

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**İZMİR VE ÇEVRESİNDEKİ GIDA ÜRETİMİNDE
ÇALIŞAN TAŞIYICILARDAN İZOLE EDİLEN
Staphylococcus aureus SUŞLARININ
İDENTİFİKASYONU; EPİDEMİYOLOJİK VE
FİLOGENETİK OLARAK GRUPLANDIRILMASI**

Emre MEMO

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Füsun B. UÇAR

Biyoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 401.01.04

Sunuş Tarihi : 22.05.2015

Bornova-İZMİR

2015

Emre MEMO tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “ **İzmir ve Çevresindeki Gıda Üretiminde Çalışan Taşıyıcılardan İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarının İdentifikasyonu; Epidemiyolojik ve Filogenetik olarak Gruplandırılması**” başlıklı bu çalışma E. Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’ nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 22.05.2015 tarihinde yapılan tez savunma sınavında adan oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı	: Prof. Dr. Füsün Bahriye UÇAR	
Raportör Üye	: Prof. Dr. Sabira Şöhret AYDEMİR	
Üye	: Doç. Dr. Evrim ÖZKALE	

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E. Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “**İzmir ve Çevresindeki Gıda Üretiminde Çalışan Taşıyıcılardan İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarının İdentifikasyonu; Epidemiyolojik ve Filogenetik Olarak Gruplandırılması**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, döküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edimeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışının olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

23/05/2015

İmzası

Emre MEMO

ÖZET

**İZMİR VE ÇEVRESİNDEKİ GIDA ÜRETİMİNDE ÇALIŞAN
TAŞIYICILARDAN İZOLE EDİLEN *Staphylococcus aureus* SUŞLARININ
İDENTİFİKASYONU; EPİDEMİYOLOJİK VE FİLOGENETİK OLARAK
GRUPLANDIRILMASI**

MEMO, Emre

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Füsün B. UÇAR

Mayıs 2015, 131 sayfa

Staphylococcus aureus sağlıklı insanların deri ve nazal boşluklarında yaygın bulunabilen bir bakteridir. Gıda kaynaklı rahatsızlıkların gıda çalışanları aracılığı ile dağılması dünya genelinde yaygın bir problemdir. Bu çalışmanın amacı da İzmir ili ve çevresinde gıda endüstrisi çalışanlarındaki *S. aureus* taşıyıcılığını analiz etmek, fenotipik olarak tanılanıp moleküler tiplendirmesinin yapılmasıdır.

Tüm *S. aureus* suşları gıda endüstrisi çalışanlarının burun deliklerinden izole edilmiştir. Suşların karakterizasyonu ve tiplendirmesi fenotipik testler, antibiyotik duyarlılık testi, multilokus sekans tiplendirmesi (MLST) ve pulsed-field jel elektroforezi (PFGE) ile yapılmıştır.

Çalışmada 1358 kişiden numune alınmıştır. Bunların arasından 64 kişi (% 4,71) *S. aureus* bakımından pozitif nazal taşıyıcı olarak saptanmıştır. % 14,06 sıda Metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) olarak tanımlanmıştır. Tüm izolatlara uygulanan PFGE analizi sonucunda tüm *S. aureus* suşları arasında % 80 üzerinde benzerlik gösterenler 13 pulsotipe ayrılmışlardır. MLST analizi sonucunda da 9 toplumsal kaynaklı MRSA (TK-MRSA) suşları 7 farklı sekans tip (ST6, ST12, ST15, ST97, ST188, ST737 ve ST837) göstermişlerdir.

Türkiye’ de gıda endüstrisi çalışanlarındaki MRSA taşıyıcılığı ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışma suşların coğrafik dağılımları ile ilgili bilgi vermesinden dolayı oldukça önemlidir. Bu çalışmada olduğu gibi

Türkiye’ den yeni kayıtların gösterilmesi ile bu organizmanın dağılım tablosuna açıklık getirilebilecektir.

Anahtar Kelimeler: *Staphylococcus aureus*, Toplumsal Kaynaklı- MRSA, PFGE, MLST, Gıda endüstrisi.

ABSTRACT**IDENTIFICATION OF *Staphylococcus aureus* STRAINS ISOLATED FROM TRANSPORTERS WHO ARE WORK IN FOOD INDUSTRY IN IZMIR AND THE SURROUNDING AREA; GROUPING AS EPIDEMIOLOGICALLY AND PHYLOGENETICALLY**

MEMO, Emre

MSc. in Biology.

Supervisor: Prof. Dr. Fusun B. UCAR

May 2015, 131 pages

Staphylococcus aureus is a common bacterium found on the skin and nasal passages of healthy people. The spread of food borne diseases via food handlers is a common and persistent problem all over the world. The purpose of this study was to determine the prevalence of *Staphylococcus aureus* carriage among the food industry workers in Izmir, and to investigate phenotypic and molecular typing of these isolates.

All of *S. aureus* strains isolated from food industry workers' nostril. Characterization and molecular typing of the strains was performed by phenotypic tests, antibiotic sensitivity test, multilocus sequence typing (MLST), and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE).

Among the 1358 people investigated, 64 (4.71%) nasal carriage were found to be positive for *S. aureus*. Methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) represented 14.06% of the isolates. PFGE analysis of all *S. aureus* strains revealed 13 pulsotypes with 80% cutoff similarity. MLST typing of 9 Community associated MRSA (CA-MRSA) strains showed 7 different sequence types (ST6, ST12, ST15, ST97, ST188, ST737, and ST837).

In Turkey, there are limited data on the molecular typing of MRSA obtained from food industry workers. This study is extremely important because it provides

information to the geographic distribution of strains. As new records are released in Turkey, the distribution table of these organisms will be clearer.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, CA-MRSA, PFGE, MLST, food industry.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezimin yürütülmesi ve tamamlanmasında ilgisini ve yardımlarını benden esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Füsün UÇAR' a, tezimin tamamlanmasında tüm sorunlarımda ilk önce fikrine başvurduğum, bilgi ve tecrübelerini her zaman benimle paylaşan değerli büyüğüm Dr. Onur AKPINAR' a ve değerli jüri üyelerine en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Yüksek lisans ve lisans eğitimim boyunca beni destekleyen ve her zaman yanımda olan başta Op. Dr. Selçuk KILINÇ olmak üzere tüm KOEK BİYOTEKNOLOJİ, BİYOMÜHENDİLİK ve MEDİKAL HİZMETLERİ SAN. ve TİC. LTD. ŞTİ. çalışanlarına, ayrıca ASKLEPİON DOKUZ EYLÜL LABORATUVAR, ÖZEL EĞİTİM, ÖZEL SAĞLIK DANIŞMANLIK ve AR-GE HİZM. SAN. ve TİC. LTD. ŞTİ.' ne teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmam Ege Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri kapsamında 2014 FEN 006 numaralı projeyle desteklenmiş olup, çalışmamda maddi destek sağlayan Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü' ne teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tüm eğitim hayatım boyunca desteklerini hiçbir zaman benden esirgemeyen ve bulduğum yere gelmemde en büyük emeğe sahip olan annem Sadiye MEMO, babam Ahmet MEMO, ablam Merve MEMO' ya, yaşamım boyunca tüm başarılarımı paylaşmayı dilediğim Özlem KARA' ya, özellikle tez yazımda beni destekleyen kuzenim Umutcan MEMO' ya ve her zaman yanımda olan dostlarıma, arkadaşlarıma tüm kalbimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	5
2.1. Tarihçe.....	5
2.2. Sınıflandırılması	5
2.3. <i>Staphylococcus aureus</i> ' un Genel ve Karakteristik Özellikleri	8
2.3.1. Morfolojik özellikleri	8
2.3.2. Hücre çeperi yapısı.....	9
2.3.3. Metabolik ve biyokimyasal özellikleri	10
2.3.4. Üreme ve kültürel özellikleri.....	11
2.3.5. Ekolojisi	12
2.3.6. <i>S. aureus</i> ' un genomu ve diğer genetik elementleri	13
2.4. <i>S. aureus</i> ' ta Patojeniteye Sebep Olan Virulens Özellikler.....	26
2.4.1. Kapsül oluşturma	26
2.4.2. Biyofilm	27
2.4.3. Hücre çeperi	27
2.4.4. Yüzey proteinleri.....	28
2.4.5. Salgıladığı enzimler.....	31
2.4.6. Toksinler	34
2.5. Epidemiyolojik Özellikleri.....	40
2.5.1. <i>S. aureus</i> ' un antibiyotik direnci aşamaları	42
2.5.2. Staphylococcal aşı çalışmaları	43
2.6. <i>Staphylococcus aureus</i> ' un Tanınması	45
2.6.1. Konvansiyonel (Fenotipik) tanılama teknikleri.....	45

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.6.2. Hızlı (Kit ile) tanılama teknikleri	48
2.6.3. Moleküler tiplendirme teknikleri.....	50
2.7. Türkiye’ de Yapılan Moleküler Tanılama ve Tiplendirme Çalışmaları ..	56
3. MATERYAL VE METOD.....	58
3.1. Materyal.....	58
3.1.1. Çalışmada kullanılan örnekler toplanması ve stoklanması.....	58
3.1.2. Kullanılan besiyerleri ve hazırlanması	58
3.1.3. Fenotipik ve biyokimyasal testlerde kullanılan çözeltiler ve hazırlanması.....	61
3.1.4. Antibiyotik direnci için kullanılan diskler.....	62
3.1.5. Hızlı tanılama için kullanılan kit	62
3.1.6. Moleküler tiplendirmede kullanılan çözeltiler ve hazırlanması	62
3.1.7. Kullanılan standart suşlar	68
3.1.8. Araştırmada kullanılan cihazların listesi	68
3.2. Metod.....	69
3.2.1. Örneklerin toplanması	69
3.2.2. <i>S. aureus</i> türlerinin izolasyonu ve diğer kültürel işlemler	70
3.2.3. Fenotipik ve biyokimyasal tanılama testleri	70
3.2.4. Hızlı tanılama kitinin kullanımı.....	71
3.2.5. <i>S. aureus</i> ’ un antibiyotiklere olan dirençlerinin saptanması.....	71
3.2.6. <i>S. aureus</i> ’ un moleküler tiplendirilmesi	72
4. BULGULAR.....	81
4.1. <i>S. aureus</i> İzolasyonu.....	81
4.2. Kültürel Tanılama.....	81
4.2.1. % 5 Kanlı Columbia agar	81
4.2.2. Fenol red mannitol salt agar	82
4.3. Biyokimyasal Tanılama.....	82
4.4. Kit ile Hızlı Tanılama	84

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
4.5. Sorulara Verilen Cevaplar ve İstatistiksel Bulguları.....	85
4.6. Stoklama.....	86
4.7. Antibiyotik Direnci	86
4.8. Moleküler Tiplendirme	89
4.8.1. PFGE	89
4.8.2. MLST	90
5. TARTIŞMA	99
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	106
ÖZGEÇMİŞ.....	129

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 <i>Staphylococcaceae</i> ailesine dahil cinslerin filogenetik yakınlıkları (Schleifer and Bell, 2009).....	6
2.2 <i>Staphylococcus</i> cinsine dahil türlerin yakınlıklarını gösteren dendrogram (Schleifer and Bell, 2009).....	7
2.3 <i>Staphylococcus aureus</i> ' ta profaj yardımı ile patojenite adasının eksizyonu ve taşınmasının mekanizması (Novick et al., 2010).....	17
2.4 SaPI sirkülerizasyonunun şematik gösterimi (Mir-Sanchis et al., 2012).	18
2.5 SaPI mobilizasyonunun replikasyon basamağının şematik gösterimi (Novick et al., 2010).	19
2.6 80α fajında SaPI enkapsülasyonunda kapsül yapısı (Cristie and Dokland, 2012).....	20
2.7 SaPI transferinin regülasyonunda görevli genler (Christie and Dokland, 2012).	22
2.8 <i>Staphylococcus</i> türlerinde bulunan <i>mec</i> gen kompleksinin 4 sınıfı (Hiramatsu et al., 2001)	25
2.9 ClfA ve ClfB aminoasit dizisinin karşılaştırılması (Eidhin et al., 1998).....	30
2.10 FnBPA nın yapısının diğer yüzey proteinleri ile karşılaştırılması (Foster and Höök, 1998).	31
2.11 a) Staphylococcal koagülaz b) vWbp (Friedrich et al., 2003).....	32
2.12 Benzilpenisilinin β-laktamaz ile hidrolizi (Bush, 1988).....	33
2.13 Alfa toksin yapısı (Berube and Wardenburg, 2013).....	35
2.14 PSM- <i>mec</i> Şeması (Queck et al., 2009).....	37
2.15 Staphylococcal eksfoliyatif toksinin etki bölgesinin şematik gösterimi (Gemmell, 1995).....	39

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.16 Antibiyotik çağında <i>Staphylococcus aureus</i> ' un yaşadığı 4 aşama (Chambers and DeLeo, 2009).....	42
2.17 <i>S. aureus</i> ' un koloni morfolojisinin % 5 Koyun kanlı agardaki görüntüsü (Newman, 2011).....	46
2.18 Mannitol' ün fruktoz-6-P' a dönüşümü (Kenny et al., 2012).	47
2.19 Lateks aglütinasyon kit örneği (Oxoid, 2014).	48
2.20 <i>S. aureus</i> kolonilerinin kromojenik agardaki görüntüsü (BD Diagnostics, 2014).	49
2.21 API ID 32 Staph hızlı tanılama kiti örnek görüntüsü (Biomérieux Industry, 2014).	49
2.22 MLST Analizi basamaklarının örnek ile gösterimi (Chambers and DeLeo, 2009).	55
3.1 Hazırlanan hücre agaroz karışımının kalıplara doldurulması.	76
3.2 Hazırlanan kalıpların endorf tüplerine konulması.....	77
3.3 PFGE için uygun agarozun dökülmesi.	78
3.4 PFGE işleminde kullanılan jel yürütme sistemi.....	79
4.1 % 5 Kanlı Columbia agarda β -hemoliz gösteren <i>S. aureus</i> kolonileri.....	81
4.2 FRMSA da <i>S. aureus</i> üremesi sonucu oluşan renk değişikliği.	82
4.3 Katalaz testinin pozitif sonucunda ortaya çıkan O ₂ sebebi ile oluşan hava kabarcıkları.....	83
4.4 Tüp koagülasyon testi sonucu oluşan jelimsi görüntü.	83
4.5 Şeker fermentasyonu sonucu besi yerinde oluşan renk değişikliği ve gaz çıkışı olmadığını gösteren tüpler.....	84
4.6 EM69(a) ve EM59(b) kodlu izolatların antibiyotik direnç testi görüntüsü.	87

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.7 Çalışmada uygulanan elektroforezlerin BIO-PROFIL 1D++ programı ile özel olarak ölçeklendirilmiş ve birleştirilmiş görüntüleri.	89
4.8 PFGE sonucu elde edilen pulsotipler ve dendrogram.	90
4.9 9 MRSA suşu ve 3 kontrolün 456 bp boyutundaki <i>arcC</i> gen bölgesinin görüntüsü.	91
4.10 9 MRSA suşu ve 3 kontrolün 456 bp boyutundaki <i>aroE</i> gen bölgesinin görüntüsü.	92
4.11 9 MRSA suşu ve 3 kontrolün 465 bp boyutundaki <i>glpF</i> gen bölgesinin görüntüsü.	92
4.12 9 MRSA suşu ve 3 kontrolün 429 bp boyutundaki <i>gmk</i> gen bölgesinin görüntüsü.	93
4.13 9 MRSA suşu ve 3 kontrolün 474 bp boyutundaki <i>pta</i> gen bölgesinin görüntüsü.	93
4.14 9 MRSA suşu ve 3 kontrolün 402 bp boyutundaki <i>tpi</i> gen bölgesinin görüntüsü.	94
4.15 9 MRSA suşu ve 3 kontrolün 516 bp boyutundaki <i>yqiL</i> gen bölgesinin görüntüsü.	94
4.16 9 MRSA suşunun filogenetik ilişkisini gösteren dendrogram.....	98

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Schleifer ve Bell'e (2009) göre <i>S. aureus</i> alt türlerinde şeker fermentasyonu ve bu fermentasyonda asit üretiminin karşılaştırılması.....	11
2.2 SaPI mobilitesinin basamakları.....	21
2.3 PSM lerin virülens etkileri (Otto, 2014b).	38
2.4 <i>S. aureus</i> aşılarının 2011 Kasım ayına kadar olan gelişmeleri (Spellberg and Daum, 2012).....	44
2.5 <i>S. aureus</i> ' un MLST' de dizilenen genlerin protein adları, kısaltmaları ve baz çifti uzunlukları (Enright et al., 2000).....	55
3.1 Test için kullanılan antibiyotiklerin doz miktarları ve referans zon çapları (CLSI, 2012).....	62
3.2 MLST için kullanılan primer dizileri (Enright et al., 2000).	64
3.3 Hazırlanan PFGE sisteminde akım ve doğrultu ayarları.....	79
4.1 Fermentasyon testinde kullanılan şekerler ve <i>S. aureus</i> ' un kullanım sonuçları. (+) kullanabiliyor, (-) kullanamıyor	84
4.2 Çalışanlara yöneltilen sorular ve kişilerin istatistiksel dağılımı (Sonuçlar 64 kişi üzerinden değerlendirilmiştir).	85
4.3 Tüm <i>S. aureus</i> izolatlarının antibiyotik direnç profilleri	88
4.4 MLST için elde edilen gen bölgesi dizilerinin veribankasına kayıtlı kabul numaraları.....	95
4.5 9 MRSA suşunun allelik profilleri ve MLST verileri	97

1. GİRİŞ

Staphylococcus aureus 1880 yılında Alexander Ogston tarafından bulunmasından buyana basit deri enfeksiyonlarından, ölümcül enfeksiyonlara kadar geniş bir patojenite gösteren gram pozitif bakteridir (Deurenberg and Stobberingh, 2008). *Staphylococcus* cinsi üyeleri ise geniş yayılım göstermeleri ve farklı koşullara adaptasyon sağlayabilmelerinden dolayı oldukça önemli bir yere sahiptir. Yaşam alanları olarak insan ve diğer memeli canlıların deri altlarını, mukozal tabakalarını kullanan bu türler, major patojen olarak bilinmektedirler (Götz and Bannerman, 2006).

Bakterilere karşı günümüzde en önemli silah olan antibiyotikler *S. aureus* türünün evriminde de önemli bir yere sahiptir. Penisilinin keşfinden sonra *S. aureus* enfeksiyonlarının tedavisi kolaylaşmış ancak çok fazla ve yaygın penisilin antibiyotiği kullanımı sonucunda penisiline direnç gelişmesi ile tedavi zorluğu tekrar ortaya çıkmaya başlamıştır. Metisilin, oksasilin, nafsilin gibi penisilinaza dirençli penisilin grubu antibiyotiklerin 1950 yıllarında keşfi ile bu sorun kısa sürede çözülmüş ise de 1961 yılında metisiline dirençli suşların tespit edildiği bildirilmiş (Chambers, 1988), metisiline dirençli *S. aureus* (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) olarak tanımlanmışlardır (Bozkurt vd., 2007). Günümüzde metisilin ve diğer antibiyotiklere direncin giderek artması ile MRSA ve bazı duyarlı suşlar dünyada özellikle hastane enfeksiyonu salgınlarına yol açan çok ciddi bir sorun haline gelmiştir (Haznedaroglu, 2009; Erdem, 2011).

MRSA kaynağı olarak hastane kökenlilerden çok sonra ortaya çıkan toplumsal kaynaklı MRSA suşlarını konu alan çalışmalar, özellikle asemptomatik olarak taşınan bu suşların dağılımı ve populasyon dinamiğinin anlaşılması açısından önemli olduğunu vurgulamışlardır. Keza bu suşların virülens faktörleri ve antibiyotiklere olan dirençliliklerinin de ortaya çıkması gerekmektedir (Fan et al., 2009).

Çalışmaların artması ve tiplendirme metodlarının gelişmesi ile paralel olarak üçüncü bir köken olarak besi hayvanlarından kaynaklandığı görülen MRSA suşları da ortaya çıkmıştır. Özellikle besi hayvanlarından kaynaklı suşlarda

protototip olarak kullanılan ST398 suşlarının insanlarda ortaya çıkması, besi hayvanları ile ilişkili veteriner, çiftçi gibi kişilerle başlaması tiplendirme analizleri ile ortaya çıkan sonuçlara örnek olarak verilebilmektedir (Bardiau et al., 2013). Son yıllarda çoklu antibiyotik direnci gösteren MRSA suşlarına bağlı enfeksiyonların artması nedeniyle hastane kökenli enfeksiyonların tedavisinde vankomisin kullanılmayada başlamıştır. Arka arkaya dünyanın birçok yerinden bildirilen vankomisin yarı dirençli suşlar antibiyotiklere direncin giderek daha büyük sorunlar ortaya çıkarabileceğini göstermektedir (Erdem, 2011).

MLST çalışmaları bakterilerde bazı dikkat çekici sonuçlar ortaya çıkarmaktadır. *S. aureus* gibi bakterilerde MLST işlemi genomdaki çok küçük değişiklikleri bile göstermektedir. Bu değişiklikler suşun ekolojisindeki farklılıkları kesin olarak ortaya koymaktadır. Bu tür bilgiler bir patojenin genetik kararlılığına veya bu durumdaki kararsız tutumuna dayanan ilaç ve aşı geliştirmedeki düşünülebilecek farklı stratejilere faydalı olabilir (Madigan et al., 2012). Moleküler tiplendirme ile gruplara ayrılan *S. aureus* tiplerini analiz edebilmek organizmanın yayılması ve tedavisi için geliştirilen yöntemlere katkısından dolayı oldukça önemlidir.

Günümüzde öncelikli ve uluslararası olarak kullanılan 4 temel tiplendirme metodu kullanılmaktadır: “Multi locus sequence typing (MLST), Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), *spa* tiplendirmesi ve *SCCmec* tiplendirmesi” (Mediavilla et al., 2012). “Bergey’s Manuel of Systematic Bacteriology” kitabında altın standart olarak gösterilen iki yöntem olan PFGE ve MLST en detaylı tiplendirme sağlayan yöntemlerdir. Toplumsal kaynaklı MRSA suşlarında MLST, hastane kökenli MRSA, suşlarında ise tiplendirmenin PFGE ile yapılması ayrıca önerilmektedir. PFGE nin jel tabanlı bir tiplendirme metodu olması, kısıtlı örneklerle çalışılabilmesi, kıyaslamalar açısından oldukça zor olması, veri tabanı oluşturmama gibi birtakım dezavantajları bulunmaktadır. *S.aureus*’un klonal yayılımını gösteren en iyi yöntem MLST olarak kabul edilmektedir. Bu yöntemde, yedi housekeeping genin (*arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yqiL*) DNA dizi analizi yapılır. Yedi hayati (housekeeping) genden beşinde benzerlik saptanırsa izolatlar aynı klonal komplekste (CC) yer alır. MLST analizi sonucunda incelenen bu yedi gende nokta mutasyonları sonucunda görülen farklılıklara göre sekans tipleri (ST)

tanımlanmaktadır. İdentik allel profiline ve SCCmec kasetine sahip olan izolatlar aynı MRSA klonu olarak kabul edilmektedir. Aynı genetik soyda yer alan izolatlar ST tipi, direnç fenotipi ve SCCmec tipine göre sınıflandırılmaktadır (Sancak, 2012). MLST sekans tabanlı tiplendirme yöntemi olması herhangi bir laboratuvarından çıkan sonucun tüm dünyadaki sonuçlarla karşılaştırılabilmesine imkan sağlamaktadır. Toplumsal kaynaklı suşlarda MLST uygulaması bu karşılaştırmaların yapılmasından, saklanabilir ve tekrar analiz edilebilir veriler vermesinden dolayı uygulanmaktadır.

S. aureus türlerinin sahip olduğu kalın ve farklı hücre çeperi bu virülens özelliklere ayrıca katkı sağlamaktadır. Hücresel yapıları, toksinler enzimler enfekte edilen hücrelerde ciddi hasara yol açmaktadır. *S. aureus* taşıdığı toksin genlerinin arasında oldukça büyük bir risk grubunu oluşturan enterotoksinler gıda zehirlenmelerinde ciddi pay sahibi olan faktörlerdir. Et ürünleri, süt, günlük gıda ürünleri, hazır gıdalar unlu mamüller en çok *S. aureus* ile ilişkili gıda zehirlenmelerine sebep olan gıda grupları olduğu önceki çalışmalarda görülmektedir (Aydin et al., 2011).

1997 yılında vankomisin tedavisine cevap vermeyen bir MRSA enfeksiyonu alternatif tedavi çalışmalarını hızlandırmıştır. Alternatif tedavilerin başlıcaları; doğal antibakteriyel bileşiklerin kullanımı, eski doğal tedavi yöntemleri, katyonik antimikrobiyal peptitler, kateter gibi enfeksiyon sebebi bakterilerin bulunabileceği yerlerin biyofilm oluşumunu engelleyen materyal kullanımı, bakteriyofajlar, fotodinamik terapi ve staphylococcal aşılardır (Kurlenda and Grinholc, 2012).

Aşı geliştirmenin hala daha devam ettiği ve ortaya çıkan ürünlerin henüz daha tam koruma ve tedavi sağlayamadığının görünmesi *S. aureus* çeşitliliği ve değişen virülens yapılarından kaynaklanmaktadır. Organizmayı iyi tanımak, gruplara ayırmak ve kökeninin bilinmesi bu tip yeni geliştirilen tedavi ürünlerine yardımcı olacağı düşünülmektedir.

Yukarıda belirtilen nedenlerle bu araştırmamızda sınırlı bir coğrafyada toplumsal kaynaklı *S. aureus* suşlarının yayılmasının çok kolay olduğu düşünülen bir risk grubu olan gıda endüstrisinde çalışan kişilerin burunlarından elde edilen

izolatların, altın standart olarak kabul edilen tiplendirme yöntemleri olan PFGE ile hem metisiline duyarlı suşlar incelenmiş, hemde çok daha önemli olduğu düşünülen MRSA suşları MLST ile tiplendirilerek iki metodun ve MRSA suşlarının uluslararası veritabanları ile kıyaslanması amaçlanmıştır. Ülkemizde konu ile ilgili çalışmalar henüz yeni başlamıştır. Bu çalışmanın, gelecekte yapılacak olan filogenetik çalışmalara öncülük edecek, hem de devam eden aşı çalışmalarına yardımcı olacağı düşünülmektedir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Tarihçe

Staphylococcus aureus insanlar ve hayvanlarda enfeksiyon ve gıda zehirlenmelerine sebep olduğu için güçlü bir patojendir. *S. aureus*' un öncelikli habitatı insanlarda burun mukozası ve deri, sıcak kanlı hayvanların da kürkleridir (Salasia, 2011).

Staphylococcus, ilk defa 1880 yılında Birleşik Krallık' ta Aberdeen Üniversitesi' nde Cerrah Alexander Ogston tarafından hastası James Davidson' ın osteomiyelitinden aldığı apse örneğinde tanılanmıştır. Ogston, evinin arkasına kurduğu laboratuvarında daha önce Robert Heinrich Herman Koch tarafından kullanılan metil-anilin boyası ve aldığı Zeiss marka mikroskobu ile çalışmalarına başlamış ve gözlemlediği mikroorganizmayı *Staphylococcus* olarak isimlendirmiştir (Newsom, 2008).

1884 yılında Alman mikrobiyolog Friedrich Julius Rosenbach iki farklı pigmente sahip *Staphylococci* kolonilerini tanılamış ve sarı pigment oluşturanları *Staphylococcus aureus*, beyaz pigment oluşturanları *Staphylococcus albus* olarak isimlendirmiştir (Todar, 2008).

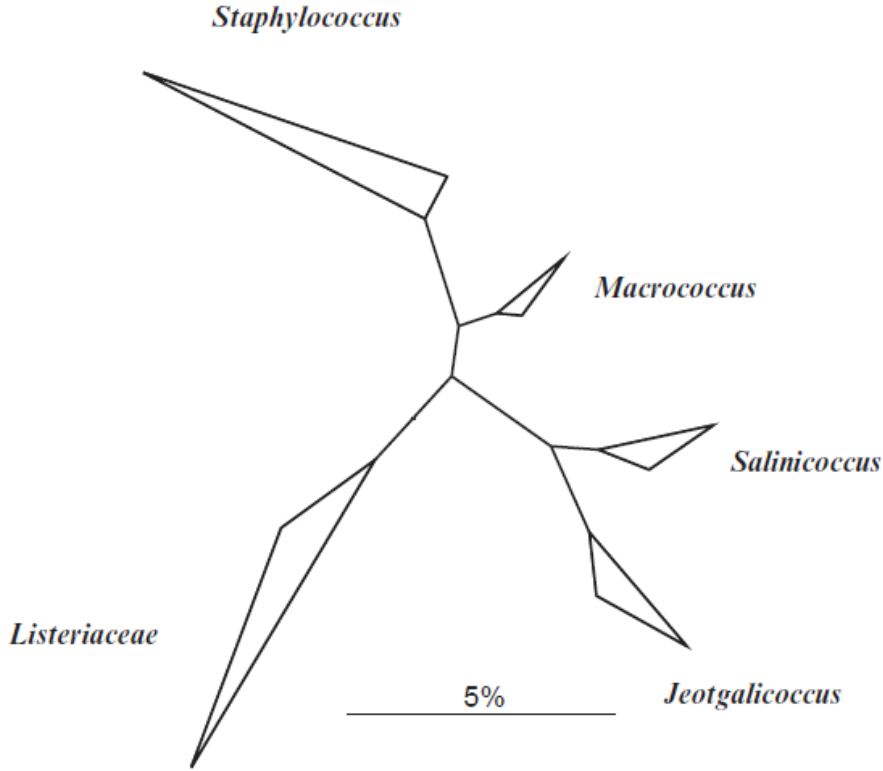
Staphylococcus Yunanca “üzüm salkımı” anlamına gelen “*staphyle*” ve “*coccus*” kelimelerinden türetilmiştir (Schleifer and Bell, 2009).

Böylece *Staphylococcus* terimi 100 yıldan uzun bir süredir en önemli enfeksiyon etkenlerinden biri olarak tıp dünyasını meşgul etmektedir (Haznedaroğlu, 2015).

2.2. Sınıflandırılması

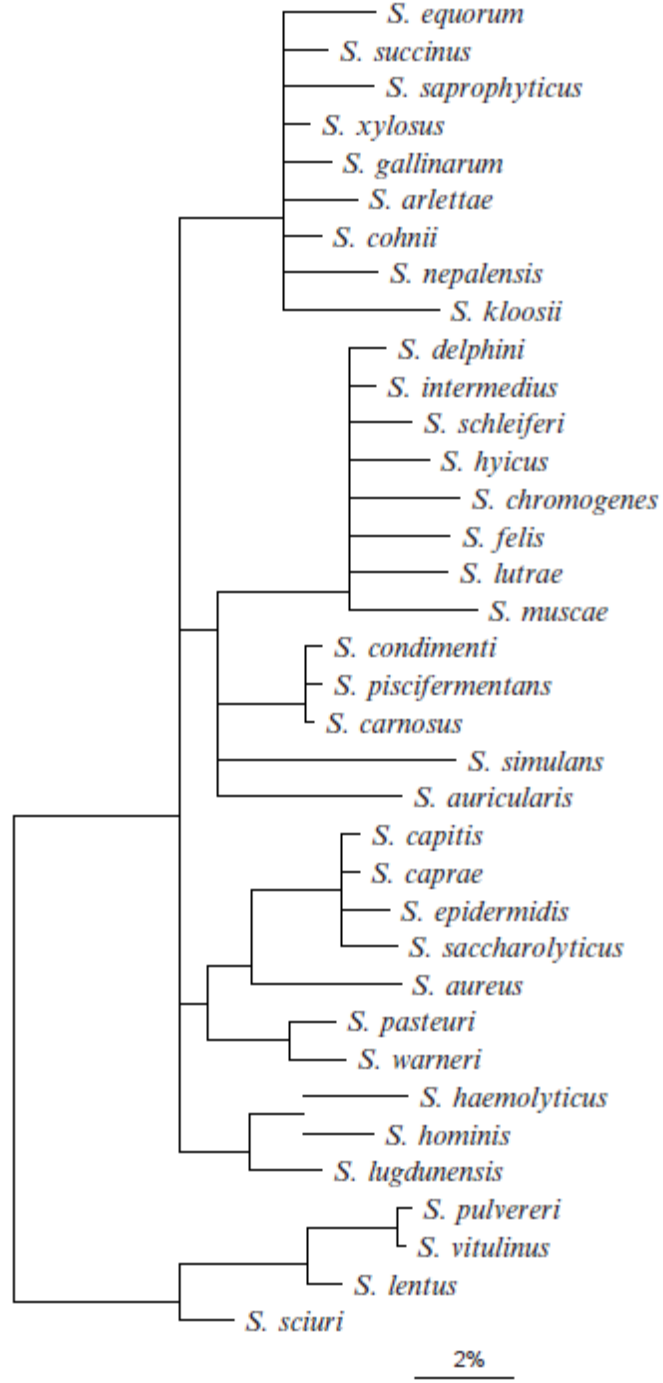
“Bergey’s Manual Of Systematic Bacteriology Volume: 3, *Firmicutes*” kitabındaki sınıflandırmaya göre, *Firmicutes* şubesinin, *Bacilli* sınıfı, *Bacillales*

ordosunda bulunan *Staphylococcaceae* familyasını; *Staphylococcus*, *Jeotgalicoccus*, *Macrococcus* ve *Salinicoccus* olmak üzere 4 cins oluşturmaktadır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 *Staphylococcaceae* ailesine dahil cinslerin filogenetik yakınlıkları (Schleifer and Bell, 2009).

Staphylococcus cinsi içerisinde de 37 tür bulunmaktadır (Şekil 2.2). *Staphylococcus aureus*' ta *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ve *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* olmak üzere iki alt tür ile yerini almıştır (Schleifer and Bell, 2009).



Şekil 2.2 *Staphylococcus* cinsine dahil türlerin yakınlıklarını gösteren dendrogram (Schleifer and Bell, 2009).

Staphylococcus geçmişte morfolojik olarak çok benzeyen *Micrococcus* ile birlikte *Micrococcaceae* familyasında yer almıştır. *Staphylococcus* ve *Micrococcus* tipik solunum metabolizmasına sahip aerobik bakterilerdir. Her ikisinde katalaz pozitifdir. Bu özellik bu iki grubun *Streptococcus* ve diğer bazı gram pozitif koklardan ayırt edilmesine olanak verir. *Micrococcus* ve *Staphylococcus* cinsi basit olarak oksidasyon-fermentasyon testi ile ayırt edilebilirler. *Micrococcus* zorunlu aerobtur ve yalnızca oksijenli ortamda glukozdan asit oluşturur. Buna karşılık *Staphylococcus* fakültatif aerobdur, hem oksijenli hemde oksijensiz ortamda glukozdan asit oluşturabilirler. Ayrıca *Staphylococcus* üyeleri küme oluştururken *Micrococcus* üyeleri oluşturmaz (Schleifer and Bell, 2009).

Bu fizyolojik özellik sonrasında iki tür arasındaki farklar belirginleşmeye başlamıştır. En büyük fark 1965 yılında DNA tabanlı karşılaştırma yapıldığında *Micrococcus*' un G+C oranının % 63 - 73, *Staphylococcus*' un ise % 30 - 39 olduğu görülmüş ve birbirlerinden oldukça uzak iki cins oldukları ortaya çıkmıştır. Sonrasında yapılan filogeni çalışmalarında hücre çeperi bileşenleri, sitokromlar ve menaquinonlar, hücresel yağ asitleri ve polar lipidler, DNA-rRNA hibridizasyonu ve 16S rRNA karşılaştırmaları da aradaki farkları göstermiş ve *Staphylococcus*, *Micrococcus* tan farklı olarak *Bacillales* ordosunda “Düşük G+C oranına sahip Gram-pozitif Bakteriler” olarak sınıflandırılmıştır (Gillespie and Hawkey, 2006).

2.3. *Staphylococcus aureus*' un Genel ve Karakteristik Özellikleri

2.3.1. Morfolojik özellikleri

S. aureus çapı 0.5 – 1.5 µm olan tek, çift, dördü ve kısa (3-4 hücre) zincirler halinde ve türün karakteristiği olan birden çok hücrenin oluşturduğu düzensiz üzüm salkımı benzeri halde bulunan gram pozitif bakterilerdir (Schleifer and Bell, 2009).

