



T.C.

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MİK-YL-2010-0004

**SIĞIRLARDAN ve SEKTÖR ÇALIŞANLARINDAN
İZOLE EDİLEN METİSİLİN DİRENÇLİ
STAFİLOKOKLARDA SCC_{mec} TİPLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Emel İNEGÖL

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ

AYDIN-2010

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİK -YL-2010-0004

SIĞIRLARDAN ve SEKTÖR ÇALIŞANLARINDAN
İZOLE EDİLEN METİSİLİN DİRENÇLİ
STAFİLOKOKLARDA SCC_{mec} TİPLERİNİN
BELİRLENMESİ

Emel İNEGÖL

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ

AYDIN-2010

ÖNSÖZ

Yirminci yüzyılın başlarında hekimler tüm bakteriyel infeksiyonların tedavi edilebilir olduğuna inanırlarken, günümüzde çoklu antibiyotik direncine sahip mikroorganizmalardan olan metisilin dirençli stafilokoklara (MRS) bağlı infeksiyonların tedavisinde güçlüklerle karşılaşmaktadır. Penisiline dirençli stafilokokların neden olduğu infeksiyonların tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilen metisilinin kullanıma girmesiyle, başlangıçta tedavi başarısı sağlanmış olsa da, bir süre sonra metisiline dirençli suşlar ortaya çıkmış ve önce hastanede kazanılmış infeksiyonlarda, yakın zamanda da toplumda kazanılmış infeksiyonlarda etken olarak karşılaşılmaya başlanmıştır.

Son yıllarda sağlıklı insan ve hayvanlarda MRS'ın yüksek prevalansı artan oranda bildirilmektedir. Hayvanların, insanlar ve hayvanlar arasında MRS'ın karşılıklı bulaşmasında potansiyel bir rezervuar olduğu gösterilmiş ve bu durum hayvanların, insanlar ve diğer hayvanlar ile sık ve yakın temasa sahip olmaları ile açıklanmıştır. Bu nedenle MRS taşıyıcılığının izlenmesi, MRS yayılımında hayvandan insana (zoonozis), insandan hayvana (humanoozis) geçişin aydınlatılması açısından önemlidir.

Günümüzde MRS, insanlar ve hayvanlarda görülen önemli patojenler haline gelmiştir. Nazal MRS'lar, taşıyıcılar ve sağlam bireyler için de risk kaynağıdır. Bunlar ile gelişen bulaşma ya da hastalıklar sonucunda, hayvanların taşıyıcı olması direk olarak insan sağlığını tehdit etmektedir. Özellikle de veteriner hekimler, hayvan bakıcıları ve aileleri hayvanlarla yakın temas halindedirler.

MRSda, MSSdan farklı olarak, Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec) olarak isimlendirilen bir direnç adası bulunmaktadır. SCC, “Staphylococcal Cassette Chromosome” için; mec ise, metisilin direncine neden olan genetik elemanı simgelemek için kullanılmaktadır. SCCmec'te bulunan en önemli genler ccrA, ccrB ve mecA genleridir. Son yapılan sınıflandırmada bu komplekslerin yapısına göre SCCmec sekiz tipe ayrılmaktadır: SCCmec tip I, II ve III “hastanede kazanılmış” (HK-MRS) klonlar, SCCmec tip IV ve V ise “toplumda kazanılmış” (TK-MRS) klonlar olarak tanımlanmaktadır.

Stafilokoklarda metisilin direncinin belirlenmesi fenotipik ve genotipik yöntemlerle yapılabilmekle beraber, moleküler olarak mecA geninin saptanması, fenotipik yöntemlere kıyasla daha duyarlıdır. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile mecA geninin saptanması altın standart olarak kabul edilmektedir.

Moleküler ya da genotipik tiplendirme teknikleri MRS epidemiyolojilerinin incelendiği çalışmalarda sıklıkla kullanılmakta ve bu suşlar arasındaki klonal ilişkinin daha iyi anlaşılabilmesini sağlamaktadırlar. SCCmec analizi, moleküler tiplendirme yöntemlerden amplifikasyona dayanan yöntemler içerisinde yer almakta ve MRS'ların hastane ya da toplumda kazanılmış tiplerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır.

Yurdumuzda MRS'ların moleküler epidemiyolojilerinin incelendiği sınırlı sayıda çalışma bulunmakla beraber; özellikle metisilin dirençli koagulaz negatif staflokokların (MRKNS) moleküler tiplendirme yöntemlerinden birisi olan SCCmec analizi ile incelendiği bir çalışma şu anki bilgilerimize göre bulunmamaktadır. Bu çalışma, i) mastitisli sığır süt ve sığır ile sektör çalışanlarından alınan nazal sıvı örneklerinden izole edilen stafilokok suşlarında metisilin direncinin belirlenmesi, ii) metisilin dirençli Staphylococcus aureus'un (MRSA) diğer MRSdan ayırt edilmesi için kullanılabilecek tripleks polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi geliştirilmesi, iii) metisilin dirençli stafilokok suşlarının SCCmec tiplerinin multipleks PCR ile incelenmesi ve böylece MRS'ların SCCmec tiplerinin Aydın yöresindeki durumunun belirlenebilmesi için gerçekleştirilmiştir.

Bu araştırma Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (VTF-10026 no'lu proje) tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL VE ONAY	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
RESİMLER DİZİNİ.....	x
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	xi
1. GİRİŞ	
1. 1. Stafilokokların ve Stafilokoklarda Metisilin Direncinin Tarihçe.....	1
1. 2. Stafilokokların Genel Özellikleri.....	3
1. 3. Morfolojik ve Kimyasal Özellikleri.....	6
1. 3. 1. Görünüm ve Boyanma.....	6
1. 3. 2. Üreme ve Kültür Özellikleri.....	6
1. 3. 3. Biyokimyasal Özellikleri.....	7
1. 3. 4. Genom Yapısı.....	7
1. 3. 5. Virulans ve Patojenite.....	8
1. 3. 5. 1. Kapsül.....	9
1. 3. 5. 2. Hücre Yapısı.....	9
1. 3. 5. 3. Enzimler.....	11
1. 3. 5. 4. Toksinler.....	12
1. 4. Epidemiyoloji.....	15
1. 5. Stafilokoklarda Penisilin Direnci	23
1. 5. 1. Metisilin Direnci ve Mekanizmaları.....	23
1. 5. 1. 1. PBP2a	23
1. 5. 1. 2. <i>mecR1-mecI</i> sistemi.....	34
1. 5. 1. 3. Direnç Fenotipini Etkileyen Diğer Faktörler.....	34
1. 6. Stafilokokların Tanısı.....	35
1. 6. 1. Fenotipik Yöntemler.....	35

1. 6. 1. 1. Biyokimyasal Testler.....	36
1. 7. Stafilokoklarda Metisilin Direncinin Belirlenmesi.....	38
1. 7. 1. Disk Difüzyon Yöntemi.....	39
1. 7. 2. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi.....	39
1. 7. 3. Agar Tarama.....	39
1. 7. 4. E-Test Yöntemi.....	40
1. 7. 5. Lateks Aglutinasyon.....	40
1. 7. 6. Kromojenik Yöntemler.....	40
1. 7. 7. Moleküler Yöntemler.....	40
1. 8. Stafilokok İnfeksiyonlarında Tedavi.....	43

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2. 1. Gereç.....	46
2. 1. 1. İzolasyon Örnekler	46
2. 1. 2. Besiyerleri, Ayıraçlar, Solüsyonlar, ve Antibiyotik Diskleri	46
2. 1. 2. 1. Besiyerleri.....	46
2. 1. 2. 1. 1. Blood Agar Base	46
2. 1. 2. 1. 2. Mannitol Salt Phenol Red Agar	46
2. 1. 2. 1. 3. Mueller-Hinton Agar	47
2. 1. 2. 1. 4. Brain Heart Infusion Broth (%20 Gliserinli) (Oxoid CM 0225).....	47
2. 1. 2. 1. 5. Tripotone Soya Broth- (%7,5 Tuzlu) (Oxoid CM 129)	47
2. 1. 2. 1. 6. Stuart Transport Medium (BBL™).....	48
2. 1. 2. 2. Ayıraç ve Solusyonlar	48
2. 1. 2. 2.1. EDTA	48
2. 1. 2. 2.2. TBE (Tris, Borik Asit, EDTA, pH: 8,0) Buffer	48
2. 1. 2. 2. 3. Gel Loading Buffer (6 X).....	49
2. 1. 2. 2. 4. Tris (1 M).....	49
2. 1. 2. 2. 5. Lizis solusyonu.....	49
2. 1. 2. 3. Kullanılan Antibiyotik Diski	49
2. 1. 3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	49
2. 1. 3. 1. Kullanılan Cihazlar	50
2. 1. 3. 2. MgCl ₂ , Taq DNA Polymerase, 10X Taq Buffer, dNTP Set	50
2. 1. 3. 3. Primerler	50

2. 1. 4. Elektroferez Cihazı.....	51
2. 1. 4.1. Agorose Jel Hazırlanışı.....	51
2. 1. 4. 2. Marker	52
2. 1. 4. 3. PstI Enzimi İle Kesilmiş Lambda Faj DNA'sının Hazırlanışı	52
2. 1. 4. 4. Etidyum Bromür.....	52
2. 1. 4. 5. Standart suşlar.....	52
2. 2. Yöntem	52
2. 2. 1. Örneklerin Alınması.....	52
2. 2. 2. Stafılakok İzolasyonu	53
2. 2. 2. 1. Stafilokok Suşlarının Fenotipik İdentifikasyonu	53
2. 2. 2. 1. 1. Katalaz Testi.....	53
2. 2. 2. 1. 2. Basitrasin Direnci	53
2. 2. 2. 1. 3. Koagulaz Testi.....	54
2. 2. 2. 1. 4. Metisilin Dirençli Stafilokok Suşlarının Belirlenmesi.....	54
2. 2. 2. 2. Stafilokok Suşlarının Genotipik İdentifikasyonu	54
2. 2. 2. 2. 1. DNA Ekstraksiyonu.....	55
2. 2. 2. 2. 2. PCR	55
2. 2. 2. 2. 2. 1. Sekans Analizi İçin 16S rRNA Geninin PCR İle Çoğaltılması	55
2. 2. 2. 2. 2. 2. Tripleks PCR.....	57
2. 2. 2. 2. 2. 3. SCCmec Multipleks PCR	58
2. 2. 2. 2. 3. Amplikonların Elektroferez Tankına Yüklenmesi.....	60
2. 2. 2. 2. 4. Yürütme.....	60
2. 2. 2. 2. 5. Görüntüleme.....	60
2. 2. 2. 2. 6. Görüntüleme Sonrası Değerlendirme.....	60

3. BULGULAR

3. 1. İzolasyon.....	61
3. 1. 1. Sütler.....	61
3. 1. 2. Burun Sıvabları.....	61
3. 2. Metisilin Direnci.....	61
3.2.1.Süt Kökenli Stafılakoklarda.....	61
3. 2. 2. Burun Kökenli Stafılakoklarda.....	62
3. 3. PCR.....	63
3. 3. 1. 16S rRNA PCR.....	63
3. 3. 2. Tripleks PCR	65

3. 3. 3. Multipleks PCR	66
4. TARTIŞMA	74
5. SONUÇ	85
ÖZET	86
SUMMARY	87
KAYNAKLAR	88
ÖZGEÇMİŞ.....	110
TEŞEKKÜR	111

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 1. 1. Stafilokok türlerinin sınıflandırılması.....	4
Çizelge 1. 2. Bugüne kadar tanımlanmış en önemli stafilokok tür ve alt türleri.....	5
Çizelge 1. 3. <i>S. aureus</i> tarafından üretilen toksik komponent ve toksinler.....	15
Çizelge 1. 4. <i>S. aureus</i> 'ta belirlenen SCCmec tipleri.....	26
Çizelge 1. 5. Farklı SCCmec tiplerinin özellikleri.....	31
Çizelge 1. 6. Gram pozitif kokların ayırd edici özellikleri.....	37
Çizelge 2. 1. Tripleks PCR'da kullanılan primerler, dizileri, ampikon büyüklükleri...	50
Çizelge 2. 2. SCCmec tipi belirlenmesinde kullanılan primerler dizilimleri, ampikon büyüklükleri ve SCCmec tipi.....	51
Çizelge 2. 3. Mastermiksin hazırlanma oranları.....	56
Çizelge 2. 4. PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı.....	56
Çizelge 2. 5. Mastermiksin hazırlanma oranları.....	58
Çizelge 2. 6. PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı.....	58
Çizelge 2. 7. Mastermiksin hazırlanma oranları.....	59
Çizelge 2. 8. PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı.....	59
Çizelge 3. 1. Sütlerden izole edilen metisilin dirençli izolatların dağılımı.....	62
Çizelge 3. 2. Burun sıvılarından izole edilen MRS dağılımı.....	62
Çizelge 3. 3. İşletmelere göre sütlerden izole edilen metisilin dirençli izolatların dağılımı.....	64
Çizelge 3. 4. Türlerle göre burun sıvılarından izole edilen MRS dağılımı.....	64
Çizelge 3. 3. İdentifiye edilen stafilokok türlerinin dağılımı.....	67
Çizelge 3. 4. Tüm MRS suşlarının SCCmec tiplerinin türlerle göre dağılımı.....	69
Çizelge 3. 5. İşletmelere göre tüm verilerin toplu sunumu.....	70
Çizelge 3. 6. Bakteri türlerine göre tüm verilerin toplu sunumu.....	72
Çizelge 3. 7. Sığır ve İnsan kökenli MRS izolatlarının SCCmec Tiplerine göre dağılımı	73
Çizelge 4. 1. Bazı ülkelerde MRSA'nın SCCmec tiplerine göre dağılımı.....	80

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1. 1. <i>ccr</i> genlerinin sınıflandırılması	27
Şekil 1. 2. <i>ccr</i> genlerinin sınıflandırılması	27
Şekil 1. 3. <i>mec</i> gen kompleksinin sınıfları	28
Şekil 1. 4. SCC <i>mec</i> elemanlarının yapıları.....	32
Şekil 2. 1. Bakterilerin 16S rRNA sekansına dayalı moleküler identifikasyonu....	57
Şekil 3. 1. İdentifiye edilen stafilokok türlerinin işletmelere göre dağılımı	65
Şekil 3. 2. Stafilokok türlerine göre materyallerin dağılımı	65
Şekil 3. 3. Tüm izolatların SCC <i>mec</i> tiplerinin dağılımı	72

RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa
Resim 3. 1. Metisilin duyarlı ve dirençli birer stafilokok suşu	63
Resim 3. 2. MSA'da mannitol pozitif (<i>S. aureus</i> , 1) ve mannitol negatif	63
Resim 3. 3. 16S primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PCR.....	64
Resim 3. 4. Tripleks PCR	66
Resim 3. 5. Tüm suşların SCCmec tiplerinin toplu görünümü	67
Resim 3. 6. SCCmec Tipleri	68
Resim 3. 7. SCCmec tip V.....	68
Resim 3. 8. <i>mec</i> kompleks ve <i>ccr</i> kompleks primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PCR görüntüleri.....	69

