 2006. Toplumda genç erişkin yaş grubu erkek bireylerde metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* burun taşıyıcılığı prevelansının saptanması ve moleküler tip tayini. Uzmanlık Tezi, T.C. Genelkurmay Başkanlığı, Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Mikrobiyolojik ve Klinik Mikrobiyoloji Servisi. İstanbul. 70s.
- Drancourt, M., Raoult, D. 2002. rpoB gene sequence-based identification of *Staphylococcus* species. J. Clin. Microbiol., 40: 1333-1338.
- Elçi, S.D. 2004. Metisilin dirençli *S. aureus* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları ve Pulsed Field Jel Elektroforeziyle tiplendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 105 s.
- Ergon, M.C., Biçmen M., Gülay Z. 2010. Dokuz Eylül Üniversitesindeki dominant metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşunun moleküller yöntemlerle tiplendirilmesi. Aknem Derg., 24(2): 65-72.
- Fluit, A.C., Wiolders, C.L, Verhoef, J., Schmitz, F.J. 2001. Epidemiology and susceptibility of 3.051 *Staphylococcus aureus* isolates from 25 university hospitals participating in the European SENTRY study. J. Clin. Microbiol. 39: 3727-32.
- Foster, T. 2003. *Staphylococcus*. Erişim:[<http://gsbs.utmb.edu/microbook/ch012>] 02.06.2003.
- Geisel, R., Schmitz, F.J, Fluit, A.C., Labischinski, H. 2001. Emergence, mechanism and clinical implications of reduced glycopeptide susceptibility in *Staphylococcus aureus*. Eur. J. Clin. Microb. Infect. Dis., 20: 685-97.

- Goldberg, M.H. 1981. Infections of the salivary glands. In: R.G Topazian, M.H Goldberg (eds) Management of infections in the oral and maxillofacial regions. Chapter 8, Philadelphia, Saunders.
- Götz, F., Bannerman, T., Schleifer, K.H. 2006. The Genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.H. Schleifer E. Stackebrand (Editors), The Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria, Third Edition, Vol. 4, Springer, New York, pp. 5-75.
- Grundmann, H., Hori, S., Enright, M.C., Webster, C., Tami, A., Feil, E. J., Pitt, T. 2002. Determining the genetic structure of the natural population of *Staphylococcus aureus*: a comparison of multilocus sequence typing with Pulsed-Field Gel Electrophoresis, Randomly Amplified Polymorphic DNA analysis, and phage typing. J. Clin. Microbiol., 40: 4544-4546.
- Güçlü , E., Yavuz, T., Tokmak, A., Behçet, M., Karali, E., Öztürk , O ., Egeli, E. 2007. Nasal carriage of pathogenic bacteria in medical students: effects of clinic exposure on prevalence and antibiotic susceptibility. Eur. Arch. Otorhinolaryngol, 264: 85–88.
- Gül, M., Çıragil, P., Aral, M. 2004. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi hastane personelinde burun ve el *Staphylococcus aureus* taşıyıcılığı. Ankem Derg., 18(1): 36-39.
- Gülbandılar, A. 2006. Kütahya yöresinde çeşitli kaynaklardan elde edilen *Staphylococcus aureus* izolatlarının karakterizasyonu. Doktora Tezi, Dumlupınar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kütahya, 78 s.
- Güneş, H. 2008. Metisiline dirençli stafilokoklarda glikopeptit antibiyotiklere duyarlılık durumunun araştırılması. Uzmanlık Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Isparta, 52 s.
- Health Protection Agency. 2006. Surveillance of surgical site infection in England: October 1997-September 2005. London, UK.
- Hèbert, G., Crowder, C., Hancock, G., Jarvis, W., Thorsberry, C. 1988. Characteristics of coagulase-negative staphylococci that help differentiate these species and other members of the *Micrococcaceae*. J. Clin. Microbiol., 26(10): 1939-1949.
- Helovuuo, H., Hakkarainen, K., Paunio, K. 1993. Changes in the prevalence of subgingival enteric rods, staphylococci and yeasts after treatment with penicillin and erythromycin. Oral Microbiol. Immunol., 8: 75-79.