2.3.2. Hücre çeperi yapısı

Staphylococcal hücre çeperinin ana komponentleri peptidoglikan ve teikoik asittir. Hücre duvarının kuru ağırlığının %50-60' ı peptidoglikan, %30-50' si teikoik asittir ve peptidoglikana kovalent olarak bağlanmıştır (Peacock, 2007).

S. aureus, peptidoglikan biyosentezinin bakteriyel türlerde ilk kez çalışılan ve konu için referans olacak sonuçların ortaya çıkmasını sağlayan organizmadır (Izaki et al., 1967).

Hücre duvarındaki peptidoglikan hücrenin şeklini korumasını sağlayan ana yapıdır. Kısa peptidlere çapraz bağlı glikanlardan oluşan heteropolimer yapılıdır. Glikan birimleri N-asetilglukozamin ve N-asetilmuramik asidin $\beta(1-4)$ glikozidik bağları ile bağlanması sonucu oluşur. Bu bağlar çok güçlü olmalarına rağmen peptidoglikanın gerçek sağlamlığı birbirlerine çapraz bağlı peptit zincirlerinden oluşmaktadır (Madigan et al., 2012)

S.aureus' un peptidoglikan yapısı II. tip peptidoglikan modifikasyonuna örnektir. Yapısında bulunan N-asetilmuramik asit şekerlerinde *O*-asetil grupları ortaya çıkmaktadır. *S. aureus'* un peptidoglikanındaki N-asetilmuramik asitlerin % 50' si 4-N,6-O diasetil türevleri olarak bulunmaktadır ve bakterilerde peptidoglikan yapısının $\beta(1-4)$ glikozidik bağlarını parçalayan lizozim enzimine karşı dirençli olduğu düşünülmektedir (Götz et al., 2006).

S. aureus' ta lizozime olan direncin mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak tartışılan ve gerçeğe yakın birçok olasılık vardır. Örneğin yukarıda da anlatıldığı gibi 11 farklı gram pozitif ve gram negatif türünde *N*-asetilmuramik asitin *O*-asetilasyonuna rastlanmıştır. İkinci bir örnek *Staphylococcus'* larda farklı polimer ve polisakkaritlerin hücre duvarına tutunması, üçüncüsü *S. aureus'* un sahip olduğu ve sayısı çok fazla olan çapraz peptit bağlarıdır. Son olarak peptidoglikan yapısında bulunan *N*-asetil glikozamin yerine *Bacillus cereus* ve *Streptococcus pneumoniae* türlerinde olduğu gibi glukozamin bulunmaktadır. (Bera et al., 2005).

S. aureus' un peptidoglikanında bir diğer fark yaratan özellik ise peptidlerdeki çapraz bağların pentaglisin köprüleri ile oluşmasıdır. Metisilin direncinde rol alan FemX, FemA, ve FemB proteinlerinden FemX ilk glisin aminoasidini peptid önceki kompleksin 3. aminoasiti olan *L*-Lizin'e bağlar arkasından FemA 2 ve 3. glisini bağlar. FemB ise 4 ve 5. glisini bir sonraki kompleksin peptid yapısının ucunda bulunan D-Alanin aminoasidine bağlayarak pentaglisin yapısını tamamlar (Götz et al., 2006).

Lizozime direncinin bir sebebi de bu çapraz köprüler olduğu halde pentaglisin köprüleri oldukça etkili bir ajan olan "glisilglisin endopeptidaz" yani "Lysostaphin" tarafından parçalanabilmektedir. "Lysostaphin" son yıllarda antibiyotiğe dirençli suşlar için klinik tedavi uygulamalarında da kullanılmaktadır (Bastos et al., 2010).

2.3.3. Metabolik ve biyokimyasal özellikleri

Staphylococcus cinsinin tanımlanmasında en önemli biyokimyasal özellik koagülaz aktivitesinin saptanmasıdır. Plazmayı koagüle eden bu enzimin üretimi ile bilinen *Staphylococcus* türleri ve alt türleri rahatlıkla iki gruba ayrılabilir. Bir diğer önemli biyokimyasal özelliğide katalaz enzimi üretimidir. Bu enzim ile de *Staphylococcus*' lar *Streptococcus*' lardan ayrılmaktadırlar. *S. aureus*' a daha yakından bakacak olursak koagülaz ve katalaz üretimlerinin dışında alkalen fosfataz, termostabil nükleaz, hemoliz enzimleri ve hyaluronidaz enzimlerini üretebilmektedirler. Ancak oksidaz, β -galaktozidaz, β -glukuronidaz gibi enzimleri üretemezler (Schleifer and Bell, 2009).

Çizelge 2.1' de detaylı olarak da verildiği gibi *S. aureus* alt iki türü bazı karbonhidrat kaynaklarını aerobik ortamda fermente edebilmekte ve asit oluşturmaktadır. Bu sırada da gaz oluşumu gözlenmemektedir. Ancak bazı karbonhidratları parçalarken asit üretmezler (Schleifer and Bell, 2009).

Çizelge 2.1 Schleifer ve Bell'e (2009) göre *S. aureus* alt türlerinde şeker fermentasyonu ve bu fermentasyonda asit üretiminin karşılaştırılması.

Not: (+) Fermentasyon sonucu asit üretimi mevcut, (-) Asit üretimi mevcut değil, +(-) Değişken

No	Karbonhidrat	<i>S. aureus</i> subs. <i>aureus</i>	<i>S. aureus</i> subs. <i>anaerobius</i>	No	Karbonhidrat	<i>S. aureus</i> subs. <i>aureus</i>	<i>S. aureus</i> subs. <i>anaerobius</i>
1	Adonitol	-		19	Ksiloz	-	-
2	Amigdalın		-	20	Laktoz	+(-)	-
3	Arabinoz	-	-	21	Liksoz	-	
4	Arabitol	-		22	Maltoz	+	+
5	Dekstrin	-		23	Mannitol	+(-)	-
6	Dulsitol	-		24	Mannoz	+	-
7	Eritritol	-		25	Melezitoz	-	-
8	Eritroz	-		26	Melibioz	-	-
9	Fruktoz	+	+	27	Raffinoz	-	-
10	Fukoz	-		28	Ramnoz	-	-
11	Galaktitol		-	29	Riboz	+	-
12	Galaktoz	+(-)	-	30	Salisin	-	-
13	Gentiobioz	-	-	31	Sellobioz	-	-
14	Gliserol	+	-	32	Sorbitol	-	-
15	Glukoz	+	+	33	Sorboz	-	
16	İnositol	-	-	34	Sükroz	+	+
17	İnulin		-	35	Trehaloz	+	-
18	Ksilitol	-	-	36	Turanoz	+(-)	

2.3.4. Üreme ve kültürel özellikleri

Staphylococcus' lar aerob ve fakültatif anaerobik bakterilerdir. Yüksek tuz konsantrasyonunda (% 10 NaCl) ve 18-40°C arasında klasik besiyerinde üreyebilme özelliklerine sahiptir. Optimal üreme ısısı 30-37°C ve pH 7-7.5 dir. Kanlı agarda 18-24 saatte yuvarlak düzgün kenarlı hafif konveks opak 1-4 mm çapında koloniler oluştururlar. (Bilgehan, 2004)

S. aureus, 18-24 saatte pigmentli (sarı-portakal rengi, krem rengi), S tipli, yuvarlak, hafif kabarık ve çoğunluğu kanlı agarda β -hemoliz yapan koloniler oluşturur. Belirgin kapsül oluşturan suşlar parlak ve nemli bir görünüme sahiptir. *S. aureus*' un kanlı besiyerinde küçük, pigmentsiz ve β -hemoliz oluşturmeyen varyantları tanımlanmıştır.

Staphylococcus aureus birçok ticari sıvı besiyerinde, sıvı triptikaz soy, Brain-Heart infüzyon ve triptoz fosfat gibi sıvı besiyerlerinde kan katkılı ya da kan katkısı olmaksızın çok iyi üreyebilirler. Bunların dışında ayırt edici besiyeri olarak mannitol salt agar, lipaz salt mannitol agar, Columbia-colistin-nalidixic asit (CNA) agar ve Braid-Parker agar kullanılmaktadır. Bu besiyerleri gram negatif bakterilerin üremesini baskımlarken *Staphylococcus*' lar ve benzeri gram pozitif bakterilerin üremesini sağlarlar (Gillespie and Hawkey, 2006).

S. aureus' ta aynı suşlarına dahil koloniler genelde aynı morfolojik özellik gösterirken (boyut, yoğunluk, kenar özellikleri, pigmentasyon vb.) farklı suşlar 2 veya daha fazla koloni morfolojisi gösterebilirler (Gillespie and Hawkey, 2006).

Staphylococcus' lar değişik selektif ya da non selektif ortamlarda ayırt edici koloni morfolojisi gösterirler. Klinik testlerde özellikle *Staphylococcus aureus*' un diğer *Staphylococcus*' lardan ayrılması önemlidir (Gillespie and Hawkey, 2006).

2.3.5. Ekolojisi

Staphylococcus cinsinin üyeleri doğada oldukça yaygın bulunurlar ve çeşitli nişleri işgal ederler. *Staphylococcus*' ların aynı anda farklı ortamlarda yaşayabilme ve adaptasyon yeteneklerinin bir sonucu olarak bakteriler arasında; insan ve diğer memeliler keza kuşların deri, deri altı tabakaları ve mukozal tabakalarında yaşayan majör tür olarak gösterilmektedir (Götz and Bannerman, 2006).

S. aureus insanlarda özellikle erişkinlerde burun deliklerinde bulunmaktadır. *S. aureus*' un nazal mukozaya seçici olarak bağlandığı görülmüştür. *S. aureus* nazal taşıyıcılığı; hastane dışındaki toplam insan popülasyonunun % 10' undan

daha az iken, hastane ortamında % 40 ın üzerinde olduğu belirtilmektedir (Götz et al., 2006).

1985 yılında De la Fuente ve arkadaşları tarafından da *Staphylococcus aureus subsp. anaerobius*' un koyunlarda yaşadığı saptanmıştır (Götz et al., 2006).

2.3.6. *S. aureus*' un genomu ve diğer genetik elementleri

2.3.6.1. Bakteriyal genomu

S. aureus' un genomu tek parça halinde yaklaşık 2.7-2.8 mbp uzunluğunda dairesel bir kromozomdur. Bu uzunluğa ek olarakta ekstra kromozomal aksesuar genetik elementler eklenmektedir (Hiramatsu et al., 2013). Broad Enstitüsü' nün hazırladığı genom istatistiklerine bakıldığında *Staphylococcus aureus*' un verilerinde % G+C oranı ortalama % 32,73 kodladığı gen sayısı ortalama 2662 olduğu görülmektedir (Broad Institute).

2.3.6.2. Plazmidler

Staphylococcus' ların sahip olduğu tüm plazmidlerin boyutları 1.2 kb ile 100 kb arasında değişmektedir. Tüm plazmidler dairesel çift iplikli DNA dan oluşmaktadır. Ayrıca “theta” ve “Rolling circle (RC)” replikasyon modellerinin her ikisini de kullandıkları bilinmektedir (Hensel and Shimdt, 2008).

2.3.6.3. Transpozonlar

DNA transpozonlar bakterilerde insersiyon sekansları (IS) olarak tanımlanmıştır. Ancak sonrasında bir çok organizmada bulundukları saptanmıştır. Bu elementler genel olarak bir genomik bölgeden bir başkasına “kopyala-yapıştır” mekanizması ile taşınmaktadırlar (Kazazian, 2004).

S. aureus genomu insersiyon sekansları, transpozonlar ve transpozon benzeri elementler gibi heterojen mobil genetik elementler barındırmaktadır. Bu

genetik elementler bakterinin evriminde önemli bir rol oynarlar ve kromozom yada diğer mobil genetik elementler ile birlikte iş görürler (Alibayov et al., 2014).

Staphylococcal transpozonlar oldukça küçük elementler olmalarına rağmen direnç genleri kodlayabilirler. Örnek olarak Tn552 bla geni ile penisiline direnç kazandırmakta, Tn554, eritromisin, spektinomisin ve makrolid-linkosamid-streptogramin B antibiyotiklerine direnç genleri kodlamaktadır. Bu elementlerin çoklu kopyaları staphylococcal kaset kromozomlara, plazmidlere ve kromozomlara entegre olabilirler. Büyük boyutlu transpozonların (18 kbp) tekli kopyaları oldukça nadir görünmekte fakat tetrasiklin, trimethoprim, vankomisin ya da aminoglikosid direnç genleri kodlayabilirler. Metisiline direnç geni ise spesifik bir transpozon olan Tn4291 ile penisilinaz plazmidi (pI524) tarafından taşınabilmektedir (Alibayov et al., 2014).

2.3.6.4. Bakteriyofajlar

Bakteriyofajlar, 13 familya ve 30 cins ile yeryüzündeki en verimli yaşam formu olarak bilinmekte ve 1×10^8 tür ile tüm biyosfere yayıldığı tahmin edilmektedir (Derenski, 2009).

2.3.6.5. Patojenite adaları

Patojenite adaları birçok organizmada virülens genleri barındırmaları ile tanınırlar.

Patojenite adaları genel olarak horizontal gen transferi ile edinilmektedir. Ancak zayıf patojen ve patojen olmayan enterik organizmaları güçlü patojenlere dönüştürmeden bu patojenite adalarının edinilmesinin sorumlu olduğu bilinmekte ve buradaki mobiliteleri çok yakın zamana kadar tam olarak ayırt edilemediği için diğer edinme yollarının arızalı bölgelerin defekti, mutasyon veya başka genotipik düzenlemelerin olabileceği de akla gelmektedir (Hensel and Schmidt, 2008).

Klinik olarak önemi olan tüm bakteriyel toksinlerin bu mobil genetik elementler ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Bu toksinler arasında difteri, antraks, tetanoz, botulizm, kolera, toksik şok, eksfoliyatif dermatit, gıda zehirlenmesi, diyare, *Shigella*' ya bağlı dizanteri, nekrotik pnömoni ye sebep olan toksinler ve diğer birçok toksin bulunmaktadır. Staphylococcal patojenite adaları da kodladıkları süper antijenler ile bu mobil genetik elementlere dahil olmaktadır (Hensel and Schmidt, 2008).

Bu adalar 15 -20 kb uzunluğunda elementler olup toksijenik suşlar ın kromozomlarına yerleşmiş ve fajlar ile ilişkileri kapsamında karakterize edilmişlerdir. İlişkili oldukları özel fajlar sebebi ile yüksek mobiliteye sahip oldukları görülmüştür. Ancak oldukça fazla dejenere olmuş olan 3.14 kb boyutundaki birisine sekanslanan 5 *S. aureus* genomunda da rastlanmıştır (Hensel and Schmidt, 2008).

Prototip olarak ilk sekanslanan patojenite adası SaPI 1 (*Staphylococcus aureus* Patojenicity Island 1) TSST-1 (Toxic Shock Syndrome Toxin-1) ve ek olarak 2 süper antijen olan SEK ve SEL yi içermektedirler (Novick, 2003).

Bu SaPI ailesinin diğer üyelerinden SaPI 3 enterotoksin B ve SaPI 4 enterotoksin C ek olarak diğer 2 süper antijeni kodlamaktadırlar (Novick, 2003).

SaPI 1 ve SaPI 2 TSST-1 in genini içerirler ve kesip çıkarılması, indüklenmesi, replikasyonu staphylococcal fajlar tarafından yapılmakta ve yüksek verimlilikle kapsül haline getirilerek normal ve yardımcı fajların boyutunun 1/3 boyutunda olan faj benzeri enfeksiyon partikülleri haline getirilir ve bu şekilde transfer edilir (Spilman et al., 2012).

Ayrıca SaPIbov2 hariç tüm staphylococcal patojenite adaları aynı kromozomal bölgeye (attc) entegre olup her zaman aynı düzenlemeye sahiptirler (Spilman et al., 2012).

Sekanslanarak tanımlanması yapılmış 15 farklı SaPI' nın varlığı bilinmekte ve bunların 2 tanesi non- aureus *Staphylococcus*' lara entegre olabilmektedir (Spilman et al., 2012).

Staphylococcus aureus Patojenite Adaları (SaPI)

Toksik şok sendromuna neden olan *S. aureus* geni 15.2 kb uzunluğundaki patojenite adası olan SaPI1 ile taşınmaktadır. Bu patojenite adasının ılımlı bir staphylococcal faj olan 80α ile çok iyi bir ilişkisi bulunmaktadır (Spilman et al., 2012).

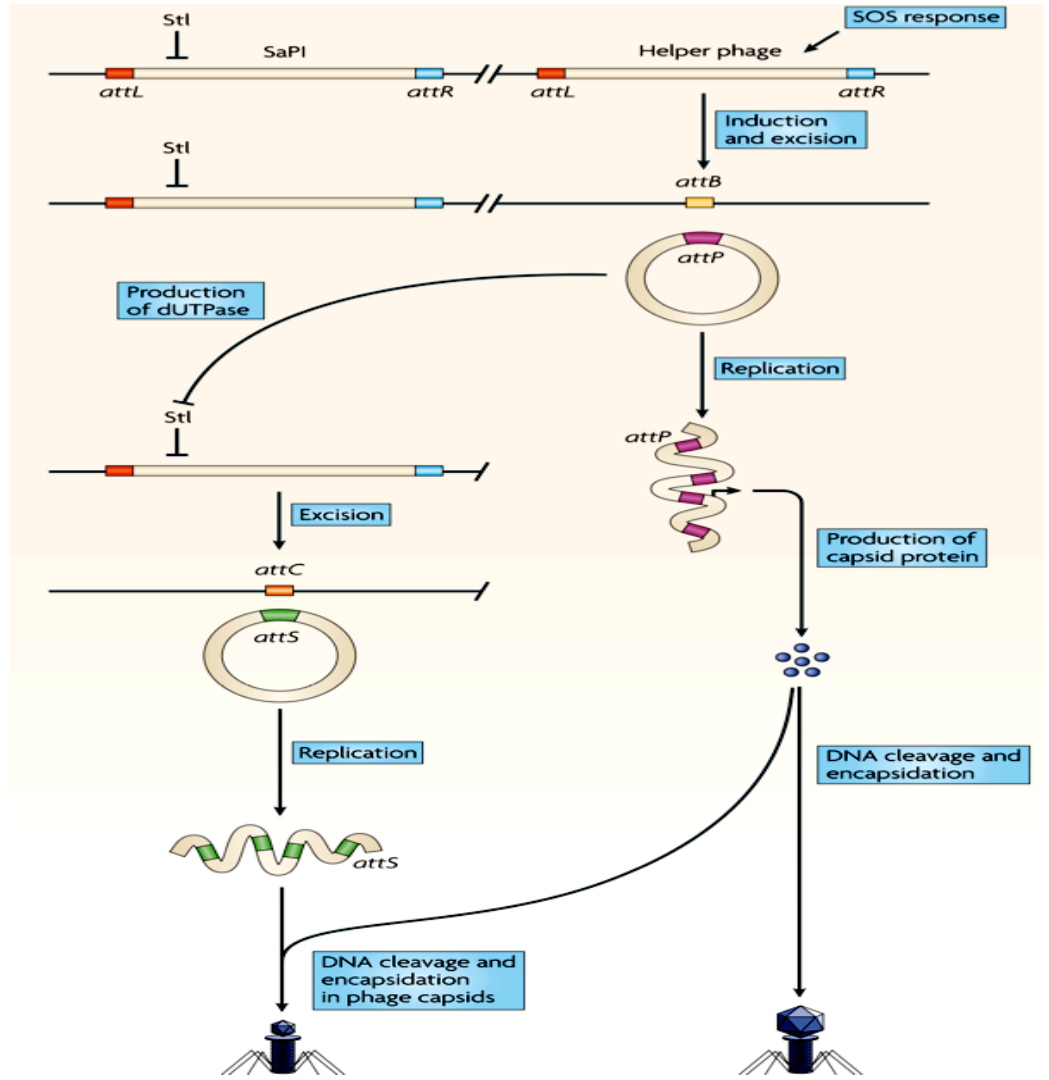
Fajın gelişme aşamasında SaPI lar özel kromozomal bölgesi olan attc den çıkar ve otonom olarak replike olur. Fajın gelişimine katılır ve boyutu ile orantılı olan faj partiküllerine dönüştürülür. Transfer edildiği alıcı organizmada SaPI kendi bünyesinde kodladığı integras proteini ile ATTC bölgesine homolog rekombinasyon ile entegre olur (Spilman et al., 2012).

Ancak SaPI ların çıkarılıp otonom olarak replikasyonunda, enkapsülasyonu ve transferinde birden çok faj fonksiyonu gerekmektedir. Örneğin SaPI1 ile 80α arasındaki ilişki bu aşamaları kapsamaktadır. Bir benzeri de kolifaj P4 ve P2 arasında görülmektedir (Spilman et al., 2012).

Bu ilişki diğer staphylococcal fajlarda da denenmiş ancak sadece Φ13 fajı ile SaPI1 arasında kısmi bir ilişki gözlenmiştir. Bu ilişkide sadece eksizyon aşamasındadır replikasyon ve genetik elementin transferinde Φ13 fajının fonksiyonuna rastlanmamıştır (Spilman et al., 2012).

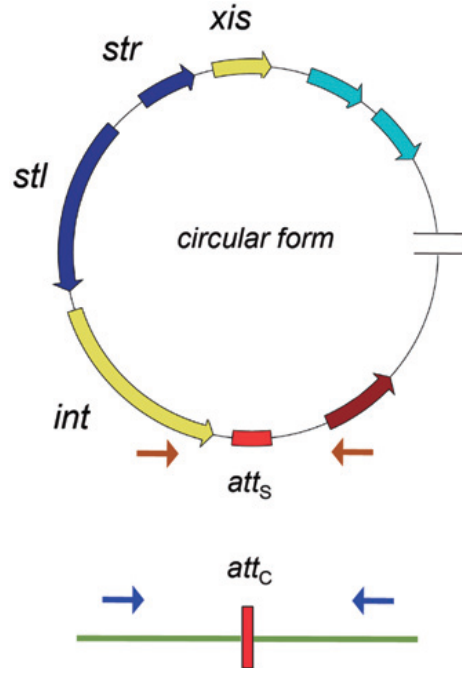
SaPI ların Mobilitesinin Analizi

Eksizyon: SaPI1 in kromozomdan eksizyonunu katalizleyen proteini kodlayan *xis* geni SaPI genomunda bulunmaktadır. Bu gen diğer staphylococcal ılımlı fajlarda bulunan *xis* ile oldukça benzerdir. Bu sebep ile 80α dışında Φ13 eksizyon aşamasında etkili olduğu düşünülmektedir. *xis*⁻ SaPI mutantları ile yapılan çalışmalarda eksizyon işleminin ortamdaki yardımcı fajlardan kaynaklı *xis* fonksiyonu ile sorunsuz yapıldığı görülmüştür. Ancak ortamda yardımcı faj yokluğunda eksizyon işleminin yapılmadığı saptanmıştır. Bu durum eksizyon işleminde yardımcı faj bağımlı birden çok elementin iş gördüğünü kanıtlamaktadır (Mir-Sanchis et al., 2012; Novick et al., 2010) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 *Staphylococcus aureus* 'ta profaj yardımı ile patojenite adasının eksizyonu ve taşınmasının mekanizması (Novick et al., 2010).

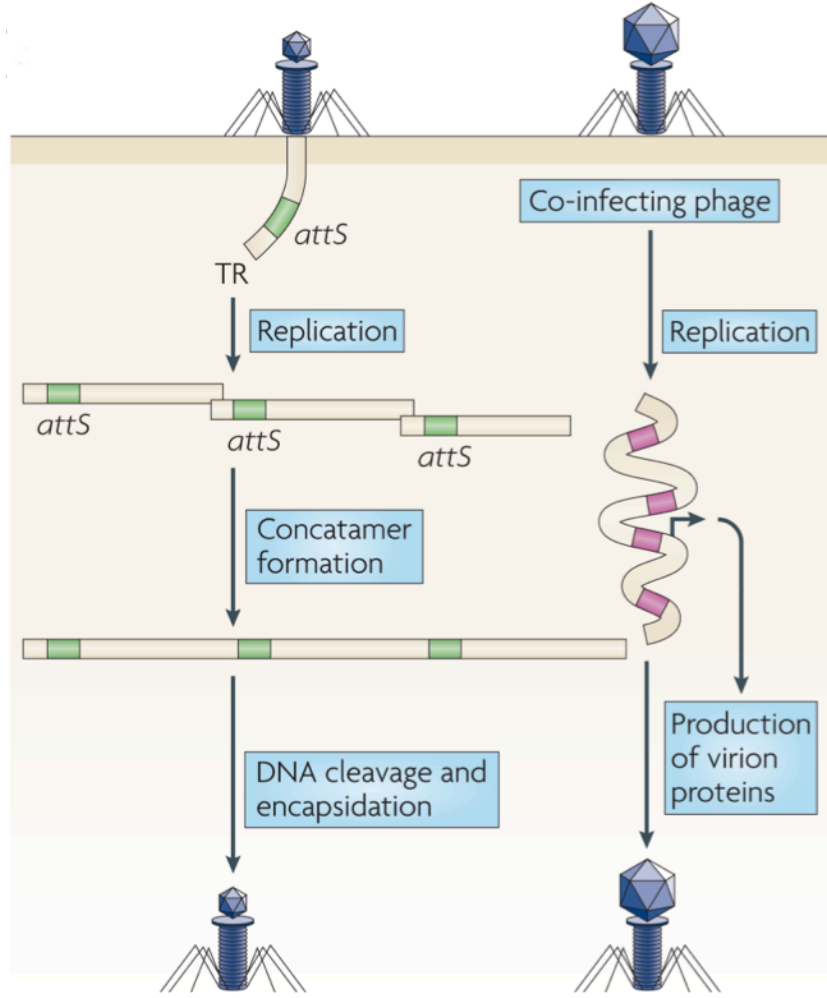
Sirkülerizasyon: SaPI hücre enfekte edildikten sonra kromozoma entegrasyon aşamasına kadar uçlarındaki *attL* ve *attR* bölgelerinin birbirlerine homolojisi ile kısa bir zaman sirküle halde bulunmaktadır. Bu durum hem homolog rekombinasyon için, hem de hücre içine girdiğinde stabilitesi için gereklidir (Mir-Sanchis et al., 2012, Ubeda et al., 2003) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 SaPI sirkülerizasyonunun şematik gösterimi (Mir-Sanchis et al., 2012).

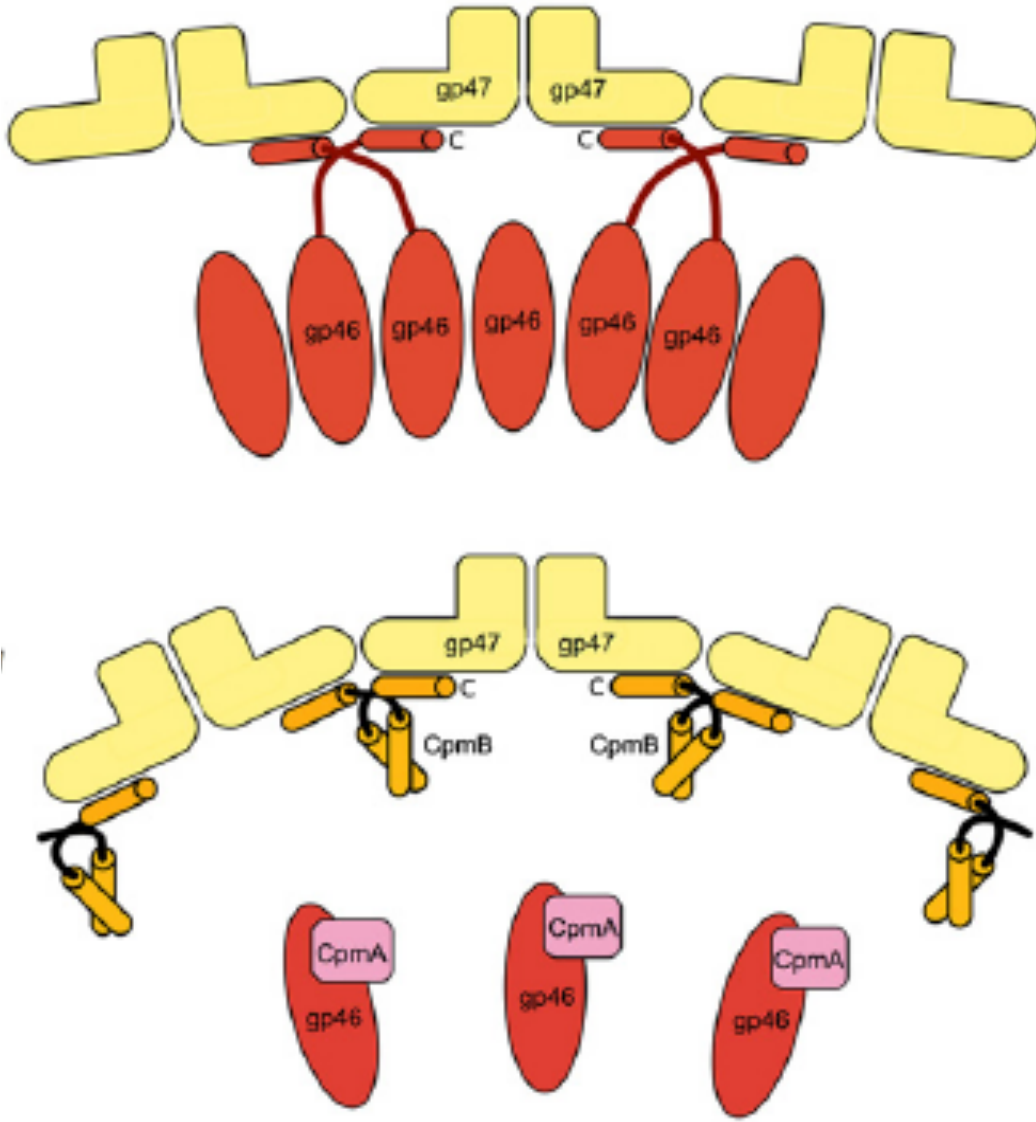
Replikasyon: Eksizyon sonrasında SaPI lar yaygın olarak replikasyona başlarlar ve bu replikasyon lineer yada sirküler formlardan her hangi birinde başlayabilmektedir. SaPI 1 ile ilgili yapılan çalışmalarda 80α ile enfekte edilmiş hücrelerde hücrenin lizisine kadar bir hücrede ortalama 120 SaPI 1 materyalinin bulunabildiği gösterilmiştir (Ruzin et al., 2001).

Replikasyon ile hücrede konkatamerik DNA dediğimiz ucuca eklenmiş tam SaPI parçaları bulunur. SaPI tarafından kendine özgü kodlanan terminaz enzimi ile bu parçalar belirli yerlerden keserek paketlenmeye hazır hale getirmektedir (Novick et al., 2010) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5 SaPI mobilizasyonunun replikasyon basamağının şematik gösterimi (Novick et al., 2010).

Enkapsülasyon: SaPI gen parçaları ortamdaki yardımcı faj genomlarının taşıdığı genetik bilgi ile sentezlenen yapısal proteinler ile enkapsüle edilerek faj benzeri transdüksiyon partikülleri içerisine paketlenirler. Bu paketler SaPI boyutuna bağlı olarak normal 80α kapsidlerinden daha küçük olurlar. Ayrıca yapılan araştırmalarda da gösterilmiştir ki SaPI in kodladığı CpmA (gp7) ve CpmB (gp6) küçük boyutlu kapsidlerin oluşmasında rol alan proteinlerdir. Ayrıca CpmB dimerleri SaPI taşıyacak prokapsidlerde faj partikülünün yapısal proteini olan gp47 ye bağlanarak normal 80α kapsidinden daha küçük kapsidlerin oluşumunu sağlamaktadır (Christie and Dokland, 2012; Tormo et al., 2008) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6 80α fajında SaPI enkapsülasyonunda kapsül yapısı (Cristie and Dokland, 2012).

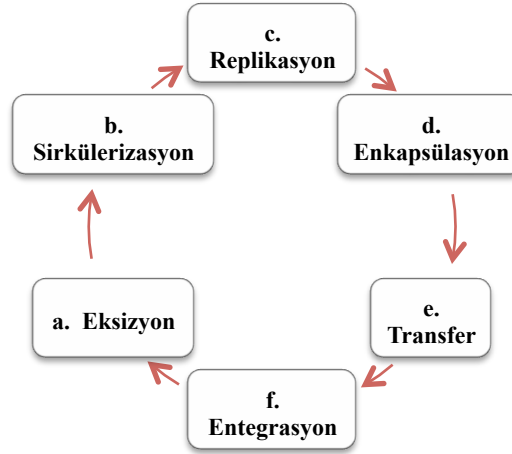
Transfer: SaPI patojenite adalarının faj partikülleri ile taşınmasında yardımcı fajların taşınmasından hiçbir farkı yoktur. Tek fark aktarılan genetik bilgi sadece SaPI yada faj ile kombine bir patojenite adası genomunu içermektedir (Ruzin et al., 2001).

İntegrasyon: SaPI in *attR* bölgesine yakın kısmında normal hücredeki integras benzeri kendine özgü bir protein barındırmaktadır. Bu protein sayesinde *recA* defektli alıcılara yüksek frekans ile transfer edilebilmektedir. SaPI in alıcı kromozomuna her zaman aynı bölgeden entegre olmasından dolayı SaPI 1 in oldukça özel bir fonksiyonel integrasyon mekanizmasına sahip olduğu

düşünülmektedir. Faj bağımsız integrasyonunu test etmek amacı ile pürifiye edilmiş SaPI 1 DNA'sı *recA*⁻ alıcılara uygulanmış ve hepsinde başarılı sonuçlar alınmıştır. Bunun dışında SaPI in *Staphylococcus aureus* kromozomuna bilinen site-spesifik rekombinasyon türlerinden biri olan tirozin rekombinaz şeklinde entegre olduğu bilinmektedir (Lindsay et al., 1998).

SaPI mobilitesinin basamakları Çizelge 2.2' de döngü şeklinde özetlenmiştir.

Çizelge 2.2 Özet olarak SaPI mobilitesinin basamakları.

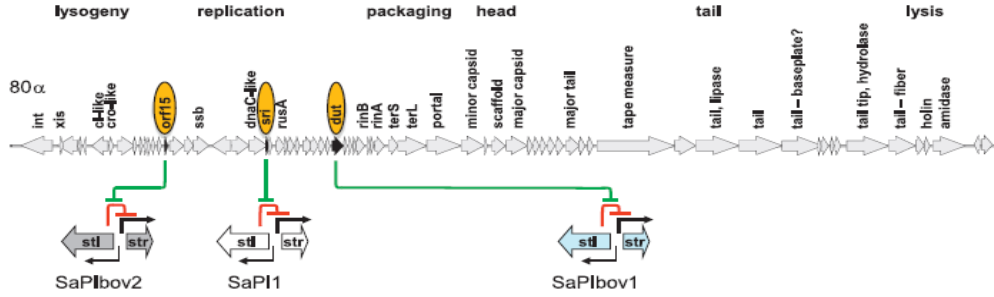


SaPI Transferinin Regülasyonu

SaPI regülasyonu yardımcı faj DNA'sının SOS tepkisi ile başlamaktadır. Bu tepki ile staphylococcal fajlarda farklı SaPI'ları regüle eden genlerde mevcuttur. Örneğin SaPI1 in regülasyonunda *sri* görev almaktadır. Ayrıca SaPIbov2 de orf15 kodladığı fonksiyonu bilinmeyen küçük bir protein ile regüle edilmektedir. SaPIbov1 de ise oldukça korunmuş olan dUTPaz enziminin transkripsiyonu ve eksizyon işleminde gerekli elementler sentezlenmeye başlar ve dUTPaz enzimi SaPIbov1 in eksizyonunu regüle eder.

SaPI genomunda *int* ve *xis* genlerini *stl* ve *str* promotorları kontrol etmektedir. Bunlardan *stl* majör promotordur ve *str* de onun tarafından kontrol

edilir. Yardımcı faj tarafından sentezlenen dUTPaz enzimi *stl* promotoruna bağlanarak aktivasyonunu, dolayısıyla *str* aktivasyonunu sağlar ve böylece *xis* ve *int* transkripsiyonu başlar (Novick et al., 2010) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7 SaPI transferinin regülasyonunda görevli genler (Christie and Dokland, 2012).