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

KNS: Koagulaz Negatif Stafilokok

MRSA: Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus*

VISA: Vankomisine Orta Derecede Duyarlı *S. aureus*

VDSA: Vankomisine Dirençli *S. aureus*

hVISA: Heterojen Dirençli *S. aureus*

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

rRNA: Ribozomal Ribo Nükleik Asit

MSCRAMM: Microbial Surface Component Reacting with Adherence Matrix Molecules

NAG : N-Asetil Glukozamin

NAMA : N-Asetil Muramik Asit

PBP: Penisilin Bağlayan Protein

KPS: Koagulaz Pozitif Stafilokok

PVL: Panton- Valentine Lökosidin

TK- MRSA: Toplum Kökenli Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus*

SSSS: Stafilokokal Haşlanmış Deri Sendromu

TSST: Toksik Şok Sendromu Toksini

HLA: İnsan Lökosit Antijeni

MRKNS: Metisilin dirençli koagülaz negatif stafilokok

MSSA: Metisilin Duyarlı *S. aureus*

SCC: Stafilokokal Kaset Kromozom

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

CDS: Centers for Disease Control and Prevention

ccr: Kaset Kromozom Rekombinaz

kbp: Kilo Baz Pair

ISS: Integrasyon Bölge Dizileri

HK-MRSA: Hastane Kökenli Metisilin Dirençli *S. aureus*

PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis

MRS: Metisilin Dirençli Stafilokok

MLEE: Multi Locus Enzim Elektroforezi

MHA: Mueller- Hinton Agar

MIC: Minimum Inhibitör Konsantrasyonu
PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
MPCR: Multipleks PCR
MSA: Mannitol Salt Agar
BHIA: Brain Heart Infusion Agar
TSB: Tryptone Soya Broth
EDTA: Ethylenediaminetetraacetic asit
S: Duyarlı
I: Orta Derecede Duyarlı
R: Dirençli
CMT: California Mastitis Test
FOX: Sefoksitin
ORF: Open Reading Framers
CRF: Coagulase Reacting Faktör
PBS: Penisilin Bağlayan Protein
ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute
PBP: Penisilin Bağlayan Protein
SCC*mec*: Stafilokokal Kaset Kromozom *mec*
SHS: Somatik Hücre Sayısı
WST: White Side Test
MCA: MacConcey Agar
NB: Nutrient Broth
MHA: Mueller – Hinton Agar
Kbp: Kilo Baz Çifti
kDa: kilo dalton

1. GİRİŞ

1.1. Stafilocokların ve Stafilocoklarda Metisilin Direncinin Tarihçesi

Stafilocokları ilk olarak 1878’de Robert Koch ışık mikroskopunda tanımlamış, 1880’de Pasteur sıvı besiyerinde üretmiştir. İskoçyalı cerrah Alexander Ogston 1881’de stafilocokların fareler ve kobaylar için patojen olduğunu gösterirken bu mikroorganizmalara; üremeleri sırasında birbirlerinden ayrılmayıp, üzüm salkımına benzeyen düzensiz kümeler oluşturmaları sonucu “*Staphylococcus*” (*Staphyle*: üzüm salkımı) adını vermiştir. Ogston patojen olduğunu vurgulamak için “mikrokoklar, aktiviteleri düşük ve yayılma alanları sınırlı olduğunda yüzeysel süpüratif inflamasyona yol açan, ancak etkinlikleri daha fazla olursa ve yayılma imkânı bulurlarsa septisemi ve piyemi oluşturan mikroorganizmalardır” ifadesini kullanmıştır. Rosenbach 1884’de ilk kez insandan izole etmiştir. İlk olarak *Staphylococcus albus* olarak adlandırılan mikroorganizmanın birden fazla alt tür içerdiği belirlenmiş; 1970’lerden itibaren *Staphylococcus epidermidis* dışındaki diğer Koagülaz Negatif Stafilocok (KNS) türleri de tanınmaya başlanmıştır (Bannerman 2003, Peacock 2005). Alexander Fleming’in 1928’de penisilini bulması ve 1940’da Florey ve Chain tarafından penisilin üretiminin başlanması ile stafilocok infeksiyonlarının tedavisinde önemli bir aşama kaydedilmiştir. *Staphylococcus aureus* suşlarında ise penisilin direncini 1944’de Kirby tanımlamıştır (Shopsin ve ark. 2001). 1950’li yıllarda penisilin yanı sıra tetrasiklin, eritromisin ve streptomisin gibi antibiyotiklere de direnç gelişimi gözlenmiştir (Haznedaroğlu 2009).

İlk semisentetik penisilinaza dirençli antimikrobiyal olan metisilin 1959’da klinik kullanıma girmiştir. İki yıl sonra, ilk Metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) izolatu İngiltere’de bildirilmiştir. *S. aureus* suşlarındaki bu direnç 1960’lı yıllarda Avrupa’da ve 1970’li yıllarda ABD’nde önemli bir sorun haline gelmiştir. MRSA suşları özellikle 1980’li yıllarda hastane kaynaklı salgın etkeni olarak bildirilirken, çoklu direnç ile sık karşılaşmıştır (Grüneberg 1997, Şardan 2000).

Hayvanlarda ise ilk MRSA izolatu 1972 yılında mastitisli sığırlardan izole edilirken, bunu 1988 yılında kedi ve 1989 yılında köpek izolatları izlemiştir. Daha sonra dünyanın

pek çok yerinde izolat sayısının artması ile MRSA infeksiyonlarının hayvanlarda da önemli bir sorun olmaya başladığı görülmüştür (Leonard ve Markey 2008, Morgan 2008).

MRSA suşlarının artık insan ve hayvanlar arasında bulaşabildiği bildirilmektedir (Juhász-Kaszanyitzky ve ark. 2007, Morgan 2008). Hem mastitisli sığırlardan hem de onların bakıcılarından MRSA suşu izole edilmesi, MRSA suşlarının insan ve hayvanlar arasında bulaşabildiği yani zoonotik önemlerinin olabileceğini göstermiştir. Hastane kökenli MRSA klonlarının köpeklerde (Rich ve ark. 2005) ve mastitisli sığır sütlerinde (Türkyılmaz ve ark. 2010) bulunması MRSA suşlarının insanlardan hayvanlara bulaşabildiğini düşündürmüştür. Weese ve ark. hem at çiftliklerinde hem de hastanede tedavi gören atlarda önemli oranlarda MRSA belirlenmiş ve alt tiplendirmede karşılıklı at-insan bulaşını ortaya konulmuştur (Weese ve ark. 2005). Ayrıca Kanada’da yapılan bir çalışmada burada izole edilen bölgesel MRSA suşunun sağlıklı atların nazal mukozalarına iyi adapte ve kolonize olduğu, bu hayvanlarla yakın temas sonrası insanlara bulaşabileceği bildirilmiştir (Willey ve ark. 2006). Duijkeren ve ark 2004 yılında sağlıklı bir köpeğin burnundan ve bir hemşire olan sahibinden aynı MRSA suşunu izole etmişler ve insandan köpeğe MRSA suşunun geçebildiğini yani etkenin humanoz olabileceğini de bildirmişlerdir (Duijkeren ve ark.2004).

Çoklu dirençli MRSA suşlarına bağlı infeksiyonların artması nedeniyle, son 25 yıldır glikopeptid grubu antibiyotiklerden özellikle vankomisin, stafilokokal nozokomiyal infeksiyonların tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. İlk olarak 1995’de Fransa’da (Ploy ve ark. 1998), 1996’da Japonya’da (Hiramutsu ve ark. 1997), 1997’de ABD (CDS 1997), Hong Kong (Mcmanus 1999) ve Kore’de (Mi-Na ve ark. 2000) insanlarda ve Türkiye’de sığırlarda (Türkyılmaz ve ark. 2010) vankomisine orta derecede duyarlı *S. aureus* (VISA) suşlarının izole edilmesi direnç sorununun ne kadar önemli olduğunu göstermiştir. İnsanlarda ilk vankomisine dirençli *S. aureus* (VRSA) suşu, Haziran 2002’de ABD’nde diyaliz tedavisi gören 40 yaşındaki bir erkek hastanın kateter ucundan izole edilmiştir (CDS 2002). VRSA suşları çeşitli ülkelerden gittikçe artan sayıda bildirilmesine karşın, henüz ülkemizde böyle suşların bulunmadığını bildirmişlerdir (Baş Öncül 2006). Ancak Türkiye’de heterojen dirençli suşlar görülmeye başlanmıştır, ilk heterojen direnç (hVISA) suşu 1998 yılında bildirilirken; (Gülay ve ark. 1998) heteroglikopeptit (vankomisin ve teikoplanin) direnci KNS suşlarında, *S. aureus* suşlarına göre daha yüksek oranda (% 11 ve % 13) saptanmıştır (Yaşar ve ark. 2004).

Sonuç olarak; günümüzde MRSA suşlarının oldukça bulaşıcı olmaları, patojenitelerinin yüksek, neden oldukları infeksiyonlarda tedavi seçeneklerinin sınırlı olması, zoonoz ve humanoz olabilmeleri gibi nedenlerden dolayı ciddi bir sağlık sorunu haline geldiği söylenebilir..

1. 2. Stafilokokların Genel Özellikleri

Stafilokoklar *Micrococcaceae* ailesinin üyesi olup, deri ve mukozalarda kolonize olabilen, değişik türleri ile farklı hastalıklar yapabilen önemli bir bakteri cinsidir. Stafilokok cinsi içinde en çok bilineni *S. aureus*'tur. Geçmişte sadece normal flora üyesi olarak kabul edilen KNS türleri günümüzde zararsız etkenler olmadığı bilinmektedir (Taponen ve Pyorola 2009). Klinik örneklerden en sık izole edilen stafilokok türü, bir deri flora üyesi olan *S. epidermidis*'tir (Kawamura ve ark. 1999, Alen ve ark. 2006). Stafilokoklar genelde bulundukları yerde konakla iyi huylu ve simbiyotik bir ilişkiye sahiptirler, ancak deri ve mukozal travma, enjeksiyon veya cerrahi müdahaleler ile dokuya girmesi sonucu patojen olabilirler (Bannerman 2003).

Bergey'in 1986'da yaptığı sistematik bakteriyoloji sınıflamasına göre, *Micrococcaceae* ailesinde *Stomatococcus* ve *Planococcus* ile birlikte yer alan *Staphylococcus* ve *Micrococcus* türleri Gram pozitif, katalaz pozitif koklardır (Alen ve ark. 2008). Bununla birlikte DNA dizi analizi, DNA-rRNA hibridizasyonu, 16S rRNA'nın karşılaştırmalı oligonükleotid analizi *Staphylococcus* ve *Micrococcus* türlerinin yakın ilişkili olmadığını göstermektedir. *Staphylococcus* türleri aynı zamanda *Bacillus*, *Brochothrix*, *Gemella*, *Listeria* ve *Planococcus* ile de nispeten yakın ilişkili bulunmuştur. Bu türler geçici olarak stafilokoklar ile *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus* kümesinin *Bacillaceae* ailesindeki diğer türler ile birlikte sınıflandırılmıştır. Sonraki çalışmalar, mikrobokların oksidaz pozitif olduğunu, G+C oranının (%63–73 mol) yüksek olduğunu, laboratuvar koşullarında stafilokokların tersine furazolidon (100 µg/ml) ve lizostafine (200 µg/ml) dirençli iken, basitrasine (0,04 µg/ml) duyarlı olduklarını göstermiştir (Bannerman 2003, Peacock 2005). Stafilokok türlerinin sınıflandırılması özet olarak Çizelge 1.1'de verilmiştir.

Çizelge 1. 1. Stafilokok türlerinin sınıflandırılması (Todar 1994)

Domain	<i>Bacteriae</i>
Alem	<i>Eubacteria</i>
Bölüm	<i>Firmicutes</i>
Sınıf	<i>Bacilli</i>
Takım	<i>Bacillales</i>
Aile	<i>Staphylococcaceae</i>
Cins	<i>Staphylococcus</i>
Tür (insan ve hayvanlarda hastalık yapan en önemli türler)	<i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i> <i>S. saprophyticus</i> <i>S. haemolyticus</i> <i>S. lugdunensis</i>

Günümüze kadar *Staphylococcus* genusunda 41 tür saptanmıştır (Trülsch ve ark. 2007). Stafilokok türleri DNA/DNA ilişkileri ve fenotipik özelliklerine göre her geçen gün değişmekle birlikte en az dört grup altında toplanabilirler: i) *S. epidermidis* grubu (*S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* ve *S. saccharolyticus* türleri), ii) *S. saprophyticus* grubu (*S. saprophyticus*, *S. cohnii*, *S. xylosus* türleri), iii) *S. simulans* grubu (*S. simulans*, *S. carnosus* türleri), iv) *S. sciure* grubu (*S. sciure*, *S. lentus* türleri) yer almaktadır (Tünger 2004, Tünger ve ark. 2005). *S. aureus*, *S. auricularis*, *S. intermedius*, *S. hyicus* ve *S. caseolyticus* herhangi bir gruba sokulamamıştır.

S. aureus insanlarda ve hayvanlarda stafilokok infeksiyonlarına neden olan en önemli türdür. Fırsatçı patojenler olan *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus* da sıklıkla infeksiyon oluştururken; daha nadiren *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. saccharolyticus*, *S. cohnii* ve *S. simulans* da fırsatçı infeksiyonlara sebep olmaktadır (Bilgehan 2000). Bugüne kadar tanımlanmış olan en önemli stafilokok türleri Çizelge 1. 2.'de gösterilmiştir (Peacock 2005, Alen ve ark. 2006).

Çizelge 1. 2. Bugüne kadar tanımlanmış en önemli stafilokok tür ve alt türleri (Peacock 2005, Alen ve ark. 2006).

Tür	Alt tür	Referans
<i>S.arlettae</i>		Schleifer ve ark. 1984
<i>S. aureus</i>	<i>anaerobius</i>	De la Fuente ve ark 1985
<i>S. aureus*</i>	<i>aureus</i>	Rosenbach 1884
<i>S.auricularis*</i>		Kloos and Schleife 1983
<i>S. capitis*</i>	<i>capitis</i>	Kloos and Schleifer 1975
<i>S. capitis*</i>	<i>ureolyticus</i>	Bannerman and Kloos 1991
<i>S.caprae*</i>		Devriese ve ark. 1983
<i>S. carnosus</i> ¥	<i>carnosus</i>	Schleifer ve Fischer 1982
<i>S. carnosus</i> ¥	<i>utilis</i>	Probst ve ark 1998
<i>S. chromogenes</i> §		Devriese et al. 1978, Hajek ve ark. 1986
<i>S. cohnii*</i>	<i>cohnii</i>	Schleifer ve Kloos 1975
<i>S. cohnii*</i>	<i>urealyticum</i>	Kloos ve Wolfshohl 1991
<i>S.condimenti</i>		Probst ve ark. 1998
<i>S.delphini</i> §		Varaldo ve ark.1988
<i>S.epidermidis*</i>		Winslow ve Winslow 1908; Evans 1916
<i>S.equorum</i> §	<i>equorum</i>	Schleifer ve ark.1984
<i>S.equorum</i> §	<i>linens</i>	Place ve ark.2003
<i>S.felis</i> §		Igimi ve ark. 1989
<i>S.fleurettii</i>		Vernozy-Rozand ve ark.2000
<i>S.gallinarum</i> §		Devriese ve ark.1978
<i>S.haemolyticus*</i>		Schleifer ve Kloos 1975
<i>S.hominis*</i>	<i>hominis</i>	Kloos ve Schleifer 1975
<i>S.homini*s</i>	<i>novobiosepticus</i>	Kloos ve ark.1998
<i>S.hyicus</i> §		Sompolinski 1953, Devriese ve ark. 1978
<i>S.hyicus</i>	<i>chromogenes</i>	Devriese ve ark. 1978
<i>S.intermedius</i>		Hajek 1976
<i>S.kloosii</i> ¥		Schleifer ve ark.1984
<i>S.lentus</i> §		Kloos et al.1976, Schleifer ve ark 1983
<i>S.muscae</i>		Hajek ve ark. 1992
<i>S.pasteuri*</i>		Chesneau ve ark.1993
<i>S.piscifermentans</i> §		Tanasupawat ve ark.1992
<i>S.saccharolyticus*</i>		Kilpper-Balz ve Schleifer 1981
<i>S.saprophyticus</i>	<i>bovis</i>	Hajek ve ark. 1996
<i>S.saprophyticus*</i>	<i>saprophyticus</i>	Shaw ve ark.1951
<i>S.schleiferi*</i>	<i>coagulans</i>	Igimi ve rak. 1990
<i>S.schleiferi</i>	<i>schleiferi</i>	Frenay ve ark.1988
<i>S.sciuri</i>	<i>carnaticus</i>	Kloos ve ark. 1997
<i>S.sciuri</i> §	<i>lentus</i>	Kloos ve ark1976
<i>S.sciuri</i> §	<i>rodentium</i>	Kloos ve rak 1997
<i>S.sciuri</i> §	<i>sciuri</i>	Kloos ve ark 1976
<i>S.simulans*</i>		Kloos ve Schleifer 1975
<i>S.succinus</i>	<i>casei</i>	Place ve ark. 2003
<i>S.succinus</i>	<i>succinus</i>	Lambert ve ark. 1998
<i>S.vitulinus</i> §		Webster et ve ark. 1994
<i>S.warneri*</i>		Kloos ve Schleifer 1975
<i>S.xylosus*</i>		Schleifer ve Kloos 1975