- Hiramatsu, K., Hanaki, H., Ino, T., Yabuta, K., Oguri, T., Tenover, F.C. 1997. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. J. Antimicrob. Chem. 40: 135-6.
- Hiramatsu, K., Cui, L., Kuroda, M., Ito, T. 2001. The Emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol., 9(10): 486-93.
- Ichiyama, S., Ohta, M., Shimokata, K., Kato, N., Takeuchi, J. 1991. Genomic DNA fingerprinting by Pulsed Field Gel Electrophoresis as an epidemiological marker for study of nosocomial infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol., 29: 2690-2695.
- Ieven, M., Verhoeven, J., Pattyn, S.R., Goossens, H. 1995. Rapid and economical method for species identification of clinically significant coagulase-negative staphylococci. J. Clin. Microbiol., 33: 1060.
- Jacobson, J.J., Patel, B., Asher, G., Wooliscroft, J.O., Schaberg, D. 1997. Oral *Staphylococcus* in older subjects with rheumatoid arthritis. J. Amer. Geriatr Soc., 45: 590-593.
- Jacson, M.S. 1998. Oral staphylococci in health and disease. FIBMS Thesis, University of Glaskow, Institute of Biomedical Science, Glaskow.
- Jacson, M., Bagg, J., Gupta M. 1999. Oral carriage of staphylococci in patients with rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford), 38: 572-575.
- Jensen, A.G., Espersen, F., Skinhoj, P., Rosdahl, V.T., Frimodt-Molter, N. 1993. *Staphylococcus aureus* meningitis. A review of 104 nationwide, consecutive cases. Arch. Intern. Med., 153: 1902-1908.
- Jevons, M.P. 1961. 'Celbenin'-resistant staphylococci. British Medical Journal, 124-125.
- Karatay, O., Arinc, H., Gündüz, H. 2006. A new effect of acetylsalicylic acid? significantly lower prevalence of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* among patients receiving orally administered acetylsalicylic acid. Infect Control Hosp. Epidemiol., 27: 318-9.
- Katayama, Y., Ito, T., Hiramatsu, K. 2000. A new class of genetic element, *Staphylococcus* cassette chromo-some mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chem., 44(6): 1549-55.
- Kloos, W.E., Schleifer, K.H. 1975. Isolation and characterization of Staphylococci from human skin: 11. description of four new species: *Staphylococcus warneri*,

- Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hominis* and *Staphylococcus simulans*. Int. J. Syst. Bacteriol., 1: 82–87.
- Kloos, W.E., Jorgensen, J.H. 1985. Staphylococci. In: A. Balows, W.J. Hauster, H.J. Shadomy (Editors), Manual of Clinical Microbiology Fourth Edition. American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp. 143-155.
- Kloos, W.E., Bannerman, T.L., 1995. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: A. Balows, J.W. Hauster, K.L. Herman, H.D. Isenberg, H.J. Shadomy, (eds), Manual of Clinical Microbiology, 6th ed, Washington D.C., pp. 1356-67.
- Kluytmans, J., Belkum A., Verbrugh H. 1997. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* epidemiology, underlying mechanism, and associated risks. Clin. Microbiol. Rev., 10: 505-20.
- Knighton, H.T. 1965. Coagulase-positive Staphylococci in oral and nasal areas of dental students: a four-year study. J. Dent. Res., 44: 467- 470.
- Kollef, M.H., Shorr, A., Tabak, Y.P., Gupta, V., Liu, L.Z., Johannes R.S. 2005. Epidemiology and outcomes of health-care-associated pneumonia: results from a large US database of culture-positive pneumonia. Chest, 128(6): 3854-62.
- Kumar, A., Ray, P., Kanwar, M., Sharma, M., Varma, S. 2005. A comparative analysis of antibody repertoire against *Staphylococcus aureus* antigens in patients with deep-seated versus superficial staphylococcal infection. Int. J. Med. Sci., 2(4): 129-136.
- Kutlu, B.S. 2006. Çeşitli klinik materyallerden izole edilen *S. aureus* suşlarında metisilin direnci ve E-test ile vankomisin MIC değerlerinin araştırılması. Uzmanlık Tezi, T.C. Sağlık Bakanlığı, Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul, 61s.
- Kwok, A.Y.C., Chow, A.W. 2003. Phylogenetic study of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species based on partial hsp60 gene sequences. Int. J. Systematic and Evolutionary Microbiol., 53: 87-92.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. Nature (London), 227: 680-685.
- Li, X., Kolltveit K.M., Tronstad, L., Olden, I. 2000. Systemic diseases caused by oral infection. Clin. Microbiol. Rev., 13: 547-551.
- Linhard, F., Ziebuhr, W., Meyer, P., Wittle, W., Hacker, J. 1992. Pulsed Field Gel Electrophoresis of genomic fragments as a tool for the epidemiological analysis