SaPI'nin bir diğer regülasyonu da enkapsülasyon aşamasında olmaktadır ve kontrolü DNA hasarının onarımında iş gören LexA proteini tarafından yapılmaktadır. LexA SaPI operon I'inin transkripsiyonunu engellemekte ve bu operon yardımcı fajın ürettiği faj yapılarının SaPI için üretilecek küçük boyutlu partiküllerin yapılarına katılan proteinleri ve paketleme aşamasında gerekli olan TerS gibi proteinleri kodlamaktadır. Yardımcı faj genomunun SOS tepkisi ile LexA operon I bağlanma bölgelerinden uzaklaşarak transkripsiyonun başlamasına yol açar ve böylece faj partikülü yapısal proteinleri SaPI için sentezlenmeye başlamış olur (Ubeda et al., 2007).

2.3.6.6. Kaset kromozomlar

“Staphylococcal Cassette Chromosome” yani SCC olarak bilinen kromozomlar *Staphylococcus* türleri arasında genetik madde transferinde rol oynayan hareketli bir genetik elemandır. MRSA suşlarında özellikle metisiline direnci sağlayan *mec* geni bu kaset yolu ile hücre tarafından kullanılmaktadır ve SCC_{mec} olarak adlandırılmaktadır. SCC_{mec} kasetinin kökeni henüz aydınlatılamamasına rağmen *S. sciuri*'nin PBP (Penisilin bağlayıcı protein) 'si ile PBP2a (Metisilin bağlayıcı protein)' sı arasında % 90'a yakın bir homoloji ortaya çıkması kökenin bu bakteri türü olabileceği düşünülmektedir (Said-Salim et al., 2003, Erdem, 2011).

SCCmec çok özel bir mobil genetik element sınıfıdır. Çünkü hareketliliğini sağlayacak faj ile ilişkili genler, spesifik transpozazlar ve *tra* genleri içermemektedirler. *SCCmec*' in mobilite için iki adet kaset kromozom rekombinazını (*ccrA* ve *ccrB*) yada sadece *ccrC* kodlaması yeterlidir. Bunlar *SCCmec*' in kromozoma entegrasyonunu, doğru bir şekilde oryantasyonunu ve kromozomdan eksizyonunu sağlamaktadır. Büyük boyutlu oluşları *SCCmec* in bir patojenite adası olduğunu çağırıştırır. Ancak bu yanlış bir yaklaşımdır. Çünkü *SCCmec* elementleri virülens gen taşımamaktadır. bu nedenle antibiyotik direnç adası daha doğru bir ifade olacaktır (Noto and Archer, 2006).

SCCmec gen kompleksi sadece β -laktam antibiyotiklerine direnci kodlamaktadırlar. Bazı transpozonlar yada entegre olmuş plazmit kopyaları β -laktam olmayan diğer pek çok antibiyotiğe direnç kazandırmaktadırlar (Noto and Archer, 2006).

İlginç olarak *mec* geni taşımayan kaset kromozomlarda tanımlanmıştır. Bunlar kapsül gen öbekleri, fusidik asit direnci yada civa direnç operonları gibi karakteristik genler içermektedirler. Ancak bu kaset kromozomlar *ccr* genleri ve entegre oldukları bölge açısından *SCCmec* elementleri ile ortak birtakım özellikler paylaşırlar. Adlandırmaları da kodladıkları karakteristik gene göre olmaktadır. *SCCcap1*, *SCCfur*, *SCCHg* gibi (Int. Work. Goup., 2009).

SCCmec Tipleri

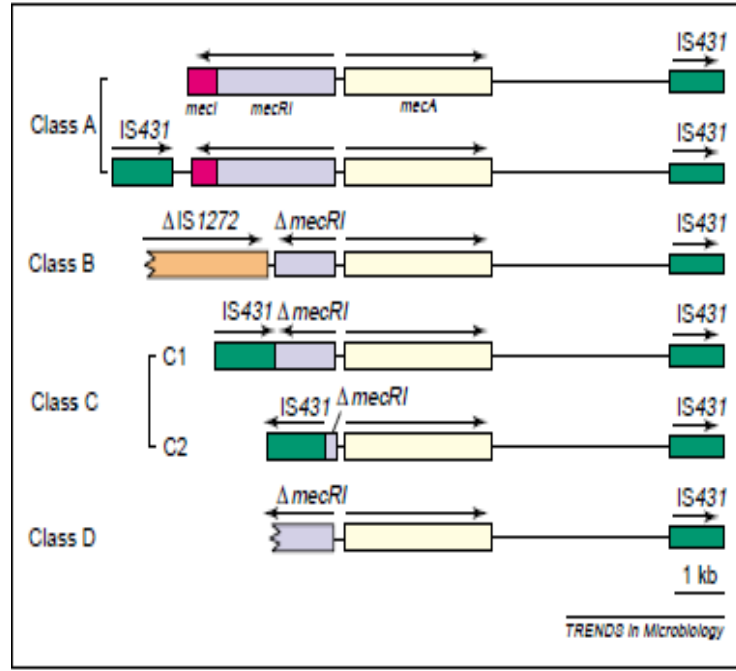
(2001) yılında Hiramatsu ve ekibi *mecA* geninin her zaman bir mobil kaset element içerisinde olduğunu gösterdikleri zaman metisilin direncinin biyolojisini ve MRSA suşlarının evrimsel ilişkisini anlayabilmemiz için oldukça önemli bir bilgiyi bize sunmuşlardır.

Şu ana kadar tanımlı 8 *SCCmec* elementi ve bunların alt tipleri bulunmaktadır. Benzer elementler sadece *S. aureus*' ta değil koagülaz negatif *Staphylococcus*' larda da görülmüştür (Hiramatsu et al., 2013).

SCCmec elementi her zaman *S. aureus*’ ta replikasyon orjinin yanında *orfX* adlı fonksiyonu bilinmeyen bir ORF içerisindeki attB_{sc} adlı 15bp’lik bir bölgeye entegre olmaktadır. Yapısındaki *mec* ve *ccr* genleri *SCCmec* elementlerinin sınıflandırılmasında kullanılmaktadır (Hiramatsu et al., 2001).

SCCmec Tiplerinin Genetik Analizi

Staphylococcal kaset kromozomlar ile taşınan *mecA* geni 4 tip kompleks şeklindedir (Şekil 2.8). A tip *mec* gen kompleksi prototip kompleks olup *SCCmecII*, *SCCmecIII* ve *SCCmecIV* tiplerinde bulunmuştur. Bu tip kompleks *mecA* geninin ön bölgesinde *mecRI* ve *mecI* regülatör genleri barındırır. Ayrıca *mecA* geninin arka bölgesinde HVR (Hiper Variable Region) ve 431 nolu insersiyon sekansı bulunmaktadır. B tipi *mec* gen kompleksinde *SCCmecI*, *SCCmecIV* ve *SCCmecVI* da bulunmaktadır. *mecA* geninin önünde ucu kesilmiş bir *mecRI* ve *IS1272* bulunmaktadır. Arka bölgesinde yine HVR ve *IS431* içermektedir. 2 alt tipe sahip C tip *mec* gen kompleksi mevcuttur. Aralarında *mecA* geninin ön bölgesinde bulunan *IS431* sekanslarının oryantasyonu açısından fark vardır. C1 ve C2 farklı bir çok *mec* elementi içermektedirler. Bu durumda onların bağımsız bir evrim geçirdiklerini göstermektedir. Ancak tüm tiplerde *mecA*, *mecI* ve *mecRI* sekansları %99 un üzerinde identiktir. Bunların dışında da sadece *Staphylococcus hominis*’ te tanımlanmış D tipi *mec* elementi vardır (Hiramatsu et al., 2001).



Şekil 2.8 *Staphylococcus* türlerinde bulunan *mec* gen kompleksinin 4 sınıfı (Hiramatsu et al., 2001).

SCCmec elementlerinin sınıflandırılmasında görev alan ve hepsinde oldukça korunmuş olarak bulunan bir diğer gen kompleksidir *ccr* gen kompleksidir. *ccrA* ve *ccrB* olmak üzere iki alt birimden oluşan yapıları *SCCmecI*, *SCCmecIV*, *SCCmecVI* ve *SCCmecVIII* bulundurmakta tek olan *ccrC* ise *SCCmecV* ve *SCCmecVII* tarafından barındırılmaktadır (Hiramatsu et al., 2001).

SCCmec' in Mobilitesi ve Regülasyonu

SCCmec' in horizontal mobilitesi tüm elementlerde bulunan *ccrAB* genlerinin ikisi yada *ccrC* site-spesifik rekombinaz proteinlerini kodlayan genler ile olmaktadır. Bunlar serin rekombinaz tip proteinler olup invertaz/resolvaz ailesine dahildirler ve büyük faj integrazlarına benzemektedirler (Noto and Archer, 2006).

ccrA ve *ccrB* genleri *S. aureus'* ta analiz edildiklerinde sonuçlar şu şekilde olmuştur. *ccrB* tek başına üretildiğinde eksizyon gerçekleşmekte ancak bu eksizyon alternatif bir attR2 bölgesinden olmaktadır. Yani kromozomdaki attB bölgesinden eksizyon için her ikisinin de ekspresyonu gerekmektedir. Aynı

zamanda *SCCmec* elementinin *attS* bölgesine insersiyonu için her ikisinde ihtiyaç vardır. Ancak CcrA'nın fazla ekspresyonu bu insersiyonun frekansını düşürmektedir. Yapılan çalışmalarda da CcrB proteininin DNA ile interaksyonunun bulunduğu ve CcrA proteininin CcrB yada CcrB-DNA kompleksi ile interaksyonda bulunduğu hipotezini desteklemektedir (Shore et al., 2011).

1960 lı yıllardan bu zaman yapılan çalışmalarda antibiyotik bulunmayan ortamlarda stoklanan ya da bu ortamlarda çok uzun kültürleri olan MRSA suşlarının spontane bir şekilde *mecA* genlerini yani metisilin dirençlerini kaybettikleri görülmüştür. (Katayama et al., 2000) Ayrıca dokunulmamış *ccr* genleri olan bazı suşlarda da eksizyon işleminin çok düşük frekanslarda olduğu görülmüştür. Bu da *ccr* gen ekspresyonundan elde edilen Ccr proteini konsantrasyonu eksizyon işleminin başlaması için yeterli olamayacak düzeyde olduğu düşünülmekte ve bu konuyu aydınlatmak amacı ile de çalışmalar devam etmektedir.

S. aureus organizmada oluşturdukları kolonizasyonlarda ekstrasellüler çeşitli maddeler sentezleyerek dokularda bölgesel hasara, kan ve diğer vücut sıvıları ile yayılarak organizmada ciddi enfeksiyonlara sebep olabilmektedirler (Netsvyetayeva et al., 2014).

2.4. *S. aureus'* ta Patojeniteye Sebep Olan Virulens Özellikler

2.4.1. Kapsül oluşturma

Kapsül oluşturma fagositoza karşı bakteri hücrelerini koruyan virülens bir özelliktir. *S. aureus'* ta kapsül sentezleme ilk olarak 1931 yılında Gilbert tarafından tanımlanmış ve bir çok *S. aureus* suşunun kapsül sentezlediği belirtilmiştir (von Eiff et al., 2007). Daha sonra 1982 yılında yapılmış olan bir çalışmada *S. aureus* için kapsül polisakkaritleri tiplendirilmiş ve bunun şeması yayınlanmıştır. Bu çalışmada da *S. aureus* kapsülleri 8 serotipe ayrılmıştır. (O'Riordan et al., 2004). 1985 yılında da Sampolinsky ve arkadaşları (Sampolinsky et al., 1985) farklı kaynaklardan elde ettikleri büyük bir *S. aureus*

koleksiyonunda yaptıkları kapsül tiplendirme sonucunda 3 yeni serotip keşfederek kapsüller serotip sayısını 11' e çıkartmışlardır.

Daha sonra yapılan çalışmalarda da bu 11 kapsül serotipinin sadece ikisinin (tip 5 ve tip 8) klinik olarak önemli enfeksiyonlara sebep olan suşların % 85' inde bulunduğu saptanmıştır (Verdier et al., 2006). *S. aureus* enfeksiyonlarından korunmak amacı ile üzerinde çalışılan kapsül polisakkaritleri tabanlı aşı geliştirme projelerinde faz 3 e kadar gelen çalışmalarda diyaliz hastalarında *S. aureus* kaynaklı enfeksiyonların ortaya çıkmasında % 60 a varan azalmalar olduğu görülmüştür (Roghman et al., 2005).

2.4.2. Biyofilm

S. aureus çok katmanlı, glikokaliks ve farklı proteinlerden oluşan bir biyofilm sentezlemektedir. İlk çalışmalarda glikokaliksin çoğunu teikoik asitlerin oluşturduğu bildirilmiştir. Ancak son dönemde yapılan çalışmalarda spesifik bir polisakkaritin bulunduğu görülmüştür. Biyofilm oluşumunda en çok iş gören bu hücrelerarası polisakkarit antijenin (Polysaccharide Intercellular Antigen, PIA) % 80 – 85' i β -1,6 bağlı *N*-Asetilglukozamin, % 15 - 20 fosfat ve ester bağlı süksinat taşıyan *N*-Asetilat *D*- Glukozaminil'den oluşmaktadır (Archer et al., 2011).

Biyofilm oluşturma genel olarak implante edilen medikal malzemelerde enfeksiyona sebep olan suşlar için oldukça önemlidir (McCarthy et al., 2015).

2.4.3. Hücre çeperi

S. aureus' un hücre çeperi teikoik asitler, yüzey proteinleri ve kalın bir peptidoglikan tabakasından oluşmaktadır. Çeperin görevleri arasında hücreyi kimyasal ajanlara karşı korumakta vardır. *S. aureus'* ta ise farklı bağlanmalar ile oluşturulan peptidoglikan *S. aureus* bakterisini bir çok antimikrobiyal maddeye karşı korumaktadır (Szweda et al., 2012).

Teikoik asitler ve lipoteikoik asitler gram pozitif hücre çeperinin bir diğer önemli yapılarıdır. Teikoik asitler ve lipoteikoik asitler kolonizasyonda ve *in vivo*

enfeksiyonlarda rol oynamaktadırlar. Hücreyi zararlı kimyasallara karşı koruma, enzim aktivitelerini kontrol etme ve hücre çeperindeki katyonik dengeyi sağlama, yüzeylere ve reseptörlere tutunma teikoik asitlerin görevleridir (Xia et al., 2010).

2.4.4. Yüzey proteinleri

2.4.4.1. Staphylococcal protein A (SpA)

Yüzey proteinleri çok çeşitli ve virülenste çok önemli olmalarından dolayı ayrı başlık olarak incelenmektedir.

SpA 47 kDa boyutunda hücre duvarı ile ilişkili birçok klinik *S. aureus* izolatı ve bazı *S. epidermidis* izolatları tarafından sentezlenen bir proteindir (Silverman et al., 2005).

SpA üretimi hücrenin büyümesinin logaritmik fazında sentezlenir ve *agr* geni ile kontrol edilmektedir. Oksijen düzeyinin düşük olduğu yumuşak dokularda SpA üretimi indüklenerek enfeksiyon oluşumu kolaylaşmaktadır (Silverman et al., 2005).

Fareler ile yapılan deneylerde SpA' nın etkileme mekanizması B hücrelerinin spesifik immünoglobulinleri ile etkileşerek hücre trafiğini karıştırır. Böylece immün sistemi zayıflatmaktadır (Silverman et al., 2005).

2.4.4.2. Kollajen bağlayan protein (Cna)

S. aureus' un kollajen madde ve kollajen dokulara bağlanabildiği 1989 yılında Switalski ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (Switalski et al., 1989).

S. aureus' un kollajen dokulara tutunması ve enfekte etmesi sonucunda osteomiyelit meydana gelmektedir. *cna* geni ile kodlanan bu Cna proteini *S. aureus'* ların kollajene tutunmasını sağlayan tek faktördür (Smeltzer and Gillaspay, 2000).

2.4.4.3. Elastin bağlayan protein (EbpS)

EbpS hücre duvarına bağlı elastine bağlanma özelliği gösteren bir staphylococcal yüzey proteindir. Bu adesin özelliği ile bağ doku gibi elastin fibrillerinden zengin olan dokularda fazla *S. aureus* enfeksiyonlarının en önemli nedenidir (Nakakido et al., 2014). Elastin bakımından en zengin dokular olan akciğer, deri ve damarlarda *S. aureus* enfeksiyonlarına oldukça fazla rastlanmaktadır (Nakakido et al., 2007).

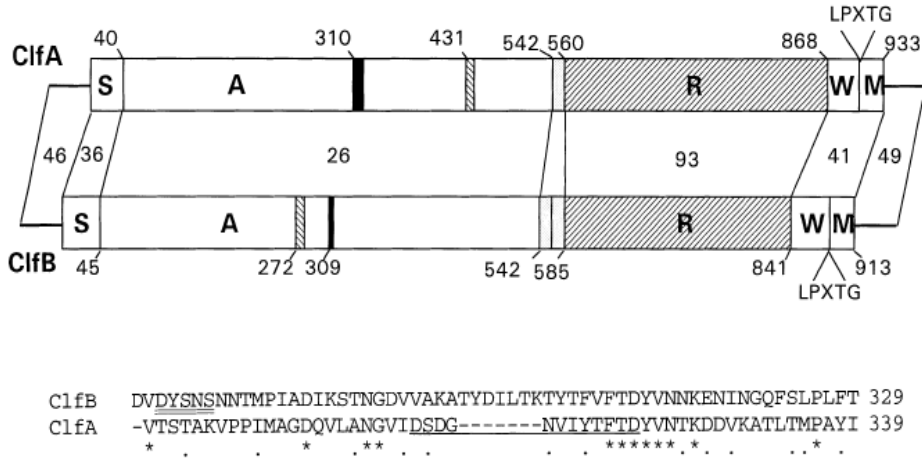
Ayrıca EbpS lerin immobilize çözülebilen elastin ve elastin sentezinde öncü olan tropoelastine bağlanmadığı onun yerine fibronektin bağlayıcı proteinlerin etkili olduğu çalışmalarda gösterilmiştir (Nakakido et al., 2007).

2.4.4.4. Fibrinojen bağlayan protein (ClfA-ClfB)

Fibrinojen insan kanında litrede 2-4 gr civarında bulunan, 340 kDa boyutlarında ve fibrine dönüştüğü zaman kabuk ve pıhtı oluşumu gerçekleştiren bir proteindir (Rivera et al., 2007).

Kümeleşme faktörü adı verilen (Clumping factor A, ClfA) bir yüzey proteini *S. aureus* yüzeyinde bulunmaktadır ve fibrinojen ile bakteri hücrelerinin bağlanmasını sağlamaktadır. Bu proteinin afinitesi düşük konsantrasyonlarda bile oldukça yüksektir (Foster, 2009).

ClfA moleküler olarak tamamen bilinen 933 aminoasitten oluşan bir proteindir. Daha sonra bu proteine benzeyen diğer kümeleşme faktörü olan ClfB bulunmuştur. Moleküler yapıları birbirlerine çok benzeyen bu iki yüzey proteininin aralarında bir takım farklar vardır. ClfB fibrinojene ve zincirlerine bağlanırken ClfA ise zincirine afinite göstermektedir. Bir diğer fark, ClfA üretimi hücrenin yaşam döngüsünün tüm basamaklarında bulunurken, ClfB sadece erken bölünme basamağında hücre yüzeyinde görünmektedir (Eidhin et al., 1998), (Şekil 2.9).

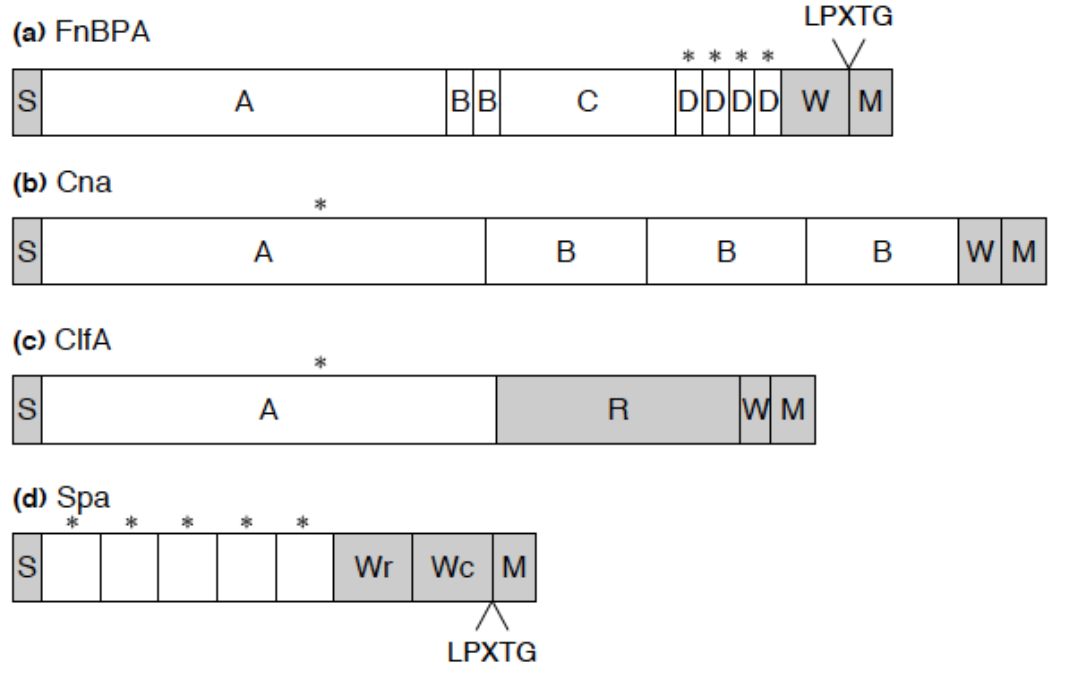


Şekil 2.9 ClfA ve ClfB aminoasit dizisinin karşılaştırılması (Eidhin et al., 1998).

Bu proteinler *S. aureus*' a fibrinojen kaplı yüzeylere tutunma ve fibrinojenin olduğu ortamlarda kümeleşme özelliği kazandırmaktadır (Eidhin et al., 1998).

2.4.4.5. Fibronektin bağlayan proteinler (FnBPA, FnBPB)

Fibronektin bağlayan proteinler hücre yüzeyine tutunarak vücut içerisinde, bakteri hücrelerinin vücut hücrelerine yapışmasını sağlayan yüzey proteinleridir. İki farklı çeşit olarak kodlandığı bilinmektedir. Bazı suşlar FnBPA ve FnBPB olarak her ikisini kodlayan geni taşıdıkları gibi bazıları sadece FnBPA kodlayan geni taşımaktadır. Fibronektin bağlayan proteinlerin yapılarının bir bölümü diğer yüzey proteinleri ile benzer aminoasit dizilişi gösterdiği bilinmektedir (Wann et al., 2000) (Şekil 2.10).



Şekil 2.10 FnbPA'nın yapısının diğer yüzey proteinleri ile karşılaştırılması (Foster and Höök, 1998).

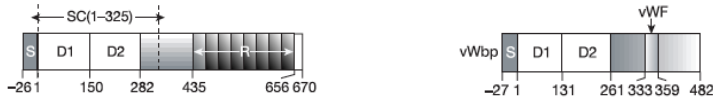
2.4.5. Salgıladığı enzimler

2.4.5.1. Koagülaz

Koagülasyon mikrobiyal patojenlere karşı en ilkel savunma özelliklerinden birisidir. *Staphylococcus*'ların patojen olup olmadıklarını koagülaz testi ile belirleme ilk olarak 1903 yılında yapılmış ve 100 yıldan fazla bir süredir kullanılan en önemli tanılama testlerinden bir olarak kabul edilmektedir (Loeb, 1903).

Ekstrasellüler sıvılar veya kanın pıhtılaşması serin proteazlar tarafından gerçekleştirilen bir olaydır. *S. aureus*'ta koagülasyonu başlatmak için iki farklı protein sentezler; koagülaz (Coa) ve von Willebrand faktörü bağlayıcı protein (vWbp). Bu iki protein protrombini aktive ederek iş görürler (Friedrich et al., 2003).

Coa yaklaşık 670 aminoasitten oluşan bir proteindir. *N*-terminal yönündeki 282 aminoasit α -helikal D1-D2 domainini oluşturmaktadır. Bu bölgede protrombinin β -zincirinin C terminaline bağlanan kısımdır. D1-D2 terminalinden sonraki 153 aminoasitin köprü görevi gördüğü düşünülmekte ancak görevi tam anlamı ile bilinmemektedir. C terminaline doğru geri kalan kısım ise tekrar dizilerinden oluşan ve fibrinojene afinitesi olan kısımdır. cWbp de D1-D2 domainleri ile homoloji gösteren ve von Willebrand faktörüne bağlanabilecek özel bir dizi içeren bölümden oluşur (McAdow et al., 2012) (Şekil 2.11 a,b).



Şekil 2.11 a) Staphylococcal koagülaz

b) vWbp (Friedrich et al., 2003).

2.4.5.2. Katalaz

Staphylococcus' ların hemen hepsinin sahip oldukları enzimdir. Bu enzim ile fagosite edilmiş hücrenin parçalanması için ortama salınan hidrojenperoksit' i (H_2O_2) su ve oksijene parçalayarak parçalanmasını engellemektedir (Schleifer and Bell, 2009).

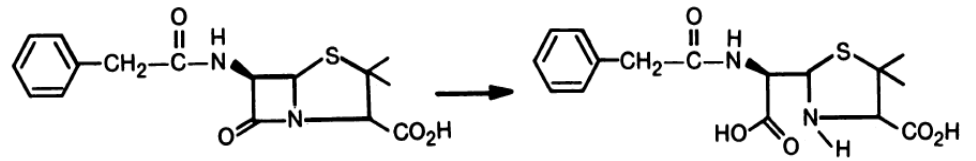
2.4.5.3. Lipazlar

S. aureus' un potansiyel lipaz üretici bir tür olduğu bilinmektedir. Ayrıca lipaz üretimi *S. aureus* için virülens bir özellik olduğu da gösterilmektedir (Rodrigues et al., 2014). Lipaz enziminin *S. aureus* için en önemli görevi bakteriyosidal lipidlere karşı savunmadır. Bunun dışında yağlı dokularda da kolonizasyonda iş gördükleri gösterilmiştir (Hu et al., 2012).

2.4.5.4. Beta-laktamaz

Penisilin G klinikte ilk kullanılan beta laktam antibiyotığıdır. Tüm beta laktam antibiyotikler hücre duvarı biyosentezini inibe ederek etki gösterirler (Bush, 1988).

Beta-laktamaz enzimi penisilin ve benzeri beta-laktam antibiyotiklerindeki halkasal yapıyı hidrolize ederek bu tür antibiyotiklere karşı direnç oluştururlar (Livermore, 2000) (Şekil 2.12).



Şekil 2.12 Benzilpenisilinin β -laktamaz ile hidrolizi (Bush, 1988).

530 çeşit gibi oldukça büyük bir grup olan beta-laktamazlar A, B , C, D olmak üzere 4 sınıfta toplanmaktadır. A, C, D sınıfında olan enzimler aktif bölgelerindeki serin esterler aracılığı ile B sınıfında olan enzimler ise çinko metalini kofaktör olarak kullanarak iş görmektedirler (Babic et al., 2006).

β -laktamazlar bakteriyal kromozom, plazmid yada transpozon üzerinde kodlanmaktadır (Babic et al., 2006).

2.4.5.5. Hyaluronidaz

Hyaluronik asiti hidrolize etmek amacı ile sentezlenir. *S. aureus* bakterisinin *in vivo* şartlarda hyalüronik asitin bulunduğu dokularda yayılmasını kolaylaştırır. *S. aureus* suşlarının tümüne yakını bu enzimi sentezlediği bilinmektedir (Winn et al., 2006).

2.4.5.6. Stafilokinaz

S. aureus tarafından salgılanan bir plazminojen aktivatörüdür. Fibrinolitik aktivitesi vardır. Stafilokinaz ve plazminojen birleşerek fibrinlerin oluşturduğu pıhtıların yıkılmasını sağlayan mekanizmayı tetikler. Bu özelliğin kardiyovasküler tıpta kullanılabileceğini gösteren çalışmalarda bulunmaktadır (Peetermans et al., 2014).

2.4.5.7. Fosfatid-spesifik fosfolipaz inositol C

Bir çok gram pozitif bakteri türü tarafından salgılanan bir enzimdir. Glikan-fosfotidilinositol proteinlerinin parçalanmasını katalizler (Goldstein et al., 2012).

2.4.5.8. Termostabil nükleaz ve deoksiribonükleaz

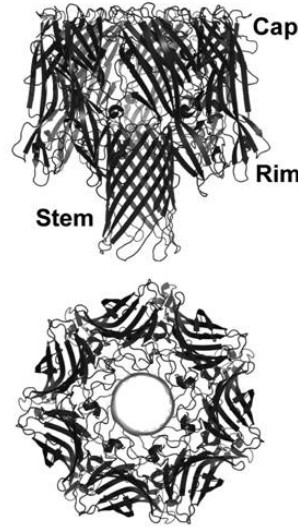
S. aureus endonükleotik ve ekzonükleotik aktiviteye sahip olan DNaz ve termostabil nükleaz üretirler. Bu enzimler nükleik asitlerin hidrolizinde iş görürler (Waller et al., 1985).

2.4.6. Toksinler

S. aureus 5 hücre yıkıcı yani hücre yüzeyinde porlar oluşturan, 3 eksfoliyatif toksin, 8 enterotoksin ve toksik şok sendrom toksini başlıkları altında çok fazla toksin üretirler.

Alfa toksinler

S. aureus α -hemolizin, α -toksin yada Hla olarak bilinen toksini konak hücrelerin membranlarındaki hidrofobik bölgelerde heptamerik yapılar ile 1-3 nm boyutunda por oluşturan yapılardır. Bu porlardan dolayı hücredeki K^+ 'un hızla dışarı çıkması ve Ca^{2+} ve bir çok küçük molekülün hücre içine girmesi ile ozmotik denge bozulur ve hücre lizise uğramış olur (Berube and Wardenburg, 2013) (Şekil 2.13).



Şekil 2.13 Alfa toksin yapısı (Berube and Wardenburg, 2013).

Alfa toksinler *S. aureus*' un patojenitesinde önemli rol oynayan toksinlerdir. Koyun kanlı besiyerinde eritrositlerin hemolizine sebep olan moleküllerin alfa toksinler olduğu bilinmektedir (Berube and Wardenburg, 2013).

Beta toksinler

Sfingomiyelinaz C olarak bilinen yaklaşık 30000 Da boyutunda ısıya duyarlı düşük ısılarda bile denatüre olabilen ancak liyofilize olduğunda ısıdan etkilenmeyen proteindir. Hemoliz aktivasyonu için magnezyum iyonlarına ihtiyaç duyar. Etki ettiği bölgeler sfingomiyelin ve lizofosfatidilkolinlerdir. Eritrositler, lökositler ve fibroblastlar gibi bir çok hücreye etki ederler. Hücrelerde membran fosfolipidlerinin hidrolizine sebep olurlar (Rogolsky, 1979; Murray et al., 2002).

Delta toksinler

S. aureus ve *S. epidermidis* tarafından üretilen küçük boyutlu toksinlerdir. Fenol çözünür modulinlere dahil edilen virülens faktörleridir. Deterjan benzeri özellik gösterirler ve sitolitik etkileri oldukça yüksektir (Otto, 2014a).

Panton-Valentin l kosidin (PVL) toksini

PVL toksini iki komponentten oluşan bir l kosidindir. LukS ve LukP alt birimlerinden oluşan bu toksinin görevini yerine getirebilmesi için her iki par anında sentezlenmesi gerekmektedir. PVL diğer alfa ve delta toksinler gibi hücre membranında   tipi porlar oluşurmaktadır. *pvl* geni çekirdek üzerinde bulunmayan profajlar tarafından hücreye kazandırılan bir virülens özelliktir (Otto, 2013).

1932 yılında Panton ve Valentin (Panton ve Valentin, 1932; Otto, 2013) tarafından bulunmuş ancak sadece abse oluşturmasından bahsedilmiştir. Epidemiyolojik olarak önemli bir virülens faktör olduğu ise 2003 yılında Vandenesch ve arkadaşlarının toplumsal kaynaklı metisilin dirençli *S. aureus*’larda PVL toksininin varlığını göstermeleri ile olmuştur (Vandenesch et al., 2003; Otto, 2013).

PVL toksini direkt olarak nötrofilleri hedef alan bir toksindir. Hemolitik değildir. 2005 yılında Genestier ve arkadaşları (Genestier et al. 2005) 0,3-2  g/ml lik bir konsantrasyonun nötrofillerin lizisini sağladığını göstermişlerdir. Ayrıca PVL toksininin TLR2 reseptörlerine ba lanarak fare karaci erinde ölümcül enfeksiyona sebep olmasının gösterilmesi PVL’ nin *S. aureus* patojenitesinde önemini daha da arttırmıştır (Sonnon and Henneke, 2013).

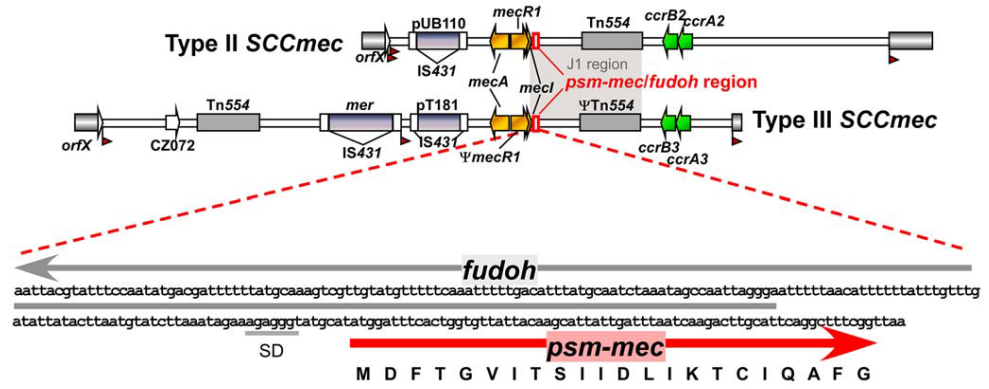
Fenol     n r modulinler (PSM)

Fenol     n r modulinler (Phenol Soluble Modulins, PSM) *S. aureus* ve *S. epidermidis* gibi cilt enfeksiyonuna sebep olan *Staphylococcus*’larda bulunan amfipatik,  - helikal peptit ailesidir. Yüksek vir lense sahip *S. aureus*larda patojeniteye önemli katkı sa lasa da bazı suşlarda oldukça güçlü bir agresifli e sebep olmaktadır. Farklı şekilde de düşük patojeniteye sahip bazı suşlarda da fizyolojik olarak bazı görevlerde bulunurlar. (Otto, 2014b)

1999 yılında Klebanoff ve arkadaşları tarafından *S. epidermidis*’te tanımladıkları 3 farklı peptidin virülenste önemli rol oynadıklarını göstermişlerdir (Mehlin et al., 1999).

İki grup olarak incelenen PSM' lerin kısa olup yaklaşık 20-25 aminoasitten oluşan grubuna α - tip, daha uzun olup yaklaşık 44 aminoasitten oluşana ise β - tip adı verilmektedir. Oldukça kısa bir gen bölgesine sahip olan PSM' lerin normal bir genomik tanıda rastlanması oldukça zordur. Ancak şu anda *S. aureus*' ta bilinen 7 çeşit PSM bulunmaktadır. PSM α 1- α 4, PSM β 1, PSM β 2 ve staphylococcal delta toksindir (Otto, 2014b)

PSM' ler genel olarak genomik DNA üzerinde kodlanmaktadır. Ancak özel bazı kaset kromozomların PSM kodlayarak Metisilin direnci kazandırdıkları gösterilmiştir (Queck et al., 2009) (Şekil 2.14).



Şekil 2.14 PSM-mec Şeması (Queck et al., 2009).