* İnsanlarda ve insan dışı primatlarda bulunanlar

¥ Diğer hayvanlarda bulunanlar

§ Daha çok doğa ve toprakta bulunanlar

1. 3. Morfolojik ve Kimyasal Özellikleri

1. 3. 1. Görünüm ve Boyanma

Stafilokoklar; 0,5–1,5 µm çapında, Gram pozitif, yuvarlak, hareketsiz, sporsuz mikroorganizmalardır. Zorunlu anaerop olan *S. saccharolyticus* ve *S. aureus subsp. anaerobius* dışında fakültatif anaerop olup çoğunlukla aerop üremeyi tercih ederler. Genellikle katalaz pozitif (*S. saccharolyticus*, *S. aureus subsp. anaerobius* hariç), oksidaz negatif (*S. sciuri*, *S. lentus* ve *S. vitulinus* hariç), kapsülsüz mikroorganizmalardır. Katı besiyerinde bölünebilme özellikleri nedeni ile mikroskopta çoğunlukla düzensiz kümeler (üzüm salkımı) oluştururlar. Pürülan örnek içinde, infekte vücut sıvılarında veya sıvı besiyerlerinde morfolojik özellikleri üçlü-dörtlü kısa zincir yapan koklar şeklinde değişebilir. Bu görünimleri ile streptokoklara benzeyen stafilokoklar, katalaz testinin pozitif olması ile ayırt edilirler (Bannerman 2003, Peacock 2005).

1. 3. 2. Üreme ve Kültür Özellikleri

Kanlı agar, nutrient agar, triptik soy agar veya beyin kalp infüzyon agar gibi besiyerlerinden izole edilen stafilokok türlerinin çoğunluğu 30-37°C’de 18–24 saat içinde 1–3 mm çapında koloni oluştururlar. *S. aureus* kolonileri 18–24 saatte pigmenti (krem rengi, sarı-portakal rengi), S tipi, yuvarlak, hafif kabarık ve çoğunluğu kanlı agarda beta hemoliz yapan koloniler oluşturur. Belirgin kapsül oluşturan suşlar parlak ve ıslak görünüme sahip olabilir. *S. aureus*’un kanlı besiyerinde küçük, pigmentsiz ve hemoliz oluşturmayan koloniler şeklinde üreyen küçük koloni varyantları tanımlanmıştır. (Bannerman 2003, Peacock 2005, Morgan 2008). KNS kolonileri ise hafif konveks kabarık, S tipi, parlak ve genellikle pigmentsizdir. Ayırt edici besiyeri olan mannitol salt agarda (MSA) yüksek yoğunlukta tuz varlığında üreyebilen stafilokoklardan olan *S. aureus*, diğer stafilokoklardan mannitolü fermente ederek 48–72 saat inkübasyon sonucunda koloniler etrafında sarı hale oluşturmalarıyla ayrılır. Fakat diğer bazı stafilokoklar (Örn. *S. saprophyticus*) da mannitolü fermente ederek benzer koloniler oluşturabilir.

Kuvvetli slaym tabakası oluşturan nadir türler mukoid koloni morfolojisi gösterirler. *S. haemolyticus* kolonileri genellikle *S. epidermidis* ve *S. hominis*

kolonilerinden büyüktür. *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus* suşlarının bazılarında beta hemoliz görülebilir (Bannerman 2003, Alen ve ark. 2006).

1. 3. 3. Biyokimyasal Özellikleri

Stafilokok identifikasyonunda en önemli test koagulaz testidir. Bugün *S. aureus* identifikasyonu için tüp koagulaz testi referans yöntem olarak kabul edilmektedir. Stafilokoklar glukozu fermentatif olarak parçalar ve son ürün olarak laktik asit oluştururlar. Ayrıca laktoz, sükroz, mannoz, trehaloz ve maltozu da fermente edebilirler. Mannitolü ise sadece *S. aureus* fermente eder (Juhász-Kaszanyitzky ve ark. 2007, Morgan 2008).

Stafilokokların çoğunluğu % 7,5–10 NaCl içeren basit besiyerlerinde üreyebilirler. Suşların en uygun üreme ısıları 30–37°C ve pH 7–7,5 arasındadır. Furazolidon ve lizostafine duyarlı olmalarına karşın, basitrasin ve lizozime direnç gösterirler. Nitratları nitritlere indirgerler. *S. aureus* ısıya ve kuruluğa dayanıklıdır. Stafilokoklar dezenfektan ve antiseptiklere duyarlıdır. Kuarternier amonyum klorür bileşikleriyle etkin bir şekilde dezenfekte edilebilir ayrıca alkol ve iyot gibi antiseptiklere de oldukça duyarlıdır (Bannerman 2003, Alen ve ark. 2006).

1. 3. 4. Genom Yapısı

Genomu yaklaşık 2000–3000 kbp bir kromozom ile profajlar, plazmidler ve transpozonlardan oluşur. Stafilokokların DNA'larındaki G+C oranı % 30–39'dur (Tünger 2004, Peacock 2005).

S. aureus genomu, 2500 yakın geni kodladığı düşünülen 2800 kbp uzunluğunda tek bir kromozomdan oluşup, G+C içeriği yaklaşık % 32 dir. *S. epidermidis*'in genomu, 2500 kbp uzunluğundaki bir kromozom ve çeşitli sayıdaki plazmidlerden oluşur. Bu türler % 32'lik G+C içeriğine sahiptir ve 2400–2500 kodlanmış sekans içermektedir (Baba ve ark. 2002, Holden ve ark. 2004, Gill ve ark. 2005). Stafilokokların genomu yaklaşık 2800 baz çiftli sirküler bir kromozomdan oluşur ve buna ek olarak profajlar, plazmidler ve transpozonlardan oluşur. Bakterinin virulansından ve direncinden sorumlu olan genler diğer *S. aureus* kökenlerine, başka stafilokok türlerine ve farklı cins Gram-pozitif bakterilere en sık aktarılma yolu transdüsiyondur (Tünger 2004).

1. 3. 5. Virulans ve Patojenite

Stafilokok türleri pek çok hücrel komponent, enzim, ekstrasellüler toksin ve hemolizin üreterek konak hücrede tahribata sebep olmaktadır. *S. aureus*'da bulunan kalın peptidoglikan tabaka virulense katkıda bulunmaktadır. Peptidoglikan tabaka aynı zamanda beyaz kan hücrelerin agregasyonu ve komplement sistemini aktivasyonu ile sonuçlanan makrofajlar tarafından çeşitli sitokinlerin salgılanmasını da uyarır. *S. aureus* aynı zamanda özellikle MRSA suşlarında bulunan 5 serotip içeren mikrokapsül de salgılamaktadır (Lowy 1998).

S. aureus iki yolla enfeksiyona neden olur. Ya vücuda konağın endovasküler hasarlı noktalarından girer, beyaz kan hücresi-fibrin-trombosit kompleksi oluşturur ve “microbial surface component reacting with adherence matrix molecules” (MSCRAMM) denilen moleküller olarak tanımlanan yüzey molekülleri yoluyla yapışır ya da endotel hücrelere adezin-reseptör etkileşimi yoluyla yapışabilir ya da fibrinojen gibi serum proteinleri yolu ile köprüler oluşturarak bağlanabilir (Todar 2005). Stafilocoklar konak hücreye girdikten sonra bağışıklık yanıtta görev alan hücreler tarafından fagosit edilirler. Stafilocokların kan dolaşımında bulunması bakteriyemi ile sonuçlanır, etkenin çeşitli proteolitik enzimleri ve toksinleri salgılayarak komşu dokulara yayılmasını kolaylaştırır (Timbury ve ark. 2002). Genelde önce kolonizasyon, ardından enfeksiyon meydana gelir.

S. aureus mukozalara veya epitelyal tabakaya penetre olduğu zaman peptidoglikan tabaka, teikoik asit ve protein A gibi hücre duvarı komponentleri ve ekstrasellüler ürünleri aracılığıyla konakta kemotaksis ve fagositoz yanıtları oluşur. Opsonizasyonun ardından fagosit edilen stafilocoklar fagositer vakuoller içinde hızla öldürülür. Bu öldürme işleminde hidrojen peroksit, süperoksit ve diğer reaktif radikaller ile fagositler içindeki düşük pH, laktoferrin ve granuler katyonik proteinler görev alır. Ancak bazı durumlarda *S. aureus* fagositer hücreler içinde de yaşamını sürdürebilir veya konağa ait diğer savunma mekanizmalarında bozukluklar ya da yetersizlikler nedeniyle sık tekrarlayan, invazif *S. aureus* enfeksiyonları oluşabilir. İnfekte endotel hücreler enfeksiyona karşı immun yanıtın bir parçası olan nekroz ve apse oluşumu ile sonuçlanan doku nekroz faktörü üretirler (Tünger 2004, Moreillon ve ark. 2005). Stafilocokların en önemli virulens faktörleri aşağıda özetlenmiştir:

1. 3. 5. 1. Kapsül

S. aureus'un özellikle mukoid türlerinde polisakkarid yapıda bir mikrokapsül bulunmaktadır. Bu ekzopolisakkarit, bakteriyi fagositozdan korur ve konak hücrelerine özellikle de kateterler gibi yabancı cisimlere adherensini kolaylaştırır. Stafilokoklarda 11 mikrokapsüler polisakkarit serotipi tanımlanmıştır. *S. aureus* suşlarının % 70-80'inde tip 5 ve tip 8 kapsül serotiplerine rastlanmıştır (Moreillon 2005, Peacock 2005). Penisiline dirençli *S. aureus* suşlarının büyük çoğunluğu tip 5 kapsül içerirken, toksik şok sendromu toksini üreten suşların çoğunda tip 8 kapsül bulunmaktadır (Moreillon 2005, Peacock 2005, Alen ve ark. 2006).

1. 3. 5. 2. Hücre Duvarı

1. 3. 5. 2. 1. Peptidoglikan Tabaka: Hücre duvarının esas yapısını oluşturan, hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilerde bulunan karmaşık bir makromoleküldür. Stafilokoklarda peptidoglikan tabaka hücre duvarı kuru ağırlığının yaklaşık % 50-60'ını oluşturur. İnsan hücrelerinde bulunmayıp bakteri hücresinde bulunduğundan antibakteriyel ilaçlar için iyi bir hedef oluşturmaktadır. Bu tabaka üç bölümden oluşur. Bunların ilki β 1-4 glikozid bağları ile bağlanan N-asetil glukozamin (NAG) ve N-asetil muramik asit (NAMA) alt gruplarından oluşan disakkarid yapısıdır. İkinci tabaka N-asetil muramik asite bağlı D ve L aminoasitlerinden oluşmuş pentapeptid zincirdir. *S. aureus*'da NAMA'ya bağlanan pentapeptid yapısı sırası ile; L-alanin, D-glutamik asit, L-lizin, D-alanin, D-alanin şeklindedir. Son tabaka da ise NAMA'ya bağlı olan pentapeptid yan zincirleri, pentaglisin köprüleri ile bir zincirde D-alanin ile diğer zincirdeki L-lizin arasında olacak şekilde birbirlerine çapraz bağlanır. Çapraz bağlar hücre duvarının sağlamlılığı ile yakından ilişkilidir ve bu bağların yapısı türler arasında farklılık gösterir. *S. aureus*'da çapraz bağlantı oranı yüksektir ve bu özellik bakterinin lizozim enzimine karşı dirençli olmasını sağlar (Ünal 2004, Lodise ve ark. 2005). Transglikozilaz disakkarid pentapeptidlerin birbirlerine bağlanmalarını, transpeptidaz pentapeptid köprüleri oluşturarak peptidoglikan yapının retiküler bir yapı kazanmasını ve D-karboksiptidaz pentapeptid yapı içindeki son D-alaninin zincirden ayrılmasına neden olur. Beta-laktam antibiyotikler, peptidoglikan sentezini, spesifik olarak karboksiptidaz ve özellikle de transpeptidazları inhibe ederek durdururlar. Bu enzimlere penisilin bağlayan proteinler

(PBP) adı verilir, çünkü inhibisyon beta-laktam antibiyotiklerin bu enzimlere bağlanması sonucu gelişir (Ünal 2004, Lodise ve ark. 2005, Moreillon ve ark. 2005).

Stafilokokların peptidoglikan tabakası; makrofajlardan sitokin salınımını uyarır, komplemanın aktivasyonuna yol açar ve trombosit agregasyonuna neden olur. Ayrıca monositlerden IL-1 salınımını uyararak polimorfonükleer lökositlerin infeksiyon bölgesine toplanmalarına ve sonuçta apse oluşumuna da yol açar. Ter, gözyaşı ve lökositlerde bulunan lizozim (muramidaz) enziminin hedefi stafilokok ve diğer Gram pozitif bakterilerin peptidoglikan tabakasının β 1-4 bağlarıdır. Stafilokoklardaki pentaglisin köprülerinin lizostafin enzimine özgül bir duyarlılığı vardır (Ünal 2004, Lodise ve ark. 2005, Moreillon ve ark. 2005).

1. 3. 5. 2. 2. Teikoik Asit: Teikoik asit, suda eriyebilen, fosfodiester bağları ile bağlanarak uzun zincirler oluşturan şeker-alkol-fosfat polimerleridir. Peptidoglikan tabakasındaki N-asetil muramik asit molekülüne fosfodiester bağlarıyla kovalent olarak bağlanmıştır. Hücre duvarı kuru ağırlığının yaklaşık olarak % 30-50'sini oluşturur. Kalınlığının yaklaşık 10- 12 nm arasında olduğu belirlenmiştir. İki tiptir; bunlar ribitol teikoik asit ve gliserol teikoik asittir. Teikoik asit; *S. aureus*'da özgün ribitol (5-karbon monosakkarid) fosfat polimeri yapısında iken, *S. epidermidis*'de gliserol fosfat yapısındadır. Sadece Gram pozitif bakterilerin hücre duvarında bulunan bu yapı hücre yüzeyine negatif yük vererek, çeşitli metal iyonlarının, katyonların lokalizasyonunda ve otolitik enzimlerin aktivasyonunda rol oynar. Stafilokokların türe özgü antijenleri teikoik asitlerdir. Mukozalarda bulunan özgül reseptörleri (fibronektin, fibrinojen, laminin, trombospondin, vitronektin, elastin, sialoprotein ve kollojen) ile birleşerek stafilokokların konağa adherensini sağlar (Ünal 2004, Lodise ve ark. 2005, Moreillon ve ark. 2005).