- of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative Staphylococci. FEMS Microbiol. Lett., 95: 181-186.
- Livermore, D. 2000. Antibiotic resistance in staphylococci. Int. J. Antimicrob. Agents., 16: 3-10.
- Loberto, J.C.S., Martins, C.A.P., Silvana, S., dos Santos, F., Cortelli, J.R., Jorge, A.O.C. 2004. *Staphylococcus* spp. in the oral cavity and periodontal pockets of chronic periodontitis patients. Brazilian J. Microbiol., 35: 64-68.
- MacFarlane, T.W., Helnarska, S. 1976. The microbiology of angular cheilitis. Brith. Dent. J., 149: 403-406.
- Malik, A., Hasani, S.E., Shahid, M., Khan, H.M., Ahmed, A.J. 2003. Nosocomial *Klebsiella* infection in neonates in a tertiary care hospital: protein profile by SDS-PAGE and klebocin typolong as epidemiological markers. Indian J. Medical Microbiol., 21: 82-86.
- Martineau, F., Picard, F.J., Roy, P.H., Ouellette, M., Bergeron, M.G. 1998. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol., 36: 618-623.
- Martins, C.A.P., Koga-Ito, Y., Jorge, A.O.C. 2002. Presence of *Staphylococcus* spp. and *Candida* spp. in the human oral cavity. Brazilian J. Microbiol., 33: 236-240.
- Maslow, J.N., Mulligan, M.E., Arbeit, R.D. 1993. Molecular epidemiology application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. Clin. Infect. Dis., 17: 153-164.
- Mason, W. J., Blevins, J.S., Benken, K., Wibowo, N., Ojha, N., Smeltzer, M.S. 2001. Multiplex PCR protocol for the diagnosis of staphylococcal infection. J. Clin. Microbiol., 39: 3332-3338.
- Miller, W.B. 1973. The microorganism of the human mouth. (unaltered reprint of the original work published in 1980 in Philadelphia) Basel: S. Karger, 96-9, pp. 285-295.
- Miyake, Y., Iwai, M., Sugai, M.K., Miura, K., Suginaka, K., Nagasaka, M. 1991. Incidence and characterization of *Staphylococcus aureus* from the tongues of children. J. Dent. Res., 70: 1045-1050.
- Morot-Bizot, S.C., Talon, R., Leroy, S. 2004. Development of a multiplex PCR for the identification *Staphylococcus* genus and four staphylococcal species isolated from food. J. Appl. Microbiol., 97: 1067-1094.

- Murdoch, F.E., Sammons, R.L., Chapple, I.L.C. 2004. Isolation and characterization of subgingival staphylococci from periodontitis patients and controls. *Oral Diseases*, 10: 155-162.
- National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System. 2002. http://www.hpa.org.uk/infections/publications/ninns/hosacq_HAB_2002.pdf.
- National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System report. 2003. *Amer. J. Infect. Cont.*, 31: 481.
- Nema, V., Agrawal, R., Kamboj, D.V., Goel, A. Knonolo., Singh, L. 2007. Isolation and characterization of heat resistant enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* from a food poisoning outbreak in Indian Subcontinent. *Inter. J. Food Microbiol.*, 117: 29-35.
- Nemoto, Y.O., Haraga, H., Kimura, S., Nemoto, T.K. 2008. Occurrence of staphylococci in the oral cavities of healthy adults and nasal-oral trafficking of the bacteria. *J. Microbiol.*, 57: 95-99.
- Neu, H.C. 1992. The crisis in antibiotic resistance. *Science*, 257: 1064-1072.
- Oliveria, A.M., Ramos, M.C. 2002. PCR-based ribotyping of *Staphylococcus aureus*. *Brazilian J. Medical Bio. Res.*, 35: 175-180.
- Olorunfemi, O.B., Onasanya, A.A., Adetuyi, F.C. 2005. Genetic Variation and relationship in *Staphylococcus aureus* isolates from human and food samples using Random Amplified Polymorphic DNAs. *Afr. J. Biotech.*, 4: 611-614.
- Osmanağaoğlu, Ö., Altanlar, N., Saçılık S.C., Çökmüş, C., Akın, A. 2000. Identification of different *Candida* species isolated in various hospitals in Ankara by fungichrom test kit and their differentiation by SDS-PAGE. *Turk J. Med. Sci.*, 30: 355-358.
- Özkalp, B., Baybek, H. 2003. Klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarının çeşitli antibiyotiklere in vitro duyarlılıkları. *Genel Tıp Derg.*, 13(2): 65-68.
- Parras, F., Guerrero, M.C., Bouza, E., Blázquez, M.J., Moreno, S., Menargues, M.C., Cercenado, E. 1995. Comparative study of mupirocin and oral co-trimoxazole plus topical fusidic acid eradication of nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chem.*, 39: 175-179.
- Percival, R.S., Challacombe, S.J., Marsh, P.D. 1991. Age-related microbiological changes in the salivary and plaque microflora of healthy adults. *J. Med. Microbiol.*, 35: 5-11.