PSM' lerin virülens rolleri ise aşağıdaki Çizelge 2.3' te gösterildiği gibi *in vivo* ve *in vitro* olarak iki farklı şekilde olmaktadır. Önemli olan sitolizisteki görevi eritrosit ve nötrofillerin lizisinde bulunmaktadır. Bunun dışında amfipatik yapıda olan bu peptidler, cilt ve kıl kökleri gibi yağlı bölgelerde kolonizasyonda görev olarak *S. aureus* için zor olan bir ortamda canlı kalmasını sağlamaktadır (Otto, 2014b)

Çizelge 2.3 PSM lerin virülens etkileri (Otto, 2014b).

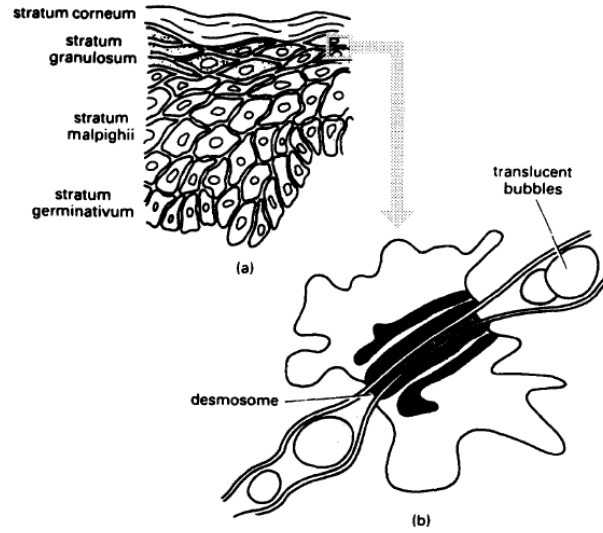
PSM	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>
α -Tip ve β -Tip Fenol çözünür modulinler	Epitelyal kolonizasyon Biyofilm kaynaklı enfeksiyonlar In vivo da bakteriyal etkileşim Cilt enfeksiyonları ve abseler	Yüzey aktif bileşen benzeri özellik gösterme ve yüzeysel yayılma Biyofilm oluşturma Anti mikrobiyal aktivite Sitolitik aktivite

Eksfoliyatif toksinler

Staphylococcal haşlanmış deri sendromu Ritter' in hastalığı olarakta bilinen eksfoliyatif dermatit ile tanımlanmış bir hastalıktır. Bu hastalığa eksfoliyatif toksinler sebep olmaktadır (Bukowski, 2010).

S. aureus' ta farklı genetik elementler ile kodlanan ETA, ETB ve ETD olmak üzere üç farklı eksfoliyatif toksin bulunmaktadır. *eta* faj, *etb* plazmid, *etd* ise kromozom üzerinde bulunmaktadır (Grumann, 2014).

Staphylococcal eksfoliyatif toksinler enzim türü olarak glutamat spesifik serin proteazlardır. Yapılan moleküler analizlerde eksfoliyatif toksinler epidermiste granulosum tabakasındaki dezmozomlarda kaderin tekrarlarında 3 ve 4 numaralı kaderinleri ayırarak epidermisin bütünlüğünü bozmaktadır (Nishifuji, 2008) (Şekil 2.15).



Şekil 2.15 Staphylococcal eksfoliyatif toksinin etki bölgesinin şematik gösterimi (Gemmell, 1995).

Toksik şok sendromu toksini (TSST)

TSST ilk olarak 1927 yılında Franklin Stevens tarafından tanımlanmış ve 1978 yılında Todd ve öğrencileri tarafından toksik şok sendrom toksini olarak isimlendirilmiştir. Daha önce farklı isimler ile bilinen bu toksin bir tür Staphylococcal süper antijen olarak tanımlanmaktadır (Xu ve McCormick, 2013).

Süperantijenler 23-29000 aminoasitten oluşabilen patojen organizmanın immün sisteminden kaçmasını sağlamak amacı ile salgılanan ve farklı türlerde bile oldukça yüksek homolojiler gösteren polipeptit parçalarıdır. Süperantijenlerin özellikle hedef aldığı iki bölge HLA-DR ve T-Lenfositlerin antijen reseptörleridir (Ulrich, 1999).

Toksin, yumuşak mukozal doku veya yara gibi bölgelerden vücuda girdiğinde ateş ile başlayan ve çoklu organ yetmezliğinden kaynaklı ölümlere sebep olabilecek kadar ciddi sonuçlar ortaya çıkarabilmektedir (Xu ve McCormick, 2013).

Enterotoksinler

Staphylococcal gıda zehirlenmeleri başta *S. aureus* olmak üzere enterotoksijenik *Staphylococcus*' lar tarafından gıdalarda oluşturulan enterotoksinlerin alınması sonucu şekillenen ve tüm dünyada yaygın olarak görülen en önemli intoksikasyonlardan biridir (Erol ve İşeri, 2004).

Enterotoksijenik *Staphylococcus*' lar en fazla kırmızı et, kanatlı eti, balık eti ve ürünleri ile süt ve ürünleri gibi proteince zengin hayvansal gıdalarda bulunur. Enterotoksijenik *Staphylococcus*' lar genotipik ve fenotipik özellikleri temel alınarak karakterize edilmişlerdir. Staphylococcal enterotoksinler (SE) yaklaşık 26-31 kDa'luk tekli polipeptidlerdir. SE'ler antijenik özellikleri temel alınarak 5 büyük serolojik tipe (SEA, SEB, SEC, SED, SEE) ayrılmıştır. Son yıllarda SE'lerin yeni tiplerinin de var olduğu (SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN ve SEO) bildirilmiş ancak bu enterotoksinlerin gıda zehirlenmeleri ile ilişkileri henüz tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. (Erol ve İşeri, 2004).

SE'lerin spesifik olmayan T hücre proliferasyonunu uyaran süperantijen fonksiyonlarının yanı sıra güçlü gastrointestinal toksin olma özellikleri de vardır. SE'lerin ısıya ve tripsin, pepsin gibi gastrointestinal enzimlere dirençli olmaları en önemli özelliklerinden biridir. SEA staphylococcal gıda zehirlenmelerinde en sık rastlanan enterotoksindir ve bunu SED izlemektedir. İntoksikasyonun oluşabilmesi için 94-184 ng enterotoksinin alınması yeterlidir. SEA hücrenin logaritmik fazında üretilmekte ve σ^{70} benzeri bir faktörden etkilenmekte bunun yanı sıra SEB, SEC ve SED çoğunlukla eksponensiyal fazdan durgunluk fazına geçiş aşamasında üretilip accessory gene regulator (*agr*) tarafından regüle edilmektedir. SE'lerin enterotoksijenik ve süperantijenik aktivitelerinin açıklığa kavuşturulması için daha çok çalışmaya gereksinim duyulmaktadır. (Erol ve İşeri, 2004).

2.5. Epidemiyolojik Özellikleri

Bir gram pozitif kok bakteri türü olan *S. aureus* sağlıklı bireylerin burun mukozasında oldukça yaygın bir şekilde kolonize olabilmelerinin yanında patojen

oldukları durumlar da söz konusudur. Patojen olarak başlıca deri abseleri, gıda zehirlenmeleri, akciğer pnömonisi, sepsis ve toksik şok sendromu gibi toplumsal ve hastane kökenli olan ciddi rahatsızlıklara sebep olmaktadır. Bu bakteri ayrıca adhesin içeren virülens faktörler, toksik proteinler, eksfoliyatif toksinler ve enterotoksinler de üretmektedirler (Indrawattana et al., 2013).

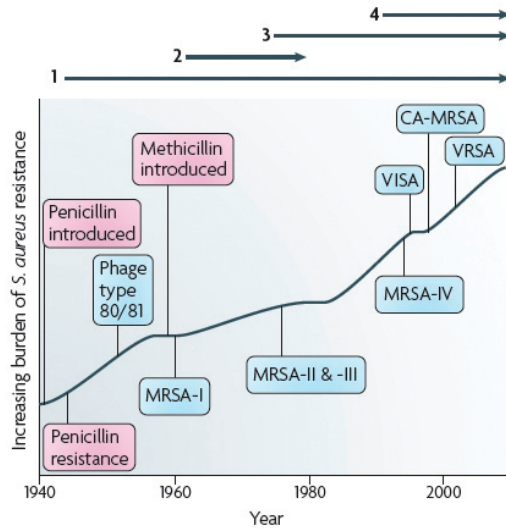
S. aureus' un burun deliklerindeki kolonizasyonu birçok önemli çalışmaya konu olmuş yaygın bir niştir. Ancak yapılan çalışmalar ve görülen enfeksiyonlara bakıldığı zaman diğer vücut bölgelerinde de oldukça fazla miktarda kolonizasyonu görülmektedir. Tüm bu bölgeler değerlendirildiğinde insanlarda *S. aureus* taşıyıcılığı üç grup altında incelenmektedir. Tüm populasyonun % 20' si her zaman bir suşun taşıyıcılığını yapmaktadır ve bu grup kronik taşıyıcılar olarak adlandırılmaktadır. Yaklaşık % 60' lık bir grup ise değişik zamanlarda farklı suşların kısa zamanlı taşıyıcılığını yapmaktadırlar. % 20' lik bir diğer kısım ise hiçbir zaman *S. aureus* kolonizasyonu bulundurmamaktadırlar (Kluytmans et al., 1997). Kolonizasyon ve taşıyıcılığa bakıldığında; nazofarinks, pelviks duvarı yada derideki enfeksiyonlar genellikle cilt bütünlüğünün bozulması ve hasar alması sonucu oluşmaktadır. Bazı durumlarda doğumdan sonra kısa dönemli ilerleyen zamanlarda da tekrar şekilde görülebilmektedir. Ailede bulunan bir taşıyıcı da yayılmada rol oynayabilir (Chambers, 2001). Toplumdaki taşıyıcıların büyük çoğunluğu enjeksiyon ilacı kullananlar, diyabet hastaları, dermatolojik rahatsızlıkları olan hastalar, uzun süreli intravasküler kateter taşıyıcılar ve hastane çalışanlarıdır (Que and Moreillon, 2010; Chambers, 2001).

Hastane kaynaklı *S. aureus* taşıyıcılığına bakıldığında ise 2009 yılında Naber' in yayınladığı kapsamlı bir çalışmada 1988 ve 2005 yılları arasında ABD' de toplanan 3.209.413 klinik izolatta hastalardan elde edilenlerde *S. aureus* tanılama oranı % 18,8 ile en sık karşılaşılan bakteriler sıralamasında ilk sıradadır. Yine aynı çalışmada hastanede hasta olmayan bireylerden alınan izolatlarda ise bu oran % 14.9 ile ikinci sıradadır.

2.5.1. *S. aureus*' un antibiyotik direnci aşamaları

Staphylococcus aureus doğal olarak kendi genomundan kaynaklı hiçbir antibiyotiğe karşı direnç göstermemesi gerektiği bilinmektedir. Ancak bulunduğu koşullar ve maruz kaldığı dış etkiler ile hem hastanelerde hem de toplumsal kaynaklı büyük enfeksiyonlara sebep olan bir tür haline gelmiştir. Yapısına katılan transpozonlar ve plazmidler gibi yaygın mobil genetik elementler ile bir çok antibiyotiğe direnç kazanmışlardır. Ancak bunlar arasında diğerlerinden çok farklı ve çok özel olan penisilin ile diğer β -laktam antibiyotiklerine karşı kazandığı direnç ve bunların taşındığı kaset kromozomlardır (Schmidt H., 2004).

S. aureus' un antibiyotik direncinde 4 önemli aşama vardır (Şekil 2.16). Birincisi 1940 lı yıllarda bugün hala devam eden penisilinin tıbbi olarak kullanılmasından çok kısa bir süre sonra ortaya çıkmıştır (Chambers and DeLeo, 2009).



Şekil 2.16 Antibiyotik çağında *Staphylococcus aureus*' un yaşadığı 4 aşama (Chambers and DeLeo, 2009).

İlk antibiyotik direncinin kazanılması 80/81 tip fajlardan köken aldığı anlaşılmış ve aynı zamanda *pvl* genininde bu fajlar ile taşındığı ortaya çıkmıştır. İkinci direnç aşaması ise metisilinin kullanımı ile başlamıştır. Hemen ardından antik bir MRSA suşu tanımlanmış ve bu direnci staphylococcal kaset kromozom *mecI* (*SCCmecI*) olduğu saptanmış ve bu aşama 1970 li yılların ortalarına kadar yayılmıştır. Bu tarihlerde üçüncü direnç aşaması yeni SCCmec elemanları taşıyan farklı suşlar ile devam etmiştir. *SCCmecII* ve *SCCmecIII* (MRSA-II,MRSA-III). Bu türler tüm dünyaya nozokomiyal olarak yayılabildiği görülmüştür. Bu hastane enfeksiyonlarındaki MRSA tedavilerinde etkin çözüm olan vankomisin kullanımı yarı duyarlı (VISA) suşların ortaya çıkmasına sebep olmuştur. 1990' lı yılların sonrasında dördüncü direnç aşaması MRSA'nın hastanelerden çıkıp topluluk kaynaklı enfeksiyonlara sebep olmalarıdır (CA-MRSA). Bu CA-MRSA suşları β -laktam antibiyotiklerinin dışındaki bir çok antibiyotiğe duyarlıdırlar. Ancak bu suşların hastane suşlarından farkı küçük, daha mobilize olan pek çok SCCmec allotipini barındırıyor olabilmeleridir (*SCCmecIV* ve birçok virülens faktör içeren). 2002 yılında da şu anda 10 civarında olan vankomisin dirençli suşlardan ilki identifiye edilmiştir (DeLeo et al., 2010).

2.5.2. Staphylococcal aşı çalışmaları

Enfeksiyon sebebi *Staphylococcus*' ların tedavisi ve kontrolünün sadece antibiyotiklerle yapılamayacağı ilk direnç ile birlikte ortaya çıkmış bir gerçektir. Özellikle çoklu direnç gösteren MRSA suşları ve toplumsal kaynaklı dirençli suşlar yardımcı tedavi yöntemlerinin gerekliliğini açıkça göstermektedir (Schaffer and Lee, 2008).

1997 yılında vankomisin tedavisine cevap vermeyen bir MRSA enfeksiyonu alternatif tedavi çalışmalarını hızlandırmıştır. Alternatif tedavilerin başlıcaları; doğal antibakteriyel bileşiklerin kullanımı, eski doğal tedavi yöntemleri, katyonik antimikrobiyal peptitler, kateter gibi enfeksiyon sebebi bakterilerin bulunabileceği yerlerin biyofilm oluşumunu engelleyen materyal kullanımı, bakteriyofajlar, fotodinamik terapi ve staphylococcal aşılardır (Kurlenda and Grinholc, 2012).

Staphylococcal aşılar literatürde oldukça kapsamlı anlatılmasına rağmen henüz çözülmemiş bazı problemler mevcuttur. En önemlisi insan ile en çok ilişkisi olan bakteri türü olması ve hemen hemen her bireyin mukus bulunan nasal, oral dokularda kalıcı yada geçici *S. aureus* taşıyıcısı olmaları aşı geliştirmeye başlama çalışmalarını zorlaştırmıştır (Kurlenda and Grinholc, 2012).

Uzun yıllardır aşı çalışmalarında staphylococcal kapsüller proteinler üzerine yoğunlaşmıştır. Aşı çalışmalarında insan bireyler üzerinde belli bir ölçüye kadar başarılı olan tek aşı olan StaphVAXTM ta 5 ve 8 tip kapsüller polisakkaritlerin pseudomonal ekzotoksinler ile komponent oluşturulması ile işlev görmektedir. Bu iki kapsüller protein tipinin seçilmesinin sebebi ise enfekte bireylerde en çok karşılaşılan tip olmasıdır. Özellikle hemodiyaliz hastalarında yapılan faz III çalışmalarında enfeksiyon oranının uzun vadede düştüğü görülmüştür. Ancak cerrahi müdahalede bulunan ve kısa zamanda yüksek risk altında bulunacak olan hastalarda istenilen başarıya ulaşılamamıştır (Spellberg and Daum, 2012). Ancak 2004 yılından bu yana faz III çalışması yapıldığı bilinen StaphVAXTM aşısında da istenilen sonuçlar alınamamış ve mevcutta lisanslanmış bir staphylococcal aşı bulunmamaktadır (Fattom et al, 2004).

En son 2012 yılında yayınlanan bir derlemede 2011 kasım ayına kadar elde edilen bilgilere göre aşı üzerine yoğunlaşmış büyük ilaç şirketlerinin çalışmaları Çizelge 2.4' te belirtilmiştir.

Çizelge 2.4 *S. aureus* aşılarının 2011 Kasım ayına kadar olan gelişmeleri (Spellberg and Daum, 2012)

Enrolling or about to enroll			
Manufacturer	Vaccine	Type of Study	Composition of Vaccine
Novartis	4 component	Phase I-Adult	Not publicly disclosed. Components are all proteins
Pfizer	4 component	Phase-I-Adult	Conjugated capsular polysaccharides, types 5 and 8, Clumping factor A, Manganese transporter C
Novadigm	recombinant protein	Phase-I-Adult	rA13p-N
GSK	4 component	Phase-I-Adult	Not publicly disclosed
Enrollment Complete			
Merck	1 component	Phase II/III efficacy	isdB ¹
Biosynexus	Passive monoclonal antibody	Phase IIb/III efficacy	anti-lipoteichoic acid antibody ²

¹ Enrollment halted 2011 by recommendation of the Independent Data Monitoring Committee.

² No significant decrease in 'staphylococcal sepsis' among very low birth weight neonates.

2.6. *Staphylococcus aureus*' un Tanılanması

2.6.1. Konvansiyonel (fenotipik) tanılama teknikleri

2.6.1.1. Katalaz testi

Lam üzerine damlatılan H₂O₂ nin üzerine ilave edilen kültürün köpürmesi ile oksijen açığa çıktığı gözle görülmektedir. Bu şekilde kolayca saptanabilmektedir (Schleifer and Bell, 2009).

2.6.1.2. Koagülaz testi

Koagülaz testi *S. aureus* tanılmasında en önemli test olarak nitelendirilmektedir. Serbest koagülaz için “tüp koagülaz”, bağlı koagülaz için ise “lam koagülaz” yöntemleri ile değerlendirilmektedir.

Lam koagülaz testinde hücre duvarına bağlı koagülaz veya “clumping factor” fibrinojen ile etkileşime girerek iş görmekte ve hızlı bir hücre aglütinasyonuna sebep olmaktadır. Ancak bazı durumlarda bu testin yapılması yanlış pozitif sonuçlar verebilmektedir. Koagülaz negatif bazı suşların clumping faktör üretmeleri sonucu ortaya çıkan aglütinasyon yada yüksek tuz konsantrasyonunda hücrelerin gerçekleştirdiği otoaglütinasyon bu durumlara örnek olarak gösterilebilir (Winn et al., 2006).

Tüp koagülaz testi, *S. aureus* için referans olarak gösterilen yöntemdir. Bu yöntemde koagülaz ekstrasellüler olarak ortama salgılanır. Koagülaz burada “Koagülaz reaksiyon faktörü ile birleşerek stafilotrombin oluşturur. Lam koagülazda negatif çıkan sonuçların tüp koagülaz ile doğrulanması gerektiği lam koagülazın yanlış pozitifleri sebebi ile önerilmektedir. Her iki yöntem için uygun materyal EDTA' lı tavşan pazmasıdır (Winn et al., 2006).

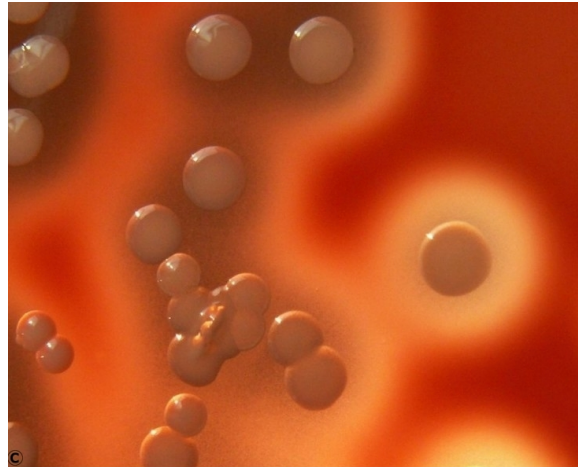
2.6.1.3. Lateks aglütinasyon testi

Plazma kaplanmış lateks partikülleri ile “Clumping factor” saptamak amacı ile kullanılır. Ayrıca bu kaplama plazmada bulunan immunoglobulinler protein A varlığında gösterebilmektedir (Wang et al., 1983).

2.6.1.4. Hemoliz testi

Staphylococcus’larda kanın hemolizini gerçekleştiren 3 farklı hemolizin bulunmaktadır. Alfa, beta ve gama hemolizinler. *S. aureus*’un tanılanmasında önemli yere sahip olan beta hemolizin bir ekzotoksin olarak ortama salınmaktadır ve moleküler ağırlığı yaklaşık 35000 kDa olan bir proteindir.

Tanılamada genel olarak % 5 kanlı agar plakları kullanılır. 35 °C sıcaklıkta inkübasyon sonrasında oluşan kolonilerin etrafındaki açılma zonları ile β -hemolizin varlığı saptanır (Dinges, 2000) (Şekil 2.17).



Şekil 2.17 *S. aureus*'un koloni morfolojisinin % 5 Koyun kanlı agardaki görüntüsü (Newman, 2011).

2.6.1.5. DNaz ve Termostabil Endonükleaz Testi

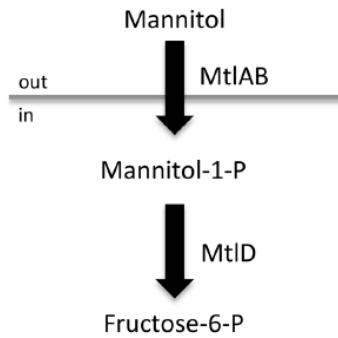
DNaz aktivitesinin varlığı DNaz agar olarak adlandırılan ve DNA içeren besiyerinde üretilmiş *S. aureus* kolonilerinin toluidin blue-O boyası ile boyanması sonucu açılma zonu oluşması ile değerlendirilir (Waller et al., 1985).

Termostabil endonüklaz testi ise 15 dakika su banyosunda kaynatılmış sıvı kültürdeki *S. aureus*' ların inokülasyonu ve inkübasyonu sonrasında aynı yöntem ile değerlendirilmesidir (Waller et al., 1985).

2.6.1.6. Mannitol Fermentasyon Testi

Mannitol şekerinin fermentasyonu ve bu yolla laktik asit üretimi *S. aureus*' u diğer *Staphylococcus*' lardan ayıran önemli bir özelliktir (Kenny et al., 2012).

Mannitolün *S. aureus* tarafından kullanılmasında 3 gen bölgesi içeren MtlABFD operonu mannitol fosfotransferaz sistemini kodlamaktadır. MtlAB gen bölgesi ürünü olan enzim bu sistemde taşıyıcı görevi görmektedir ve ortamda bulunan mannitolü hücre içine mannitol-1-P olarak sokmaktadır. *mtlF* bölgesi ise bu taşıyıcı proteinin transkripsiyonunu regüle etmektedir. Hücre içine alınan bu mannitol-1-P nin fruktoz-6-P ye dönüşümünü katalizleyen üçüncü proteinin gen bölgesi ise *mtlD*' dir. Sonrasında fruktoz-6-P' ın Embden-Meyerhoff yada pentoz fosfat yol izleri ile glikolizise girmesi ile enerji ve laktik asit üretimi tamamlanmış olur (Kenny et al., 2012) (Şekil 2.18).



Şekil 2.18 Mannitol' ün fruktoz-6-P' a dönüşümü (Kenny et al., 2012).

S. aureus tanılmasında mannitol kullanımını test etmek için “fenol red mannitol salt agar” kullanılmaktadır. Bu besiyeri % 1 mannitol, % 7,5 NaCl, pepton ve indikatör olması amacı ile fenol kırmızısı içermektedir. Ortamda kullanılacak tek karbon kaynağı mannitol olması sebebi ile *S. aureus* kolonileri mannitolü laktik asit üretmekte ve ortam pH’ sını düşürerek kırmızı besiyerinin koloni etrafında sarıya dönüşmesine sebep olmaktadır. Bu görüntü ile mannitol kullanımı değerlendirilmektedir (Winn et al., 2006).

2.6.2. Hızlı (Kit ile) tanılama teknikleri

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında *S. aureus*’ un hızlı bir şekilde tanılanması önemlidir. Son yıllarda hızlı ve kolay fenotipik tanılama kitleri çalışma prensiplerine göre farklı gruplar halinde kullanıma sunulmuştur.

Bu gruplardan ilki clumping faktör yada protein A yı hedefleyen plazma kaplı lateks aglütinasyon kitleridir. Mevcutta en çok kullanılanlar ise Pastorex™, StaphTEX™ (Hardy Diagnostics), Staphaurex™ (Thermo Scientific), PROLEX™ Staph latex kit (PRO-LAB Diagnostics), BactiStaph™ (Thermo Scientific), Dryspot Staphytect Plus Kit (Oxoid), BBL™ Staphyloslide™ Latex Test (BD Diagnostics, Heidelberg, Germany) adlı ticari ürünlerdir (Şekil 2.19).



Şekil 2.19 Lateks aglütinasyon kit örneği (Oxoid, 2014).

Diğer grup hızlı tanılama kitleri ise kromojenik besiyerleri olarak bilinen ve spesifik enzimlere substrat sağlayarak kolaylıkla ve ayırt edilebilen standart renklere kolonilerin oluşumunu sağlayan besi ortamlarıdır (Perry et al., 2003). Kromojenik agarlara da örnek olarak *S. aureus* ID (bioMérieux, La Balme Les Grottes, France) ve CHROMagar (BD Diagnostics, Heidelberg, Germany) verilebilir (Şekil 2.20).



Şekil 2.20 *S. aureus* kolonilerinin kromojenik agardaki görüntüsü (BD Diagnostics, 2014).

Bir diğer tanılama grubu olarak da özel cihazlar yada göz ile saptanabilen tek kit üzerinde birçok kimyasal testin yapıldığı ticari ürünlerde mevcuttur. Örnek olarak RAPIDEC Staph™, API STAPH™ (bioMérieux, La Balme Les Grottes, France) verilebilmektedir (Şekil 2.21).



Şekil 2.21 API ID 32 Staph hızlı tanılama kiti örnek görüntüsü (Biomerieux Industry, 2014).

2.6.3. Moleküler tiplendirme teknikleri

2.6.3.1. Pulsed-field jel elektroforezi (PFGE)

PFGE günümüzde de MRSA izolatları için referans bir tiplendirme metodu, aynı zamanda da hastaneden hastaneye taşınan izolatların birbirleri ile olan ilişkileri detaylı olarak inceleyebilme imkanı sunan önemli bir metottur (Deurenberg et al., 2006).

PFGE ilk olarak 1984 yılında Schwartz ve Cantor adlı iki bilim adamı tarafından maya kromozomunun ayrılması çalışmasında elektriksel alanın periyodik olarak yön değiştirdiği farklı bir jel elektroforezi tasarlayarak kullanılmışlar ve o günden sonra epidemiyolojik çalışmalarda kullanılmaya devam etmiştir.

PFGE sisteminin çalışma prensibine bakıldığında; ilk elektrik akımı jele uygulandığında DNA molekülünün akım yönünde uzayarak jel üzerinde hareket ettiği görülmektedir. Bu akım durdurulup jele diğer yönde ikinci akım verildiğinde DNA molekülü konformasyonunu değiştirmekte ve ikinci akımın yönünde hareketini düzenlenleyerek ikinci akım yönünde ilerlemektedir. Tüm bu tekrar düzenleme işlemi molekülün büyüklüğüne göre zaman gerektiren hassas bir aşamadır. Böylece boyutuna göre küçük olan DNA parçası agarozun boşlukları sebebi ile de konformasyonunu büyük olanlardan daha hızlı tamamlayacak ve hareketine başlayacaktır. Takip eden bu hareketler ile jel üzerinde DNA ayırımı sağlanmaktadır (Birren and Lai, 1993)

PFGE tekniği kendi içerisinde de farklı metotlara ayrılmaktadır. FIGE, OFAGE, TAFE, ST/RIDE, ROFE, CHEF olarak adlandırılan bu sistemler elektrik akımının uygulanma şekillerine göre değişmektedirler (Otlu, 2014).

“Field Inversion Gel Electrophoresis (FIGE)” ilk kullanılan PFGE tekniğidir ve tek yönlü ve sabit akımlı en basit sistemdir. Bu sistemde elektroforezin

yürütme süresi uzundur. Elektrik akımının jel üzerinde 3 ileri: 1 geri yönde düzenlenmesi önerilir. Özellikle 50-60 kb aralıkta iyi ayırım gücüne sahiptir (Otlu, 2014).

“Orthogonal Field Alternation Gel Electrophoresis (OFAGE)” bu metotta elektriksel alan jelde homojen bir dağılım göstermemektedir. DNA fragmentleri, jelin farklı bölgelerinde farklı hızda hareket eder. Tekrarlanabilirliği düşük olan bu sistemde laboratuvarlar ve cihazlar arası standardizasyon oldukça zordur (Burmeister and Ulanovsky, 1992).

“Transverse Alternating Field Electrophoresis (TAFE)” Bu sistemde jel elektriksel alana dikey bir biçimde yerleştirilmiştir. Basit bir elektrot yapısına sahiptir ve elektrik akımı jel boyunca homojen olarak dağılmaktadır. Elektriksel açı, üst bölgeler 15° , alt kısımlarda 165° olmak üzere jel boyunca farklılık gösterir. Bundan dolayı jelin alt kısımlarında DNA’nın göçü yavaşlar ve bantlarda yığılma görülebilir (Shortridge et al., 1991).

“Simultaneous Tangential/Rectangular Inversion Decusate Electrophoresis (ST/RIDE)” TAFE düzeneğine ek olarak bir çift elektrot daha vardır. Elektriksel alan jelin eni boyunca homojendir ve 90° ile 180° arasında değiştirilebilir. Bu sayede TAFE sisteminde oluşan jelin alt kısımdaki bant yığılmalarının önüne geçilmiş ve sistem daha verimli hale getirilmiştir (Burmeister and Ulanovsky, 1992).

“Rotating gel electrophoresis (ROFE)” Bu sistemde diğerlerinin aksine elektriksel alan sabit tutulur ve jelin kendisi ya da elektrotlar döndürülür. Bu işlemin yapılacağı mekanik düzenek gerektirmektedir. Mekanik olarak değişiklik hızı, elektriksel alan değişikliklerine göre daha yavaştır. Toplam elektroforez süresi daha uzundur (Burmeister and Ulanovsky, 1992)..

“Contour- Clamped Homogenous Electric Field (CHEF)” Hekzagonal yerleşime sahip toplam 24 (6 x 4) elektrottan oluşan bir platformda gerçekleştirilir. Homojen bir elektriksel alan elde edilmesini sağlamaktadır. İşlem süresinde yapılacak olan çalışmaya göre elektriksel alanın açısı sabit veya

değişken olabilmektedir. DRII sisteminde sabit 120°'dir. DRIII sisteminde 90-120° arasında değişmektedir. Ayrıca “CHEF Mapper” adlı sistemde ise 1° - 360° arasında değiştirilebilmektedir (Birren and Lai, 1993).

2.6.3.2. spa tiplendirmesi

S. aureus için bu tek lokuslu sekans tabanlı tiplendirme sistemi geçmiş yıllarda oldukça fazla kullanılan yöntem olmuştur. Frenay ve arkadaşları tarafından 1996 yılında keşfedilen bu teknikte *S. aureus*' un sahip olduğu virülens bir faktör olan “Staphylococcal Protein A (*spa*)” nın kodlandığı 24 bp lik dizi tekrarlarından oluşan *spa* lokusundaki polimorfik X bölgesindeki varyasyonlara göre ayırım sağlamaktadır (Deurenberg et al., 2008).

spa tiplendirmesi MLST ve PFGE ile kıyaslanabilecek derecede güçlü bir ayırım sağlayabilmektedir. Özellikle hastane kökenli MRSA' ların tiplendirilmesinde ve moleküler evrim ile ilgili çalışmalarda oldukça başarılı olmuştur (Koreen et al., 2004).

Sekans tabanlı tiplendirme yöntemleri olan MLST ve *spa* tiplendirme karşılaştırıldığı zaman MLST ye göre oldukça fazla kolaylıkları olduğu görülmektedir. Tek lokus tiplendirmesi olmasından dolayı MLST den daha ucuz ve daha az laboratuvar işlemi gerektirmektedir. Bir başka avantajı da Ridom şirketi (Almanya) tarafından hazırlanmış olan StaphType® program paketi ile rahatlıkla analiz edilebilmektedir. *spa* tiplendirmesinde Koreen ve arkadaşları (2004) ve Harmsen ve arkadaşları (2003) tarafından tanımlanan iki farklı isimlendirme sistemi olmasına rağmen program ile her iki sistemde de analiz ve isimlendirme yapmak mümkün olmaktadır. Ayrıca SeqNet.org internet adresinden her iki isimlendirme sisteminde veri tabanına ulaşılabilir. Spa veritabanı *S. aureus* için hazırlanmış en büyük tiplendirme veri bankasıdır. Ekim 2014 itibari ile 14210 *spa* tipi, 656 *spa* tekrarı ve 53 ülkeden 311971 izolat kaydı bulunmaktadır (SeqNet, 2014).

spa tiplendirmede klonal köken analizide yapılmaktadır ancak bazı ayrımlarda yetersiz kalmaktadır. Bu durumda MLST ve PFGE yöntemlerinden eksik taraflarının olduğu görülmektedir (Strommenger et al., 2008).

2.6.3.3. Multilokus sekans tiplendirmesi (MLST)

1998 yılında Maiden ve arkadaşları patojenik mikroorganizmalarda tiplendirme ve karakterizasyonunun diğer laboratuvarlar ile karşılaştırılmasının zor olmasından dolayı *Neisseria meningitidis* türünü kullanarak ortaya çıkardıkları “Multi Locus Sequence Typing (MLST)” metodu bugün birçok mikroorganizmanın tiplendirilmesinde kullanılmakta ve bu organizmalar ile ilgili veri bankaları gün geçtikçe büyümektedir (Maiden et al., 1998).

Farklı sayıda hücrenin “yaşamsal işlevlerini kodlayan (housekeeping) genin belirli bölgelerinin dizi analizi yapılarak ve elde edilen her farklı diziye bir kod verilerek (sequence type, ST), sonrasında tüm analizi yapılan genlerden sağlanan kodlar ile elde edilen profiller saklanır veya diğer laboratuvarlardan elde edilen sonuçlarla karşılaştırılarak tiplendirme çalışmaları için önemli bir veri bankası ve kolaylık sağlamaktadır (Maiden et al., 2013). MLST bir fenotipik tiplendirme tekniği olan ve seçilerek boyanmış proteinlerin elektroforezi sonuçlarının değerlendirildiği “Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE)” tekniğinin sekans verilerine uygulanarak geliştirilmiş halidir (Trindade et al., 2003).

MLEE ilk olarak 1973 yılında Roger Milkman tarafından doğal *Escherichia coli* suşlarına uygulanmış ve sonrasında 1980 li yıllarda *Legionella pneumophila*, *Haemophilus influenzae*, *Listeria monocytogenes* ve *Bordetella bronchiseptica* gibi farklı patojenlerde çalışılmıştır (Feil and Enright, 2004).

MLEE yönteminde, organizmadan ekstrakte edilen proteinlerin, elektroforezde ayrılma sonrasında oluşturdukları herbir bandın pozisyonu, proteinin kodlandığı bölge ile ilgili bilgiler vermektedir. Proteinin kodlandığı bölgedeki tek nükleotid farkının, proteinin mobilitesini ve konformasyonunu etkilediği, aynı proteinlerin de elektroforezde farklı bölgede bant verdiğini, bu

durum da aynı protein için iki farklı allelin bulunduğunu gösterir (Trindade et al., 2003).