1. 3. 5. 2. 3. Yüzey Proteinleri: Protein A, elastin, kollajen, fibronektin bağlayan proteinler ve kümeleşme faktörü (clumping faktör) kimyasal yapıları ve hücre duvarı yerleşimleri birbirlerine benzeyen stafilokoksik yüzey proteinleridir. Bu proteinler stafilokokların konak dokularında kolonize olmasında en önemli faktörlerdir (Cengiz ve ark. 1999, Tünger 2004, Peacock 2005, Alen ve ark. 2006). Protein A, 42 kilo dalton ağırlığında olup bu grubun prototipidir. İlk olarak 1940'da Wervey tarafından tanımlanmıştır. Büyük bir kısmı peptidoglikan yapıya kovalent olarak bağlanmıştır. Bir kısmı ise hücre dışı ortama salınmaktadır (Moreillon ve ark. 2005, Peacock 2005, Alen ve

ark. 2006). En önemli özelliği IgG3 dışındaki tüm IgG ve IgA2 ile bazı IgM'lerin Fc reseptörleri ile birleşebilmesidir. Bu nedenle protein A'nın antikomplemanter ve antifagositer etkinliği vardır (Cengiz ve ark. 1999, Alen ve ark. 2006).

1. 3. 5. 3. Enzimler

1. 3. 5. 3. 1. Katalaz: Tüm stafilokoklar (*S. saccharolyticus* ve *S. aureus subsp. anaerobius* hariç) tarafından üretilen toksik hidrojen peroksidi (H₂O₂), toksik olmayan oksijen ve suya ayrıştıran bir enzimdir. Bakteriler, bu enzim sayesinde fagositlerin içinde toksik oksijen radikalleri tarafından öldürülmeye direnç kazanırlar (Alen ve ark. 2006).

1. 3. 5. 3. 2. Koagülaz: Stafilokoklar tarafından üretilen bir plazma pıhtılaşma proteindir. İki tip koagülaz bulunur; serbest koagülaz ve bağlı (clumping factor) koagülazdır. Bu enzimlerin farklı mekanizmalarla plazmayı pıhtılaştırdıkları belirlenmiştir.

Koagülaz testi lam yöntemiyle bağlı, tüp yöntemiyle serbest koagülazın tayini için kullanılır. Lam koagülaz testi negatif olan stafilokoklar için mutlaka tüp koagülaz testi de uygulanmalıdır. Koagülaz negatif türlerde var olan “clumping faktör” nedeniyle testin pozitif olabileceği de unutulmamalıdır. Koagülaz pozitif olan diğer stafilokoklar; *S. intermedius*, *S. lugdunensis*, *S. hyicus*, *S. delphini*, *S. lutrae* ve *S. schleiferi subsp.*'dir. Bugün *S. aureus* identifikasyonu için tüp koagülaz testi referans yöntem olarak kabul edilmektedir. Koagülaz pozitif stafilokokların (KPS) üzerinde oluşan kalın fibrin tabakasının, mikroorganizmayı fagositoza karşı koruyarak, patojenliğe katkı sağladığı ileri sürülmektedir (Cengiz ve ark. 1999, Alen ve ark. 2006).

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

1. 3. 5. 3. 4. Lipaz: *S. aureus* suşlarının tümü ve KNS'ların yaklaşık % 30'undan fazlası lipaz enzimi üretir. Lipaz, yağları hidrolize ederek vücudun lipid içeren bölgelerinde stafilokokların yaşamasını sağlamak ve yüzeyel dokuları invaze ederek

fronkül ve karbonkül gibi infeksiyonlarının gelişimine neden olmaktadır (Cengiz ve ark. 1999, Alen ve ark. 2006).

1. 3. 5. 3. 5. Hiyalüronidaz: Konak bağ dokusu matriksinde asit mukopolisakkaritlerden olan hiyalüronik asiti parçalayarak mikroorganizmanın kolayca yayılmasını sağlar. Antijenik özelliğe sahip bir enzimdir. *S. aureus* suşlarının % 90'dan fazlası hiyalüronidaz oluşturur (Cengiz ve ark. 1999, Alen ve ark. 2006).

1. 3. 5. 3. 6. Fibrinolizin (Stafilokinaz): Stafilokoklar tarafından ortama salınan kinazlar, plazmada bulunan plazminojeni aktive ederek plazmin oluşturur. Fibrinolitik etki ile fibrini parçalayarak organizmanın yayılmasına yardımcı olur (Alen ve ark. 2006).

1. 3. 5. 3. 7. Fosfatidilinozitol – Spesifik Fosfolipaz C: Özellikle erişkin tip solunum zorluğu sendromu ve dissemine intravasküler koagülasyon bulunan hastalardan izole edilen suşlarda saptanan bir enzimdir. Bu suşlar antimikrobiyal ajanlara özellikle de penisiline daha dirençlidir (Alen ve ark. 2006).

1. 3. 5. 3. 8. Deoksiribonükleaz: DNaz enzimleri endo ve ekzonükleaz aktivitesine sahip, nükleik asitleri 3'-fosfomononükleotidlere parçalayan fosfodiesterazlardır. *S. aureus* suşlarının % 90'dan fazlasında bulunur. Isıya dirençli bir enzimdir (Alen ve ark. 2006).

1. 3. 5. 3. 9. Beta-laktamaz: Stafilokoklar salgıladıkları beta-laktamaz enzimi ile penisilin grubu antibiyotiklerdeki beta-laktam halkasının hidroksil grubunu parçalayarak etkisizleştirir. Genetik taşınma plazmid ve transpozonlarla sağlanır (Bannerman 2003, Peacock 2005, Alen ve ark. 2006).

1. 3. 5. 4. Toksinler

1. 3. 5. 4. 1. Sitolitik Toksinler: Stafilokoklar, konak hücre morfolojisini ve/veya fonksiyonunu etkileyen çok sayıda ekstrasellüler toksin üretebilir. Bu toksinler sayesinde stafilokoklar yoğun inflamatuvar yanıt olan bölgelerde üremelerini sürdürebilirler. Bunlardan en iyi tanımlananları hemolizinler ve lökositindir (Cengiz ve ark. 1999).

1. 3. 5. 4. 2. Hemolizinler

Hemolizinler, çeşitli hayvan eritrositleri üzerinde hemolitik etki yapıp yapmamalarına, hemoliz için gerekli ısı derecesi ve zamana, toksisite derecelerine bağlı olarak ayrımlar gösterirler. Bu toksinler dört tiptir.

1. 3. 5. 4. 2. 1. Alfa hemolizin (Alfa Toksin): En güçlü membran hasar proteini olup 33 kDa ağırlığındadır. *S. aureus* suşlarının ana hemolizindir. Bakteriyel kromozomlarda ve plazmidlerde kodlanır. Tavşan eritrositleri için hemolitik aktivitesi yüksektir. İnsan makrofaj ve trombosit hücre membranları üzerinde litik etkiye sahiptir fakat monositlere etkisizdir. Hemolitik, dermonekrotik ve sitolitik etkileri vardır. Formol ile toksoid haline getirilebilir (Cengiz ve ark. 1999, Moreillon 2005, Peacock 2005, Alen ve ark. 2006).

Bazı alfa-hemolizinler diğer hücrelere ek olarak lökositleri de eritebilir ve lökositin ya da Panton-Valentine Toksin (PVL) olarak adlandırılır. Diğer hemolizinler kromozom üzerinde kodlanmıştır ve çoğu *S. aureus* suşunda bulunur. PVL toksini ise alfa-hemolizinin bir homologudur, mobil bir faj üzerinde kodlanır ve transfer edilebilir. PVL, özellikle Toplum Kökenli-Metisilin Dirençli *S. aureus* (TK-MRSA)'a bağlı toplum kökenli cilt ve yumuşak doku infeksiyonları ile akut nekrotizan pnömonilerden izole edilen *S. aureus* suşları tarafından salgılanan önemli bir virulans faktörüdür (Moreillon 2005). PVL, birbirlerini sinerjik olarak etkileyen F (fast) ve S (slow) adında iki protein komponentinden oluşmuş bir ekzotoksin olup; konak lökositlerinin membranlarında porlar oluşturarak bu hücrelerin erimesine neden olmaktadır. Bunların moleküler ağırlıkları 32 ve 35 kDa'dur. Her biri iyi antijen yapısında olup her birinden ayrı toksoid oluşturulur. Toksin aktivitesi için bu alt birimlerin her ikisi de gereklidir. Toksin, hücre zarında potasyum ve diğer kanyonlara karşı geçirgenliği artırıcı gözeneklerin açılmasını sağlayarak etkili olur. Lökositler ve makrofajlar üzerine litik etkisi vardır. Lökositler tarafından fagosite edilseler de lökositin üreten stafilokoklar hücre içerisinde üremeye devam ederler. Bu toksini bulunduran türlerin infeksiyonlarında hızlı ilerleme, kanama ve nekrotizan pnömoni tablosu görülmektedir (Cengiz ve ark. 1999, Moreillon 2005, Peacock 2005, Alen ve ark. 2006). PVL sentezleyen suşlar tarafından oluşturulan infeksiyonlar daha şiddetli seyretmekte, hatta akut nekrotizan pnömonilerde olduğu gibi ölümle sonuçlanabilmektedir. Özellikle toplum kökenli suşlar tarafından sentezlenmekle birlikte, yapılan çalışmalar PVL-pozitif *S. aureus* suşlarının hastanelerde yayılabildiğini, hatta hastane kaynaklı

salgınlara neden olabildiğini göstermektedir. *S. aureus* izolatları arasında ortalama olarak %2–10 arasında PVL pozitifliği bildirilmektedir (Lina ve ark. 1999, Morgan 2008).

1. 3. 5. 4. 2. 2. Beta Hemolizin (Beta Toksin): Stafilokokal sfingomyelinaz olup 35 kDa ağırlığındadır. En iyi koyun eritrositlerine, daha az olarak da insan ve tavşan eritrositlerine litik etki gösterir. Toksinin en önemli özelliği sıcak-soğuk lizis yapabilme yeteneğidir. Eritrositler üzerindeki etkisi soğukla artar. Fibroblast ve lökosit hücrelerine de toksik etki gösterir. Antijeniktir, antitoksini ile nötralize olur ve formol ile toksoide haline getirilebilir (Cengiz ve ark. 1999, Moreillon 2005, Peacock 2005, Alen ve ark. 2006).

1. 3. 5. 4. 2. 3. Gama Hemolizin (Gama Toksin): İnsan eritrositleri üzerine orta derecede etkilidir. Tavşan ve koyun eritrositleri duyarlıdır. Özellikle stafilokokal kemik infeksiyonlarında kanda bu toksine karşı antikor düzeyinin yüksek bulunması, toksinin bu hastalıklarda etkili olduğunu düşündürmektedir (Cengiz ve ark. 1999, Moreillon 2005, Peacock 2005, Alen ve ark. 2006).

1. 3. 5. 4. 2. 4. Delta Hemolizin (Delta Toksin): Hücre membran bütünlüğünü bozar ve adenilat siklazı aktive ederek cAMP salınımına neden olur. Bu enzimatik aktivite, Stafilokokal Toksik Şok Sendromu (STSS) ve stafilokokal besin zehirlenmesinde rol oynar. İnsan, tavşan ve maymun eritrositlerine etkilidir. Ayrıca, lökosit, makrofaj, lenfosit ve trombositleri de hasara uğratar. Alfa ve delta toksin insanda hastalık oluşturan stafilokok suşlarında en çok bulunanlardır. *S. aureus* suşlarının % 95'inde bunlardan biri veya diğeri bulunurken, % 82'inde her ikisi de birlikte bulunabilmektedir (Cengiz ve ark. 1999, Moreillon 2005, Peacock 2005, Alen ve ark. 2006).

1. 3. 5. 4. 3. Enterotoksin: Isıya dirençli, 100°C'ye 30 dakika dayanabilen, polipeptid yapısında maddelerdir. Enterotoksinin A, B, C1, C2, C3, D, E ve F olmak üzere sekiz immünolojik tipi vardır. Enterotoksin; makrofaj ve yardımcı T hücrelerinden, sırasıyla IL-1 ve IL-2 salınımını uyarıp, sindirim kanalında süper antijen olarak davranır. *S. aureus* suşlarının % 35-50'inin bu toksinleri oluşturabildiği saptanmıştır. A ve D besin zehirlenmelerinde sık karşılaşılan toksinlerdir (Moreillon ve ark. 2005, Alen ve ark. 2006).

1. 3. 5. 4. 4. Eksfoliyatif Toksin (Eksfoliyatin): Epidermolitik bir toksindir. Stafilokokal infeksiyonların veziküler ve eksfoliyatif deri lezyonlarından sorumludur. Antijenik ve biyokimyasal özelliklerine göre iki tipe ayrılır. Eksfoliyatif toksin A; ısıya

duyarlı ve plazmid orjinlidir, eksfoliyatif toksin B ise ısıya dirençli ve yapısal geni kromozomaldır. Bu iki protein yapısal olarak farklı olmasına rağmen benzer biyolojik aktiviteye sahiptir. Stafilokokal Haşlanmış Deri Sendromu (SSSS)’ndan sorumludur (Moreillon ve ark. 2005, Alen ve ark.2006).

1. 3. 5. 4. 5. Toksik Şok Sendromu Toksini-1 (TSST-1): TSST-1; sistemik olarak salınır ve toksik şok sendromuna neden olur. Süper antijen olarak davranır. T lenfosit proliferasyonu ve monositlerden IL-1 salınımını uyarır. *S. aureus* suşlarının %5-25’i TSST-1 geni taşır. Son yıllarda KNS’lara bağlı toksik şok sendromu da bildirilmiştir (Dinges ve ark. 2000, Moreillon ve ark. 2005, Alen ve ark. 2006). *S. aureus* tarafından üretilen toksik komponent ve toksinlerin özeti Çizelge 1. 3.’de özetlenmiştir.

Çizelge 1. 3. *S. aureus* tarafından üretilen toksik komponent ve toksinler (Timbury ve ark. 2002).

Toksin	Etki
Hemolizinler (α , β , γ)	Sitolitik: çeşitli hayvan türlerinde eritrositlerin lizisi
Koagulaz	Plazmayı pıhtılaştırır. Laboratuarlarda KPS ve KNS türlerinin ayırımında kullanılır
Fibrinolizin	Fibrinin sindirimi
Lökositin	Lökositlerin tahribi
Hiyaluronidaz	Hiyaluronik asidin parçalanması
DNA’sı	DNA hidrolizi
Protein A	Lipolitik
Kapsül	Antifagositik
Epidermolitik toksin	Epidermal yayılma ve eksfoliatin
Enterotoksinler	Kusma ishale sebep olan gıda zehirlenmesi
Toksik Şok sendrom Toksini	Şok, deri döküntüsü

1. 4. Epidemiyoloji

MRSA özellikle 1980’lerin başından itibaren önemli bir klinik ve epidemiyolojik sorun olarak ortaya çıkmıştır (Haddadin ve ark. 2002, Moreillon 2005, Dündar ve ark. 2008). İnsanda hastalık etkeni olan stafilokoklar cilt ve mukozal yüzeylerde; anterior burun mukozası, nazofarinks, perineal bölgede kolonize olurlar. Çalışmalar anterior burun deliklerinin en sık kolonize olan bölge olduğunu göstermiştir (Kluytmans ve Wertheim 2005).

Üç tip *S. aureus* taşıyıcılığı gösterilebilir: sağlıklı bireylerin %10-35’i sürekli taşıyıcıdır ve bir suşu her zaman taşırlar, %20–75 aralıklı taşıyıcı iken %5–50 oranında kişi

neredeyse hiçbir zaman taşıyıcılık göstermez. Sürekli taşıyıcılarda bakteri yükü daha fazladır ve bu yüzden bunlarda infeksiyon gelişme riski daha yüksektir. Sürekli taşıyıcılık çocuklarda erişkinlerden daha fazladır ve çoğu kişide 10–20 yaşlar arasında aralıklı taşıyıcılığa dönüşür (Kluytmans ve Wertheim 2005).