- Piochi, B.J.A., Zelante, F. 1973. Contribuição para o estudo de *Staphylococcus* isolados da cavidade bucal. I - *Staphylococcus* isolados da saliva. Rev. Fac. Odontol. São Paulo, 11: 367-378.
- Poyart, C., Quesne, G., Bournalia, C., Trieu-Cuot, P. 2001. Rapid and accurate species-level identification of coagulase-negative staphylococci by using the *sodA* gene as a target. J. Clin. Microbiol., 39: 4296-4301.
- Prevost, G., Jaulhac, B., Piemont, Y. 1992. DNA fingerprinting by Pulsed-Field Gel Electrophoresis is more effective than ribotyping in distinguishing among methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. J. Clin. Microbiol., 30: 967-973.
- Rams, T.E., Feik, D., Slots, J. 1990a. Staphylococci in human periodontal diseases. Oral Microbiol. Immunol., 5: 29-32.
- Rams, T.E., Feik, D., Slots, J. 1990b. Staphylococci in human periodontal diseases. Oral Microbiol. Immunol., 5: 29-32.
- Rubinstein, E. 2008. *Staphylococcus aureus* bacteraemia with known sources. Int. J. Antimicrob. Agents, 32: 378-385.
- Saçılık, S.C. 1998. Türkiye'deki klinik örneklerden elde edilen *Staphylococcus aureus* izolatlarının karakterizasyonu. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 60 s.
- Sanchez-Cordero, S., Hoffman, H., Stahl, S.S. 1979. Occurrence of staphylococci in periodontal pockets of diabetic and nondiabetic adults. J. Periodontol. 50: 109-113.
- Sazakli, E., Leotsinidis, M, Vantarakis, A., Papapetropoulou, M. 2005. Comparative typing of *Pseudomonas* species isolated from the aquatic environment in Greece by SDS-PAGE and RAPD analysis. J. Appl. Microbiol., 99: 1191-1203.
- Schleifer, K.H., Bell J.A. 2009. Family VIII *Staphylococcaceae* fam. nov. In: (Eds) P. De Vos, G.M, Garrity, D. Jones, N.R. Krieg, W. Ludwig, F.A. Rainey, K.H. Schleifer, W.B. Whitman. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition, Volume 3, Springer, pp. 392-426.
- Schlichting, C., Branger, C., Fournier, J.M., Witle, W., Boutonnier, A., Wolz, C. 1993. Typing of *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis, zymotyping, capsular typing and phage typing: resolution of clonal relationships. JCM, 31:227-32.

- Schlievert, P.M., Tripp, T.J., Peterson, M.L. 2004. Reemergence of staphylococcal toxic shock syndrome in Minneapolis-St. Paul, Minnesota, during the 2000-2003 surveillance period. *J. Clin. Microbiol.*, 42(6): 2875-2876.
- Selçukbiricik, S. 2005. Tusdata TUS Hazırlık Dergisi Mikrobiyoloji-2. Klinisyen Tıp Kitapevleri, 10-11 s.
- Serindağ, A. 2007. Çürük dişlerde diş plaklarındaki mikroorganizmaların analizi. Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Malatya, 38 s.
- Slots, J., Feik, D., Rams, T.E. 1990. Age and relationship of superinfecting microorganisms in periodontitis patients. *Oral Microbiol. Immunol.*, 5: 305-308.
- Smith, A.J., Robertson, D., Tang, M.K., Jackson, M.S., MacKenzie D., Bagg, J. 2003. *Staphylococcus aureus* in the oral cavity: a three-year retrospective analysis of clinical laboratory data. *British Dental J.*, 195(12): 701-703.
- Souto, R., Andrade, A.F.B., Uzeda, M., Colombo, A.P.V. 2006. Prevalence of “non-oral” pathogenic bacteria in subgingival biofilm of subjects with chronic periodontitis. *Brazilian J. Microbiol.*, 37: 208-215.
- Steinberg, J.P., Clark, C.C., Hackman, B.O. 1996. Nosocomial and community-acquired *Staphylococcus aureus* bacteremias from 1980 to 1993 impact of intravascular devices and methicillin resistance. *Clin. Infect. Dis.*, 23: 255-259.
- Suzuki, J., Komatsuzawa, H., Sugai, M., Suzuki, T., Kozai, K., Miyaki, Y., Suginaka, H., Nagasaka, N. 1997. A long-term of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the oral cavity of children. *Microbiol. Immunol.*, 41: 681-686.
- Talay, F., Karatay, O., Yılmaz, F., Koçoğlu, E. 2007. Astımlı hastalarda inhaler budesonid’in nazal ve orofarengeal *Staphylococcus aureus* taşıyıcılığına etkisi. *Toraks Derg.*, 8(1): 13-16.
- Temizkan, G., Yılmaz, S., Öztürk, M., Arı, S., Ertan, H., Sarıkaya, A.T., Arda, Nazlı. 2008. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. (Editörler: G. Temizkan, N. Arda), Nobel Tıp Kitabevleri, 3. Baskı, İstanbul, 68 s.
- Tenover, F.C., Arbeit, R., Archer, G., Biddle, J., Byrne, S., Goering, R., Hancock, G., Hebert, G.A., Hill, B., Hollis, R., Jarvis, W.R. Kreiswirth, B., Eiser, W., Maslow, M. Dougal, J., Miller, L.K., Mulligan, J.M. 1994. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.*, 32: 407-415.