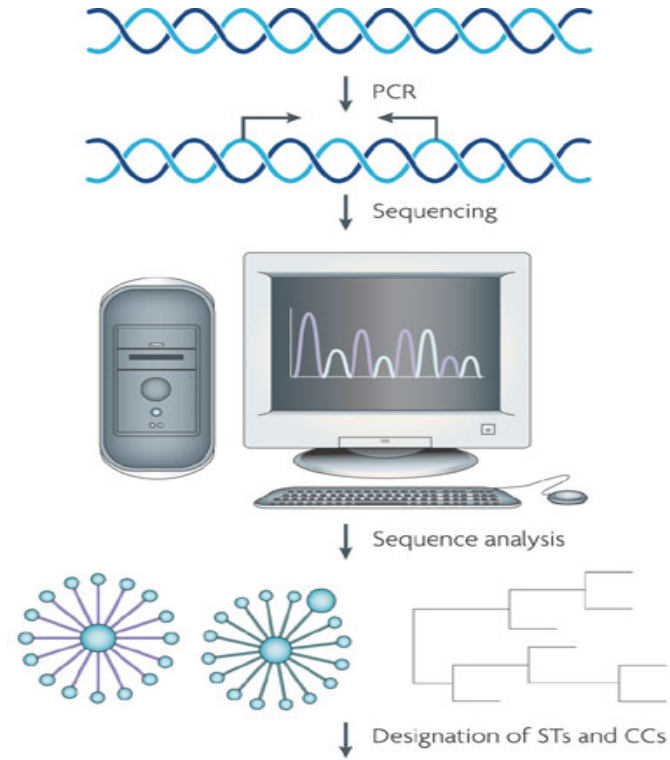
MLST aynı zamanda epidemiyolojik çalışmalarda da oldukça yararlıdır. Örneğin MLST bir bakteriyal patojenin popülasyondan uzaklaşan virülens bir suşunu takip edebilir ve popülasyonda yakından akraba pek çok organizma olsa bile, suşu kesin bir şekilde saptayabilir. Bunun dışında MLST nin PCR temelli bir teknik olmasından dolayı numuneleri kültüre etmeden de test edebilme imkanı sağlar (Madigan et al., 2012).

Enright ve arkadaşları 2000 yılında yaptıkları bir çalışma ile MLST yöntemini *S. aureus*' un moleküler tiplendirilmesinde ilk defa kullanarak *S. aureus*' ta başarılı bir şekilde tiplendirme gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada Çizelge 2.5' te verilmiş olan 7 farklı genin belirli bölgelerindeki yaklaşık 45 baz çiftinin karşılaştırılarak elde edilen sonuçlar ile ilk *S. aureus* MLST veribankası kurulmuştur (Enright et al., 2000).

Imperial Collage London in kontrolündeki “www.mlst.net” internet adresinde şu anda 29 farklı mikroorganizmaya ait veri bankası bulunmaktadır. Ayrıca bunların içinde sadece *S. aureus*' a ait veriler bulunan “saureus.mlst.net” adresinde organizmaya ait spesifik allelik profillere, işlemlerde kullanılacak solüsyon ve analiz edilecek genlerin primerlerine ayrıca farklı ülke ve laboratuvarlardan veritabanına yüklenmiş olan izolatların coğrafi olarak yayılımlarına ulaşma imkanı sağlamaktadır (Imperial Collage London, 2014) (Şekil 2.22).

Çizelge 2.5 *S. aureus*' un MLST' de dizilenen genlerin protein adları, kısaltmaları ve baz çifti uzunlukları (Enright et al., 2000).

No	Genin Kodladığı Proteinin Adı	Genin Kısa Adı	Karşılaştırılan uzunluk
1	Carbamate kinase	<i>arcC</i>	456
2	Shikimate dehydrogenase	<i>aroE</i>	456
3	Glycerol kinase	<i>glp</i>	465
4	Guanylate kinase	<i>gmk</i>	429
5	Phosphate acetyltransferase	<i>pta</i>	474
6	Triosephosphate isomerase	<i>tpi</i>	402
7	Acetyl coenzyme A cetyltransferase	<i>yqiL</i>	516



Chromosomal genes and allelic designation							ST	CC
<i>arcC</i>	<i>aroE</i>	<i>glpF</i>	<i>gmk</i>	<i>pta</i>	<i>tpiA</i>	<i>yqiL</i>		
1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	4	1	4	12	1	10	5	5
3	3	1	1	4	4	3	8	8
3	3	1	1	4	4	16	250	8
3	3	1	12	4	4	16	247	8

Şekil 2.22 MLST Analizi basamaklarının örnek ile gösterimi (Chambers and DeLeo, 2009).

MLST nin sekans temelli ve epidemiyolojik çalışmalardaki önemli bir başarısı da MRSA suşlarında köken araştırma konusunda olmuştur. 1960 yılı öncesinde izole edilen ilk MRSA suşlarının MLST ve *SCCmec* tiplerine bakıldığında çoğunun ST250 ve *SCCmec* tip I olduğu saptanmıştır. Sonrasında, farklı coğrafyadan izole edilen ilk MRSA suşu olan İberya MRSA suşunun ST247 ve *SCCmec* tip I olduğu, bununda ST250 sekans tipinden sadece tek lokusunun farklı olduğu görülmüştür. Devam eden büyük çaplı köken araştırma çalışmalarında ve eBURST analizlerinde ilkel MRSA suşlarının hepsinin CC8 klonal kompleksine ait oldukları görülmüştür (Feil Enright, 2004).

2.7. Türkiye’ de Yapılan Moleküler Tanılama ve Tiplendirme Çalışmaları

Özkan ve arkadaşlarının (1999) yaptığı bir çalışmada gıda sektöründe çalışanların ve esnafların burun boğazlarından aldıkları sürüntülerde *S. aureus* enfeksiyonlarına da bakmışlar ve sadece taşıyıcılık oranını vermişlerdir.

Bundan çok sonra 2009 yılında da Kütahya bölgesinde yine aynı şekilde gıda personellerinden alınan örneklerde taşıyıcılık ve antibiyotik dirençliliği araştırılmıştır ve inceleme sonucu taşıyıcı olarak tesbit edilen toplam 217 burun taşıyıcısı izolatlarının sadece 12’ sinde metisilin direnci belirlenmiştir (Gülbandılar, 2009).

Yine 2009 yılında Şanlıurfa’ da gıda sektöründe çalışan bireylerden örnek toplanmış ve antibiyotik dirençliliğine bakılmıştır (Şimşek vd., 2009).

Aynı yıl hastane kökenli suşların araştırılması için 8 farklı hastaneden aldıkları suşları PFGE, MLST ve *spa* tiplendirme gibi yöntemler ile tiplendirmesini yapmışlardır (Alp et al., 2009).

Sudagidan ve Aydın (2010) yaptıkları çalışmada, gıda örneklerinden izole ettikleri suşlar ile MLST çalışması yapmışlar ve sonuçlarını uluslararası veritabanına girmişlerdir.

Bursa, Nilüfer’ de gıda çalışanlarından alınan numunelerde de asemptomatik *S. aureus* taşıyıcılığı çalışılmış ve metisiline dirençli *S. aureus* burun taşıyıcılığı sağlık karnesi olmayan, tıbbi muayene ve bakteriyolojik olarak taşıyıcılık taraması yapılmayan işçilerde daha sık bulunmuştur (Pala et al. 2010).

Ergon ve arkadaşlarıda (2010) Dokuz Eylül Üniversitesi hastanesinde MRSA suşlarının moleküler tiplendirmesini yapmışlar, PFGE ile bu MRSA izolatlarının aynı veya çok benzer klonal özellikler taşıdığı gözlenmiştir. SCCmec analizi ve MLST ile de bu klonun, ülkemizde daha önce de bildirilmiş olan ST239-MRSA-III klonal kompleksinin (Brezilya klonu) bir üyesi olduğu saptanmıştır.

Otel personelinin burun ve boğaz sürüntülerinden *S. aureus* izolasyonu ile yapılan çalışma sonucunda da Otel personeline metisiline duyarlı ve dirençli *S. aureus* taşıyıcılık oranları diğer toplum kaynaklı çalışmalara göre yüksek bulunmamıştır. Ayrıca araştırılan risk faktörleri arasında sadece sigara içiciliği veya sigara içilen ortamda bulunma ile *S. aureus* kolonizasyonu arasında negatif bir ilişki saptanmıştır (Erdoğan ve Arslan, 2011).

Son olarak Yılmaz ve arkadaşları (2014), Orta Karadeniz bölgesinde metisiline dirençli *S. aureus* kökenlerinin filogenetiği için yaptıkları çalışmanın sonucunda baskın olan MRSA klonal kompleks, beş büyük pandemik MRSA klonundan biri olan, epidemik ST239 olduğu ve nozokomiyal MSSA izolatlarının uzun dönemli klonal çeşitlilik sergilediği belirlenmiştir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada kullanılan örnekler toplanması ve stoklanması

Çalışmada kullanılan materyallerin denemeye alınması için Ege Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 'ndan 28.01.2013 tarihli 13-1/3 karar numarası ile etik kurul onayı alınmıştır.

Çalışmada kullanılan örnekler İzmir il sınırları içerisinde bulunan 10 farklı hazır gıda işleme, et ve et ürünleri, tabldot yemek üretimi yapılan 10 farklı fabrikada üretimde çalışan ve gıda ile direk teması bulunan kişilerin burun deliklerinden izole edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan besiyerleri ve hazırlanması

3.1.2.1. % 5 Kanlı Columbia agar

Pancreatic Digest of Casein	12 g
Peptic Digest of Animal Tissue	5 g
Yeast Extract	3 g
Beef Extract	3 g
Corn Starch	1 g
Sodium Chloride	5 g
Agar	13,5 g
Distilled Water	1000 ml

Ticari olarak satın alınan besiyerinin (BBL Columbia Agar Base, Sparks, Maryland, USA) 42,5 g' ı 1000 ml distile suda hazırlanıp otoklavda 121°C, 1 atm basınç altında 15 dakika sterilize edilmiştir. Sonrasında 50°C' ye kadar soğutulur ve hacmen %5 olacak şekilde steril kan eklenerek iyice karıştırılır. Sonrasında her steril petri kabına yaklaşık 10 ml olacak şekilde dökülür.

Bu besiyeri burundan alınan sürüntülerde bulunan bakterilerin izolasyonu için kullanılmıştır. Gram pozitif ve negatif bir çok bakterinin üremesi için zengin bir besiyeridir. *S. aureus* kolonizasyonu ve hemoliz açılma zonları % 5 koyun kanlı agarda ayırt edilebilmektedir (Ellner et al., 1966).

3.1.2.2. Fenol red mannitol salt agar

Beef Extract	1 g
Pancreatic Digest of Casein	5 g
Peptic Digest of Animal Tissue	5 g
Sodium Chloride	75 g
D-Mannitol	10 g
Phenol Red	0,025 g
Agar	15 g
Distilled Water	1000 ml

Ticari olarak satın alınan besiyerinin (BBL Mannitol Salt Agar Base, Sparks, Maryland, USA) 111,025 g' ı 1000 ml distile suda hazırlanıp otoklavda 121°C, 1 atm basınç altında 15 dakika sterilize edilmiştir. Yeterli sıcaklığa kadar soğutulduktan sonra her steril petri kabına yaklaşık 10 ml olacak şekilde dökülür.

Besiyerinde bulunan % 7.5 oranındaki NaCl, *Staphylococcus* dışındaki bakterilerin üremesini inhibe eder. Mannitol fermentasyonu fenol kırmızısı sebebi ile ortamdaki renk değişiminden anlaşılmaktadır (York, 2004).

3.1.2.3. Mueller-Hinton II agar

Beef Extract	2 g
Acid Hydrolysate of Casein	17,5 g
Starch	1,5 g
Agar	17 g
Distilled Water	1000 ml

Ticari olarak satın alınan besiyerinin (BBL Mueller-Hinton II Agar Base, Sparks, Maryland, USA) 38 g' ı 1000 ml distile suda hazırlanıp otoklavda 121°C, 1 atm basınç altında 15 dakika sterilize edilmiştir. Yeterli sıcaklığa kadar soğutulduktan sonra her steril petri kabına yaklaşık 10 ml olacak şekilde dökülür.

Besiyeri Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) kriterlerine göre antibiyotik disk difüzyon yönteminde kullanılan standart besiyeridir. (York, 2004).

3.1.2.4. Brain hearth infusion broth (%20 Gliserollü)

Brain Heart, Infusion from (solids)	6 g
Peptic Digest of Animal Tissue	6 g
Pancreatic Digest of Casein	14,5 g
Dextrose	3 g
Sodium Chloride	5 g
Disodium Phosphate	2,5 g
Distilled Water	1000 ml

Ticari olarak satın alınan besiyerinin (BBL Brain Heart Infusion Base, Sparks, Maryland, USA) 37 g' ı 1000 ml distile suda hazırlanıp otoklavda 121°C, 1 atm basınç altında 15 dakika sterilize edilmiştir.

3.1.2.5. Tryptic soy broth

Bacto™ Tryptone (Pancreatic Digest of Casein)	17 g
Bacto Soytone (Pptic Digest of Soybean Meal)	3 g
Glucose (=Dextrose)	2,5 g
Sodium Chloride	5 g
Dipotassium Hydrogen Phosphate	2,5 g
Distilled Water	1000 ml

Ticari olarak satın alınan besiyerinin (BD Tryptic Soy Broth, Heidelberg, Germany) 30 g' ı 1000 ml distile suda hazırlanıp, kapaklı tüplere 5 'er ml paylaştırılmış ve ağızları kapatılmıştır. Sonrasında otoklavda 121°C, 1 atm basınç altında 15 dakika sterilize edilmiştir.

3.1.2.6. Tryptic soy agar (Difco)

Pancreatic Digest of Casein	15 g
Papaic Digest of Soybean	5 g
Sodium Chloride	5 g
Agar	15 g
Distilled Water	1000 ml

Ticari olarak satın alınan besiyerinin (BBL Difco Tryptic Soy Agar, Sparks, Maryland, USA) 40 g' ı 1000 ml distile suda hazırlanıp, kapaklı tüplere 5 'er ml paylaştırılmış ve ağızları kapatılmıştır. Sonrasında otoklavda 121°C, 1 atm basınç altında 15 dakika sterilize edilmiştir. Sonrasında yatık besiyeri elde edilmiştir.

3.1.3. Fenotipik ve biyokimyasal testlerde kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

3.1.3.1. Katalaz test çözeltisi

Katalaz testi yapılırken ticari olarak satılan % 3 H₂O₂ çözeltisi kullanılmıştır.

3.1.3.2. Koagülaz test çözeltisi

Koagülaz testi için ticari olarak satılan EDTA' lı liyofilize tavşan plazması (Bactident Coagulase, Merck) kutu içeriğine uygun olarak hazırlanır.

3.1.4. Antibiyotik direnci için kullanılan diskler

Antibiyotik direnç testleri yapılırken “Clinical and Laboratory Standards Institute” yayınladığı “CLSI, M 100 S 22 Vol. 32 No: 3” kılavuzu dikkate alınarak *S. aureus*’ un klinik olarak ilk test edilmesi gereken antibiyotikler kullanılmıştır. Bu antibiyotikler ile ilgili bilgiler Çizelge 3.1’ de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Test için kullanılan antibiyotiklerin doz miktarları ve referans zon çapları (CLSI, 2012).

Antibiyotik	Kısaltma	Doz Miktarı	Disk Çapı	Zon Çapları (mm)		
				R	I	S
Erythromycin	ERY	15 µg	6 mm	≥ 23	14 - 22	≤ 13
Clindamycin	CLI	2 µg	6 mm	≥ 21	15 - 20	≤ 14
Oxacillin	OX	1 µg	6 mm	≥ 13	11 - 12	≤ 10
Penicillin	P	10 U	6 mm	≥ 29		≤ 28
Trimethoprim - Sulfamethoxazole	SXT	1,25 / 23,75 µg	6 mm	≥ 16	11 - 15	≤ 10

Not: R: Dirençli I: Yarı Duyarlı S: Duyarlı

3.1.5. Hızlı tanılama için kullanılan kit

Hızlı tanılama için BBL™ Staphyloslide™ Latex test kiti kullanılmıştır.

3.1.6. Moleküler tiplendirmede kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

3.1.6.1. DNA izolasyonunda kullanılan çözelti ve tamponlar

Lizis tamponu

Tris HCl (pH: 8,0)	400mM
EDTA (pH: 8,0)	60 mM
NaCl	150 mM
SDS	% 1

Potasyum asetat tamponu

Potasyum Asetat	5 M
Glacial Asetik Asit	11,5 ml
Distile Su	28,5 ml
SDS	% 1

Etanol (% 70)

Etanol (% 96)	146 ml
Distile Su	54 ml

3.1.6.2. PCR’ da kullanılan çözelti ve tamponlar

dNTP karışımı (Geneaid, tüm deoksinükleotidtrifosfatlardan 10 mM)

Taq DNA polimeraz (Geneaid, 500U)

MgCl₂ solüsyonu (Geneaid, 500U)

PCR tamponu (Geneaid, 500U)

Marker (Fermentas)

Kullanılan cihaz Amplifikasyon Corbett marka bir termal cycler ile gerçekleştirilmiştir.

3.1.6.3. Primerler

Çalışmada kullanılan *S. aureus* suşlarının MLST analizleri için Çizelge 3.2’ de gösterilen primerler kullanılmıştır.

Çizelge 3.2 MLST için kullanılan primer dizileri (Enright et al., 2000).

Gen Bölgesinin Adı ve Kodu	Primer Dizisi
Carbamate kinase (arcC)	arcC-Up 5’-TTG ATT CAC CAG CGC GTA TTG TC-3’ arcC-Dn 5’-AGG TAT CTG CTT CAA TCA GCG-3’
Shikimate dehydrogenase (aroE)	aroE-Up 5’-ATC GGA AAT CCT ATT TCA CAT TC-3’ aroE-Dn 5’-GGT GTT GTA TTA ATA ACG ATA TC-3’
Glycerol kinase (glpF)	glpF-Up 5’-CTA GGA ACT GCA ATC TTA ATC C-3’ glpF-Dn 5’-TGG TAA AAT CGC ATG TCC AAT TC-3’
Guanylate kinase (gmk)	gmk-Up 5’-ATC GTT TTA TCG GGA CCA TC-3’ gmk-Dn 5’-TCA TTA ACT ACA ACG TAA TCG TA-3’
Phosphate acetyltransferase (pta)	pta-Up 5’-GTT AAA ATC GTA TTA CCT GAA GG-3’ pta-Dn 5’-GAC CCT TTT GTT GAA AAG CTT AA-3’
Triosephosphate isomerase (tpi)	tpi-Up 5’-TCG TTC ATT CTG AAC GTC GTG AA-3’ tpi-Dn 5’-TTT GCA CCT TCT AAC AAT TGT AC-3’
Acetyl coenzyme A acetyltransferase (yqiL)	yqiL-Up 5’-CAG CAT ACA GGA CAC CTA TTG GC-3’ yqiL-Dn 5’-CGT TGA GGA ATC GAT ACT GGA AC-3’

3.1.6.4. Pulsed-Field jel elektroforezinde kullanılan çözelti ve tamponlar

Tris-Cl

Tris-Base	121,1 g
HCl pH 7,2	
Distile Su	1000 ml

EDTA (0,5 M pH 8,0)

EDTA	186,1 g
NaOH	pH 8,0
Distile Su	800 ml

TBE (5X)

Tris-Base	54 g
Borik Asit	27,5 g
0,5 M pH 8,0 EDTA	20 ml
Distile Su	1000 ml

TBE (0,5X)

5X TBE	200 ml
Distile Su	1800 ml

5 M NaCl

NaCl	146,1 g
Distile Su	500 ml

HST tampon

1 M Tris-Cl	2,5 ml
0,5 M EDTA pH 8,0	25 ml
5 M NaCl	1 ml
Steril Distile Su	221,5 ml

Lizis tampon

1 M Tris-Cl pH 7,2	0,1 ml
5 M NaCl	0,1 ml
0,5 M EDTA pH 8,0	1 ml
Sodyum Deoksikolat	20 mg
Sarkosyl	50 mg
Steril Distile Su	8,8 ml

Proteinaz K tampon

0,5 M EDTA pH 8,0	5 ml
Sarcosyl	0,1 g
Proteinaz K	0,5 mg
Steril Distile Su	5 ml

TE tampon

1 M Tris-Cl	5 ml
0,5 M EDTA pH 8,0	0,1 ml
Steril Distile Su	494,9 ml

SmaI reaksiyon tamponu

SmaI	3 µl
10X Tango Tamponu	10 µl
Steril Distile Su	87 µl

Etidyum Bromür boyası

Et-Br (10 mg/ml)	300 µl
Steril Distile Su	600 µl

Low-melt agaroz kalıplar

HST tamponu	10 ml
Low melt Agaroz	0,2 g

% 1 PFGE için agaroz jel

PFGE Grade Agaroz	1 g
0,5 X TBE	100 ml

3.1.6.5. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözelti ve tamponlar

Tris borik asit EDTA (TBE) tamponu

Stok çözelti (5X / 1000 ml)

Tris base	54 g
Borik asit	27,5 g
0,5 M EDTA	20 ml (pH 8,0)

1X çalışma çözeltisi

Tris base	89 mM
Borik asit	89 mM
0,5 M EDTA	20 ml (pH 8,0)

Jel yükleme tamponu

- % 0,25 Bromfenol Mavisi
- % 0,25 Ksilen Siyanol FF
- % 15 Ficoll Suda (Tip 400; Pharmacia)

Jel görüntüleme boyası

10000X gelRed SafeView

3.1.6.6. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan cihaz

PCR ürünlerinin elektroforezinde Consart HU 13 marka 13x15 cm boyutlarında bir küvet kullanılmıştır.

3.1.6.7. Agaroz jelin hazırlanışı

Aynı ya da farklı agaroz jellerdeki bant izlerinin karşılaştırılabilmesi için elektroforez koşulları standardize edilmiştir ve bütün elektroforez işlemleri aynı koşullarda gerçekleştirilmiştir. Elektroforez, 90 V' ta 1 saat 20 dakika boyunca sürdürülmüştür. Tampon olarak TBE kullanılmış ve elektroforez % 1 agaroz jelde

gerçekleştirilmiştir. Ayrıca jel hazırlanırken içerisine 5 ml/ 100 ml olacak şekilde 10000XgelRed (SafeView Nucleic Acid Stain) nükleik asit boyası ilave edilmiştir.

Elektroforez için 5 µl PCR ürünü ve 2 µl jel yükleme tamponu karıştırılarak kuyucuklara yüklenmiş, her elektroforez işleminde örneklerle birlikte DNA markerı da jelde yürütülmüştür.

3.1.7. Kullanılan standart suşlar

Staphylococcus aureus subsp. *aureus* Rosenbach (ATCC® 43300™)

Staphylococcus aureus subsp. *aureus* Rosenbach (ATCC® 6538P™)

Staphylococcus epidermidis (ATCC® 12228™)

3.1.8. Araştırmada kullanılan cihazların listesi

Otoklav (Hirayama)

İnkübatör

Mikroskop

-20 °C derin dondurucu

Mikro santrifüj

Sekans cihazı

SeqScape software

Terazi

pH metre

Vorteks

Elektroforez

Güç kaynağı

Jel görüntüleme cihazı

Çoklu ısı bloğu

3.2. Metod

3.2.1. Örneklerin toplanması

Çalışmadaki numuneler İzmir ili içerisinde hazır gıda üretimi yapan fabrikalarda üretimde aktif olarak görev yapan 1358 kişinin burunlarından izole edilmiş ayrıca numune toplama sırasında kimlik bilgileri dışında Adesida ve arkadaşlarının (2007) de yaptığı çalışmada yönelttiği sorular modifiye edilerek aşağıdaki şekli ile kişilere yöneltilmiştir.

- Yakın zamanda hastanede yattı mı?
- Burun deliklerini düzenli olarak temizler mi?
- Ellerini düzenli olarak yıkar mı?
- Sık antibiyotik kullanır mı?
- Antibiyotik kullanıyor ise reçeteli mi?
- Kendini tedavi ederken antibiyotik kullandı mı?
- Geçtiğimiz iki hafta içerisinde antibiyotik kullandı mı?

Çalışmaya uygun olarak bu sorulara verilen cevaplar kayıt altına alınmış ve çalışmada kullanılan izolatlara sahip olan kişilerin cevapları oransal olarak değerlendirilmiştir. Alınan izolatlar stuart transport besiyerli eküvyon çubuklar ile soğuk zincir şartlarında laboratuvara ulaştırılmıştır.

3.2.2. *S. aureus* türlerinin izolasyonu ve diğer kültürel işlemler

3.2.2.1. % 5 Kanlı Columbia agar

Stuart besiyeri ile transport edilen örneklerin ilk olarak % 5 Kanlı Columbia ağara ekilmiş ve 37 °C’ de 24 saat inkübe edilmiştir. *S. aureus*’ un karakteristik koloni morfolojisi olan sarı, yuvarlak, 1 – 4 mm, belirgin kenarlı, parlak görünümlü ve β -hemoliz gösteren kolonilerden 1-2 tanesi öze ile dikkatlice alınarak fenol red mannitol salt agar’ a ekim yapılmıştır.

3.2.2.2. Fenol red mannitol salt agar

S. aureus identifikasyonunda kullanılan bu besiyeri yüksek tuz konsantrasyonun da ve sadece mannitolün şeker kaynağı olarak bulunduğu bir ortamda üreyebilmeye izin vermektedir. İdentifikasyonun ilk basamaklarından olan bu besiyerine öze ile kanlı agardan alınan sarı renkli kolonilerden ekim yapılmıştır. 37 °C’ de 24 saat inkübasyon sonucu üremenin olduğu yerlerde kırmızı renkli besiyerinin sarı olduğu görülmekte ise mannitol fermentasyonu pozitif olarak değerlendirilir. Ayrıca üreyebilen bakteri % 7,5 lik NaCl konsantrasyonunda da çoğalabilmektedir.

3.2.3. Fenotipik ve biyokimyasal tanılama testleri

3.2.3.1. Katalaz testi

Mannitol salt agar besiyerinde pozitif sonuç veren kolonilerden steril öze ile temiz bir lam üzerine 1-2 damla damlatılmış % 3’ lük H_2O_2 çözeltisi ile süspanse edilmiştir. Katalaz aktivitesi gösteren hücreler H_2O_2 ’ yi su ve oksijene parçalayacağı için oksijen çıkışından dolayı ortamda kabarcık oluşumu gözlemlenmektedir. Bu aktiviteyi gösteren izolatlar katalaz pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.2.3.2. Koagülaz testi

Koagülaz aktivitesi steril eppendorf tüplerde gerçekleştirilmiştir. 0,8 ml serum fizyolojik çözelti ile 0,2 ml EDTA' lı tavşan plazması karıştırılarak içerisine bakteri inoküle edilmiş, 37°C sıcaklıktaki su banyosuna tutularak ve 1., 2., 4., 8. ve 24. Saatlerde koagülasyon izlenmiştir. Koagülasyon için tüp içerisinde jelimsi görünen pıhtı olup olmadığına bakılmış ve pıhtı var ise koagülaz pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.2.3.3. Şeker fermentasyon testleri

Şeker fermentasyonu testi için “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” kitabında listesi bulunan ayırt edici olan arabinoz, cellobioz, früktoz, galaktoz, laktoz, maltoz, mannitol, mannoz, raffinöz, riboz, sükroz, trehaloz, ksilitol ve ksiloz şekerleri seçilerek modifiye edilmiş fenol red mannitol salt sıvı besiyerinde test edilecek olan şeker mannitolün yerine tek karbon kaynağı olacak şekilde hazırlanmıştır. Ayrıca sadece *S. aureus* üreyebilmesi için % 7,5 lik NaCl oranı korunmuştur (Schleifer and Bell, 2009).

3.2.4. Hızlı tanılama kitinin kullanımı

BBL™ Staphyloslide™ Latex test kiti kullanımı için agar besiyerinde üretilen *S. aureus* izolatlarından steril öze ile alınan bir miktar hücre test kartında solüsyon ile karıştırılmıştır. Pozitif ve negatif kontroller ile birlikte agglütinasyon varlığı gözlemlenmiştir. Agglütinasyon faktörüne göre seçim yapan bu kit ile hızlı bir şekilde tanılama gerçekleştirilmiştir.

3.2.5. *S. aureus*' un antibiyotiklere olan dirençlerinin saptanması

Bir gece önceden tryptic soy agarda inkübasyona bırakılan *S. aureus* izolatlarından her örnek için ayrı steril tüpte serum fizyolojik çözeltisinde 0,5 McFarland olacak şekilde steril öze ile hücreler homojenize edilmiştir. CLSI

kriterlerine göre yapılmış olan antibiyogram testinde ticari olarak satılan ve belirtilen şartlara göre hazırlanan Müller-Hinton II agar besiyeri kullanılmıştır.

Her bir örnekten steril eküvyon çubuk ile alınan örnekler petrilerin yüzeylerine boşluk kalmayacak şekilde ve kontamine olmayacak şekilde inoküle edilmiştir. Sonrasında kısa bir süre kurumaya bırakılan petrilerin yüzeyine CLSI 2012 de belirtildiği gibi bir petride en çok 5 disk olacak şekilde ve bu disklerin birbirleri ile aralarındaki uzaklık en az 24 mm olmasına dikkat edilmiştir. Sonrasında 37 °C’ de 24 saat inkübasyona bırakılan petrilerdeki zon çapları kılavuzda belirtildiği gibi ölçülerek antibiyogramlara olan dirençlilikleri dirençli, yarı duyarlı ve duyarlı olmak üzere üç kriterde değerlendirilmiştir. Kullanılan antibiyotik diskleri CLSI kriterlerine göre klinik laboratuvara gelen *S. aureus* suşlarının ilk olarak test edilmesi gereken antibiyotikleridir (CLSI, 2012) .

3.2.6. *S. aureus*’ un moleküler tiplendirilmesi

3.2.6.1. DNA izolasyonu

Fenotipik tanılamaları yapılan *S. aureus* izolatlarının MLST işlemi için yapılacak olan PCR işleminde kullanılmak üzere genomik DNA izolasyonu Liu ve arkadaşları (2000) tarafından tanımlanan metot temel alınıp modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir.

Tüpte tryptic soy sıvı besiyerlerine inoküle edilen izolatlar 24 saat 37 °C’ de inkübe edilmiştir. 1,5 ml’ lik eppendorf tüplerine 1000 µl olacak şekilde konulan inoküle edilmiş sıvı besiyeri 12000 rpm de 5 dakika santrifüj edilir ve süpernatant dökülür. Pelletin üzerine 500 µl lizis tamponu ilave edilir ve vorteks ile homojen hale getirilir. 65 °C’ de 15 dakika bekletilerek lizis işlemi tamamlanır. Tekrar 12000 rpm de 5 dakika santrifüj edilerek pellet oluşturulur. Süpernatant dökülür. Her bir tüpün içerisine 150 µl potasyum asetat ilave edilir ve vorteks ile homojen hale getirilir. Oda sıcaklığında 10 dakika bekletildikten sonra 12000 rpm de 5 dakika boyunca santrifüj edilir. Süpernatant yeni bir eppendorf tüp içerisine alınır ve üzerine 500 µl izopropil alkol ilave edilir. Pipet ile yavaş bir şekilde homojen hale getirilir. Karışım 12000 rpm de 4 C’ de 3 dakika boyunca çöktürülmüş ve

süpernatant atılmıştır. DNA pelleti üzerine 300 µl %70'lik soğuk etanol ilave edilir, 12000 rpm de 2 dakika santrifüj edilir ve süpernatant yavaşça dökülür. 65 °C etüv yada ısıtıcı blokta etanol uçurulur ve pelletin üzerine 50 µl ultra saf su eklenerek süspanse edilir. Sonrasında genomik DNA -20 °C' de muhafaza edilir (Liu et al., 2000).

3.2.6.2. DNA' ların saflık kontrolü

İzolatlardan elde edilen genomik DNA' lar agaroz jel elektroforezinde kontrol edildikten sonra nanodrop spektrofotometre cihazı ile miktar tayinleri yapılmıştır (Sık vd., 2008).

Agaroz jel elektroforezi, SafeView 10000X GelRed içeren % 1,5 lik agaroz içeren jelde gerçekleştirilmiştir. Jel hazırlanırken ve elektroforezde TBE tamponu kullanılmış ve 1 µl yükleme tamponu, 5 µl DNA karıştırılarak 90 V' da 1 saat 20 dakika yürütülmüştür. Elektroforez sonucunda, başlangıç noktasına yakın, yüksek molekül ağırlığında tek bir bant gözlenmesi, izole edilmiş DNA' ların bütünlüğünün tam olduğunu göstermiştir (Sambrook et al, 1989).

DNA ların NanoDrop spektrofotometrede miktar tayini yapıldıktan sonra - 20 °C kapalı şekilde tutulmuşlardır.

3.2.6.3. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

DNA amplifikasyonu optimize edilmiş 25 µl' lik reaksiyon karışımında gerçekleştirilmiştir. Toplam reaksiyon hacmi 25 µl olacak şekilde, aşağıdaki bileşenler sıra ile 0,2 ml' lik PCR tüplerine konulmuştur.

Ultra saf su	10,65 µl
PCR reaksiyon tamponu	2,5 µl
MgCl ₂	3,6 µl
dNTP karışımı	1,0 µl
Primer (Up)	1,0 µl
Primer (Down)	1,0 µl
Taq polimeraz	0,25 µl
Kalıp DNA	5 µl

Multi lokus sekans tiplemesinde dizi analizi yapılacak tüm gen bölgelerinin primer çiftlerinde aynı şartlarda hazırlanan sistemde reaksiyon karışımları buharlaşmayı engellemek için ince bir tabaka steril mineral yağ ile kaplanmış ve amplifikasyonlar programlanabilir bir termal cycler da aşağıdaki koşullarda gerçekleştirilmiştir.

İlk denatürasyon 95 °C’ de 5 dakika

30 döngü, her döngüde

I.	Denatürasyon	95 °C	1 Dakika
II.	Bağlanma	59 °C	1 Dakika
III.	Uzama	72 °C	1 Dakika

PCR tüpleri son döngüden sonra 72 °C’ de 5 dakika inkübe edilir.

Tüpler reaksiyon bittikten sonra -20 °C’ de tutulur (Enright et al., 2000).

3.2.6.4. Agaroz jel elektroforezi

PCR ürünlerinin elektroforezinde Consort marka 13x15 cm boyutlarında bir cihaz kullanılmıştır. Aynı ya da farklı agaroz jellerdeki bant izlerinin karşılaştırılabilmesi için elektroforez koşulları standardize edilmiş ve bütün elektroforez çalışmaları aynı cihaz ve aynı koşullarda gerçekleştirilmiştir. Elektroforez işlemi, 90 V, 300 mA ve 50 W elektrik akımında 1 saat 20 dakika sürdürülmüştür. Tampon olarak TBE tampon kullanılmış ve elektroforez % 1’ lik agaroz jelde gerçekleştirilmiştir. Ayrıca jel hazırlanırken içerisine, 5 µl / 100 ml olacak şekilde 10000X GelRed nükleik asit boyası katılmıştır (Ausubel et al., 1997).

Elektroforez için 5 µl PCR ürünü ve 2 µl jel yükleme tamponu karıştırılarak kuyucuklara yüklenmiş, her elektroforez işleminde örneklerle beraber DNA markerı da jelde yürütülmüştür.