Nazal taşıyıcılığı etkileyen başka faktörler de vardır. Bunlar *S. aureus*'un hücre duvarında bulunan lipoteikoik asit ve bazı yüzey proteinleri, viral infeksiyonlar sırasında burun epiteline adheransın artması, bazı insan lökosit antijen (HLA) tipleri (DR3 gibi), yaş, ırk, genetik yapı, immunolojik durum, kadınlarda hormonal durum ve hastanede yatış gibi durumlardır (Nouven ve ark. 2001). *S. aureus* kolonizasyonu genelde genetik özelliklerle ilişkilendirilirken, MRSA için kolonizasyon ve infeksiyon açısından en önemli risk faktörleri, yaş, altta yatan hastalıklar, yabancı cisimler olarak belirlenmiştir. Ayrıca MRSA infeksiyonu açısından burun taşıyıcılığı, antibiyotik kullanımı fazlalığı ve uzun süreli hastanede kalma da önemli risk faktörleri olarak gündeme gelmektedir (Çetinkya ve ark. 1999).

S. aureus taşıyıcılığının özellikle hastane kaynaklı infeksiyonların patogenezi ve epidemiyolojisinde anahtar rol oynadığı bilinmektedir. Hastadan hastaya bulaşmada sağlık çalışanlarının elleri en önemli araçtır. İnfeksiyonlar genellikle kolonize suşun cilt veya mukozal yüzeylere olan travma sonucu normalde steril olan bölgelere girişi ile gelişir. Fakat bu travma genelde fark edilemeyecek kadar küçüktür (Forbes ve ark. 2002). Hastanede uzun süreli yatış öyküsü, yoğun antibiyotik kullanma, yanık ünitesinde tedavi görme, yoğun bakım servislerinde kalma, intravasküler kateter varlığı, cerrahi girişim geçirme öyküsü, MRSA ile kolonize veya infekte hasta ile temas ve aynı ailede sağlık alanında çalışan kişi varlığı MRSA infeksiyonu için başlıca risk faktörlerini oluşturmaktadır (Moreillon ve ark. 2005, Dündar ve Dündar 2008, Kluytmans 1997). Nozokomiyal infeksiyonların en sık etkenlerinden biri olan MRSA suşlarının esas kaynağı infekte veya kolonize hastalar ile birlikte sağlık personelleridir. MRSA suşları özellikle sağlık personellerinin elleri ile diğer hastalara yayılmaktadır. Hastaların başka nedenlerle antibiyotik almaları kolonizasyon riskini çok fazla artırmaktadır. Hava yoluyla bulaş, yoğun bakım servislerinde pnömoni olgularında ve yanık ünitesi birimlerinde önem kazanmaktadır (Kluytmans 1997, Peacock 2005 ve Dündar ve Dündar 2008). Aynı zamanda hastane personelindeki taşıyıcılığın da esas olarak hasta bakımı sırasında elde edildiği bildirilmektedir. Türkiye’de farklı illerde yapılan çalışmalarda farklı oranlarda

burun taşıyıcılığı bildirilmiştir. Elazığ'da sağlık çalışanlarındaki MRSA burun taşıyıcılığı %35'i MRSA, %59,3 MRKNS olarak (Çelik ve ark. 2005) bildirilmiştir. Kütahya'da 3048 kişiye alınan burun örneklerinden 217'sinde nazal *S. aureus* taşıyıcılığı, bunlarında 17 tanesinde metisilin direnci bulunmuştur (Gülbandılar 2009). Genel popülasyonda ortalama %33 olan taşıyıcılık, sağlık çalışanlarında %50-90'a ulaşmaktadır. Ülkemizde yapılan bir çalışmadaki sonuçlar ülkemizde merkezlere göre değişkenlik göstermekle birlikte hastane personelinin yaklaşık 1/3'ünde taşıyıcılık olabileceğini göstermesi açısından önemlidir (Kaleli ve ark. 1997).

Son yıllarda TK-MRSA infeksiyonları da giderek önem kazanmaya başlamıştır. TK-MRSA infeksiyonları sağlıklı kişilerde, özellikle çocuk ve genç erişkinlerde görülür. Çoğunluğu PVL toksini taşıyan bu suşlar daha çok deri-yumuşak doku infeksiyonları ve pnömoniye yol açarlar (Malteou ve Giamarellou 2006, Boyle-Vavra Daum 2007). Başta *S. epidermidis* olmak üzere KNS'lar son yıllarda hastane infeksiyonlarının önemli etkenleridir. Bu durumun nedeni normal flora bakterileri olmaları ve invazif girişimler sonucu kolayca alınabilmeleridir. İnsanlarda en fazla patojen olanlar *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus*'tur. Bunu *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis*, *S. hominis* ve *S. schleiferi* izlemektedir. *S. epidermidis* infeksiyonlarının büyük çoğunluğu hastane kökenli iken, *S. saprophyticus* infeksiyonları genellikle toplum kökenlidir (Archer 2005, Dündar ve Dündar 2008).

KNS'ların neden olduğu infeksiyonlarında lizin üretimi ve slaym yapımı önemli patojenite faktörlerindendir. Peritonitte de en sık etken *S. epidermidis* olup bunu *S. haemolyticus* izler. *S. epidermidis* göz cerrahisi sonrasında gelişen infeksiyonların en önemli nedenlerindendir. *S. saprophyticus* ise özellikle akut üriner sistem infeksiyonu etkenleri arasında *Escherichia coli*'den sonra ikinci sırayı alır (Kloos ve Bannerman 1994, Archer 2005, Dündar ve Dündar 2008).

Metisiline dirençli yada duyarlı olan *S. aureus*'lar, hayvanlarda sistemik ve lokal çeşitli infeksiyonlara neden olmaktadır. Bu hastalıklar; pnömoni, rinitis, bakteriyemi, septik artiritis, osteomyelitis, omphalophlebitis, metritis, mastitis, fistül, abse, dermatitis, pyoderma ve postoperatif yara enfeksiyonları şeklinde görülmektedir (Lee 2003, Goni 2004, Leonard 2006). İnsanlarda deri ve yumuşak doku, dolaşım sistemi, solunum sistemi, kas ve iskelet sistemi, santral sinir sistemi, üriner sistem infeksiyonları ile

toksinlere bağılı olarak gelişen çok sayıda enfeksiyona neden olmaktadır (Moreillon ve ark. 2005, Peacock 2005, Dündar, Dündar 2008, Leonard ve Markey 2008).

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

Türkiye'de MRSA enfeksiyonları özellikle insan hekimleri tarafından yıllardır takip edilmektedir. 1996–1999 yılları arasında yapılan dokuz ayrı çalışmada bildirilen metisilin direncinin ortalama % 47,5 olduğu hesaplanmış, 2000–2003 yıllarında ise sekiz ayrı çalışma sonuçlarının ortalaması da bu orana çok yakın (% 46,6) bulunmuştur. Ancak son yıllarda hastanede yatan hastalardan izole edilen *S. aureus* suşlarına ilişkin verileri içeren yayınlar, metisilin direncinin %52'ye yükseldiğini göstermiştir (Derbentli 2004). Türkiye geneline bakıldığında KNS'larda 2003–2004 yıllarında belirlenen metisiline direnç oranının (%50), *S. aureus* suşlarındakine benzer olduğu gözlenmiştir (Derbentli 2005). Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi'nde 2007–2008 yıllarında, metisilin direnç oranı *S. aureus* suşlarında %49, KNS suşlarında ise % 60 olarak bulunmuştur. Bozca ve ark İzmir Eğitim ve Araştırma Hastanesinde 2005–2006 yıllarında izole ettikleri 720 *S. aureus* ve 1169 koagülaz negatif stafilokok (KNS) suşunda metisiline direnç oranlarını incelemişler *S. aureus* suşlarının % 34'ü, KNS suşların % 56'sını metisiline dirençli bulmuşlardır (Bozca ve ark. 2008). Yapılan çalışmalarda bildirilen MRSA oranları; Marmara Üniversitesi'nde 2000'de % 67, 2001'de % 60 (Korten 2003), Gazi Üniversitesinde 2001'de % 73, 2002'de % 77'dir (Kaçmaz ve ark. 2002). Erciyes Üniversitesinde %66 (Esel ve ark. 2003), Ankara Üniversitesinde 1988'de % 32, 1995'te % 45; Hacettepe Üniversitesinde 1988'de % 20, 1995'de % 25;, 1995'te % 42 olarak bildirilmiştir (Çetinkaya 2000). Adnan Menderes Üniversitesi'nde 2009 yılı hastane enfeksiyonları içinden izole edilen 198 suşun 31'i (%15,6) MRKNS, 23'ü (%11,6) MRSA olarak tespit edilmiş (İnegöl 2010). Genelde yıllar geçtikçe bir artış gözlenmektedir. Ancak, Sipahi ve ark. Ege Üniversitesi hastanesinde yaptıkları çalışmalarında metisilin

direncinin 2001'de % 73,8 iken 2005'de %55,3 olduğunu, 2003 bütçe uygulama talimatı sonrasında metisilin ve diğer antibiyotiklere karşı dirençteki istatistiksel olarak anlamlı düşüş uygulamanın yalnızca antibiyotik harcamalarında düşüşe değil, antibakteriyel dirençte azalmaya da neden olduğunu düşündürdüğünü bildirmektedirler (Sipahi ve ark. 2007).

Veteriner hekimlikte, insan hekimliği ile kıyaslandığında MRSA ile ilgili daha az sayıda vaka bildirilmesine karşın günümüzde evcil hayvanlarda MRSA infeksiyonları ve taşıyıcılıkla ilgili çalışmalar artmıştır. Günümüzde MRSA ve MRSA taşıyıcılığı, insanlarda olduğu gibi hayvanlarda da son derece önemli bir patojen haline gelmiştir. Özellikle de veteriner hekimler, hayvan bakıcıları ve aileleri hayvanlarla yakın temas halindedirler. İnsan ve hayvanların karşılıklı olarak bu patojeni bulaştırabilmesi ile TK- MRSA geniş bir rezervuar potansiyeline ulaşmaktadır. Özellikle de at, domuz, kedi ve köpek gibi çeşitli evcil hayvanlarda MRSA taşıyıcılığı ve hayvan rezervuarlığı bildirilmiştir (Bochev ve Russenova 2005). 2001'de Macaristan'da yapılan antibiyotik dirençliliğine yönelik bir araştırmada, hayvanlarda ve hayvansal ürünlerde hiçbir vakada *mecA*-pozitif stafilokok izole edilememiş; ancak, 2004 de devam eden bu çalışmada, sığır sürülerinde 5 MRSA izolasyonu yapılmıştır (Kaszanyitzky 2003).

İnsanlarda olduğu gibi hayvan izolatu olan MRSA infeksiyonlarında da inkübasyon süresi klinik semptoma göre değişebilir ve hayvanlar klinik bulgu göstermeden değişik periyotlarda kolonize olabilir. Köpek, kedi, at ve diğer evcil hayvanlar arasında asemptomatik MRSA taşıyıcılığı bulunabilmekte ve bu hayvanlar hem insanlar hem de diğer hayvanlar için rezervuar olarak görev almaktadır (Manian 2003, Duquette ve Nuttall 2004, Weese ve ark. 2006).

Çeşitli ülkelerde yapılan çalışmalarda evcil hayvanlar arasında MRSA infeksiyonları, kedi, köpek, at, sığır, koyun, domuz, tavşan, papağan ve tavuklarda bildirilmiştir. Hayvanlarda MRSA taşıyıcılığına yönelik araştırmalar insan çalışmaları kadar fazla olmasa da her geçen gün artmaktadır (Lilenbaum ve ark. 1998, Kireççi ve Çolak 2002, Kaszanyitzky ve ark. 2003, Weese ve ark. 2005).

Pet hayvanlarında taşıyıcılık oranının ortaya konulması güç olup böyle vakalar genellikle insan ya da hayvan hastalıklarının takibi sırasında ortaya çıkmaktadır. Amerika'da bir hemşirede MRSA tesbitini takiben yapılan incelemelerde, bu bireyin

çocuğunda ve evinde beslediği köpeğin oral-nazal, anal mukozasında MRSA izolasyonu yapılmış ve ev ortamında aile içi bulaşma olduğu anlaşılmıştır. Bu çalışmada köpeğin daha önce antibiyotik tedavisi görmediği ve bu bulaşmanın hayvan sahibinden kaynaklandığı belirlenmiştir (Duijkeren ve ark. 2004). 1998 de Kore’de ilk kez evcil köpeklerde MRSA bildirimi yapılmış ve veteriner hastanelerinde çeşitli hastalıklardan tanısı konulan 12 köpekte MRSA izole edilmiştir (Pak ve ark. 1999). Brezilya’da sağlıklı kedilerde taşıyıcılık araştırmasında, 148 kediden 11’i MSSA ve 3’ü MRSA toplam 14 *S. aureus* izole edilmiştir (Lilenbaum ve ark. 1998). İngiltere’de ev hayvanlarına yönelik kapsamlı bir çalışmada, yapılan bir süreyde 6519 hayvanın 95’inde (69 köpek, 24 kedi, bir tavşan ve bir at) MRSA tespit edilmiştir (Rich ve Roberts 2004). Aseptomatik MRSA’sı olan insanlardan, veteriner hastanelerinde tedavi gören hayvanlara MRSA bulaşabilmektedir (Kireççi 2009). İrlanda veteriner kliniğinde bir köpekte cerrahi operasyon sonrası MRSA izolasyonu yapılmış ve ameliyatı gerçekleştiren veterinerin burun florasında da aynı suş tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada köpek izolatı MRSA’nın yaygın bir insan suşu olan epidemik-MRSA-15 olduğu belirlenmiştir (Leonard ve ark. 2006). Loeffler ve ark. 2005’de veteriner hastanelerinde, hastane çalışanlarının %17,9’unda MRSA taşıyıcılığı saptamışlar ve bu personelin bulaşmada rol aldıklarını belirtmişlerdir. Türkiye’de pet hayvanlarında MRSA taşıyıcılığı ile ilgili bir çalışma Samsun’da yapılmıştır. Çalışmada sağlıklı köpeklerin burnundan izole edilen 80 *S. aureus* izolatının 3 (%3,75)’ünde *mecA* geni pozitif olarak bulunmuş ve sağlıklı köpeklerin *mecA* geni taşıyıcılığı nedeni ile insan sağlığı için risk teşkil edebileceği bildirilmiştir (Fındık ve ark. 2009).

Araştırmalar gerek ev ortamında gerekse de veteriner kliniklerinde yakın temas sonrası hayvan ile hayvan sahibi arasında MRSA bulaşının olduğunu ortaya koymaktadır. Hayvan taşıyıcılığı, infeksiyon kaynağı olarak çoğu zaman göz ardı edilmekte ve TK-MRSA yaygınlaştıkça bu oran sahipli evcil hayvanlara da yansımaktadır. Bulaşmanın ilk olarak hayvandan mı yoksa sahibinden mi kaynaklandığını belirlemek güçtür. Ancak sonuç olarak hayvanlar etkeni nazal olarak bulundurabilmekte ve MRSA geniş bir rezervuar potansiyeline ulaşarak insanoğluna karşı varlığını daha da güçlendirmektedir (Weese ve ark. 2006).