- Theilade, E. 2003. The microbiology of necrotic pulp. In: G. Bergenholtz et al., (eds), Textbook of Endodontology. Blackwell, Munksgaard, Oxford, pp. 111-29.
- Tekeli, E. 2002. Yoğun bakım infeksiyonlarının dünü, bugünü, yarını (değişen profili). Yoğun Bakım Dergisi, 2: 9-13.
- Todar, K. 2006. *Staphylococc aureus*. <http://textbookofbacteriology.net/staph.html>. 01. 08 2006.
- Tünger, A. 2004. *Staphylococcus aureus*: mikrobiyoloji, patogenez ve epidemiyoloji In: Ulusoy, S., Usluer, G., Ünal, S. Gram-Pozitif Bakteri İnfeksiyonları. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 9-22 s.
- Ünal, N. 2007. İnsan ve hayvan kökenli *Staphylococcus aureus* izolatlarının fenotipik ve genotipik özellikleri üzerine çalışmalar. Doktora Tezi, Kırıkkale Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kırıkkale, 92 s.
- Üslü, E.D. 2007. Klinik izolatlardan elde edilen *Staphylococcus aureus* suşlarının fenotipik ve genotipik yöntemler ile tanımlanması ve karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 72 s.
- Verhoef, J., Schmitz, F.J. 1999. Staphylococci and the *Micrococaceae*. In: “D. Armstrong, J. Cohen, (eds): Infectious diseases, first edition”, Mosby-Harcourt Publishers Ltd, Mosby, Barcelona, 813: 1-12.
- Waldvogel, F.A. 1999. New Resistance in *S. aureus*, <http://www.nejm.org>.
- Waldvogel, F.A. 2000. *Staphylococcus aureus* (including staphylococcal toxin shock). In: Mandel, G.L., Bennet, J.E., Dolin, R (eds). Principle and practice of infection diseases. 5th Ed., New York, Churchill Livingstone, pp. 2070-92.
- Wessel, D., Flugge, U.I. 1984. A metod for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. Anal. Biochem., 138: 141-143.
- Yetkin, G., Kuzucu, Ç., Bayraktar, M., Iraz, M. 2006. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi’nde yoğun bakımlarda yatan hastalarda ve hastane personelinde *Staphylococcus aureus* ve MRSA taşıyıcılığı. İnönü Üniversitesi Tıp Fak. Derg., 13(2): 91-93.
- Zinsser, H. 2005. *Staphylococcus*, Todar’s online textbook of bacteriology, Kenneth Todar University of Wisconsin-Madison, Department of Bacteriology. <http://textbookofbacteriology.net/staph.html>.
- Zschöck, M., Sommerhauser, J., Castaneda, H. 2000. Relatedness of *Staphylococcus aureus* isotes from bovine mammary gland suffering from mastitis in single herd. Journal of Dairy Research, 67: 429-435.

EK-1. Suşların Tanısında Kullanılan Besi Yerleri

1. Brain Heart Infüzyon (BHI) Broth

Brain Heart Infüzyon (BHI) Broth (Difco)	37 gr
Damıtık Su	1000 ml
pH	7.4

Besi yeri damıtık suda çözündükten sonra eritilir ve tüplere dağıtılarak otoklavda 121°C’de 15 dk sterilize edilir. 50°C’ye kadar soğutulan besi yeri steril petri kaplarına dökülür, +4°C’de saklanır.

2. Brain Heart Agar (BHA)

Nutrient Substrat	27.5 gr
D (+) Glikoz	2 gr
Sodyum Klorür	5 gr
Sodyum Hidrojen Fosfat	2.5 gr
Agar	15 gr

Besi yerinde 15 gr tartılarak 1 lt damıtık suda çözülür, tüplere 10’ar ml dağıtılarak otoklavda 121°C’de 15 dk sterilize edilir. 50°C’ye soğutulan besi yeri steril petri kaplarına dökülür, +4°C’de saklanır.