3.2.6.5. Pulsed-field jel elektroforezi (PFGE)

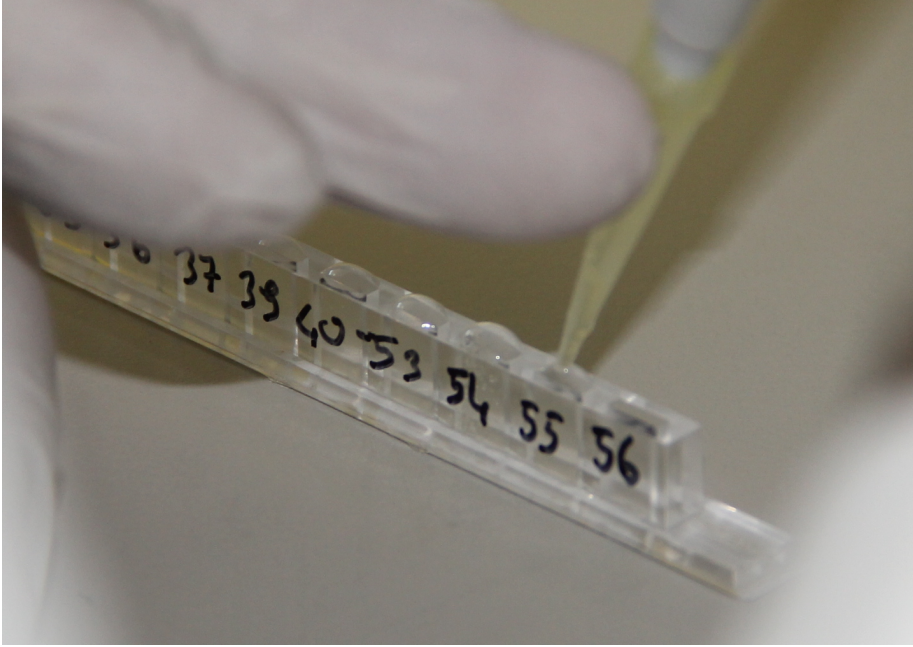
“Bergey’s Manual Of Systematic Bacteriology” kitabında *S. aureus*’ un tiplendirmesinde altın standart olarak kabul edilen iki yöntemden biri olan PFGE bakteri hücrelerinin bütün halinde yumuşak agaroz jele gömülmesini, hücre duvarı lizisini ve kromozomun kesilmesi işlemlerini barındıran ve bir çok bakteri türünün tiplendirmesinde kullanılan bir yöntemdir (Schleifer and Bell, 2009).

Tüm genom *SmaI* restriksiyon endonükleazı ile kesilerek agaroz jelde ayrılarak oluşan fragmentler izlenir.

S. aureus bakterisine özgü olarak kullanılan *SmaI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile aşağıdaki protokol izlenerek ve en uygun şekline göre modifiye edilerek uygulanmıştır, bakteriyel kromozomun kesilmesinden sonra 18-24 saat arasında yürütme gerçekleştirilmektedir (Mulvey et al., 2001). Tüm PFGE çalışması aşağıdaki basamaklarda gerçekleşmiştir:

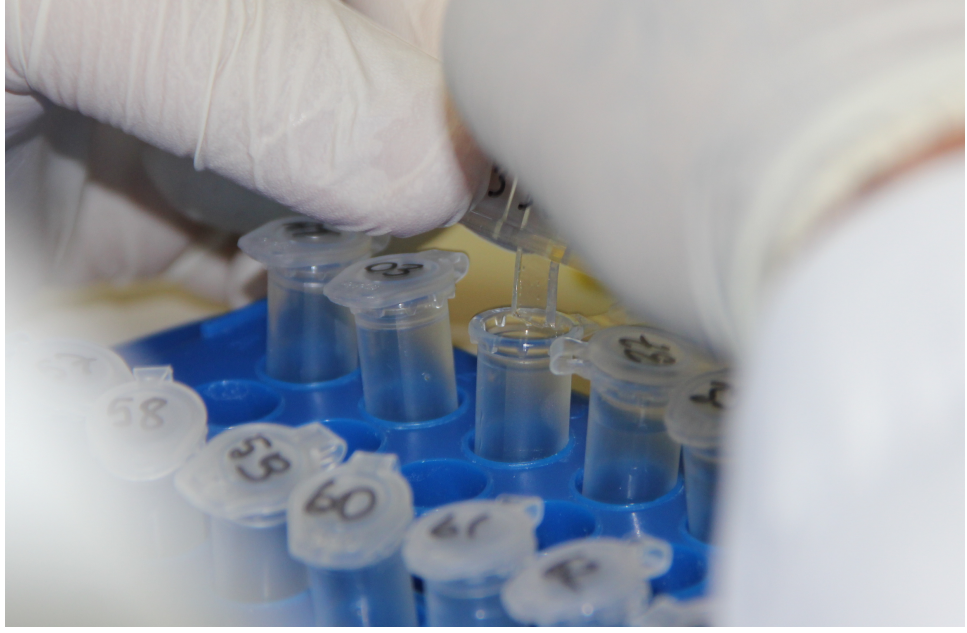
- TSA’ da 24 saat inkübe edilmiş taze kolonilerden öze ile alınan örnekler steril tüp içerisinde 5 ml serum fizyolojik ile çözülür.
- Vorteks ile iyice karıştırılmış çözeltiden 300 µl alınarak eppendorf tüplere konulur.
- 13000g’ de 4 °C’ de hücrelerin çöktürülmesi için santrifüj edilir.
- Santrifüj sonrası çöken hücrelerin üzerinde kalan süpernatant atılır. Kalan pellet 500 µl HST ile süspanse edilir.
- Vorteksle tekrar yapılan karıştırma sonrasında 13000g’ de 4 °C’ de tekrar santrifüj edilir.
- Süpernatant tekrar atılır ve pellet 1 ml soğuk HST ile süspanse edilir.
- Herbir örnekten 100 µl alınarak ayrı tüplerde buz üzerinde bekletilir.
- % 2’lik low melt agaroz hazırlanır.

- Homojen hale gelen sıcak low melt agaroz 100' er μ l ependorflara konularak 50 °C' de kuru bloklarda bekletilir.
- Uygun boyutta örnek kalıbı alabilmek amacı ile özel PFGE kalıpları hazırlanır (Şekil 3.1).



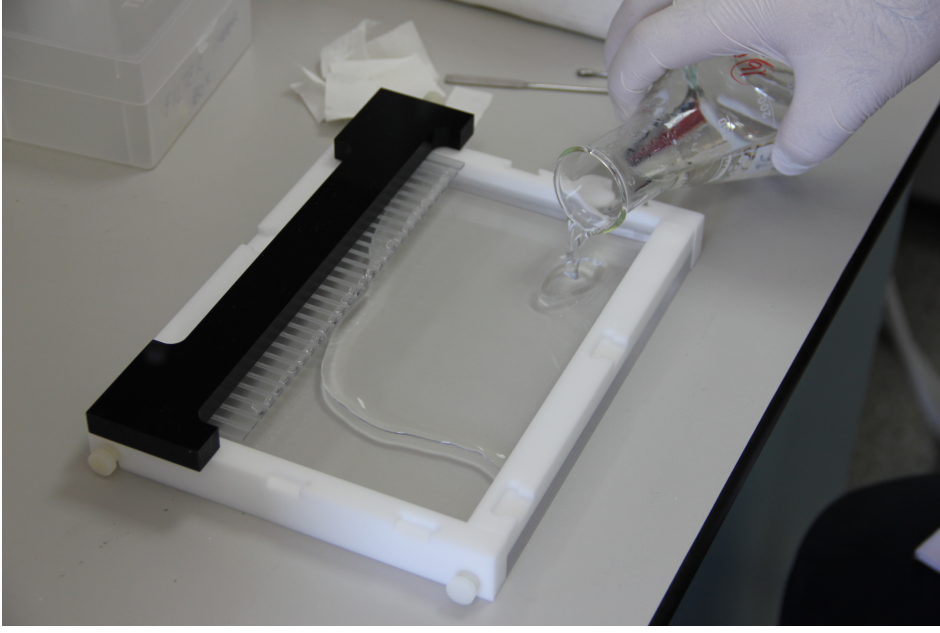
Şekil 3.1 Hazırlanan hücre agaroz karışımının kalıplara doldurulması.

- 3 μ l lysostaphin (1 mg / ml) ve 100 μ l bakteri solüsyonu homojen olarak karıştırılır. 100 μ l low melt agaroz ile de karıştırılarak kalıpların herbir kuyucuğu farklı örnek ile doldurulur.
- Kalıplar sonrasında +4 °C' de en az 15 dakika tutularak katılaşması sağlanır.
- Kalıptan çıkarılan her bir agaroz parçası farklı ependorflara konulur üzerine her bir tüpe 500 μ l lizis tamponu ilave edilir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 Hazırlanan kalıpların ependorf tüplerine konulması.

- Tüpler 1 saat boyunca 37 °C’ de su banyosunda inkübe edilir.
- İnkübasyondan çıkarılan tüplerdeki lizis tamponu dökülür ve yerine her tüpe 500 µl olacak şekilde Proteinaz K tamponu eklenir.
- Bu şekilde 50 °C’ de 30 dakika inkübe edilir. Sonrasında bu içerisinde 15 dakika bekletilir.
- Kalıplar 3 kez 50 °C’ de 30 dakika TE tampon ile yıkanır ve proteinaz K ortamdan tamamen uzaklaştırılır.
- Genomik DNA nın kesimi için kalıplar 30 °C’ de 100 µl 1x SmaI tamponu ile inkübe edilir. Sonrasında her tübe 30 U olacak şekilde enzim eklenerek 30 °C’ de bir gece inkübasyona bırakılır.
- Tüpler +4 °C’ de 15 dakika bekletilerek soğutulur.
- 0,5x TBE tamponu ile % 1 lik 100 ml PFGE kalitesinde jel hazırlanır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 PFGE için uygun agarozun dökülmesi.

- Bekletilen kalıplar her bir kuyucuğa bir örnek olacak şekilde kalıplar yerleştirilir ve kalan agaroz jel ile deliklerin üzerleri kapatılır.
- Elektroforez cihazının haznesi 2 L 0,5x TBE tampon ile doldurulur (Şekil 3.4) ve Çizelge 3.3' te verilen şartlarla 20 saat elektroforez işlemi gerçekleştirilir.



Şekil 3.4 PFGE işleminde kullanılan jel yürütme sistemi.

- Jel 600 ml deiyonize su ve 300 µl Etidyum Bromür (10 mg/ml) ile 30 dakika çalkalanarak boyanır. Sonrasında 5 – 6 deiyonize su ile yıkanır ve görüntüleme cihazında görüntülenir.

Çizelge 3.3 Hazırlanan PFGE sisteminde akım ve doğrultu ayarları.

Vuruş Zamanları	5,3 - 34,9 Saniye
Süre	20 Saat
Tampon Sıcaklığı	14 °C
Vuruş Açısı	120°
Gerilim	6 V/cm ²

3.2.6.6. Multi Lokus Sekans Tiplendirmesi (MLST)

MLST için gerekli olan; *arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yqiL* gen bölgelerinin PCR ları gerçekleştirilmiş, jel elektroforezi ile PCR sonuçları değerlendirilmiş ve her bölgenin sekansı ayrı olacak şekilde dizi analizi için soğuk ortamda hizmet alımı yapan bir laboratuvara gönderilmiştir. Dizi analizi Applied Biosystems® 3130XL Genetic Analyzers marka ve modele sahip cihazda gerçekleştirilmiştir.

3.2.6.7. Verilerin Analizi

Veri analizleri için tiplendirme yöntemlerinde farklı program ve uygulamalar kullanılmıştır.

PFGE verilerinin analizi için VersaDoc 4000MP image analyzer system (Bio-Rad) ile görüntü alınmıştır ve alınan görüntüler BIO-PROFIL Bio-1D++ programı ile analiz edilmiştir. Dendrogram çizimi yine aynı program ile UPGMA metodu kullanılarak yapılmıştır.

MLST analizi için <http://www.mlst.net> web sitesinde entegre olarak çalışan program kullanılmış ve sekans tipleri ile karşılaştırma her bir gen için ayrı ayrı yapılmıştır. Sonrasında yine aynı sitede bulunan program ile UPGMA metodu kullanılarak dendrogram çizilmiştir.

Dizi analizi sonucu elde edilen sonuçlar “Sequin” programı ile uygun şekilde NCBI GenBank veribankasına kayıt edilmişlerdir.

4. BULGULAR

4.1. *S. aureus* İzolasyonu

İzolasyon burun deliklerinin ön bölgelerinden steril eküvyon çubuk ile sürüntü şeklinde alınmıştır. Stuart besiyerli transport tüplerinde soğuk zincir şartlarında laboratuvara ulaştırılmış ve zenginleştirmek amacı ile % 5 Kanlı Columbia agar besiyerine yayma ekimi yapılmıştır.

4.2. Kültürel Tanılama

4.2.1. % 5 Kanlı Columbia agar

Bölüm 3.2.2.1’ de anlatıldığı şekilde çalışılan burun sürüntü örnekleri 24 saat 37 °C’ de inkübe edilmelerinin ardından değerlendirmeye alınmıştır. % 5 Kanlı Columbia agarda *S. aureus* için karakteristik sarı renkte koloniler oluşturan ve β -hemoliz gerçekleştiren 64 farklı izolata ait koloni *S. aureus* şüphesi ile ayrı petriye alınmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 % 5 Kanlı Columbia agarda β -hemoliz gösteren *S. aureus* kolonileri.

4.2.2. Fenol red mannitol salt agar

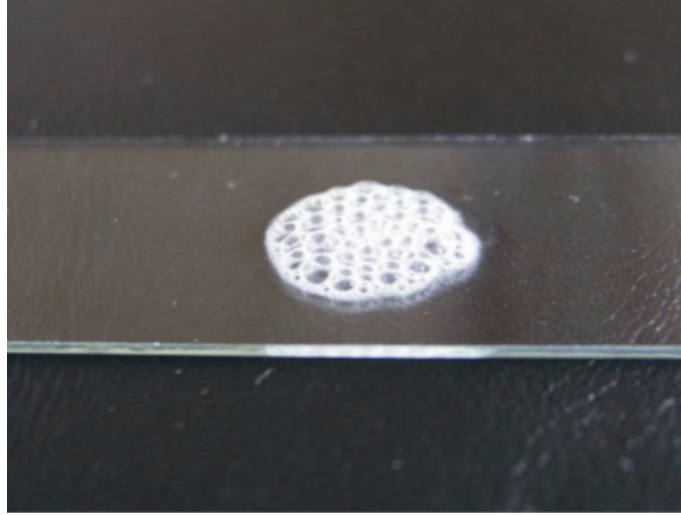
% 5 Kanlı Columbia agarda saf halde elde edilen koloniler bir sonraki kültürel test olan ve Bölüm 3.2.2.2’ de belirtilen fenol red mannitol salt agar petrilere seyreltme plaka ekimi tekniği ile ekilmiş ve mannitol fermentasyonu ve yüksek tuz konsantrasyonunda üreyebilme yönünden değerlendirilmiştir. Steril halde kırmızı renkte olan besi ortamı laktik asit oluşumu sebebi ile Şekil 4.2’ de görüldüğü gibi sarıya dönmekte ve üreme gözlenmektedir. 64 izolatın tamamı mannitol fermente edebilmekte ve yüksek tuz konsantrasyonunda üreyebilmektedir.



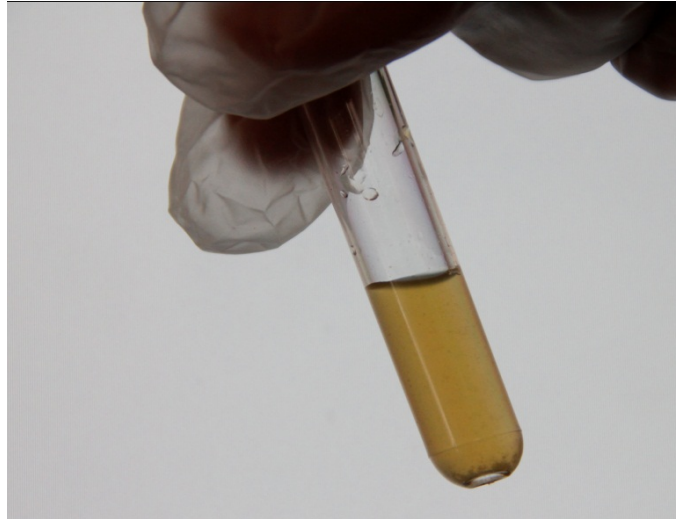
Şekil 4.2 FRMSA da *S. aureus* üremesi sonucu oluşan renk değişikliği.

4.3. Biyokimyasal Tanılama

3.2.3.1. ve 3.2.3.2 bölümlerinde anlatıldığı gibi yapılan katalaz ve koagülaz testlerinde 64 izolatın tamamı katalaz ve koagülaz testlerinde pozitif sonuç vermiştir. Pozitif katalaz Şekil 4.3, pozitif koagülaz testi de Şekil 4.4 ‘de gösterilmiştir.



Şekil 4.3 Katalaz testinin pozitif sonucunda ortaya çıkan O₂ sebebi ile oluşan hava kabarcıkları.



Şekil 4.4 Tüp koagülasyon testi sonucu oluşan jelimsi görüntü.

Tüm *S. aureus*' larda karakteristik sonuç veren bu şekerlerin fermentasyon sonuçları tüm izolatlarda aynı sonucu vermiştir. Sonuçlar Çizelge 4.1, Örnek test görüntüleri Şekil 4.5' te gösterilmiştir.

Çizelge 4.1 Fermentasyon testinde kullanılan şekerler ve *S. aureus*' un kullanım sonuçları. (+) kullanabiliyor, (-) kullanamıyor

Arabinoz	Cellobioz	Fruktoz	Galaktoz	Laktoz	Maltoz	Mannitol	Mannoz	Raffinoz	Riboz	Sükroz	Trehaloz	Ksilitol	Ksiloz
-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-



Şekil 4.5 Şeker fermentasyonu sonucu besi yerinde oluşan renk değişikliği ve gaz çıkışı olmadığını gösteren tüpler.

4.4. Kit ile Hızlı Tanılama

Kümelenme faktörüne göre tanılama yapan BBL™ Staphyloslide™ Latex test kiti ile fenotipik olarak tanılanan 64 izolat pozitif olarak sonuç vermiştir.

4.5. Sorulara Verilen Cevaplar ve İstatistiksel Bulguları

İzmir ili ve çevre ilçelerinde 10 gıda fabrikasında üretimde aktif olarak çalışan 1358 kişinin burunlarından izole edilen sürüntü örneklerinden % 5 Kanlı Columbia agarda β -hemoliz, fenol red mannitol salt agar da üreme gerçekleştiren *S. aureus* olduğu düşünülen 64 tanesi seçilmiş ve çalışmaya dahil edilmiştir. Bu 64 kişinin sorulara verdiği cevaplar kayıtlardan değerlendirilmiştir. yöneltilen sorular ve kişilerin istatistiksel dağılımı Çizelge 4.2’ de verilmiştir. Fabrika isimleri ve kişi bilgileri gizli tutulmuştur.

Çizelge 4.2 Çalışanlara yöneltilen sorular ve kişilerin istatistiksel dağılımı (Sonuçlar 64 kişi üzerinden değerlendirilmiştir).

Özellikler	Çalışan Sayısı (n)	Oran (%)
Yaş (Yıl)		
<20	9	14,06
21-25	16	25
>26	39	60,94
Cinsiyet		
Erkek	41	64,06
Kadın	23	35,94
Fabrika		
Fabrika 1	4	6,25
Fabrika 2	3	4,69
Fabrika 3	3	4,69
Fabrika 4	1	1,56
Fabrika 5	3	4,69
Fabrika 6	2	3,13
Fabrika 7	10	15,63
Fabrika 8	8	12,50
Fabrika 9	1	1,56
Fabrika 10	29	45,31
Hastanın Tıbbi Geçmişi		
Yakın zamanda hastanede yattı mı?	4	6.25
Burun deliklerini düzenli olarak temizler mi?	45	70.31
Ellerini düzenli olarak yıkar mı?	60	93.75
Sık antibiyotik kullanır mı?	23	35.94
Antibiyotik kullanıyor ise reçeteli mi?	14	21.88
Kendini tedavi ederken antibiyotik kullandı mı?	20	31.25
Geçtiğimiz iki hafta içerisinde antibiyotik kullandı mı?	17	26.56

4.6. Stoklama

Kültürel ve biyokimyasal yöntemler ile *S. aureus* olarak tanılanan izolatlar kodlanarak % 20 gliserol ilave edilmiş 5 ml' lik tüplerde brain hearth infusion broth içerisinde -80 °C sıcaklıkta stoklanmıştır.

Ayrıca testlerde kullanılmak için tüplerde yatık tryptic soy agar hazırlanmış ve her bir izolat steril olarak ekilmiş 3 ayda bir değiştirilmek üzere +4 - +8 °C' de bekletilmiştir.

4.7. Antibiyotik Direnci

S. aureus izolatlarının antibiyotik direnç testleri Bölüm 3.2.5' te anlatıldığı gibi çalışılmıştır. Antibiyogram petri görüntüsü örnekleri Şekil 4.6' da görülmektedir. Ayrıca 64 izolatın herbirine ait CLSI verilerine göre değerlendirilmiş profilleri Çizelge 4.3' de verilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre 64 *S. aureus* izolatının % 92,18' i (59/64) en az bir antibiyotiğe karşı direnç göstermektedir. Test edilen izolatların % 79,68' i (51/64) Penicillin' e, % 6,25' i (4/64) Erythromycin' e, % 4,68' i (3/64) Clindamycin' e, % 1,56' sı (1/64) Trimethoprim-Sulfamethoxazole' ye, % 14,06' sı (9/64) Oxacillin' e karşı direnç gösterdiği görülmüştür. Oxacillin' e dirençli 9 izolat metisilin dirençli olarak değerlendirilmiş ve EM21, EM22, EM33, EM59, EM64, EM66, EM79, EM81, EM82, MRSA olarak işaretlenmiştir.



Şekil 4.6 EM69(a) ve EM59(b) kodlu izolatların antibiyotik direnç testi görüntüsü.

Çizelge 4.3 Tüm *S. aureus* izolatlarının antibiyotik direnç profilleri

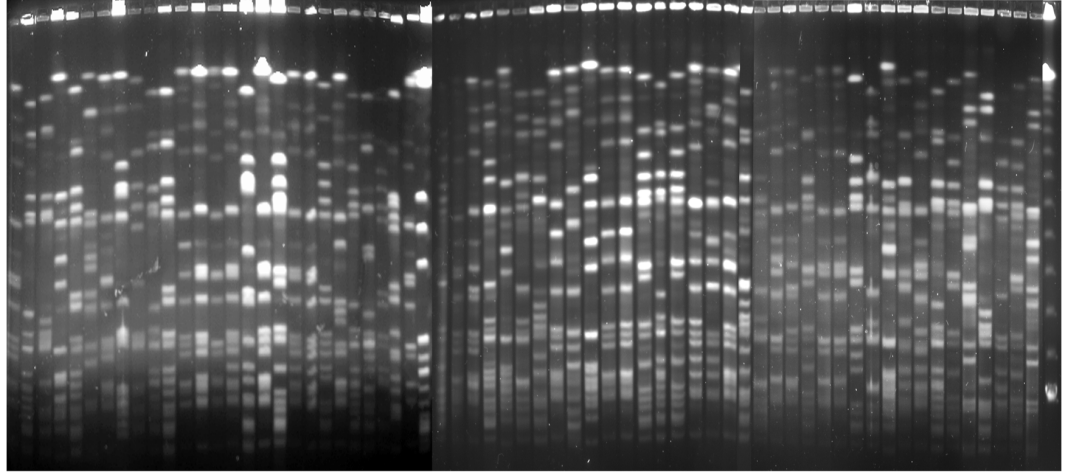
No	İzolot Kodu	ERY	CLI	OX	P	SXT	No	İzolot Kodu	ERY	CLI	OX	P	SXT
1	EM01	I	I	S	R	S	35	EM53	S	S	S	R	S
2	EM02	I	S	S	R	S	36	EM54	S	S	S	R	S
3	EM03	S	I	S	R	S	37	EM55	S	I	S	R	S
4	EM04	I	I	S	S	S	38	EM56	S	I	S	R	S
5	EM07	S	I	S	R	S	39	EM57	S	I	S	R	S
6	EM09	S	S	I	R	S	40	EM58	S	S	S	R	S
7	EM10	S	I	S	R	S	41	EM59	S	S	R	R	R
8	EM11	S	S	I	R	S	42	EM60	R	R	S	R	S
9	EM12	I	S	S	R	S	43	EM61	R	R	S	R	S
10	EM13	S	I	S	R	S	44	EM62	S	S	I	R	S
11	EM14	I	I	S	R	S	45	EM63	S	I	S	R	S
12	EM15	S	I	S	R	S	46	EM64	S	S	R	R	S
13	EM16	I	I	S	R	S	47	EM66	S	S	R	S	S
14	EM18	S	I	S	R	S	48	EM67	R	R	I	R	S
15	EM19	S	S	S	S	S	49	EM68	R	I	S	R	S
16	EM20	S	I	S	R	S	50	EM69	S	I	S	R	S
17	EM21	S	S	R	R	S	51	EM70	S	I	S	R	S
18	EM22	S	S	R	R	S	52	EM71	S	S	S	S	S
19	EM23	S	I	I	R	S	53	EM72	I	I	S	S	S
20	EM24	S	S	S	R	S	54	EM73	S	S	S	S	S
21	EM25	S	S	S	R	S	55	EM74	S	S	S	S	S
22	EM26	S	S	S	R	S	56	EM75	S	I	S	R	S
23	EM27	S	I	S	R	S	57	EM76	S	S	S	R	S
24	EM28	S	S	S	R	S	58	EM77	S	I	S	R	S
25	EM29	S	S	I	R	S	59	EM78	S	S	I	S	S
26	EM30	S	I	S	S	S	60	EM79	S	S	R	R	S
27	EM31	S	S	S	R	S	61	EM80	S	S	S	S	S
28	EM33	S	S	R	R	S	62	EM81	S	S	R	R	S
29	EM34	I	S	S	R	S	63	EM82	S	I	R	S	S
30	EM35	S	S	S	S	S	64	EM83	S	S	I	R	S
31	EM36	S	I	S	R	S	65	6538P	R	I	S	S	S
32	EM37	S	I	S	R	S	66	43300	R	S	R	R	S
33	EM39	S	S	S	S	S	67	12228	S	S	S	R	S
34	EM40	S	S	I	S	S							

Not: S: Duyarlı; I: Yarı Duyarlı; R: Dirençli; ERY: Erythromycin; CLI: Clindamycin; OX: Oxacillin; P: Penicillin; SXT: Trimethoprim- Sulfamethoxazole, (Tip türler; 6538P MSSA, 43300 MRSA, 12228 *S. epidermidis*)

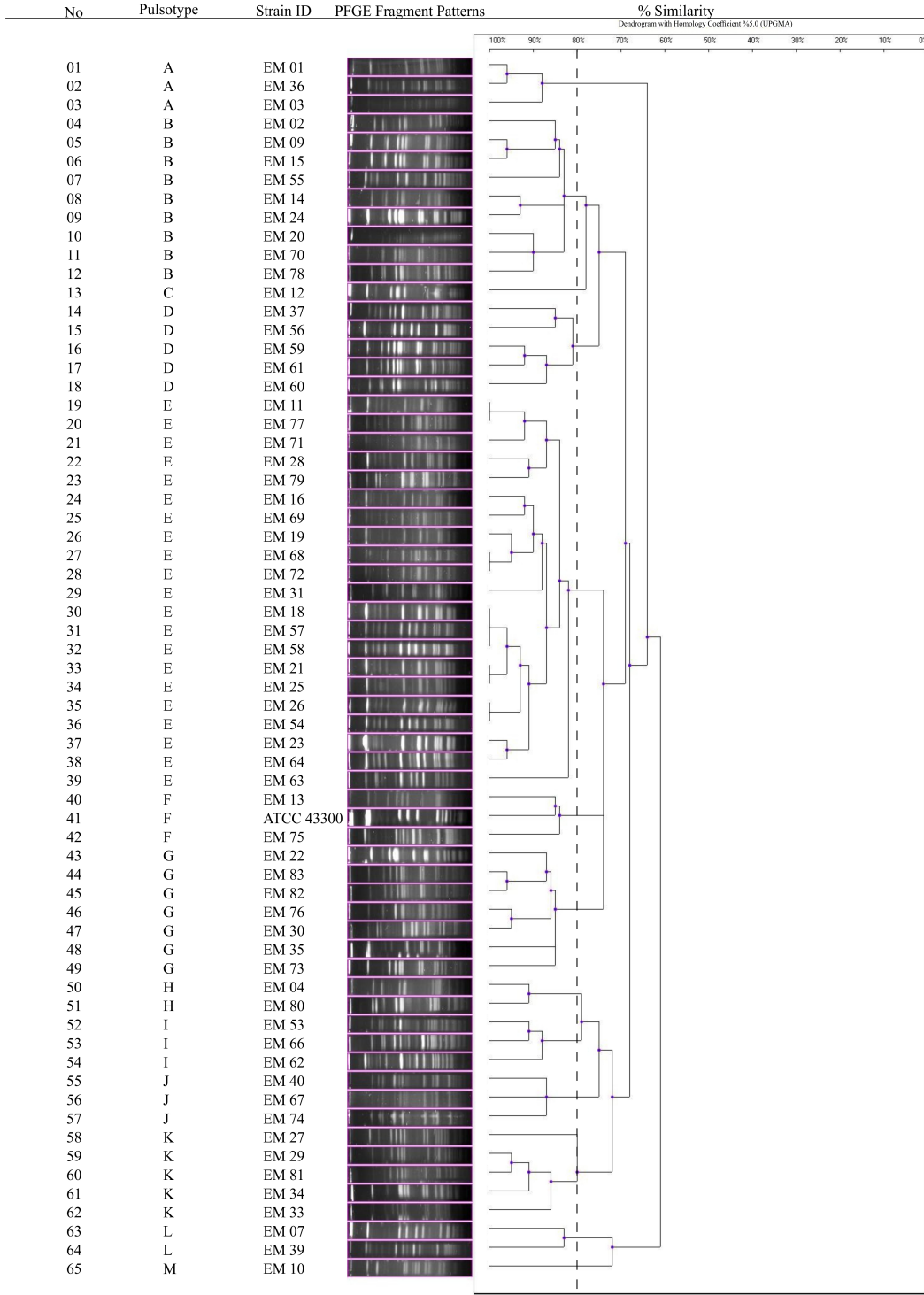
4.8. Moleküler Tiplendirme

4.8.1. PFGE

Yapılan pulsed-field jel elektroforezi analizinde *S. aureus* izolatlarının DNA' sı *Sma*I ile fragmentlere ayrılmış ve 11 ile 21 arasında değişen farklı sayılarda fragmentlere sahip profiller elde edilmiştir. Bantlar BIO-PROFIL Bio-1D++ programı ile karşılaştırılmıştır. PFGE sonuçlarında 64 *S. aureus* izolatı % 80 üzerinde benzerlik göstermelerine göre 13 farklı pulsotipe ayrılmıştır. EM18, EM57 ve EM58 kodlu izolatlar aynı bant profiline sahip olup E pulsotipine sahip izolatlar arasında bulunmuşlardır. Ayrıca C ve M kodlu pulsotipler birer izolat ile temsil edilmektedir. PFGE sonucu elde edilen jel görüntüsü programda özel olarak ölçeklendirilmiş ve birleştirilmiş olup Şekil 4.7' de gösterilmiştir. Ayrıca verilerin analizi sonucu elde edilen tip tür profili, pulsotip ve dendrogramların bulunduğu Şekil 4.8 aşağıda gösterilmiştir.



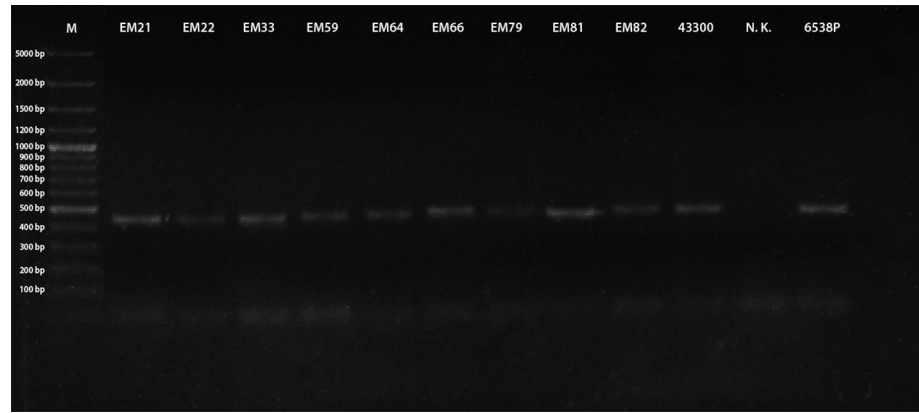
Şekil 4.7 Çalışmada uygulanan elektroforezlerin BIO-PROFIL 1D++ programı ile özel olarak ölçeklendirilmiş ve birleştirilmiş görüntüleri.



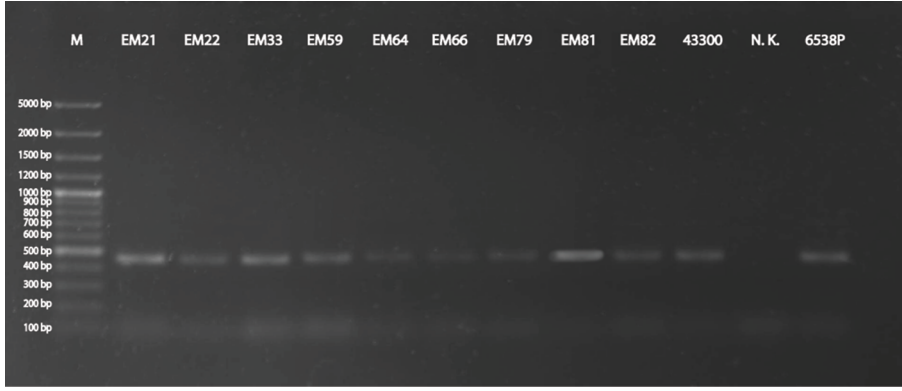
Şekil 4.8 PFGE sonucu elde edilen pulsotipler ve dendrogram.

4.8.2. MLST

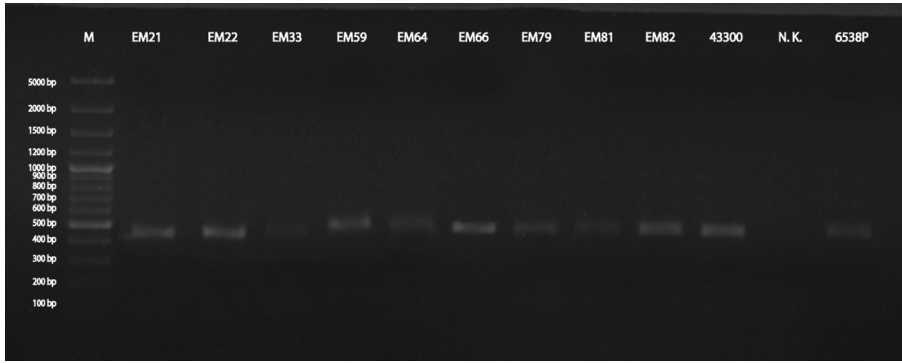
Bu çalışmada 9 toplumsal kaynaklı metisilin dirençli *S. aureus* (CA-MRSA) suşu 7 farklı sekans tipinde tanılanmıştır. Tanılama işleminde izole edilen DNA MLST analizinde kullanılan gen bölgelerinin primerleri ile çoğaltılmış ve jel elektroforezi ile bölgelerin varlığı pozitif kontrol olarak 2 (ATCC 6538P, Patojen *S. aureus*; ATCC 43300, MRSA) ve negatif kontrol olarak 1 (ATCC 12228, *Staphylococcus epidermidis*) suş ile kontrol edilmiştir. Bu kontrol işleminin jel görüntüleri Şekil 4.9 - Şekil 4.15 arasında verilmiştir.



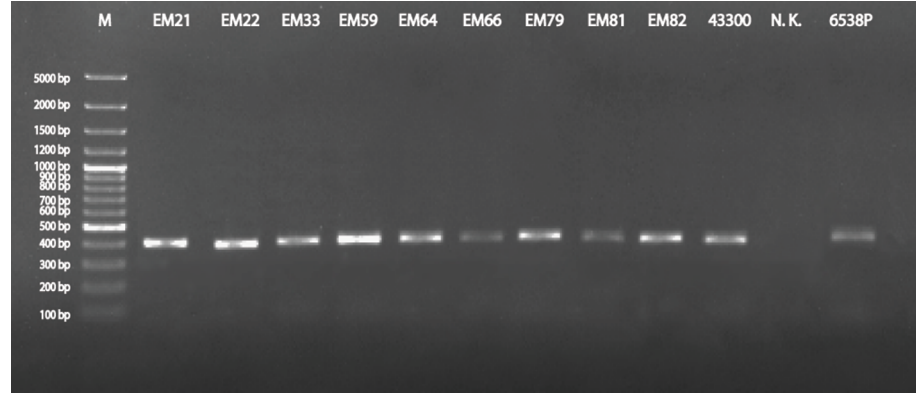
Şekil 4.9 9 MRSA suşu ve 3 kontrolün 456 bp boyutundaki *arcC* gen bölgesinin görüntüsü.