Son yıllarda sağlıklı atlarda metisiline dirençli koagülaz negatif stafilokok (MRKNS)’ların yüksek prevalansı bildirilmektedir. Atların insanlar ve atlar arasında MRSın karşılıklı bulaşmasında potansiyel bir rezervuar olduğu gösterilmiş ve bu durum

atların insanlar ve diğer atlar ile sık ve yakın temasa sahip olmaları ile açıklanmıştır. Bu nedenle atlarda MRS taşıyıcılığının izlenmesi toplumda MRS yayılımında atların olası rolünün aydınlatılması açısından önemlidir. MRKNS sağlıklı hayvanların, özellikle de atların nazal mukozalarında yaygın olarak bulunmaktadır (de Martino ve ark. 2010). MRKNS klonlarının atlar ve atlarla yakın temasta olan personel arasında karşılıklı bulaşabildiği ve klinikte kullanılan malzeme ve cerrahi aletler dahil klinik ortamların yaygın olarak bu bakteriler ile kontamine olabildiği gösterilmiştir (Moodley ve Guardabassi 2009). İnsan ve hayvanlarda bu bakteriler ile ilişkili risk faktörleri bilinmemekle birlikte, insanlarda KNS enfeksiyonları genellikle hastanın kendi kolonize suşundan kaynaklandığı bildirilmiştir (Frebourg ve ark. 1999). Bir yaştan altındaki atlarda MRSA taşıyıcılığı da sıklıkla bulunabilmekte ve bu hayvanların ülke içi ya da ülkeler arası sevkiyatlarında rezervuar olması kaygı verici olarak ifade edilmektedir (Kaszanyitzky ve ark. 2003). Kanada veteriner araştırma hastanesi at kliniklerinde üç yılı kapsayan bir çalışma başlatılmış; 2002 yılında 17, 2003'te 10 ve 2004'te 36 atta MRSA kolonizasyonu tespit edilmiştir (Weese ve ark. 2006).

Domuz yetiştiriciliği yapılan ülkelerde özellikle de Hollanda'da, domuz popülasyonunda MRSA taşıyıcılığı araştırılmış ve bu hayvanların TK-MRSA'nın yayılmasında önemli bir rezervuar olduğu belirtilmiştir (Neeling ve ark. 2007). Hollanda'da 9 farklı domuz kesimhanesinde 540 sağlıklı domuzun burun deliklerinden kesim öncesi sürüntü numunesi almış ve örneklerin 209 (%39)'unda MRSA tespit edilmiştir (Neeling ve ark. 2007). Voss ve ark., 2005 de domuz teması olan üç kişiden MRSA izole etmişler ve 26 domuz çiftliğindeki hayvanlarda %23 oranında MRSA taşıyıcılığı belirlemişlerdir (Voss ve ark. 2005).

Büyükbaş hayvanların yanı sıra koyun ve keçi gibi küçükbaş hayvanlarda da MRSA izole edilmiştir (Bochev ve Russenova 2005). Portekizde, subklinik mastitisli ineklerden izole edilen 9 *S. epidermidis* suşunda metisilin dirençliliği belirlenmiştir (Nunes ve ark. 2007). Kore'de 153 farklı çiftlikte, 3047 mastitisli inek sütünden 835 *S. aureus* ve 763 KNS izole edilmiştir. Bu izolatların metisilin dirençliliği araştırıldığında 21 (%2,5) *S. aureus* ve 19 (%2,4) KNS'de dirençlilik tespit edilmiştir (Moon ve ark. 2007).

İnsanlarda MRSA taşıyıcılığı ile mücadelede nazal taşıyıcılığı elimine etmek için intranazal mupiracin uygulaması gibi antibakteriyel tedaviler yapılmaktadır. MRSA, nazal yerleşimin dışında vücudun diğer bölgelerinde kolonize olmuşa, mupiracin dirençliliği

varsa ve özellikle aynı ailenin bireylerinde ya da pet hayvanlarında taşıyıcılık bulunuyorsa, nazal tedaviyi takiben reinfeksiyonlar sıklıkla görülebilmektedir (Duquette ve Nuttall 2004). Hayvanlarda nazal taşıyıcılığın eliminasyonunda topikal uygulamalar pratik olmadığından ya da tedavide elverişsiz kaldığından sistematik tedavi gerekmektedir (Duijkeren ve ark. 2004)). Günümüzde hayvanlarda, nazal taşıyıcılığı önlemede kabul edilebilir ve güvenli eradikasyon seçenekleri bulunmamaktadır. Ülkeler arası canlı hayvan ya da hayvansal besin ithalatı nedeniyle TK-MRSA'un yayılarak uluslar arası zoonotik bir risk olabileceği vurgulanmaktadır (Wulf ve ark. 2008).

Hollanda'da hastane kaynaklı MRSA'nın düşük oranda (%1) görüldüğü ve bunun ise katı sağlık kuralları ile sağlandığı bildirilmektedir. Ayrıca benzer bir mücadelenin TK-DRSA için yapılması gerektiği ve bu amaçla hastane girişlerinde risk gruplarında tarama, hayvan taşıyıcılığına yönelik "bul ve yok et" uygulamalarının önemi vurgulanmaktadır (Wulf ve ark. 2008). Hollanda'da TK-MRSA ile mücadele kapsamında, 99 veteriner hekim ve 80 veteriner öğrencide tarama yapılmış ve 2 öğrenci ile 5 veteriner hekimde nazal taşıyıcılık belirlenmiştir. Bu taşıyıcıların düzenli olarak domuz ve inek sürüleri ile devamlı temas halinde oldukları, özellikle veteriner öğrencilerin klinik uygulamalarda maske ve eldiven kullanmadıkları belirlenmiştir (Wulf ve ark. 2006). Bu nedenle hayvan teması sırasında riskli meslek gruplarında eldiven, maske ve çizme kullanılmalı, bu kişilere insan hastanelerine girişte MRSA taraması yapılmalı, hayvanlarda ise rezervuarlar belirlenerek hayvan hareketlerine yönelik gerekli önlemler alınmalıdır.

Aile içi bulaşmada, MRSA tedavisi gören bir bireyin diğer aile yakınları taranmakta ancak çoğu zaman evde beslenen hayvanlardaki kolonizasyon ihtimali unutulmaktadır. TK-MRSA ile mücadelede, hem taşıyıcı bireyler hem de onların besledikleri ya da sürekli temas halinde oldukları evcil hayvanlar taranmalı ve takip edilmelidir (Duquette ve Nuttall 2004). Hospitalizasyonun bulunduğu veteriner hastanelerinde, hastane kaynaklı hayvan hastalıklarına yönelik olarak öncelikle hastane personelinde MRSA taraması yapılmalıdır. Ancak günümüzde bu uygulamalar sadece bazı gelişmiş ülkelerde ve sadece bilimsel araştırmalarda yapılmaktadır. Veteriner hastanelerinde MRSA/MRKNS'lar yolu ile gelişebilecek çapraz kontaminasyonları en aza indirmek için koruma kontrol programları geliştirilmelidir (Bilgehan 2002).

1. 5. Stafilokoklarda Penisilin Direnci

Stafilokoklar sıklıkla insan ve hayvanların deri ve mukoz membranlarında kolonize olurlar ve hızlı bir şekilde özellikle klinik kullanıma yeni giren antimikrobiyal ilaçlara direnç kazanma kapasitesine sahiptirler. Birçok stafilokok suşu içerisinde *S. aureus* en yüksek patojenik potansiyele sahiptir çünkü *S. aureus* tarafından direnç genlerinin kazanılması stafilokokal infeksiyonların tedavi ve kontrolüne mani olan en önemli sorundur. MRSA suşları özellikle önemlidir çünkü hem toplum kaynaklı infeksiyonların en önemli nedenlerinden birisidir hem de tüm dünyada halk sağlığı ile ilgili infeksiyonlara yol açarlar.

S. aureus'a bağlı gelişen ölümcül infeksiyonlar, 1941 yılında penisilin G'nin klinik kullanıma girmesinden sonra önemli ölçüde azalmıştır. Ancak bundan çok kısa bir süre sonra penisiline direnç gösteren *S. aureus*'lar ortaya çıkmış, bunu takip eden 20 yıl içinde hastane ve toplum kaynaklı *S. aureus* izolatlarının yaklaşık %80'i penisiline dirençli hale gelmiştir. Beta-laktamaz enziminin yol açtığı bu direnç sorunu, 1959 yılında beta-laktamaz enzimine dayanıklı semisentetik bir penisilin olan metisilin klinikte kullanımının başlamasıyla aşılmıştır. Ancak, *S. aureus* infeksiyonlarının tedavisinde metisilin kullanımının başlamasından sadece iki yıl sonra, 1961 yılında ilk MRSA izolatı tanımlanmıştır (Jevons 1961).

1. 5. 1. Metisilin Direnci ve Mekanizmaları

Beta-laktamaz enzimiyle hidrolize olmayan betalaktam antibiyotiklere (metisilin, oksasilin, nafsilin, kloksasilin, dikloksasilin) karşı olan direnç “metisilin direnci” olarak adlandırılır (Chambers 1988, Chambers 1997). Metisilin direnci, aynı zamanda intrinsek direnç olarak da tanımlanmaktadır. Böylece direncin, antibiyotiği inaktive eden beta-laktamaz enzimiyle değil, kromozomal yolla olduğu anlaşılmıştır (Maranan ve ark. 1993, Mulligan ve ark. 1993) Metisilin direnç mekanizmaları üç grupta özetlenebilir: i) PBP2a ii) *mecR1-mecI* sistemi iii) Direnç fenotipini etkileyen diğer faktörler (Sancak 2007).

1. 5. 1. 1. PBP2a: Metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA)'larda, beş adet penisilin bağlayan protein (PBP) bulunurken, MRSA'larda bunlara ek olarak PBP2'ya da PBP 2a olarak adlandırılan 78 kDa ağırlıkta olan farklı bir PBP sentezlenmektedir (Hartman ve Tomasz 1986). PBP2a, diğer PBP'lerden farklı olarak beta-laktam yapısındaki

antibiyotiklere karşı düşük afinite göstermektedir. Dolayısıyla, betalaktam grubu antibiyotik varlığında, yüksek afiniteli PBP'lerin fonksiyonunu görerek peptidoglikan sentezini sürdürebilme yeteneğine sahip olan tek transpeptidazdır (Mulligan ve ark. 1993, Chambers 1997). Beta-laktam grubu antibiyotikler, normalde hücre duvarında yer alan PBP'lere bağlanarak peptidoglikan sentezini engeller. MRSA'larda ise bu antibiyotikler PBP2a'ya bağlanamazlar ve bunun sonucunda peptidoglikan sentezi devam eder (Deurenberg ve ark. 2007). PBP2a'yı kodlayan gen, 2,1 kb büyüklüğünde olan ve *mecA* olarak adlandırılan bir gendir. Tüm MRSA'lar bu gene sahipken metisiline duyarlı olan suşlarda bu gen bulunmamaktadır (Sancak 2007). *mecA* geni SCC*mec* adı verilen Stafilokokal Kaset Kromozom (SCC) ailesinin metisilin direnci açısından özelleşmiş bir üyesidir (Chambers 1997, Hiramatsu ve ark. 2002, Ito ve ark. 2003).

1. 5. 1. 1. 1. Stafilokokal Kaset Kromozom (SCC) Nedir?

SCC stafilokok türleri arasında genetik madde alışverişine aracılık eden hareketli bir elemandır. Yapı olarak patojenite adasına benzemekle birlikte hiç virulans geni içermemektedir. MRSA suşlarının en belirleyici özelliği Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*)'e sahip olmalarıdır. Bu hareketli genetik element *mecA* geni tarafından kodlanan geniş spektrumlu beta laktam direnci için önemli bir belirleyicidir. Metisilin dirençli stafilokok suşlarının ortaya çıkması duyarlı suşların kromozomlarına SCC*mec* elemanlarının kazanılması yolu ile olmaktadır (IWG-SCC 2009). SCC*mec* kasetinin kökeni hâlâ bilinmemektedir. Fakat *S. sciuri*'nin PBP ile MRSA'daki PBP2a arasında % 87,8 oranında homoloji bulunması nedeniyle, güncel bilgiler ışığında kökeninin bu bakteri olduğu düşünülmektedir (Said-Salim ve ark. 2003).

SCC*mec* elemanları oldukça farklı yapısal organizasyonu ve genetik içeriği ile tip ve alt tiplere ayrılmıştır. Günümüzde MRSA klonları yaygın olarak pratikte SCC*mec* tipi ve kromozomal yapısına (örneğin Sekans Tipi: ST, Multi Locus Sequence Typing: MLST) dayanan sekans tipleri ile tanımlanmaktadır Örn; ST22-SCC*mec* IV, ST22-IV olarak kısaltılır (Enright ve ark. 2002). Eskiden *mecA* taşımayan SCC ve SCC*mec* tip ve alttipleri herhangi bir standardizasyon yapılmadan bildirilmekteydi. Bu nedenle günümüze kadar SCC elemanlarının sınıflandırılmasında tutarsızlık ve belirsizlik olmuştur. Bu konuda Stafilokokal Kaset Kromozom Elemanlarının Sınıflandırılması Uluslararası Çalışma Grubu (International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette

Chromosome Elements (IWG-SCC)'nın çalışmaları sayesinde SCC*mec* ve diğer SCC elemanlarının başarılı bir şekilde sınıflandırması yapılmıştır (IWG-SCC 2009).

PBP2a, 2 kb'lık DNA segmentine lokalize bir gen olan *mecA* geni tarafından kodlanmaktadır. *mecA* geninin kodladığı PBP2a diğer PBP'lerden farklı olarak beta-laktam antibiyotiklere ileri derecede azalmış afiniteye sahiptir. Beta-laktam antibiyotiklerin varlığında diğer PBP'ler inhibe olurken, PBP2a fonksiyon görmeye devam ederek hücre duvar sentezi görevini sürdürür ve bakterinin yaşamını devam ettirebilir. Bu nedenle metisiline dirençli olan bir stafilokok kökeninin, duyarlılık testi yapılmaksızın tüm beta-laktam grubu antibiyotiklere (penisilinler, beta-laktam+betalaktamaz inhibitör kombinasyonları, tüm sefalosporinler, monobaktamlar, karbapenemler) dirençli olduğu kabul edilir (CLSI 2005).

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

Cassette Chromosome Recombinases (*ccr*) olarak bildirilen yer-spesifik gen kompleksi SCC*mec* gen kasedinin ikinci ana genetik yapısıdır ve kasetin bakteriyel genomu integrasyonu ve ekzisyonundan sorumludur (İto ve ark. 1999, Katayama ve ark. 2000). SCC*mec*'in tanımlanmasından kısa süre sonra SCC*mec* elemanlarının birçok yapısal farklı elemanları tanımlanmıştır. Bu elemanların önemli karakteristik özellikleri şöyledir: i) *mec* gen kompleksinde *mecA*'nın taşınması ii) *ccr* gen kompleksinde *ccr* gen(lerinin) taşınması iii) stafilokokal kromozomda *ccr*-ilgili rekombinasyonlarda hedef olarak işlev yapan ve SCC için integrasyon bölge dizileri (integration site sequence (ISS)) olarak isimlendirilen stafilokokal kromozomda özel bir bölgede integrasyon iv) ISS içeren doğrudan tekrar dizilerinin varlığı. Son sınıflandırmaya göre *S. aureus*'ta belirlenen SCC*mec* tipleri Çizelge 1. 4.'de verilmiştir.

Çizelge 1. 4. *S. aureus*'ta belirlenen SCCmec tipleri (IWG-SCC 2009).