3. Nutrient Agar (NA)

Nutrient Agar (Difco)	23 gr
Damıtık Su	1000 ml
pH	6.8

Besi yerinden 23 gr Nutrient Agar 1 lt damıtık suda süspanse edilir, eritilir ve otoklavda 121°C’de 15 dk sterilize edilir. 50°C’ye soğutulan besi yeri steril petri kaplarına dökülür, +4°C’de saklanır.

4. Yatık Nutrient Agar (YNA)

Nutrient Agar (Difco)	23 gr
Damıtık Su	1000 ml
pH	6.8

Besi yerinden 23 gr Nutrient Agar 1 lt damıtık suda süspanse edilir, agar eriyinceye kadar kaynatılır. Ağzı kapalı tüplere 2 ml dağıtıldıktan sonra otoklavda 121°C’de 15 dk sterilize edilir. Sterilizasyondan sonra tüpler bir pipet üzerine yatık vaziyette konur ve besi yeri katılaştıktan sonra +4°C’de saklanır.

5. Nutrient Broth (NB)

Nutrient Broth (Difco)	8 gr
Damıtık Su	1000 ml
pH	6.8

Besi yerinde 8 gr tartılarak 1 lt damıtık suda çözülür, tüpler dağıtılarak otoklavda 121°C’de 15 dk sterilize edilir. +4°C’de saklanır.

6. Triptik Soy Broth (TSB)

Triptik Soy Broth (Difco)	30 gr
Damıtık Su	1000 ml
pH	7.3

Besi yerinde 30 gr tartılarak 1 lt damıtık suda çözülür, tüplere dağıtılarak otoklavda 121°C’de 15 dk sterilize edilir. +4°C’de saklanır.

7. Deoksiribonükleaz (DNaz) Agar

DNaz Agar (Oxoid)	39 gr
Damıtık Su	1000 ml
pH	7.3

Besi yerinde 39 gr tartılarak 1 lt damıtık suda çözülür, otoklavda 121°C’de 15 dk sterilize edilir. 50°C’ye soğutulan besi yeri steril petri kaplarına dökülür, +4°C’de saklanır.

8. Üreaz Broth

Yeast Ekstrakt	0.1 gr
Potasyum di Hidrojen Fosfat	9.1 gr
Sodyum Hidrojen Fosfat	9.5 gr
Üre	20 gr
Fenol Kırmızısı	0.01 gr

Besi yerinden 38.5 gr tartılarak 1 lt damıtık suda eritilir. Membran filtre ile sterilize edilir. Steril tüplere 3’er ml dağıtılır.

10. Glikozun Anaerobik Fermantasyon Besi Yeri (GAFB)

Trypton (Difco)	10 gr
Yeast Ekstrakt (Oxoid)	1 gr
Glukoz	10 gr
Brom Timol Mavisi	0.04 gr
Agar (Difco)	2.2 gr
Damıtık Su	1000 ml
pH	7.0

Gerekli miktarlar tartılıp 1 lt suda süspanse edilir ve eritilir, tüplere dağıtılır ve otoklavda 121°C’de 15 dk sterilize edilir. Sterilizasyondan sonra steril parafin ile besi yerinin üzeri kapatılır.

11. Mannitolün Anaerobik Fermantasyon Besi Yeri (MAFB)

Trypton (Difco)	10 gr
Yeast Ekstrakt (Oxoid)	1 gr
Mannitol (Oxoid)	10 gr
Brom Timol Mavisi	0.04 gr
Damıtık Su	1000 ml
pH	7.0

Gerekli miktarlar tartılıp 1 lt suda süspanse edilir ve eritilir, tüplere dağıtılır ve otoklavda 121°C’de 15 dk sterilize edilir. Sterilizasyondan sonra steril parafin ile besi yerinin üzeri kapatılır.

12. Gliserin Eritromisin Agar (GEA)

Yeast Ekstrakt (Oxoid)	2 gr
Gliserin	10 ml
NH ₄ H ₂ PO ₄	1 gr
KCl	0.2 gr
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0.2 gr
Brom Fenol Mavisi	0.04 gr
Agar (Difco)	9 gr
Damıtık Su	1000 ml
pH	7.0

Gerekli miktarlar tartılıp 1 lt suda süspanse edilir ve eritilir, tüplere dağıtılır ve otoklovda 121°C’de 15 dk sterilize edilir. Sterilizasyondan sonra filtrasyonla sterilize edilen eritromisin antibiyotiğinden 0.4 µg/ml olacak şekilde 50°C’ye soğutulan besi yerine eklenir ve petri kaplarına dökülür, +4°C’de saklanır.