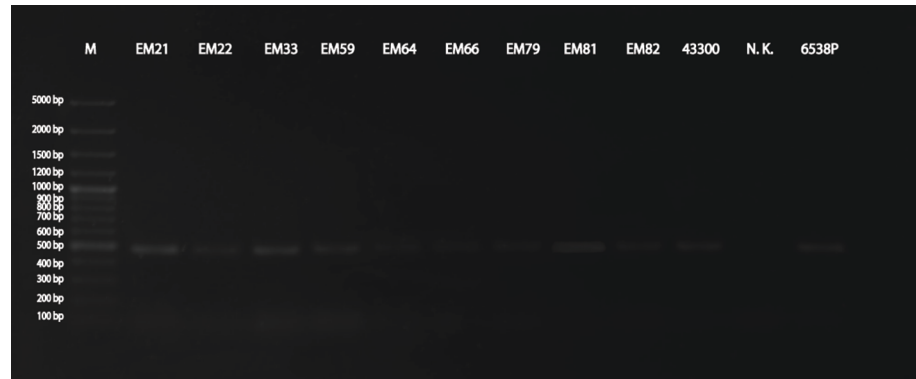
Şekil 4.10 9 MRSA suşu ve 3 kontrolün 456 bp boyutundaki *aroE* gen bölgesinin görüntüsü.



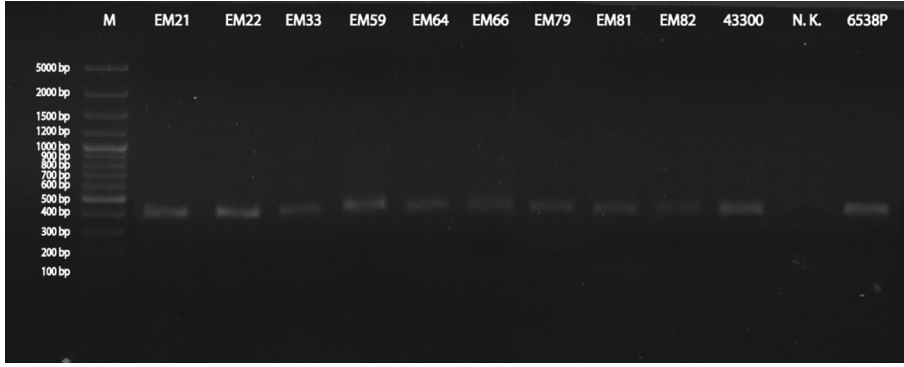
Şekil 4.11 9 MRSA suşu ve 3 kontrolün 465 bp boyutundaki *glpF* gen bölgesinin görüntüsü.



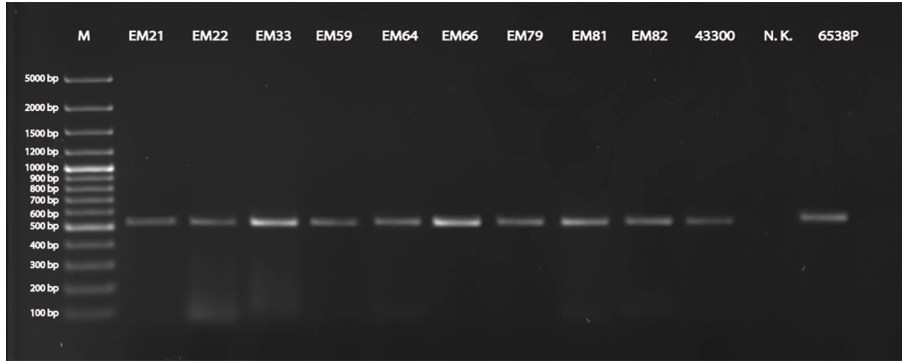
Şekil 4.12 9 MRSA suşu ve 3 kontrolün 429 bp boyutundaki *gmk* gen bölgesinin görüntüsü.



Şekil 4.13 9 MRSA suşu ve 3 kontrolün 474 bp boyutundaki *pta* gen bölgesinin görüntüsü.



Şekil 4.14 9 MRSA suşu ve 3 kontrolün 402 bp boyutundaki *tpi* gen bölgesinin görüntüsü.



Şekil 4.15 9 MRSA suşu ve 3 kontrolün 516 bp boyutundaki *yqiL* gen bölgesinin görüntüsü.

Tanımlanan bu sekans tiplerinden ST97 ve ST737 en sık karşılaşılan CA-MRSA sekans tipi olmuş ve tüm CA-MRSA suşlarının % 44,4' ünü kapsamaktadır. Multi lokus sekans tiplemesi sonucundan 9 izolat CC12, CC15, CC30, CC97, CC121 ve CC188 klonal kompleksleri arasında dağılım göstermiştir. Dağılımın detaylı analizi Çizelge 4.5 de verilmiştir. Ayrıca MLST sonucunda 9 izolatın birbirleri ile olan filogenetik ilişkisi Şekil 4.16 de gösterilmiştir.

MLST analizinde kullanılan 9 farklı izolata ait gen bölgeleri uygun etiketler ile GenBank nükleotid sekans veribankasına Çizelge 4.4'te verilen kabul numaraları ile kayıt edilmiştir.

Çizelge 4.4 MLST için elde edilen gen bölgesi dizilerinin veribankasına kayıtlı kabul numaraları.

No	İzolat Kodu	Gen	Boyutu (bp)	GenBank No
1	EM21	<i>arcC</i>	456	KM362444
2	EM21	<i>aroE</i>	456	KM362445
3	EM21	<i>glpF</i>	465	KM362446
4	EM21	<i>gmk</i>	429	KM362447
5	EM21	<i>pta</i>	474	KM362448
6	EM21	<i>tpi</i>	402	KM362449
7	EM21	<i>yqiL</i>	516	KM362450
8	EM22	<i>arcC</i>	456	KM362451
9	EM22	<i>aroE</i>	456	KM362452
10	EM22	<i>glpF</i>	465	KM362453
11	EM22	<i>gmk</i>	429	KM362454
12	EM22	<i>pta</i>	474	KM362455
13	EM22	<i>tpi</i>	402	KM362456
14	EM22	<i>yqiL</i>	516	KM362457
15	EM33	<i>arcC</i>	456	KM362458
16	EM33	<i>aroE</i>	456	KM362459
17	EM33	<i>glpF</i>	465	KM362460
18	EM33	<i>gmk</i>	429	KM362461
19	EM33	<i>pta</i>	474	KM362462
20	EM33	<i>tpi</i>	402	KM362463
21	EM33	<i>yqiL</i>	516	KM362464
22	EM59	<i>arcC</i>	456	KM362465
23	EM59	<i>aroE</i>	456	KM362466
24	EM59	<i>glpF</i>	465	KM362467
25	EM59	<i>gmk</i>	429	KM362468
26	EM59	<i>pta</i>	474	KM362469
27	EM59	<i>tpi</i>	402	KM362470
28	EM59	<i>yqiL</i>	516	KM362471
29	EM64	<i>arcC</i>	456	KM362472
30	EM64	<i>aroE</i>	456	KM362473

Çizelge 4.4. (Devam)

No	İzolat Kodu	Gen	Boyutu (bp)	GenBank No
31	EM64	<i>glpF</i>	465	KM362474
32	EM64	<i>gmk</i>	429	KM362475
33	EM64	<i>pta</i>	474	KM362476
34	EM64	<i>tpi</i>	402	KM362477
35	EM64	<i>yqiL</i>	516	KM362478
36	EM66	<i>arcC</i>	456	KM362479
37	EM66	<i>aroE</i>	456	KM362480
38	EM66	<i>glpF</i>	465	KM362481
39	EM66	<i>gmk</i>	429	KM362482
40	EM66	<i>pta</i>	474	KM362483
41	EM66	<i>tpi</i>	402	KM362484
42	EM66	<i>yqiL</i>	516	KM362485
43	EM79	<i>arcC</i>	456	KM362486
44	EM79	<i>aroE</i>	456	KM362487
45	EM79	<i>glpF</i>	465	KM362488
46	EM79	<i>gmk</i>	429	KM362489
47	EM79	<i>pta</i>	474	KM362490
48	EM79	<i>tpi</i>	402	KM362491
49	EM79	<i>yqiL</i>	516	KM362492
50	EM81	<i>arcC</i>	456	KM362493
51	EM81	<i>aroE</i>	456	KM362494
52	EM81	<i>glpF</i>	465	KM362495
53	EM81	<i>gmk</i>	429	KM362496
54	EM81	<i>pta</i>	474	KM362497
55	EM81	<i>tpi</i>	402	KM362498
56	EM81	<i>yqiL</i>	516	KM362499
57	EM82	<i>arcC</i>	456	KM362500
58	EM82	<i>aroE</i>	456	KM362501
59	EM82	<i>glpF</i>	465	KM362502
60	EM82	<i>gmk</i>	429	KM362503

Çizelge 4.4. (Devam)

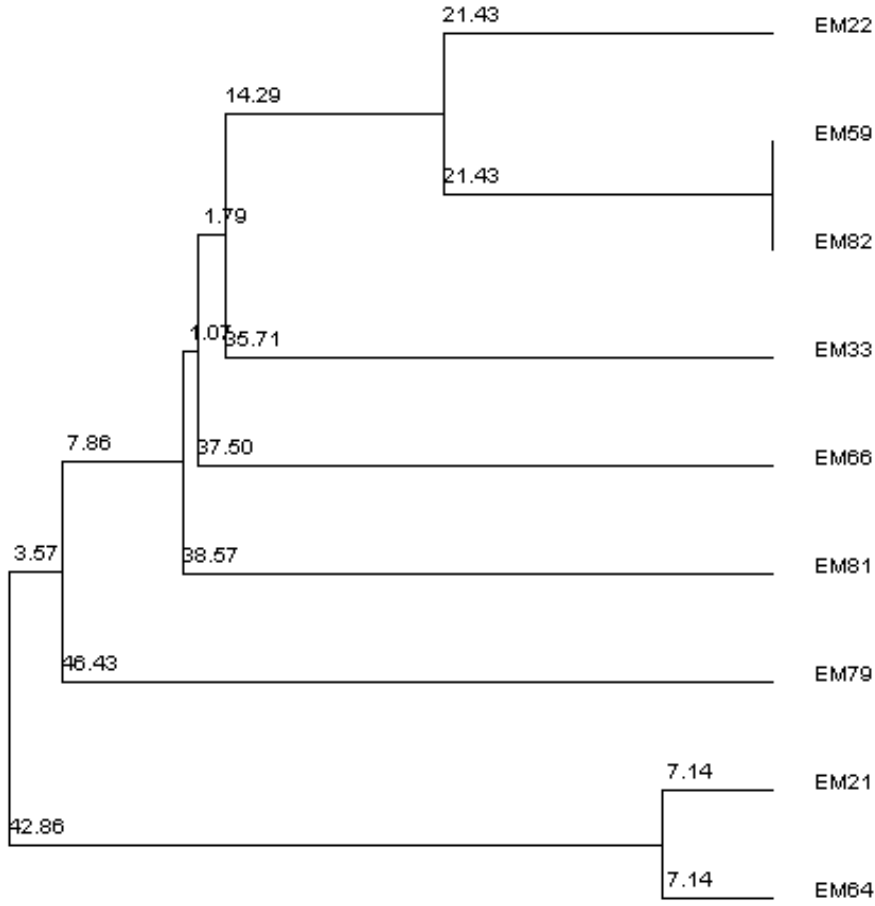
No	İzolat Kodu	Gen	Boyutu (bp)	GenBank No
61	EM82	<i>pta</i>	474	KM362504
62	EM82	<i>tpi</i>	402	KM362505
63	EM82	<i>yqiL</i>	516	KM362506

Çizelge 4.5 9 MRSA suşunun allelik profilleri ve MLST verileri

NO	İZOLAT KODU	ST	CC	Allelik Profil (allel no.)						
				<i>arcC</i>	<i>aroE</i>	<i>glpF</i>	<i>gmk</i>	<i>pta</i>	<i>tpi</i>	<i>yqiL</i>
1	EM21	ST737	CC30	7	6	149	70	8	8	6
2	EM22	ST188	CC188	3	1	1	8	1	1	1
3	EM33	ST6	Single	12	4	1	4	12	1	3
4	EM59	ST97	CC97	3	1	1	1	1	5	3
5	EM64	ST737	CC30	7	6	172	70	8	8	6
6	EM66	ST15	CC15	13	13	1	1	12	11	13
7	EM79	ST837	CC121	6	5	6	2	7	14	3
8	EM81	ST12	CC12	1	3	1	8	11	5	11
9	EM82	ST97	CC97	3	1	1	1	1	5	3

ST: Sekans Tipi

CC: Klonal Kompleks



Şekil 4.16 9 MRSA suşunun filogenetik ilişkisini gösteren dendrogram.

5. TARTIŞMA

S. aureus sağlıklı nazal mukozada, normal flora bakterisi ya da patojen olarak kolonize olabilen, abse, akciğer pnömonisi, sepsis, toksik şok sendromu ve gıda zehirlenmesi gibi rahatsızlıklara sebep olup, hastane ve toplumsal kökenli olarak yayılabilen ciddi bir patojendir (Indrawattana et al. 2013).

Dünya’ da *S. aureus* gıda zehirlenmelerine sebep olan önemli patojenlerin arasındadır. Gıda zehirlenmelerine sebep olan hazır gıdalar, paketlenmeden önce personeller tarafından işlem görmesinden dolayı, gıda çalışanlarının toplumdaki diğer kişileri enfekte edebilme riskide yükselmektedir. Geçmişte yapılan bazı çalışmalarda kişilerin burunlarında bulunabilen bazı özel *S. aureus* suşlarının gıdalarda taşıyıcılar ile aynı zamanda bulunması, milyonlarca insanın yediği yemeklerin üretimini yapan gıda çalışanlarını önemli bir kontaminasyon kaynağı yapmaktadır (Acco et al., 2003).

Gıda zehirlenmesine sebep enterotoksijenik *S. aureus* suşlarının antibiyotiklere direnç kazanmış olan suşların tedavisinde de zoluk çekilmektedir (Loeto et al., 2007). Son zamanlarda hayvansal gıdalar ile oldukça fazla ilişkilendirilen metisilin dirençli *S. aureus* suşlarının özellikle gıdalar, gıda ortamları ve çalışanlarındna izole edilmesindeki artış hastaneden bağımsız, toplumsal kaynaklı suşların yayılması konusunda dikkat çekici olmuştur (Paludi et al., 2011).

Hastane ve hasta ilişkisi bulunmayan bireylerden izole edilen toplumsal kaynaklı metisilin dirençli *S. aureus* suşlarının tanılanması ile geçtiğimiz 30 yılda *S. aureus* enfeksiyonunun epidemiyolojisinde ciddi değişiklikler olmuştur (Chuang and Huang, 2013).

Staphylococcus enfeksiyonlarındaki artış ve değişimler yayılım ve antibiyotiklere olan direncin kontrol altına alınabilmesi için, organizma iyi bir şekilde takip edilmeli ve populasyon genetiği üzerine daha çok çalışmanın yapılması gerekmektedir (Schinasi et al., 2014).

Bir kısmında *S. aureus* enfeksiyonunun ve antibiyotik dirençliliğinin analiz edildiği bu çalışmada 1358 gıda fabrikası çalışanından izole edilen 64 *S. aureus* izolatının verdiği oran % 4,71 olarak hesaplanmış olup bu sonucun diğer ülkelerde yapılmış olan gıda çalışanlardaki nazal taşıyıcılık ve enfeksiyon oranlarına (Lamers et al., 2011) göre çok düşük olduğu ortaya çıkmıştır. Ülkemizde farklı bölgelerde yapılan benzer çalışmalar irdelendiğinde enfeksiyon ve taşıyıcılık oranının bölgelere göre farklılık gösterdiği görülmektedir. Örneğin; Şimşek ve arkadaşlarının (2009) Şanlıurfa’ da gıda çalışanları ile yapmış oldukları bir çalışmada *S. aureus* taşıyıcılığı oranı % 23,1 olarak saptanmıştır. Bu çalışmada MRSA taşıyıcılığı ile ilgili veri bildirilmemiştir. Pala ve arkadaşları (2010) tarafından yapılan bir çalışmada, Bursa ili Nilüfer ilçesinde gıda fabrikalarında çalışan kişilerin burunlarından izole ettikleri *S. aureus* oranı % 15,2 olarak verilmiştir. İzole edilen *S. aureus* suşları arasındaki metisilin antibiyotiğine direnç oranına bakıldığında Pala ve arkadaşları 169 izolat içerisinde 29 MRSA ile % 17,15 lik bir oran bulmuşlardır. Yapılan bu çalışmaya bakıldığında ise izole edilen 64 *S. aureus* izolatı arasında bulunan 9 MRSA suşu %14,06’ lık bir oran ortaya çıkmaktadır. Türkiye’ de yapılmış olan bu sınırlı çalışmalardan sonra diğer ülkelerde yapılan çalışmalar arasında farklar ortaya çıktığı görülmüştür.

Acco ve arkadaşlarının (2003) gıda çalışanlarından aldıkları nazal sürüntülerin tanılanması sonucunda *S. aureus* enfeksiyonu oranı yaklaşık % 30 bulunmuştur. Ancak 47 kişiden aldıkları bu sürüntülerde MRSA suşlarına rastlanmamıştır. Loeto ve arkadaşları (2007) Botswana’ da yaptıkları çalışmada da nazal sürüntülerde *S. aureus* taşıyıcılığı oranını % 44,6 MRSA oranını da % 53 olarak bildirmişlerdir. 2011 yılında yapılan geniş çaplı bir çalışmada (Paludi et al., 2011) gıda ve gıda çalışanlarından alınan 1007 örnekten 165 *S. aureus* izole edilmiş ve MRSA suş sayısı 8 olarak verilmiştir. 2012 yılında Arjantin’ de gıda çalışanlarında ise *S. aureus* taşıyıcılığı % 37,5 MRSA suşu sayısı ise 2 örnek ile sınırlı kalmıştır (Jorda et al., 2012). Aynı yılda Etiyopya’ da gıda çalışanlarında ise *S. aureus* taşıyıcılığı % 20,5 MRSA oranı ise % 9,75 bulunmuştur (Dagnew et al., 2012). Son olarak Ho ve arkadaşları (2014) yaptıkları çalışmada *S. aureus* enfeksiyonu oranını % 22,8 MRSA oranını da % 5,05 olarak bildirmişlerdir.

Bu verilen sonuçlar ile kıyaslandığında, gerçekleştirilen çalışmada elde edilen sonuçlarda *S. aureus* taşıyıcılığı oranında ciddi bir düşüş MRSA oranının ise ortalamanın üzerinde bir durumda olduğu görülmüştür.

Çalışmada elde edilen verilerin daha sağlıklı analizi için örnek toplama sırasında çalışanlara yöneltilen sorulara bakıldığında sadece 4 kişinin hastanede tedavi olduğu, 14 kişinin muayenesiz doktor veya eczacı gibi konun uzmanı ancak o hastanın tedavisinde yetkili olmayan kişilerin tavsiyesi ile antibiyotik kullandığı, 20 kişininde kendi düşünceleri ve çevreden duydukları ile alabildikleri antibiyotikleri kullandıkları görülmüştür. Yapılan görüşmeler sonucunda ücretsiz izin ile cezalandırılan daha önce taşıyıcı olduğu tespit edilmiş, duydukları yanlış bilgiler ile burunlarında kaşıntı, yara, boğazlarında batma ve acı hisseden taşıyıcı olma riski olduklarını düşünen kişilerin zorunlu muayene periyodunu takip ederek öncesinde bilinçsiz antibiyotik aldıkları ve muayeneden sağlıklı olarak geçtikleri saptanmıştır. Yapılan bu periyodik kontroller T.C. Sağlık Bakanlığı' nın 1593 numaralı "Umumi Hıfzıssıhha Kanunu" 126. Maddesi gereğince gıda ile uğraşanlar için yılda bir periyodik muayene yapılması zorunlu olarak belirtilmiş (T.C. Sağlık Bakanlığı, 1930) , ancak 11/10/2011 tarihinde yayınlanan kanun hükmünde kararname ile bu periyodik muayenelerin zorunluluğu işverenin hijyen eğitim verdirmesi zorunluluğu ile değiştirilmiştir. Bu değişiklik ile birlikte taşıyıcılık, enfeksiyon ve bulaşma riski tüm hastalıklar gibi *S. aureus* için de artmıştır.

Staphylococcal enfeksiyonların kontrolü için yapılan moleküler düzeyde tanılama çalışmaları son yıllarda oldukça hız kazanmıştır. Antibiyotik direncinin giderek artması ve yeni virülens faktörler organizmanın iyi bir şekilde tanımanın önemini bir kez daha vurgulamaktadır. Özellikle *S. aureus*' un moleküler evrimi için tiplendirme önemli bir yere sahiptir. Pulsed-field jel elektroforezi (PFGE) *S. aureus* epidemiyolojisinin lokal veya kısa zamanlı çalışmalarında en sık kullanılan yöntemdir. Bu yöntemin özellikle hastane kaynaklı salgınların incelenmesinde paha biçilmez imkanlar sağlamasına rağmen, genellikle küçük çalışmalara uygulanabilmesi ve laboratuvarlar arası güvenilirliği ve tekrarlanabilirliğinin sınırlı olması bu yöntemin dezavantajıdır. Teknolojinin ilerlemesi ile geliştirilen analiz programları ve elektroforez şartlarının

standardizasyonunun sağlanabilmesi ile uluslararası laboratuvar sonuçlarının karşılaştırılması mümkün hale gelmiştir (Cookson et al., 2007). Ancak, yöntemle ilgili pulstip veritabanı çok sınırlı olup sadece Amerika Birleşik Devletleri' ndeki sonuçları barındırmaktadır (CDC, 2014). Multi lokus sekans tiplendirmesi (MLST) bakteri tiplendirmesinde sık olarak kullanılan diğer bir yöntemdir. Birçok çalışmada, *S. aureus*' un evrimsel ve epidemiyolojik çeşitliliği bu yöntem ile analiz edilmiştir. PFGE yöntemine göre MLST yönteminin temel avantajı DNA sekans analizine dayanmasından dolayı her bir izolata karşılık gelen klinik bilgiler ile zenginleştirilmiş sekans verileri internet bağlı veri bankaları ile kolayca karşılaştırılabilmesidir (Cookson et al., 2007).

Referans olarak gösterilen çalışmaların çoğunda altın standart olarak gösterilen iki yöntem olan PFGE ve MLST bu çalışmada birlikte uygulanmış ve elde edilen sistematik ilişkiler antibiyotik direnci ile birlikte yorumlanmıştır. Özellikle MRSA suşlarında uygulanmış olan MLST yöntemi ile PFGE nin dezavantajları ortadan kaldırılmış ve sınırlı coğrafyadan ve spesifik bireylerden elde edilen sistematik veriler uluslararası veritabanları ile karşılaştırılmıştır. Jel tabanlı tiplendirme metodu olan PFGE' de birbirleri ile kıyaslanan 64 *S. aureus* izolatu 13 farklı pulstip ile kendi aralarında oldukça yüksek bir çeşitliliğe sahip oldukları görülmüştür. Ayrıca % 100 identik olan suşların izole edildiği bireylere bakıldığında; EM11 ve EM77 nin, EM68 ve EM72 nin, EM 57 ve EM58 in, EM21 ve EM25 in aynı fabrika, EM68 ve EM72 nin farklı fabrika ancak aynı mahalle de oturuyor oluşları çalışanların birbirlerine de enfeksiyon bulaştırabildiklerini göstermektedir. Dünyada yapılan benzer çalışmalara bakıldığında da PFGE nin kısıtlı ancak tiplendirmede tatmin edici sonuçlar verdiği bildirilmiştir (Wei and Chiou, 2002; Borques et al., 2010).

9 MRSA izolatu ile çalışılan MLST işlemi sonucunda elde edilen sonuçlar hem PFGE hemde sekans tabanlı olmasından dolayı veritabanları ile birlikte değerlendirilmiştir. Bulgularda belirtilen klonal komplekslerden CC15 insanlarda görülen ve enfeksiyona sebep olan *S. aureus* suşlarının en çok dahil olarak görüldükleri klonal kompleks olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Aklilu et al., 2013). 9 MRSA suşundan ikisinin dahil olduğu CC30 klonal kompleksinin de ortadoğudan orjinlenerek yayıldığı bilinmektedir (Chuang and

Huang, 2013). Bir diğer iki suşun dahil olduğu CC97 klonal kompleksine ise uzak doğudan batı avrupaya kadar oldukça geniş bir alanda rastlanabildiği görülmektedir. Bunların dışında, klonal komplekslere dahil edilemeyen sekans tiplerine baktığımızda çalışmamızda saptanan ST837 sekans tipi veri tabanında sadece Fransa’ da izole edilmiştir. ST12 İngiltere, Hollanda, İsviçre, Japonya ve Brezilya, bir başka sekans tip olan ST6 ise Asya ülkeleri, İngiltere, Avustralya ve Gambiya olmak üzere 4 farklı coğrafyadan izole edilmiştir (Imperial Collage London, 2014).

Bir başka derlemeye göre de, yapılan çalışmalarda dünyadaki majör MRSA suşları, CC5, CC8, CC22, CC30 ve CC45 klonal kompleksleri ile ilişkili bulunmuştur. Güney Avrupa, ABD ve Güney Amerika’dan olmak üzere 3000 izolatın analizi sonucunda, izolatların yaklaşık % 70’i Iberian (CC8 [ST247-MRSA-IA]), Brezilya (CC8 [ST 239-MRSA-III]), Macaristan (CC8 [ST239-MRSA-III]), New York-Japonya (CC5 [ST5-MRSA-II]) ve pediatrik (CC5 [ST5-MRSA-IV]) klonal kompleksleri olmak üzere 5 majör pandemik komplekse ait olduğu görülmüştür. Tüm dünyada en sık saptananlar ise CC5 ve CC8’dir. Bu klonal kompleksler birçok ST içerirler. Dünyanın farklı bölgelerinde ve farklı ülkelerde birbirinden farklı ST’ler görülmektedir. CC30-ST36 ABD’de ve İngiltere’de yaygın olarak saptanmaktadır. CC45 ise ABD ve Avrupa ülkelerinde, CC8, CC5 ve CC22 Asya’da en sık görülen MRSA’lardır. Latin Amerika’da CC5 (ST5), CC8 (ST239) ve CC30 MRSA klonları bulunmaktadır. Türkiye’den yapılan çalışmalarda ise ülkemizde ST239 klonunun hakim olduğu gösterilmiş olsa da zaman içinde ülkelerde ve hastanelerde görülen kompleksler değişmiştir. Örneğin Macaristan’da görülen ST239-MRSA-III yerini ST5-MRSA-II ve ST228 MRSA-I almıştır. Yine Japonya’da 1990’lı yılların başında görülen ST5-MRSA-II klonu yerine ST-30-MRSA-IV klonu görülmeye başlanmıştır (Sancak, 2012).

Toplumsal kaynaklı MRSA lar hastane kökenli MRSA’lardan farklılık gösterir. Örneğin ABD’de yapılan çalışmalarda, toplumsal kaynaklı MRSA enfeksiyonlarının genellikle USA300 (ST8-IV, PVL(+)) ve USA400 (ST1-IV, PVL(+)) olmak üzere 2 pulsotip ile meydana geldiği, hastane kaynaklı MRSA enfeksiyonlarının ise başlıca USA100 (ST5-II) ve USA200 (ST36-IV) pulsotipleriyle oluştuğu saptanmıştır. Dolayısıyla toplumsal kaynaklı

MRSA'ların hastane kaynaklı MRSA'lardan bağımsız olarak toplumsal kaynaklı MSSA'lardan geliştiği düşünülmektedir. Genetik farklılıkların yanı sıra toplumsal kaynaklı MRSA'lar, hastane kaynaklı MRSA'lardan oluşturdukları enfeksiyonlar açısından da farklılık gösterir. Toplumsal kaynaklı MRSA'lar genellikle cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları (apse, follikülit vb) ile pnömoniye yol açarken, hastane kaynaklı MRSA'lar solunum yolu enfeksiyonları, kan akımı enfeksiyonları ve cerrahi yara enfeksiyonları gibi klinik tablolara yol açarlar (Sancak, 2012).

MLST veribankasında görüldüğü gibi Türkiye' de MLST çalışması sonucu elde edilen ve veri bankasına yüklenen 8 suş ve 4 sekans tipi bulunmaktadır. Bunlardan üçü gıda kaynaklı, dördü hastane ve biri de evcil hayvan kaynaklı olup aralarında gıda çalışanlarına yada hastane dışı bir insan topluluğuna ait suş bulunmamaktadır (Sudagidan ve Aydın, 2010). Ayrıca kayıt tarihlerine bakıldığında en son kaydın 2010 yılında olduğu görülmektedir. Çalışmada değerlendirilen verilere bakıldığında ise veribankasına Türkiye' den farklı bir kaynaktan ST6, ST12, ST15, ST188, ST737 ve ST837 olmak üzere 6 farklı sekans tipe rastlandığı görülmüştür

Ayrıca PFGE de olduğu gibi MLST analizinde de % 100 identik çıkan suşların aynı fabrika çalışanı olduğu görülmüş ve yine enfeksiyonları bireylerin birbirlerine bulaştırdıkları görülmüştür.

Gün geçtikçe antibiyotiklere karşı olan dirençlerin güçlenmesinden dolayı aşı çalışmalarının önemi daha da artmıştır. Hastanelerde karşılaşılan suşlar ile ilgili tiplendirme bilgileri literatüre oldukça hızlı girilmesine rağmen hem yapılan çalışma sayısının az olması hem de yayılmasının daha kolay olmasından dolayı toplumsal kaynaklı suşlar ile çalışmanın literatüre daha büyük katkı sağlayacağı düşünülmüştür. Aşı çalışmalarının temelinde organizmayı iyi tanımak olmasından dolayı küçük bir coğrafyada toplumsal kaynaklı suşlarda, global tiplendirme odaklı yapılan bu çalışma gelecekte Türkiye' de yapılabilecek olan filogenetik gruptandırma ve aşı geliştirme çalışmalarına yardımcı olabileceği, herkesin sağlığını tehdit edebilecek bu konumdaki bir taşıyıcıdan kaynaklanabilecek enfeksiyon riskine dikkat çekeceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada, *S. aureus* suşlarının antibiyotik dirençliliği ve MRSA suşlarının iki farklı yöntemle tiplendirilmesi gerçekleştirilmiştir. MLST yöntemi ile 7 farklı sekans tip (ST) saptanmıştır, ülkemizde bu konu ile ilgili çalışmalar çok sınırlı olması sebebi ile bu 7 sekans tipinden 6 tanesi Türkiye’ de daha önceden saptanmamış sekans tipleridir. Dolayısıyla bu çalışma hem bu konu ile ilgili gelecekte yapılacak olan filogenetik çalışmalara öncülük edecek hem de devam edecek aşı çalışmalarına yardımcı olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Acco, M., Ferreira, F.S., Henriques, J.A.P. and Tondo, E.C., 2003,** Identification of multiple strains of *Staphylococcus aureus* colonizing nasal mucosa of food handlers, *Food Microbiology*, 20, 489 – 493pp.
- Adesida, S.A., Abioye, O.A., Bamiro, B.S., Brai, B.I.C., Smith, S.I., Amisu, K.O., Ehichioya, D.U., Ogunsola, F.T. and Coker, A.O., 2007,** Associated risk factors and pulsed field gel electrophoresis of nasal isolates of *Staphylococcus aureus* from medical students in Tertiary hospital in Lagos, Nigeria, *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 11(1), 63 – 69pp.
- Alibayov, B., Baba-Moussa, L., Sina, H., Zdenkova, K., Demnerova, K., 2014,** *Staphylococcus aureus* mobile genetic elements, *Molecular Biology Reports*, 41, 5005 – 5018pp.
- Alp, E., Klassen, C.H.W., Doganay, M., Altoparlak, U., Aydın, K., Engin, A., Kuzucu, C., Ozakin, C., Ozinel, M.A., Turhan, O. and Voss, A., 2009,** MRSA genotypes in Turkey: Persistence over 10 years of a single clone of ST239 *Journal of Infection* (2009) 58, 433e438.
- Archer, N.K., Mazaitis, M.J., Costerton, J.W., Leid, J.G., Powers, M.E. and Shirtliff, M.E., 2011,** *Staphylococcus aureus* biofilms properties, regulation and roles in human disease, *Virulence*, 2(5), 445 - 459pp.
- Ausubel, F.M., Brent, R. and Kingston, R.E., 1997,** Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, 3rd edition, New York.
- Aydin, A., Sudagidan, M. and Muratoğlu, K., 2011,** Prevalence of staphylococcal enterotoxins, toxin genes and genetic-relatedness of foodborne *Staphylococcus aureus* strains isolated in the Marmara Region of Turkey, *International Journal of Food Microbiology*, 148, 99 – 106pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bardiau, M., Yamazaki, K., Duprez, J.-N., Taminiau, B., Mainil, J.G. and Ote, I.**, 2013, Genotypic and phenotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from milk of bovine mastitis, *Letters in Applied Microbiology*, 57, 181 – 186pp.
- Bastos, M. do C. de F., Coutinho, B.G. and Coelho, M.L.V.**, 2010, Lysostaphin: A staphylococcal bacteriolysin with potential clinical applications, *Pharmaceuticals*, 3, 1139 – 1161pp.
- BD Diagnostics**, http://www.bd.com/ds/images/products/img_staph_400px.jpg (Erişim tarihi: 4 Kasım 2014)
- Bera, A., Herbert, S., Jakob, A., Vollmer, W. and Götz, F.**, 2005, Why are pathogenic staphylococci so lysozyme resistant? The peptidoglycan O-acetyltransferase OatA is the major determinant for lysozyme resistance of *Staphylococcus aureus*., *Molecular Microbiology*, 55(3), 778 – 787pp.
- Berube, B.J. and Wardenburg, J.B.**, 2013, *Staphylococcus aureus* α -toxin: nearly a century of intrigue, *Toxins*, 5, 1140 – 1166pp.
- Bilgehan H.**, 2004, Klinik Mikrobiyolojik Tanı, Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları, 35 - 45 ss.
- Biomerieux Industry**, http://www.biomerieux-industry.com/sites/industry/files/styles/original/public/id_32_staph_pos_0.jpg (Erişim tarihi: 4 Kasım 2014)
- Birren, B. and Lai, E.**, 1993, Pulsed Field Gel Electrophoresis: A Practical Guide, Academic Press, Inc., San Diego, 149p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Borges, L.J., Campos, M.R.H., Cardoso, J.L., Andr'e, M.C.D.P.B. and Serafini, A.B., 2010, Molecular epidemiology of microorganisms isolated from food workers and enteral feeding of public hospitals, *Journal of Food Science*, 75(7), 449 – 454pp.

Bozkurt, H., Bayram, Y., Güdücüođlu, H., ve Berktař, M., 2007, Y.Y.. Tıp fakültesi araştırma hastanesi personelinde nazal *Staphylococcus aureus* taşıyıcılığı ile metisiline direnç oranları araştırılması, *Van Tıp Dergisi*, 14(2): 52 – 56pp.

Broad Institute,
http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/staphylococcus_aureus_group/GenomeStats.html, (Erişim tarihi: 14 Ekim 2014)

Bukowski, M., Wladyka, B. and Dubin, G., 2010, Exfoliative Toxins of *Staphylococcus aureus*, *Toxins*, 2, 1148 – 1165pp.

Burmeister, M. and Ulanovsky, L., Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Protocols, Methods and Theories, 1 – 451, *Methods in Molecular Biology*, Walker, J..M., (Ed.), Humana Press, Totowa, 473 p.

Bush, K., 1988, β -Lactamase inhibitors from laboratory to clinic, *Clinical Microbiology Reviews*, 1(1), 109 – 123pp.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC),
<http://www.cdc.gov/pulsenet/> (Erişim tarihi :19 Aralık 2014).

Chambers, H.F., 1988, Methicillin-Resistant *Staphylococci*, *Clinical Microbiology Reviews*, 1(2), 173 -186pp.