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

^agen kompleksinde *ccr* genleri parantez içinde gösterilmektedir

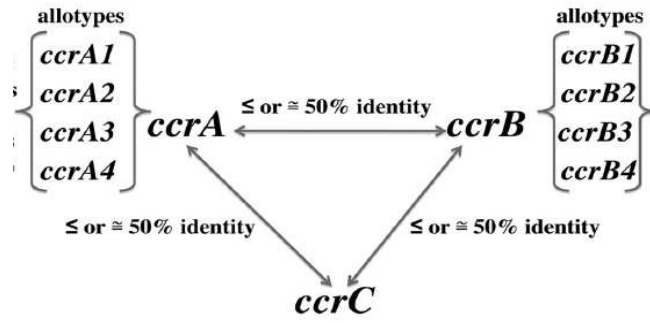
^b*ccrA4B4* genleri SCCmec tip VIII'de bulunur

1. 5. 1. 1. 2. SCCmec Elemanlarının Sınıflaması

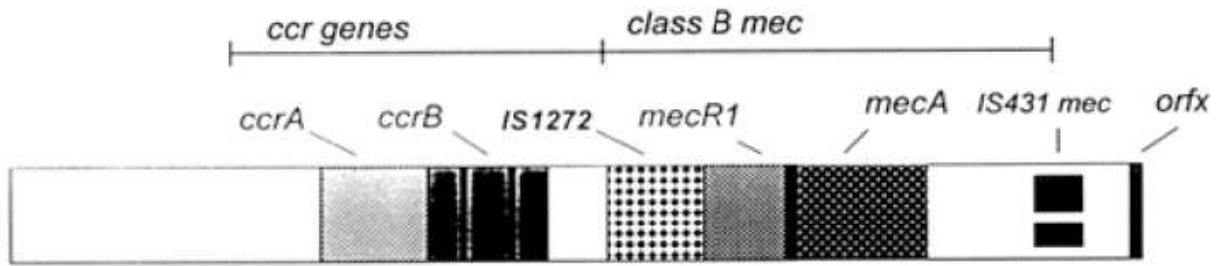
SCCmec üç önemli gen kompleksi tarafından oluşturulur; *ccr* gen kompleksi, *mec* gen kompleksi ve J bölgesi (IWG-SCC 2009).

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

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



Şekil 1. 1. *ccr* genlerinin sınıflandırılması (IWG-SCC 2009).



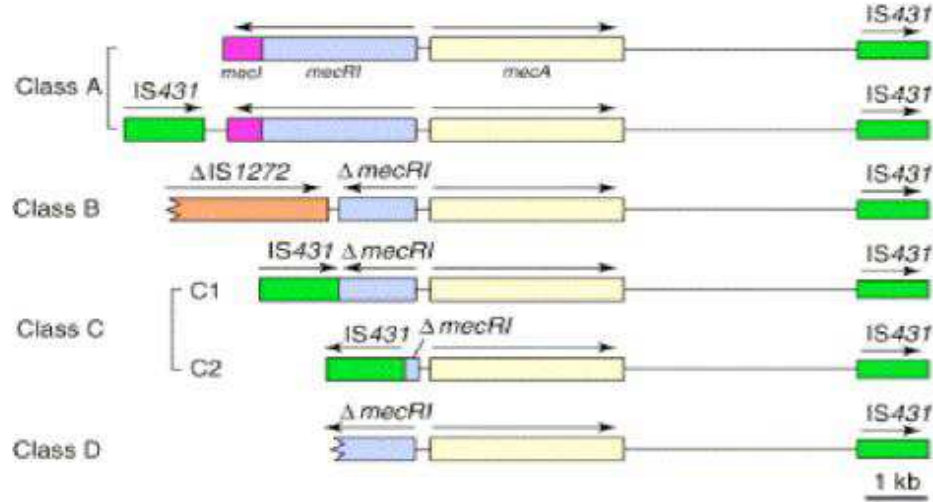
Şekil 1. 2. *ccr* genlerinin sınıflandırılması (Biçer 2009).

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

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

mec gen kompleksi: *mec* gen kompleksi; *mecA*, regüle edici genler ve insertion sequence denilen IS elemanlardan oluşur. Beta laktam direnç fenotipidir ve metisilin direncinden sorumludur. İçerdikleri yapılara göre *mec* gen kompleksi dört sınıfta incelenir (Hiramatsu ve ark. 2001, Hanssen-Ericson 2006, Martins-Cunha 2007). *mec* gen kompleksinin sınıfları Şekil 1. 3.'de gösterilmiştir.

Şekil 1. 3. *mec* gen kompleksinin sınıfları (Biçer 2009).



Sınıf A *mec* gen kompleksi (class A *mec*) *mecA*'nın yukarısında tam *mecR1* ve *mecI* düzenleyici genlerini, aşağısında HVR olarak isimlendirilen aşırı değişken bölgeyi ve insertion sequence IS431 içeren prototip komplekstir. Class B *mec* gen kompleksi *mecA*'nın yukarısında kısa bir *mecR1*, insertion sequence IS1272 aşağısında HVR ve insertion sequence IS431 içeren komplekstir. Class C *mec* gen kompleksi, muhtemelen bağımsız olarak evrimleştiklerinden, C1 ve C2 olmak üzere *mecR1* bölgesinin uzunluğuna ve IS431'in yerleşimine göre iki farklı tipte olabilir. *mecA*'nın yukarısında kısa bir *mecR1* ile birlikte IS431 ve aşağısında HVR ve IS431 içerir. Class D *mec*, *mec* gen kompleksi *mecA*'nın yukarısında *mecR1* ve aşağısında HVR ve IS431'den oluşur. Ana *mec* gen kompleksi sınıflarında çeşitli varyantlar bulunmuştur. Bunlar, sınıf A *mec* gen kompleksinde *mecA*'nın yukarısına IS431 veya IS1182 insersiyonu, veya sınıf B *mec* gen kompleksinde *mecA*'nın yukarısına Tn4001 insersiyonudur. Bu varyantlar sınıfa eklenmiş alt numara olarak gösterilir (IWG-SCC 2009).

J bölgesi: SCC*mec* elemanı *mec* ve *ccr* gen komplekslerinden başka üçüncü bir bölge olan J bölgesi olarak isimlendirilen, *mec* ve *ccr* gen komplekslerinden başka bir bölge olarak tanımlanan, SCC*mec* tipleri arasında farklılık gösteren diziler içerir. J dizileri

arasında “insersion sequence” denilen IS elemanları, farklı antibiyotiklere dirençten sorumlu transpozonlar yer almaktadır. İsmi ilk olarak L-C, C-M, ve I-R bölgeleri olarak bildirilen bu yapı daha sonra J bölgesi olarak değiştirilmiştir. Artık J bölgesi “birleşme bölgesi” (junkyard region) olarak isimlendirilmektedir. J1 (eskiden L-C) bölgesi *ccr* kompleksi ile sağ kromozom arasında, J2 (C-M) *ccr* gen kompleksi ve *mec* geni arasında, ve J3 (I-R) *mec* gen kompleksi ile sol kromozomal bölge arasındaki bölgedir. Aynı *mec-ccr* kompleksinde J bölgesindeki değişiklikler SCC*mec* alttiplerini tanımlamak için kullanılır.

1. 5. 1. 1. 3. Bugüne Kadar Tanımlanan Sekiz SCC*mec* Tipi

Günümüze kadar yukarıda belirtilen kriterlere göre sekiz farklı SCC*mec* tipi tanımlanmıştır. İlk olarak tanımlanan SCC*mec* tipI, II, ve III (İto ve ark. 1999, İto ve ark. 2001)’ü, SCC*mec* tip IV, V, VI, VII, VIII izlemiştir (Ma ve ark. 2002, İto ve ark. 2004, Oliviera ve ar. 2006, Berglund ve rak. 2008, Zhang ve ark. 2009). Yeni SCC*mec* elemanları ve mevcut *mec* sınıfı ve *ccr* tipi esas alınarak isimlendirilmesi önerilmektedir. Örneğin SCC*mec* tip I (1B) tip I *ccr* ve class B *mec* gen kompleksi taşır. Diğer SCC*mec* tipleri tipII (2A), tipIII (3A), tipIV (2B), tipV (5C2), tipVI (4B), tipVII (5C1), ve tipVIII (4A) olarak adlandırılır. Bu nedenle SCC*mec* tipleri roma rakamları kullanılarak tanımlanır bunu parantez içerisinde *ccr* ve *mec* gen komplekslerinin tipi birlikte yazılarak izler. TipIII ve tipVI SCC*mec* elemanları yeni sekans bilgilerine göre düzenlenmiştir. TipIII SCC*mec* elemanı 67 kb uzunluğundadır ve en uzun SCC*mec* elemanı olduğu bildirilmektedir. Bununla birlikte, 2006 yılında, bu 67-kb’lık elementin SCC*mercury* ve tip III (3A) SCC*mec* (tip 3 *ccr* ve class A *mec* taşıyan) olarak bilinen iki küçük SCC elementinin ard arda gelmesinden oluştuğu bildirilmiştir. SCC*mec* ile SCC*mercury*’yi birbirine karıştırmamak için bu yeni yapı SCCHg olarak isimlendirilmiştir. *S. aureus* HDE288 suşu ilk olarak tipe IV SCC*mec* (Oliviera ve rak. 2001) olarak isimlendirilmiş ancak daha sonra TipVI SCC*mec* (4B) olarak yeniden tanımlanmıştır (Oliviera ve ark. 2001).

Günümüzde tanımlanmış 8 SCC*mec* tipi aşağıda özetlenmiştir:

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

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

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

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

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

SCCmec TipVI; sınıf B *mec* gen kompleksi ile tip4 *ccr* gen içermektedir.

SCCmec TipVII; sınıf C1 *mec* gen kompleksi ile tip5 *ccr* gen (*ccrC*) içermektedir.

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

SCCmec tip I, II ve III esas olarak hastanede kazanılmış metisilin dirençli stafilokok suşlarında bulunur. Bunlar plasmid veya transpozabl genetik elemanlar üzerinde taşınır. SCCmec tip II ve III çoklu beta laktam dışı antimikrobiyallere dirence neden olur. SCCmec tip IV ve V tipik olarak toplumda kazanılmış metisilin dirençli stafilokok suşlarında bulunur. Bu SCCmec tiplerinin boyutları daha küçüktür ve diğer çoklu ilaç direnç genlerini taşımazlar. (Zaoutis ve ark. 2006). Bu gen kasetleri diğer gen kasetlerine kıyasla çok daha küçüktür ve bu özelliğin kolaylıkla diğer suşlara yayılımını kolaylaştırdığı düşünülmektedir. Ayrıca bu gen kasetlerinde beta laktam dışı antibiyotiklere direnç geni bulunmaz. TK-MRSA'da metisilin direnç kazanım

mekanizması SCCmec gen kaseti aracılığıyla. Bu gen kasetinin boyutunun küçük olması ve hareketliliğini sağlayan genlere sahip olması nedeniyle, gelecekte ciddi sağlık problemlerine neden olması ve diğer Gram pozitif bakterilerde de görülmeye başlanması, gerekli önlemler alınmazsa kaçınılmaz bir son olacaktır (Ünal S 2006). TK-MRSA prevalansında artış görülmesi ve insanların yanı sıra hayvan rezervuarlarının belirlenmesi ile araştırmalar farklı bir boyut kazanmıştır (Kollef-Micek 2006, Aygün ve ark. 2007). TK-MRSA'nın hastane kaynaklı klonlardan köken alarak toplumda yayıldığı ya da metisiline duyarlı stafilokokların (MSSA) *mecA* genini MRSA lardan kazanarak toplumda dirençli kökenlerin yayıldığı şeklinde iki görüş üzerinde durulmaktadır (O'Rourke 2003). TK-MRSA'nın, başlangıçta bakım evlerinde yaşayan, damar içi ilaç bağımlıları ya da kronik hastalığı bulunan insanlar da görülmesine rağmen son zamanlarda askerler, sporcular, çocuklar, tutuklular ve homoseksüel bireyler gibi yakın temasla popülasyonlarda da salgınlar geliştirebildiği belirtilmektedir (CDC 2010). Farklı SCCmec tiplerinin özellikleri Çizelge 1. 5.'te gösterilmiştir.

Çizelge 1. 5. Farklı SCCmec tiplerinin özellikleri (File 2008).

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

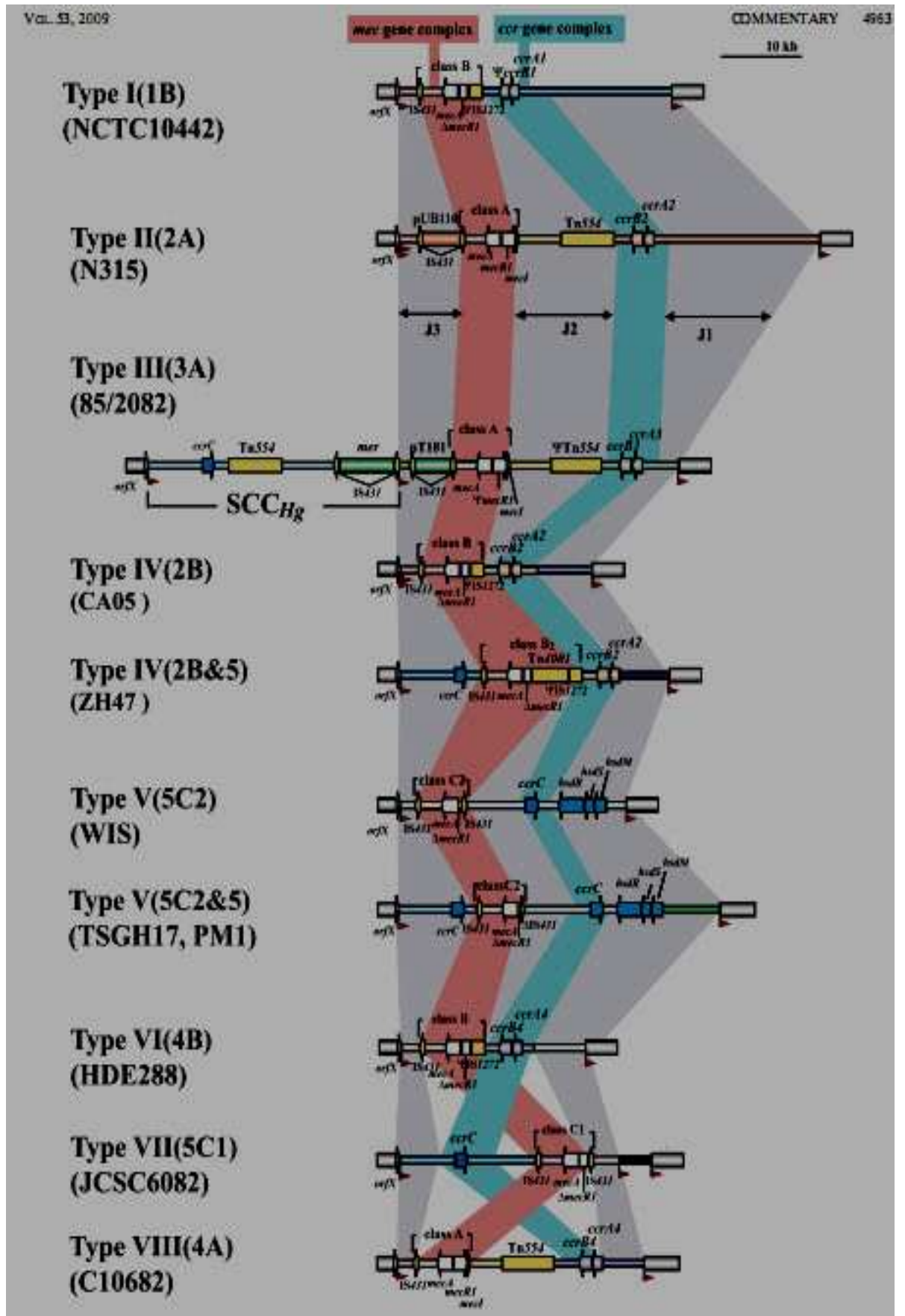
TK-MRSA: Toplum-kökenli metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*

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

PFGE: Pulsed field gel electrophoresis

İngiltere'de 1961'de izole edilen ilk MRSA (NCTC 10442) suşunun Tip I, Japonya'da 1982'de izole edilen MRSA (N315) suşunun Tip II, Yeni Zelanda'da 1985'de izole edilen MRSA (85/2082) suşunun Tip III SCCmec içerdiği saptanmıştır (Ito ve ark. 1999, Ito ve ark. 2001, Martins ve Cunha 2007). Şekil 1. 4.'de SCCmec elemanlarının yapıları gösterilmiştir.

Şekil 1. 4. SCCmec elemanlarının yapıları (IWG-SCC 2009).