13. Kanlı Agar Bazı (Blood Agar Base: BAB)

Kanlı Agar Bazı (BBL)	40 gr
Damıtık Su	1000 ml
pH	7.3

40 gr BAB damıtık suda çözülür ve hacim 1 lt tamamlanarak eritilir. Otoklavda 121°C’de 15 dk sterilize edilir. 50°C’ye soğutulduktan sonra %5-10 olacak şekilde steril kan ilave edilerek karıştırılır ve petri kaplarına döküldükten sonra +4°C’de saklanır.

14. Nutrient Jelatin Besi Yeri (NJB)

Nutrient Jelatin (Difco)	128 gr
Damıtık Su	1000 ml
pH	6.8

Besi yeri damıtık suda süspanse edilir ve eritilir, tüplere dağıtılır ve otoklavda 121°C’de 15 dk sterilize edilir. +4°C’de saklanır.

15. Müller Hinton Agar (MHA)

Müller Hinton Agar	38 gr
Damıtık Su	1000 ml
pH	7.3

Besi yeri damıtık suda süspanse edilir ve eritilir, otoklavda 121°C’de 15 dk sterilize edilir. 50°C’ye kadar soğutulup steril petri kaplarına dökülür.

16. Mannitol Salt Agar (MSA)

Beef Extract	1 gr
Pepton	10 gr
D-Mannitol	10 gr
NaCl	75 gr
Fenol Red	0.025 gr
Agar	15 gr
Damıtık Su	1000 ml

Besi yeri damıtık suda süspanse edilir ve eritilir, otoklavda 121°C’de 15 dk sterilize edilir. 50°C’ye kadar soğutulup steril petri kaplarına dökülür.

EK-2. Poliakrilamid Jel Elektroforezinde Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

1. Akrilamid + N, N'-Metilen Bis-akrilamid Monomer Stoğu

Akrilamid (Oxoid)	28.8 gr
Bis-akrilamid (Oxoid)	1.2 gr

Maddeler gerekli miktarda tartılıp 75 ml damıtık su içersinde çözülerek son hacim 100 ml'ye tamamlanır. Whatman No:1 filtre kağıdından süzülerek renkli cam şişede +4°C'de saklanır.

2. Ayırma Jel Tamponu (1.5 M Tris-HCL, pH 8.6)

Gerekli miktar trizma bazı tartılarak bir miktar damıtık suda çözüldükten sonra 1N HCl ile pH 8.6'ya ayarlanır. Son hacim tamamlandıktan sonra Whatman No:1 filtre kağıdından süzülür ve +4°C'de saklanır. SDS-PAGE için %0.4 oranında SDS ilave edilir.

3. Yığıma Jel Tamponu (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8)

Gerekli miktar trizma bazı tartılarak bir miktar damıtık suda çözüldükten sonra 1N HCl ile pH 6.8'e ayarlanır. Son hacim tamamlandıktan sonra Whatman No:1 filtre kağıdından süzülür ve +4°C'de saklanır. SDS-PAGE için %0.4 oranında SDS ilave edilir.

4. Tank Buffer

Trizma Bazı (Sigma)	1.21 gr
Glisin (Merck)	5.76 gr

Maddeler 1000 ml damıtık suda çözülür. SDS- PAGE için %0.1 oranında SDS ilave edilir.

5. Laemmli Buffer (X4)

0.5 M Tris-HCl pH 6.8	5.12 gr
Gliserin (Merck)	8.00 gr
Damıtık Su	3.00 ml
SDS (Merck)	2.00 ml
2- β -Merkaptoetanol (Merck)	4.00 ml
Bromo Fenol Mavisi (Merck)	0.025 ml

Gerekli miktarlar tartılıp temiz bir deney tüpü içerisinde homojen hale getirilir ve gün ışığına maruz bırakılmadan saklanır.

6. Laemmli Modifiye Buffer

Laemmli Buffer	2.5 ml
%10'luk TCA	0.5 ml
9 M Üre	1 ml
1 mM EDTA	1 ml

Gerekli miktarlar tartılıp temiz bir deney tüpü içerisinde homojen hale getirilir ve gün ışığına maruz bırakılmadan saklanır.

7. Boyama Çözeltisi

Coomassie Brilliant Blue (Sigma)	1.5 gr
İzopropil Alkol (Merck)	250 ml
Asetik Asit (Merck)	100 ml
Damıtık Su	650 ml

Boya çözündükten sonra Whatman No:1 filtre kağıdından süzülür ve renkli cam şişede oda sıcaklığında saklanır.

8. Boya Çıkarma Çözeltisi

İzopropil Alkol (Merck)	250 ml
Asetik Asit (Merck)	100 ml
Damıtık Su	650 ml

Gerekli miktarlar tartılarak 650 ml damıtık suda çözündürülür. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında renkli cam şişede saklanır.