Chambers, H.F. and DeLeo, F.R., 2009, Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era, *Nature Reviews Microbiology*, 7, 629 – 641pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chambers, H.F.**, 2001, The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*?, *Emerging Infectious Diseases*, 7(2), 178 -182pp.
- Christie, G.E. and Dokland, T.**, 2012, Pirates of the caudovirales, *Virology*, 434, 210 – 221pp.
- Christie, G.E., Matthews, A.M., King, D.G., Lane, K.D., Olivarez, N.P., Tallent, S.M., Gill, S.R., Novick, R.P.**, 2010, The complete genomes of *Staphylococcus aureus* bacteriophages 80 and 80α- Implications for the specificity of SaPI mobilization, *Virology*, 407, 381 – 390pp.
- Chuang, Y.Y. and Huang, Y.C.**, 2013, Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Asia, *The Lancet Infectious Diseases*, 13, 698 – 708pp.
- CLSI**, 2012, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-second informational supplement, CLSI document M100-S22, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 188p.
- Cookson, B.D., Robinson, D.A., Monk, A.B., Stephen Murchan, S., Ariane Deplano, A., Ryck, R., Struelens, M.J., Scheel, C., Fussing, V., Salmenlinna, S., Varkila, J.V., Cuny, C., Witte, W., Tassios, P.T., Legakis, N.J., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Vindel, A., Garaizar, J., Haeggman, S., Liljequist, B.O., Ransjö, U., Premru, M.M., Hryniewicz, W., Rossney, A., O’Connell, B., Short, B.D., Thomas, J., O’Hanlon, S. and Enright, M.C.**, 2007, Evaluation of molecular typing methods in characterizing a European collection of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains: the HARMONY collection, *Journal of Clinical Microbiology*, 45(6), 1830 – 1837pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Dagneu, M., Tiruneh, M., Moges, F. and Tekeste, Z.,** 2012, Survey of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and intestinal parasites among food handlers working at Gondar University, Northwest Ethiopia, *BMC Public Health*, 12, 837p.
- Daum, R.S. and Spellberg, B.,** 2011, Progress toward a *Staphylococcus aureus* vaccine, *Vaccines*, 54, 560 – 567pp.
- DeLeo, F.R., Otto, M., Kreiswirth, B.N. and Chambers, H.F.,** 2010, Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Lancet*, 375, 1557 – 1568pp.
- Deresinski, S.,** 2009, Bacteriophage therapy: exploiting smaller fleas., *Clinical Infectious Diseases*, 48, 1096 – 1101pp.
- Deurenberg, R.H. and Stobberingh E.E.,** 2008, The evolution of *Staphylococcus aureus*, *Infection, Genetics and Evolution*, 8, 747 – 763pp.
- Deurenberg, R.H., Vink, C., Kalenic, S., Friedrich, A.W., Bruggeman, C.A. and Stobberingh, E.E.,** 2007, The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Clinical Microbiology and Infection*, 13, 222 – 235pp.
- Dinges, M.M., Orwin, P.M. and Schlievert, P.M.,** 2000, Exotoxins of *Staphylococcus aureus*, *Clinical Microbiology Reviews*, 13(1), 16 – 34pp.
- E. Aklilu, E., Zunita, Z., Hassan, L. and Cheng, C.H.,** 2013, Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among veterinary students and personnel at a veterinary hospital in Malaysia, *Veterinary Microbiology*, 164, 352 – 358pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Eidhin, D., Perkins, S., Francois, P., Vaudaux, P., Höök, M. and Foster, T.J.**, 1998, Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of *Staphylococcus aureus*, *Molecular Microbiology*, 30(2), 245 – 257pp.
- Ellner, P.D., Stoessel, C.J., Drakeford, E. and Vasi, F.**, 1966, A new culture medium for medical bacteriology, *American Journal of Clinical Pathology*, 45(4), 502 – 504pp.
- Enright, M.C., Day, N.P.J., Davies, C.E., Peacock, S.J. and Spratt, B.G.**, 2000, Multilocus sequence typing for characterization of methicillin - resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*, *Journal of Clinical Microbiology*, 38(3), 1008 – 1015pp.
- Erdem, Z.**, 2011, Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarının moleküler tiplendirmesi, Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 137s.
- Erdoğan, H. ve Arslan, H.**, 2011, Otel personelinin burun ve boğaz kültüründe *Staphylococcus aureus* taşıyıcılığının araştırılması ve risk faktörlerinin irdelenmesi, *Klinik Dergisi*, 24(2), 90 – 93pp.
- Ergon, M.C., Biçmen, M. ve Gülay, Z.**, 2010, Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi' ndeki dominant metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşunun moleküler yöntemlerle tiplendirilmesi, *ANKEM Dergi*, 24(2), 65 – 70pp.
- Erol, İ. ve İşeri, Ö.**, 2004, Stafilokokal enterotoksinler, *Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 51, 239 – 245s.
- Fan, J., Shu, M., Zhang, Ge., Zhou, W., Yongmei, J., Zhu, Yu., Chen, G., Peacock, S.J., Wan, C., Pan, W. and Feil, E.J.**, 2009, Biogeography and virulence of *Staphylococcus aureus*, *PLoS ONE*, 4(7), e6216.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Fattom, A.I., Horwith, G., Fuller, S., Propst, M., Naso, R.,** 2004, Development of StaphVAX™, a polysaccharide conjugate vaccine against *S. aureus* infection: from the lab bench to phase III clinical trials, *Vaccine*, 22: 880 – 887pp.
- Feil, E.J. and Enright, M.C.,** 2004, Analyses of clonality and the evolution of bacterial pathogens, *Current Opinion in Microbiology*, 7, 308 – 313pp.
- Foster .T.,** 2009, Colonization and infection of the human host by staphylococci: adhesion, survival and immune evasion, *Veterinary Dermatology*, 20, 456 - 470pp.
- Foster, T.J. and Höök, M.,** 1998, Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*, *Trends in Microbiology*, 6(12), 484 - 488pp.
- Friedrich, R., Panizzi, P., Fuentes-Prior, P., Richter, K., Verhamme, V., Anderson, P.J., Kawabata, S.I., Huber, R., Bode, W. and Bock, P.E.,** 2003, Staphylocoagulase is a prototype for the mechanism of cofactor-induced zymogen activation, *Nature*, 425, 535 -539pp.
- Gemmell, C.G.,** 1995, Staphylococcal scalded skin syndrome, *Journal of Medical Microbiology*, 43, 318 – 327pp.
- Goldstein, R., Cheng, J., Stec, B. and Roberts M.F.,** 2012, Structure of the *S. aureus* PI specific phospholipase C reveals modulation of active site access by a titratable [I]-cation latched loop, *Biochemistry*, 51(12), 2579 – 2587pp.
- Götz, F., Bannerman, T., Schleifer K.H.,** 2006, The Genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*, Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E. (Eds.), Springer-Verlag, New York, 5 -75pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Grumann, D., Nübel, U., Bröker, B.M.**, 2014, *Staphylococcus aureus* toxins – Their functions and genetics, *Infection, Genetics and Evolution*, 21, 583 – 592pp.
- Harmsen, D., Claus, H., Witte, W., Rothgänger, J., Claus, H., Turnwald, D. and Vogel, U.**, 2003, Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and databasemanagement. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(12): 5442 – 5448pp.
- Haznedaroğlu, T.**, “Metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) (Korunma ve kontrol)”, http://www.gata.edu.tr/infek_komitesi/dosya/MRSA.pdf (Erişim tarihi: 3 Mart 2015)
- Hensel, M. and Schmidt, H.**, 2008, Horizontal Gene Transfer in the Evolution of Pathogenesis, Cambridge University Press, Cambridge, 317p.
- Hiramatsu K., Cui L., Kurado M. and Ito T.**, 2001, The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Trends in Microbiology*, 9, 486 - 493pp.
- Hiramatsu, K., Ito, T., Tsubakishita, S., Sasaki, T., Takeuchi, F., Morimoto, Y., Katayama, Y., Matsuo, M., Kuwahara-Arai, K., Hishinuma, T. and Baba, T.**, 2013, Genomic basis for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*., *Infection & Chemotherapy*, 45(2), 117 – 136pp.
- Ho, J., O'Donoghue, M.M. and Boost, M.V.**, 2014, Occupational exposure to raw meat: A newly-recognized risk factor for *Staphylococcus aureus* nasal colonization amongst food handlers, *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 217, 347 – 353pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hu, C., Xiong, N., Zhang, Y., Rayner, S. and Chen, S.,** 2012, Functional characterization of lipase in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 419, 617 -620pp.
- Imperial Collage London,** “<http://saureus.beta.mlst.net>” (Erişim tarihi: 23 Kasım 2014)
- Indrawattana, N., Sungkhachat, O., Sookrung, N., Chongsa-nguan, M., Tungtrongchitr, A., Voravuthikunchai, S.P., Kong-ngoen, T., H. Kurazono, H. and Chaicumpa, W.,** 2013, *Staphylococcus aureus* clinical isolates: antibiotic susceptibility, molecular characteristics, and ability to form biofilm., *BioMed Research International*, 11p.
- International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements,** 2009, Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): Guidelines for Reporting Novel SCCmec Elements, *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 53, 4961 - 4967pp.
- Izaki, K., Matsubishi, M. and Strominger, J.L.,** 1968, Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls., *The Journal of Biological Chemistry*, 243 (11), 3180 – 3192pp.
- Jordá, G.B., Marucci, R.S., Guida, A.M., Pires, P.S. and Manfredi, E.A.,** 2012, Carriage and characterization of *Staphylococcus aureus* in food handlers, *Revista Argentina de Microbiología*, 44(2), 101 – 104pp.
- Katayama, Y., Ito T., and Hiramatsu K.,** 2000, A new class of genetic element, *Staphylococcus* cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44, 1549 – 1555pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kazazian, Jr. H.H.**, 2004, Mobile Elements: Drivers of Genome Evolution., *Science*, 303, 1626 – 1632pp.
- Kenny, J.G., Moran, J., Kolar, S.L., Ulanov, A., Li, Z., Shaw, L.N., Josefsson, E. and Horsburgh, M.J.**, 2012, Mannitol utilisation is required for protection of *Staphylococcus aureus* from human skin antimicrobial fatty acids, *PLoS ONE*, 8(7), e67698.
- Kluytmans, J., Belkum, A.V. and Verbrugh, H.**, 1997, Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks, *Clinical Microbiology Reviews*, 10(3), 505 – 520pp.
- Koreen, L., Ramaswamy, S.V., Graviss, E.A., Naidich, S., Musser, J.M. and Kreiswirth, B.N.**, 2004. spa typing method for discriminating among *Staphylococcus aureus* isolates: implications for use of a single marker to detect genetic micro- and macrovariation, *Journal of Clinical Microbiology*, 42(2), 792 - 799pp.
- Kurlenda, J. and Grinholtz M.**, 2012, Alternative therapies in *Staphylococcus aureus* diseases, *Acta Biochimica Polonica*, 59, 171 – 184pp.
- Lamers, R.P., Stinnett, J.W., Muthukrishnan, G., Christopher L. Parkinson, C.L. and Cole, A.M.**, 2011, Evolutionary analyses of *Staphylococcus aureus* identify genetic relationships between nasal carriage and clinical isolates, *PLoS ONE*, 6(1), e16426.
- Lindsay J. A., Ruzin A., Ross H. F., Kurepina, N. and Novick, R.P.**, 1998, The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*, *Molecular Microbiology*, 29(2), 527 – 543pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rodrigues, dos S.J.B., Pinto, T.S., de Oliveira, C.P., Freitas, F.I.S., Pereira, M.S.V., de Souza, E.L., de Siqueira-Júnior, J.P.,** 2014, Lipolytic activity of *Staphylococcus aureus* from human wounds, animals, foods, and food-contact surfaces in Brazil, *The Journal of Infection in Developing Countries*, 8(8), 1055 – 1058pp.
- Liu, D., Coloe, S., Baird, R., Pedersen, J.,** 2000, Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR, *Journal of Clinical Microbiology*, 38(Suppl 1), 471p.
- Livermore, D.M.,** 2000, Antibiotic resistance in staphylococci, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 16, 3 – 10pp.
- Loeb, L.,** 1903, The influence of certain bacteria on the coagulation of the blood, *Montreal Medical Journal*, 7, 407 – 419pp.
- Loeto, D., Matsheka, M.I. and Gashe, B.A.,** 2007, Enterotoxigenic and antibiotic resistance determination of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food handlers in Gaborone, Botswana, *Journal of Food Protection*, 12, 2708 – 2934pp.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Stahl, D.A. and Clark, D.P.,** 2012, Brock Biology of Microorganisms, Pearson Education Inc., 13th ed., San Francisco, 1155p.
- Maiden, M.C.J., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A., Feavers, I.M., Achtman, M. and Spratt, B.G.,** 1998, Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 3140 – 3145pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Maiden, M.C.J., Rensburg, M.J.J., Bray, J.E., Earle, S.G., Ford, S.A., Jolley, K.A. and McCarthy, N.D.**, 2013, MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics, *Nature Reviews Microbiology*, 11(10), 728 – 736pp.
- Maja Babic, M., Hujer, A.M. and Bonomo, R.A.**, 2006, What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases, *Drug Resistance Updates*, 9, 142 – 156pp.
- McAdow, M., Missiakas D.M. and Schneewind, O.**, 2012, *Staphylococcus aureus* secretes coagulase and von Willebrand factor binding protein to modify the coagulation cascade and establish host infections, *Journal of Innate Immunity*, 4, 141 – 148pp.
- McCarthy, H., Rudkin, J.K., Black, N.S., Gallagher, L., O'Neill, E. and O'Gara, J.P.**, 2015, Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5, 1 – 9pp.
- Mediavilla, J.R., Chen, L., Mathema, B. and Kreiswirth, B.N.**, 2012, Global epidemiology of community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA), *Current Opinion in Microbiology*, 15, 588 – 595pp.
- Mehlin, C., Headley, C.M. and Klebanoff, S.J.**, 1999, An inflammatory polypeptide complex from *Staphylococcus epidermidis*: isolation and characterization, *The Journal of Experimental Medicine*, 189(6), 907 – 917pp.
- Mir-Sanchis I., Martinez-Rubio R., Martí, M., Chen, J., Lasa, I., Novick, R.P., Tormo-Más, M.A. and Penadés, J.R.**, 2012, Control of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island excision, *Molecular Microbiology*, 85(5), 833 – 845pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mulvey, M.R., Chui, L., Ismail, J., Louie, L., Murphy, C., Chang, N., Alfa, M. and The Canadian committee for the standardization of molecular methods**, 2001, Development of a Canadian standardized protocol for subtyping methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using pulsed-field gel electrophoresis, *Journal of Clinical Microbiology*, 39(10): 3481 – 3485pp.
- Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Kobayashi, G.S. and Pfaller, M.A.**, 2002, *Staphylococcus* and Related Organisms, Mosby Inc., Louis, 202 - 216pp.
- Naber, C.K.**, 2009, *Staphylococcus aureus* bacteremia: epidemiology, pathophysiology, and management strategies, *Clinical Infectious Diseases*, 48, 231 - 237pp.
- Nakakido, M., Aikawa, C., Nakagawa, I. and Tsumoto, K.**, 2014, The staphylococcal elastin-binding protein regulates zinc-dependent growth/biofilm formation, *The Journal of Biochemistry*, 56(3), 155 – 162pp.
- Nakakido, M., Tanaka, Y. and Tsumoto, K.**, 2007, The N-terminal domain of elastin-binding protein of *Staphylococcus aureus* changes its secondary structure in a membrane-mimetic environment, *The Journal of Biochemistry*, 142, 131 - 134pp.
- Netsvyetayeva, I., Fraczek, M., Piskorska, K., Golas, M., Sikora, M., Mlynarczyk, A., Swoboda-Kopec, E., Marusza, W., Palmieri, B., Iannitti, T.**, 2014, *Staphylococcus aureus* nasal carriage in Ukraine: antibacterial resistance and virulence factor encoding genes., *BMC Infectious Diseases*, 14(128), 1 – 9pp.
- Newman, H.**, 2011, “*Staphylococcus aureus*” <http://www.bacteriainphotos.com/photo%20gallery/staphylococcus%20aureus%20B.jpg> (Erişim tarihi: 3 Kasım 2014)

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Newsom S.W.B.**, 2008, Ogston' s coccus, *Journal of Hospital Infection*, 70, 369 – 372pp.
- Nishifuji, K., Sugai, M. and Amagai, M.**, 2008, Staphylococcal exfoliative toxins: “Molecular scissors” of bacteria that attack the cutaneous defense barrier in mammals, *Journal of Dermatological Science*, 49, 21 – 31pp.
- Noto M.N. and Archer G.L.**, 2006, A subset of *Staphylococcus aureus* strains harboring staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) type IV is deficient in ccrAB-mediated SCCmec excision, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50, 2782 – 2788pp.
- Novick R. P., Christie G. E. And Penades J. R.**, 2010, The phage-related chromosomal islands of gram positive bacteria, *Nature Reviews Microbiology*, 8(8), 541 - 551pp.
- Novick R.P.**, 2003, Mobile genetic elements and bacterial toxinoses: the superantigen encoding pathogenicity islands of *Staphylococcus aureus*, *Plasmid*, 49, 93 – 105pp.
- O’Riordan K. and Lee, J.C**, 2004, *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides, *Clinical Microbiology Reviews*, 17(1), 218 -234pp.
- Otlu, B.**, Bakteriyel salgınların araştırılması; PFGE yönteminin uygulamaları, problemleri ve sonuçlarının analizi, <https://www.klimud.org/public/uploads/dosya/1352738657.pdf> (Erişim tarihi: 20 Kasım 2014)
- Otto, M.**, 2013, Community-associated MRSA: what makes them special?, *International Journal of Medical Microbiology*, 303(0), 324 – 330pp.(in press)

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Otto, M.**, 2014a, *Staphylococcus aureus* toxins, *Current Opinion in Microbiology*, 0, 32 -37pp. (in press).
- Otto, M.**, 2014b, Phenol-soluble modulins, *International Journal of Medical Microbiology*, 304, 164 – 169pp.
- Oxoid**, <http://www.oxoid.com/omd/library/fullsize/DR0900C.jpg> (Erişim tarihi: 4 Kasım 2014)
- Özkan, S., Aycan, S., Sultan, N. ve Maral, I.**, 1999, Periyodik esnaf muayenelerinin ve buru-boğaz taşıyıcılıklarının değerlendirilmesi, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 56(1), 13 – 17pp.
- Pala, K., Özakin, C., Akış, N., Sınırtaş, M., Gedikoğlu, S. ve Aytakin, H.**, 2010, Asymptomatic carriage of bacteria in food workers in Nilüfer district, Bursa, Turkey, *Turkish Journal of Medical Science*, 40(1), 133 – 139s.
- Paludi, D., Vergara, A., Festino, A.R., Di Ciccio, P., Costanzo, C., Conter, M., Zanardi, E., Ghidini, S. and Ianieri, A.**, 2011, Antimicrobial resistance pattern of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the food industry, *Journal of Biological Regulators & Homeostatic Agents*, 25(4), 671 - 677p.
- Panton, P.N. and Valentine, F.C.O.**, 1932, Staphylococcal toxin, *Lancet*, 1, 506 – 508 pp.
- Peacock, S.**, 2006, *Staphylococcus aureus*, Gillespie, S.H. and Hawkey, P.M. (Eds.), John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, 73p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Peacock, S.J.**, 2007, *Staphylococcus*, 756 - 817, Topley and Wilson' s Microbiology and Microbial Infections, Volume 2, Bacteriology, Borriello, S.P., Murray, P.R. and Funke, G. (eds.), Hodder Arnold Ltd., London, 2228pp.
- Peetermans, M., Vanassche, T., Liesenborghs, L., Claes, J., Velde, G.V., Kwiecinski, J., Jin, T., Geest, B.D., Hoylaerts, M.F., Lijnen, R.H. and Verhamme, P.**, 2014, Plasminogen activation by staphylokinase enhances local spreading of *S. aureus* in skin infections, *BMC Microbiology*, 14, 1 – 12pp.
- Perry, J.D., Rennison, C., Butterworth, L.A., Hopley, A.L.J. and Gould, F.K.**, 2003, Evaluation of *S. aureus* ID, a new chromogenic agar medium for detection of *Staphylococcus aureus*, *Journal of Clinical Microbiology*, 41(12), 5695 – 5698pp.
- Que, Y.A. and Moreillon, P.**, 2010, *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock), 2543 – 2608, Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases, Mandell, G.L., Bennett, J.E., Dolin, R. (eds.), Elsevier Inc., Philadelphia, 4155p.
- Queck, S.Y., Khan, B.A., Wang, R., Bach, T.H.L., Kretschmer, D., Chen, L., Kreiswirth, B.N., Peschel, A., DeLeo, F.R. and Otto, M.**, 2009, Mobile genetic element-encoded cytolysin connects virulence to methicillin resistance in MRSA, *PLoS Pathogens*, 5(7), 1 – 12pp.
- Rivera, J., Vannakambadi, G., Höök, M. and Speziale, P.**, 2007, Fibrinogen-binding proteins of Gram-positive bacteria, *Thrombosis and Haemostasis*, 98, 503 – 511pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rodrigues, J.B.S., Pinto, T.S., Oliveira, C.P., Freitas, F.I.S., Pereira, M.S.V., Souza, E.L., Siqueira-Júnior, J.P.,** 2014, Lipolytic activity of *Staphylococcus aureus* from human wounds, animals, foods, and food-contact surfaces in Brazil, *The Journal of Infection in Developing Countries*, 8(8), 1055 – 1058pp.
- Roghmann, M., Taylor, K.L., Gupte, A., Zhan, M., Johnson, J.A., Cross, A., Edelman, R. and Fattom, A.I.,** 2005, Epidemiology of capsular and surface polysaccharide in *Staphylococcus aureus* infections complicated by bacteraemia, *Journal of Hospital Infection*, 59, 27 – 32pp.
- Rogolsky, M.,** 1979, Nonenteric toxins of *Staphylococcus aureus*, *Microbiological Reviews*, 43(3), 320 – 360pp.
- Ruzin A., Lindsay J. and Novrick R. P.,** 2001, Molecular genetics of SaPI1- a mobile pathogenicity island in *Staphylococcus aureus*, *Molecular Microbiology*, 41(2), 365 – 377pp.
- Ruzin, A., Lindsay, J. and Novick, R.P.,** 2001, Molecular genetics of SaPI1 – a mobile pathogenicity island in *Staphylococcus aureus*, *Molecular Microbiology*, 41(2), 365 – 377pp.
- Said, S.B., Mathema, B. and Kreiswirth, B.N.,** 2003, Community-acquired Methicillin resistance *Staphylococcus aureus*: an emerging pathogen, *Infection Control Hospital Epidemiology*, 24, 451 – 455pp.
- Salasia, S.I.O., Tato, S., Sugiyono, N., Ariyanti, D. and Prabawati, F.,** 2011, Genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from bovines, humans, and food in Indonesia, *Journal of Veterinary Science*, 12(4), 353 – 361pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Shuman, H.A.,** 1989. Molecular Clonning: a Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sancak, B.,** 2012, MRSA direnç mekanizmaları: Dünyada ve Türkiye’ de epidemiyolojisi. *ANKEM Dergi*, 26(Ek 2), 38 – 47pp.
- Schaffer, A.C. and Lee, J.C.,** 2008, Vaccination and passive immunisation against *Staphylococcus aureus*, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 32, 71 78pp.
- Schinasi, L., SWing, S., Augustino, K.L., Ramsey, K.M., Nobles, D.L., Richardson, D.B., Price, L.B., Aziz, M., MacDonald, P.D.M. and Stewart, J.R.,** 2014, A case control study of environmental and occupational exposures associated with methicillin resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage in patients admitted to a rural tertiary care hospital in a high density swine region, *Environmental Health*, 13(54), 12p.
- Schleifer, K.H. and Bell, J.A.,** 2009, Family VIII. *Staphylococcaceae* fam. nov., 392 – 434, Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology Second Edition Volume Three The Firmicutes, De Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.H. and Whitman, W.B. (eds.), Springer, New York, 1450p.
- Schmidt, H. and Hensel, M.,** 2004, Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis, *Clinical Microbiology Reviews*, 17, 14 -56pp.
- SeqNet**, <http://www.seqnet.org> (Erişim tarihi: 21 Ekim 2014)

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Shore, A.C., Deasy, E.C., Slickers, P., Brennan, G., O'Connell, B., Monecke, S., Ehricht, R. and Coleman, D.C.,** 2011, Detection of staphylococcal cassette chromosome mec type XI carrying highly divergent mecA, mecI, mecR1, blaZ, and ccr genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(8), 3765 – 3773pp.
- Shortridge, V.D., Pato, M.L., Vasil, A.I. and Vasil, M.L.,** 1991, Physical mapping of virulence-associated genes in *Pseudomonas aeruginosa* by transverse alternating-field electrophoresis, *Infection and Immunity*, 59(10), 3596 – 3603pp.
- Sık, L., Candan, F., Soya, S., Karamenderes, C. and Kesercioğlu, T.,** 2008, Genetic variation among crocus L. species from Western Turkey as revealed by RAPD and ISSR markers, *Journal of Applied Biological Sciences*, 2(2), 73-78pp.
- Silverman, G.J., Goodyear, C.S. and Siegel, D.L.,** 2005, On the mechanism of staphylococcal protein A immunomodulation, *Transfusion*, 45, 274 – 280pp.
- Simsek, Z., Koruk, I., Copur, A.C. and Gürses, G.,** 2009, Prevalence of *Staphylococcus aureus* and intestinal parasites among food handlers in Sanliurfa, Southeastern Anatolia, *Journal of Public Health Management and Practice*, 15(6), 518 - 523pp.
- Smeltzer, M.S. and Gillaspay, A.F.,** 2000, Molecular pathogenesis of staphylococcal osteomyelitis, *Poultry Science*, 79, 1042 – 1049pp.
- Sompolinsky, D., Samra, Z., Karakawa, W.W., Vann, W.F., Schneerson, R., and Malik, Z.,** 1985, Encapsulation and capsular types in isolates of *Staphylococcus aureus* from different sources and relationship to phage types, *Journal of Clinical Microbiology*, 22(5), 828 – 834pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sonnen, A.F.P. and Henneke, P.**, 2013, Role of pore-forming toxins in neonatal sepsis, *Clinical and Developmental Immunology*, 2013, 1 – 13pp.
- Spellberg, B. and Daum, R.**, 2012, Development of a vaccine against *Staphylococcus aureus*, *Seminars in Immunopathology*, 34(2), 335 – 348 pp.
- Spilman M. S., Damle P. K., Dearborn A. D., Rodenburg, C.M., Chang, J.R., Wall, E.A., Christie, G.E., Dokland, T.**, 2012, Assembly of bacteriophage 80a capsids in a *Staphylococcus aureus* expression system, *Virology*, 434, 242 - 250pp.
- Strommenger, B., Bräulke, C., Heuck, D., Schmidt, C., Pasemann, B., Nußbel, U. and Witte W.**, 2008, *spa* typing of *Staphylococcus aureus* as a frontline tool in epidemiological typing, *Journal of Clinical Microbiology*, 46(2), 574 - 581pp.
- Sudagidan, M. ve Aydın, A.**, 2010, Virulence properties of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* food isolates encoding Pantone–Valentine Leukocidin gene, *International Journal of Food Microbiology*, 138, 287 – 291pp.
- Switalski, L.M., Speziale, P. and Höök, M.**, 1989, Isolation and characterization of a putative collagen receptor from *Staphylococcus aureus* strain Cowan 1, *The Journal of Biological Chemistry*, 264(35), 21080 – 21086pp.
- Szweda, P., Schielmann, M., Kotłowski, R., Gorczyca, G., Zalewska, M. and Milewski, S.**, 2012, Peptidoglycan hydrolases-potential weapons against *Staphylococcus aureus*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96, 1157 – 1174pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- T.C. Sağlık Bakanlığı,** 1930, “Umumi Hıfzıssıhha Kanunu”, <http://www.mevzuat.gov.tr/MevzuatMetin/1.3.1593.pdf>, (Erişim tarihi 13 Ekim 2014)
- Todar K.,** 2008, “Todar' s Online Textbook of Bacteriology”, <http://textbookofbacteriology.net/staph.html> (Erişim tarihi: 3 Kasım 2013)
- Tormo M. A., Ferrer M. D., Elisa Maiques, E., U' beda, C., Selva, L., Lasa, I., Calvete, J.J., Novick, R.P. and Penade's, J.R.,** 2008, *Staphylococcus aureus* pathogenicity island DNA is packaged in particles composed of phage proteins, *Journal of Bacteriology*, 190, 2434 – 2440pp.
- Trindade, P.A., McCulloch, J.A., Oliveira, G.A. and Mamizuka, E.M.,** 2003, Molecular techniques for MRSA typing: current issues and perspectives, *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 7(1), 32 – 43pp.
- Ubeda C., Maiques E., Tormo M. A., Campoy, S., Íñigo Lasa, I., Jordi Barbé, J., Novick, R.P. and Penadés, J.R.,** 2007, SaPI operon I is required for SaPI packaging and is controlled by LexA, *Molecular Microbiology*, 65(1), 41 - 50pp.
- Ubeda C., Tormo M. A., Cucarella, Trotonda, P., Timothy J. Foster, T.J., Lasa, I. and Penadés J.R.,** 2003, Sip, an integrase protein with excision, circularization and integration activities, defines a new family of mobile *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands, *Molecular Microbiology*, 49(1), 193-210pp.
- Ulrich, R.G.,** 2000, Evolving superantigens of *Staphylococcus aureus*, *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 27, 1 – 7pp.
- Vandenesch, F., Naimi, T., Enright, M.C., Lina, G., Nimmo, G.R., Heffernan, H., Liassine, N., Bes, M., Greenland, T., Reverdy, M.E. and Etienne, J.,** 2003, Community-acquired methicillin - resistant *Staphylococcus aureus*, carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence, *Emerging Infectious Diseases*, 9(8), 978 – 984pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Verdier, I., Durand, G., Bes, M., Taylor, K.L., Lina, G., Vandenesch, F., Fattom, A.I. and Etienne, J.,** 2007, Identification of the capsular polysaccharides in *Staphylococcus aureus* clinical isolates by PCR and agglutination tests, *Journal of Clinical Microbiology*, 45(3), 725 -729pp.
- von Eiff, C., Taylor, K.L., Mellmann, A., Fattom, A.I., Friedrich, A.W., Peters, G. and Becker, K.,** 2007, Distribution of capsular and surface polysaccharide serotypes of *Staphylococcus aureus*, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 58, 297 -302pp.
- Waller, J.R., Hodel, S.L. and Nuti, R.N.,** 1985, Improvement of two toluidine blue O-mediated techniques for DNase detection, *Journal of Clinical Microbiology*, 21(2), 195 – 199pp.
- Wang, D., Bortolussi, R. and Noble, M.,** 1983, Latex agglutination test to identify coagulase, clumping factor and protein A produced by staphylococci, *Clinical & Investigative Medicine*, 6(4), 301-304pp.
- Wann, E.R., Gurusiddappa, S. and Höök, M.,** 2000, The fibronectin-binding MSCRAMM FnbpA of *Staphylococcus aureus* is a bifunctional protein that also binds to fibrinogen, *The Journal of Biological Chemistry*, 275(18), 13863 – 13871pp.
- Wei, H.L. and Chiou, C.S.,** 2002, Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* from an outbreak associated with a food handler, *Epidemiology & Infection*, 128, 15 – 20pp.
- Winn, W., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G.W., Schreckenberger, P.C., Woods, G.L.,** 2006, Gram-positive cocci, 623 - 671, Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, Darcy, P. (Ed.), Lippincott Williams Wilkins. Baltimore, 625p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Xia, G., Kohler, T. and Peschel, A.,** 2010, The wall teichoic acid and lipoteichoic acid polymers of *Staphylococcus aureus*, *International Journal of Medical Microbiology*, 300, 148 – 154pp.
- Xu, S.X. and McCormick, J.K.,** 2013, Staphylococcal superantigens in colonization and disease, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2(52), 1 – 11pp.
- Yılmaz, Ş.K., Acuner, İ.Ç., Strommenger, B., Bek, Y., Witte,** 2014, Türkiye'nin Orta Karadeniz bölgesinde metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* kökenlerinin Enfeksiyözite-Rezistotip-Genotip Kümelenmesi, mikrobiyoloji bülteni, 48(1), 14-27pp.
- York, M.K.,** 2004, Aerobic Bacteriology Section 3, 80 – 640, Clinical Microbiology Procedures Handbook, vol. 1, 2 and 3, 2nd edition, Isenberg, H.D. (ed.), American Society for Microbiology, Washington, D.C., 2279p.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Emre MEMO
E-mail : emrememo@gmail.com

GENEL BİLGİLER

T.C. Kimlik No : 26050630530
Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri : Edirne
Doğum Tarihi : 30.11.1988

EĞİTİM DURUMU

2011 – 2015 : İzmir Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı (Yüksek Lisans Eğitimi)
2006 – 2011 : İzmir Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Ve Genetik Anabilim Dalı (Lisans Eğitimi)
2002 – 2006 : Tekirdağ Çorlu Mehmet Akif Ersoy Anadolu Lisesi
2001 – 2002 : Tekirdağ Çorlu Unilever-İş İlköğretim Okulu
1994 – 2001 : Edirne Karaağaç Pansiyonlu İlköğretim Okulu

YÜKSEK LİSANS EĞİTİMİ ÇALIŞMASI

İzmir ve çevresindeki gıda üretiminde çalışan taşıyıcılardan izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarının identifikasyonu; epidemiyolojik ve filogenetik olarak gruplandırılması

DANIŞMAN : Prof. Dr. Füsün Bahriye UÇAR (Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi)

LİSANS EĞİTİMİ ÇALIŞMASI

Kolorektal Kanser Tümör Hücrelerinde Siyalik Asit Seviyeleri Ve Profilleri

DANIŞMAN : Prof. Dr. Sabire KARAÇALI (Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Ve Genetik Anabilim Dalı Başkanı)

STAJLAR VE ÖZEL SEKTÖR TECRÜBELERİ

2012 – ... Yılları Arasında : Koek Biyoteknoloji Biyomühendislik Ve Medikal Hizmetleri San. Ve Tic. Ltd. Şti.

2009 – 2012 Yılları Arasında : Asklepion Dokuz Eylül Laboratuvar Özel Eğitim Özel Sağlık Danışmalık Ve Ar-Ge Hizmetleri Tic. Ltd. Şti.

2010 yılında Zorunlu Staj : Burç Sağlık Hizmetleri Genetik Tanı Merkezi

2009 yılında İsteğe Bağlı : Özel Trakya Hastanesi Biyokimya ve Mikrobiyoloji Laboratuvarı

2008 yılında İsteğe Bağlı : Edirne Selimiye Devlet Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı

YABANCI DİL EĞİTİMİ

İngilizce : 2010 Sonbahar Dönemi **KPDS: 58** (Seviye E)

BİLGİSAYAR EĞİTİMİ

- İleri Seviyede Office Programları (Word, Excel, Powerpoint, Outlook, Access, OneNote), Windows ve İnternet
- Giriş Seviyede NETSİS Muhasebe
- Giriş Seviyede Photoshop CS
- Giriş Seviyede (Amatör olarak) Adobe Illustrator CS
- Giriş Seviyede (Amatör olarak) CorelDraw

SERTİFİKA VE BELGELER

- Temel İlk Yardım Eğitimi 2012 Erzincan
- Temel İş Sağlığı ve İş Güvenliği Eğitimi 2012 İzmir

KONGRE, KONFERANS KATILIMLARI VE SUNUMLAR

- 2014 22. Ulusal Biyoloji Kongresi Eskişehir Osmangazi Üniversitesi / Eskişehir
- 2012 21. Ulusal Biyoloji Kongresi Ege University/İZMİR

- 2011 16. Ege Onkoloji Günleri “Meme Kanseri’ne Moleküler Yaklaşım Kursu ve Workshop” Pine Bay Hotel Kuşadası/İZMİR
- 2011 VII. IUGEN International Molecular Biology and Genetics Student Winter School İstanbul University/İSTANBUL
- 2010 Genomics, Proteomics and Glycomics Approaches to Nuclear Estrogen Signaling (Mesut Muyan, Research Professor, Departments of Biochemistry & Biophysics and Obstetrics and Gynecology, University of Rochester Medical School, Rochester, NY, USA)

İLGİ ALANLARIM

Amatör olarak fotoğraf sanatı ile ilgilenmekteyim.