9. Jel Saklama Çözeltisi

Jel saklamak amacıyla %7'lik Glasial Asetik Asit çözeltisi kullanılır.

10. % 10'luk Amonyum Per Sülfat (APS)

APS (Sigma)	1 gr
Damıtık Su	10 ml

Gerekli miktarlar tartılarak damıtık suda çözülür ve +4°C’de saklanır. Bir haftadan sonra taze hazırlanarak kullanılır.

11. %10’luk SDS-PAGE Ayırma Jel İçeriği

Akrilamid/Bis-akrilamid (Oxoid)	8.78 ml
Damıtık Su	10.84 ml
1.5 M Tris-HCL pH 8.6	6.58 ml
APS (Sigma)	125.00 µl
SDS	250 µl
TEMED (Oxoid)	10.00 µl

Gerekli miktarlar tartılarak kısa sürede süspansiyon hazırlanır. Polimerleşme başlamadan dikey elektroforezin alt kısma aktarılır.

12. %4’lük SDS-PAGE Yığma Jel İçeriği

Akrilamid/Bis-akrilamid (Oxoid)	0.81 ml
Damıtık Su	2.95 ml
0.5 M Tris-HCL pH 6.8	1.235 ml
APS (Sigma)	50.00 µl
SDS	125 µl
TEMED (Oxoid)	6.00 µl

%10’luk SDS-PAGE polimerleştikten sonra, yukarıdaki maddelerden gerekli miktarlar tartılarak kısa sürede süspansiyon hazırlanır. Polimerleşme başlamadan dikey elektroforezde %10’luk SDS-PAGE kısmın üzerine aktarılır. Polimerleşme başlamadan en kısa zamanda hava boşluğu bırakılmadan tarak yerleştirilir.

EK-3. Araştırmada Kullanılan Boya ve Diğer Çözeltiler

1. Kristal Viyole

Kristal Viyole (Merck)	10 gr
Etil Alkol (%95'lik)	100 ml

2. Lügol

İyot (Merck)	1 gr
Potasyum İyodür (Merck)	2 gr
Damıtık su	300 ml

3. Bazik Fuksin

Bazik Fuksin (Merck)	3 gr
Etil Alkol (%95'lik)	100 ml

4. Serum Fizyolojik

Sodyum Klorür (Merck)	8.5 gr
Damıtık su	1000 ml

5. İyot Çözeltisi

İyot (Merck)	1 gr
KI (Merck)	2 gr
Damıtık Su	100 ml

KI suda çözündükten sonra iyot ilave edilir ve çözmeye devam edilir. Membran filtreden geçirilip renkli şişede 2-3 hafta bekletilebilir.

6. Alfa-naftol Çözeltisi

Alfa-naftol (Merck)	5 gr
Etil Alkol (Merck)	100 ml

7. KOH çözeltisi

Potasyum Hidroksit (Merck)	10 gr
Damıtık Su	100 ml

8. Metil-Red Ayıracı

Metil Red (Merck)	0.050 gr
Etil Alkol (%95)	150 ml
Saf Su	100 ml

Metil Red, alkolde eritildikten sonra damıtık su eklenerek çözülür. Oda sıcaklığında saklanabilir.

EK-4. Antibiyotik Duyarlılık Testinde Kullanılan Standart Zon apları

Antibiyotik	Sembol	R	I	S
Siproflaksasin	CIP	≤ 15	16-20	≥ 21
Trimetoprim/Sülfametaksazol	SXT	≤ 10	11-15	≥ 16
Sefaperozon /sülbaktam	CES	≤ 16	32	≥ 64
Amoksisilin/klavulanik asit	AMC	≤ 19	-	≥ 20
Erirtomisin	E	≤ 13	14-22	≥ 23
Vankomisin	VA	-	-	≥ 15
Klindamsin	DA	≤ 14	15-20	≥ 21
Streptomisin	S	≤ 11	12-14	≥ 15
Tetrasiklin	TE	≤ 14	15-18	≥ 19
Imipenem	IPM	≤ 13	14-15	≥ 16
Ampisillin	AM	≤ 28	-	≥ 29
Novobiyosin	NV	≤ 14	15-16	≥ 17
Seftazidim	CAZ	≥ 14	15-17	≥ 18
Polimiksin B	PB	≥ 10	-	-

Klinik Laboratuar Standartları Ulusal Komitesi (Clinical and Laboratory Standarts Institute) tarafından önerilen antibiyotik zon çapları

ÖZGEÇMİŞ

Nevra Çine, 1984 yılında Samsun’da doğdu. İlk, orta, lise öğrenimini Samsun’da tamamladı. 2003 yılında girdiği Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü’nden 2009 yılında mezun oldu. 2010-2011 yılında Sinop Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı ve halen devam etmektedir.