1. 5. 1. 1. 4. *mecA* Taşımayan SCC Elemanlarının Sınıflandırılması

Stafilokoklarda ilginç bir şekilde *mecA* taşımayan ancak diğer karakteristik genler (örn. kapsül gen kümesi, fusidik asit direnç, civa direnç operonu) taşıyan SCC elemanları da bulunmuştur. Bu elemanlar SCC_{mec} ile aşağıdaki özellikleri paylaşırlar: *ccr* genlerinin (*ccrAB* ve/veya *ccrC*) taşınması, ISS bölgesinde integrasyon ve ISS içeren DR sekanslarının bulunması.

Bu tip elemanlar adlandırılması için SCC'den sonra gen adını veya fonksiyonunu yansıtan kısaltmanın kullanılması önerilmektedir. Örneğin, SCC_{cap1}, tip 1 kapsül gen kümesini taşıyan; SCC_{fur}, fusidik asit direnç genini taşıyan; SCC_{Gg}, civa direnç operonunu taşıyan SCC elemanlarını işaret etmektedir. Eğer SCC de belli bir fonksiyona yönelik gen bulunamazsa suşun adının yazılması önerilmektedir (örn SCC₄₇₆).

Metisilin direncinin fenotipik olarak ortaya konması bakteriler arasında değişkenlik göstermektedir. Tüm MRSA suşları PBP2a oluşturmalarına rağmen, direnç değişik derecelerde ortaya çıkmaktadır. Bir başka deyişle, metisilin direncinin fenotipik olarak ifade edilmesi, homojen ya da heterojen olmak üzere iki şekildedir. Homojen dirençte, hücrelerin hepsi yüksek konsantrasyondaki metisilin varlığında üreyebilme özelliği göstererek yüksek düzeyde direnç ortaya koyarlar. Heterojen dirençte ise, o bakteri topluluğunda bulunan tüm hücreler metisilin direnci için gerekli olan bilgiyi yani *mecA* genini taşımalarına rağmen bu topluluğun sadece belirli bir kısmında direnç açığa çıkar (Hartman ve Tomasz 1986). Heterojen direnç gösteren MRSA topluluğunda, hücrelerin çoğunluğu (%99,9 veya daha fazlası) düşük metisilin konsantrasyonlarına (1–5 µg/mL) duyarlı iken, 10^{-2} ile 10^{-8} sıklıkta olmak üzere hücrelerin bir kısmı yüksek metisilin konsantrasyonlarına (≥ 50 µg/mL) direnç göstermektedir. Heterojen direnç gösteren suşlar, NaCl veya sukrozlu besiyeri kullanılması, düşük derecede inkübasyon gibi bazı özel kültür koşullarının sağlanması durumunda homojen direnç gösterir hale gelirler. Değişik kültür koşullarına göre direncin ortaya konulmasında meydana gelen bu değişiklik geçicidir ve tamamen fenotiptir (Chambers 1997). Bu durumdan da anlaşılacağı gibi, metisilin direncinin fenotipik olarak ortaya konulmasının regülasyonu oldukça karışıktır.

1. 5. 1. 2. *mecR1-mecI* sistemi

mecA geni, *mecR1* ve *mecI* olmak üzere iki regülatuar gen ile kontrol edilmektedir. Bu genler, beta-laktamaz geninin regülatuar genleri olan *blaR1* ve *blaI* ile yapı, fonksiyon ve regülasyon mekanizması açısından benzerlik göstermektedir (Mulligan ve ark. 1993, Chambers 1997). *blaI*, *blaI* geni tarafından kodlanan, betalaktamaz geninin transkripsiyonunu inhibe eden bir proteindir. *blaR1* ise *blaR1* geni tarafından kodlanır ve beta-laktamaz varlığında beta-laktamaz gen transkripsiyonuna yol açar. *mecI* ve *mecR1*, *mecA* için aynı düzenleyici rolü oynar. *mecI*, *mecA*'yı baskılayan bir protein, *mecR1* ise sinyal uyarıcı bir protein kodlar (Kuwahara-Arai ve ark. 1996, Kobayashi ve ark. 1998).

1. 5. 1. 3. Direnç fenotipini etkileyen diğer faktörler

- **Beta-laktamaz plazmidi:** Beta-laktamaz enzim yapımı *blaZ* adlı gen tarafından kodlanır ve antirepresör olan *blaR1* ve represör olan *blaI* olmak üzere iki gen tarafından kontrol edilir. Transmembran bir protein olan *blaR1*, beta-laktam varlığında ona bağlanır ve hücre dışından hücre içine sinyal iletimini sağlayarak beta-laktamaz enziminin sentezinin başlamasına yol açar (Maranan ve ark. 1997). *blaR1* ve *blaI* genleri *blaZ* genini regüle eden plazmid kökenli genlerdir. Bu genlerin aynı zamanda metisilin direncinin fenotipik olarak ortaya konmasında rol aldığı düşünülmektedir. Beta-laktam grubunda yer alan bir antibiyotik ile indüksiyon yapıldığında, *blaR1-blaI* sisteminde meydana gelen indüklenme, *mecR1-mecI* sisteminden daha hızlı olmaktadır. Yine, *mecR1-mecI* sistemi ile kıyaslama yapıldığında, *mecA* geninin baskılanması, *blaR1-blaI* sistemine göre daha zayıf olmaktadır (Ryffel ve ark. 1992, Hackbarth-Chambers 1993). MRSA'ların çoğunda beta-laktamaz genini taşıyan plazmid bulunması ve *mecR1-mecI* sisteminin defektif olması nedeniyle *mecA* geninin esas olarak “*bla* sistemi” ile indüklendiği düşünülmektedir. Ancak beta-laktamaz genlerini taşıyan plazmid, alıcı hücreye verildiğinde *PBP2a* yapımı konstitütif halden indüklenebilir hale gelmekle birlikte, *PBP2a* miktarı ya da indüklenebilir olma durumu ile direnç profili arasında bir ilişki kurulamamıştır. *PBP2a* yapımı konstitütif olabilir, ama suş heterojen direnç gösterebilir (Chambers 1997). Bu da metisilin direnç fenotipinin belirlenmesinde başka faktörlerin de yer aldığını göstermektedir.

- **Fem faktörleri:** Konstitütif ya da indüklenebilir olsun olmasın, *PBP2a* miktarı ile ortaya çıkan metisiline direnç fenotipi (homojen-heterojen) arasında bir ilişkinin gösterilememesi, metisilin direncinin ortaya konulmasını etkileyen diğer olası faktörlerin

arayıfına girilmesine yol açmıştır. Transpozonlarla inaktivasyon yoluyla metisiline dirençli suşlardan duyarlı suşlar elde edilmesi, *mec* dışındaki genlerin tanımlanmasına yol açmıştır (Mariraju ve ark. 1987). *mec* bölgesi dışında bulunan bu genler, “auxiliary” veya “factors essential for the expression of methicillin resistance” ya da kısaca “*fem*” genleri olarak tanımlanmıştır *fem* faktörleri, *mecA* geninden farklı olarak hem duyarlı hem de dirençli suşlarda bulunmaktadır (Henze ve ark. 1993). Direncin ortaya çıkmasını arttıran bazı koşulların da hücre otolizisindeki değişikliklerle ilişkili olduğu görülmüştür. Örneğin; ortama %4 NaCl’ün eklenmesi, PBP2a miktarını arttırmamasına rağmen, direncin eksprese edilmesini arttırmaktadır. NaCl, tüm hücrelerde otolizisi inhibe eder. 30°C’de inkübasyon da NaCl gibi antibiyotik ile tetiklenmiş olan otoliziz aktivitesini inhibe eder (Hartman ve Tomasz 1986, Chambers ve Hackbarth 1987). Bu etki, sadece dirençli olan suşlara özgül olmamakla birlikte, *PBP2a* varlığında direncin artmasına yol açar (Chambers ve ark. 1987).

Ayrıca *mecA* genini taşımadığı halde metisiline azalmış duyarlılık gösteren *S.aureus* suşları da tanımlanmıştır. Böyle bir direnç aşırı miktarda penisilinaz üretimine bağlı olarak (borderline-resistant *S.aureus*-BORSA) meydana gelebildiği gibi; esas olarak normal penisilin bağlayan proteinlere sahip olduğu halde, bu proteinlerin beta-laktamlara zayıf afinitesi (methicillin-intermediate *S.aureus*-MODSA) sonucunda da görülebilir. BORSA ve MODSA suşları genetik olarak MRSA suşlarından farklıdır ve klinik ve epidemiyolojik önemleri bilinmemektedir (Derbentli 2004).

1. 6. Stafilocokların Tanısı

Stafilocok suşlarının identifikasyonu fenotipik ve genotipik tiplendirme yöntemleri ile yapılabilmektedir (Fluit ve ark 2001). Fenotipik tiplendirme yöntemlerinin tekrarlanabilirlik düzeyleri düşük ve ayırım güçleri zayıftır. Ayrıca fenotipik olarak aynı fakat genotipik olarak farklı olan suşları ayırt edememektedir. Bu yüzden son yıllarda tekrarlanabilirliği ve ayırım gücü yüksek olan genotipik yöntemler kullanılmaktadır.

1. 6. 1. Fenotipik Yöntemler

Fenotipik metotlar; antibiyotik duyarlılık testleri, biyotipleme, serotipleme, bakteriyosin tipleme, fajla tiplendirme, protein bazlı yöntemler (örneğin Multilokus Enzim Elektroforezi: MLEE) olarak sıralanabilir (Arbeit 1995). Antibiyotik direnç profil analizi

(antibiyogram), laboratuvarlarda en çok kullanılan, ucuz, uygulanması kolay, hızlı ve ekonomik bir metottur. Fakat ayırım gücü yeterli değildir (Foster 2003).

1. 6. 1. 1. Biyokimyasal Testler

Biyokimyasal testler rutin teşhis laboratuvarlarında en çok uygulanan, nisbeten ucuz ve kolay uygulanabilir yöntemlerdir. Stafilocoklar, mikrokoklardan farklı olarak oksidaz negatif olup basitrasine dirençlidir, furazolidone ve lizostafine ise duyarlıdır. Stafilocokların laboratuvar tanısında koloni morfolojisi, boyanma, pigment üretimi, hemoliz, mannitol fermentasyonu, yüksek tuz konsantrasyonlu ortamda üreme gibi özellikler araştırılmaktadır. *S. aureus*'un bütün suşları koagülaz pozitif olup mannitolü fermente ederler. *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus* da üreaz testi pozitifdir. KNS'lar kendi aralarında öncelikle novobiyosin (5 mg/ml) duyarlılıklarına göre iki gruba ayrılırlar. Novobiyosine duyarlı grup genel olarak *S. epidermidis* grubu, dirençli grup ise *S. saprophyticus* grubu (*S. saprophyticus* subsp. *saprophyticus*, *S. xylosus*, *S. cohnii* ve *S. sciuri*) olarak adlandırılır. Novobiyosin duyarlılığı dışında laboratuvarlarda KNS'larda tür tanımlanması yoğun emek, uzun zaman ve maliyete neden olduğundan rutin olarak yapılmaz (Bannerman 2003, Peacock 2005, Alen ve ark. 2006). Stafilocokların tanısında en çok kullanılan biyokimyasal testler aşağıda özetlenmiştir.

1. 6. 1. 1. 1. Katalaz Testi: H₂O₂, su ve oksijene ayırtırmaya yarayan katalaz enziminin gösterilmesi için yapılır. Bu test Gram pozitif olan stafilocok ve mikrokokların, streptokok üyelerinden ayırımını sağlar (Alen ve ark. 2006).

1. 6. 1. 1. 2. Koagülaz Testi: Koagülaz pozitif stafilocokları diğer stafilocoklardan ayırt etmede en yaygın kullanılan önemli bir tanı testidir. Tüp ve lam testi olmak üzere iki şekilde yapılabilir. Tüp koagülaz testinde stafilocokların besiyerine salgıladıkları serbest koagülaz araştırılır. Bu madde plazmada bulunan "coagulase reacting factor" (CRF) ile ilişki kurar ve trombokinaza benzeyen bir etki ile fibrinojeni pıhtılaştırır. Pıhtının oluşması pozitif sonuç olarak değerlendirilir. Lam koagülaz testinde ise bağlı koagülaz = kümeleştirme faktörü (clumping factor) gösterilmektedir. Bağlı koagülaz kültür filtratlarına geçmez, hücreye bağlıdır. Besiyerinden öze ile alınan stafilocok kolonisi lam üzerinde bir damla distile su ile homojenize edilir ve üzerine bir damla plazma damlatılıp elde çevrilerek karıştırılır. Olumlu sonuçlarda gözle görülen kümeleşmeler oluşur (Bilgehan 2002, Alen ve ark. 2006). Gram pozitif kokların en önemli ayırd edici özellikleri Çizelge 1. 6.'da verilmiştir.

Çizelge 1. 6. Gram pozitif kokların ayırd edici özellikleri (Quinn ve ark. 1994).

	Koagulaz	Katalaz	Oksidaz	O-F Glikoz	Hemoliz	Basitrasin
Patojenik Stafilokok	+	+	–	F	+(-)	R
Apatojenik Stafilokok	-	+	–	F	+(-)	R
Enterokoklar	-	-	-	F	(+)	R
Streptokoklar	-	-	-	F	(+)	R
Mikrokoklar	-	+	+	O	-(+)	S

Fenotipik yöntemlerle özellikle KNS'ların tür düzeyinde identifikasyonları oldukça güç yapılmakta ve amplifikasyon ve dizi analizine dayalı sekans tekniği bu gibi güç üreyen mikroorganizmaların tür düzeyinde identifikasyonlarının yapılmasında oldukça faydalı olmaktadır. Moleküler tanısal yöntemler, geleneksel yöntemler kullanarak identifikasyon yapılması zor veya imkânsız olan enfeksiyöz etkenlerin tanımlanmasında en değerli yöntemler olarak kabul edilmektedirler. Enfeksiyöz hastalıkların moleküler tanısı çoğunlukla nükleik asit odaklıdır (Mehndiratta ve ark. 2009).

Bakteri ribozomlarının 30S ve 50S alt birimlerinden elde edilen 5S ve 16S rRNA'ların baz dizileri çalışmalarda çok yaygın olarak kullanılmaktadır. rRNA'lar bütün mikroorganizmalarda bulunurlar ve mikroorganizma evrimi ile ilişkilerini araştırmada idealdirler. Bütün ribozomlardaki işlevleri aynıdır; sabit ve kritik rolleri nedeni ile de yapıları zaman boyunca çok az değişir. Ana filogenetik grupların çoğunda 16S rRNA bir veya daha çok karakteristik nükleotid dizilerine sahiptir; bunlara “oligonükleotid imzaları” denir (Kaya 2009). 16S rRNA gen sekansı 1980'li yıllardan beri bakterilerin sınıflandırılmasında ve genotipik analizleri için önemli bir araç olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin kullanılmasıyla pek çok yeni cins ve tür ayrılmıştır. rRNA mutasyonlardan en az etkilenen genetik materyaldir. Bu amaçla araştırılan 16S rRNA, rRNA 30 S alt ünitesinde yer alan bir dizidir. Özellikle kültürde üretilmemiş veya klasik yöntemlerle zor tanımlanabilen bakterilerin identifikasyonu için 16S rRNA hedef dizidir. 16S rRNA'nın birkaç bölgesi tüm bakterilerde çok iyi korunmuştur. Bu korunmuş bölgelerden seçilen primerler tüm bakterilerde 16S rRNA amplifikasyonunu sağlar ve bunlara universal primerler denir. Çoğaltılan bölgeler aynı zamanda tür identifikasyonunu sağlayan özgün değişken bölgeleri de içerir. Bundan dolayı 16S rRNA gen sekansına dayalı analiz yöntemleri insanlarda klinik tanı laboratuvarlarında bakteriyel izolatların

identifikasyonunda kullanılan önemli bir yöntem halini almıştır (Rantakokko-Jalava ve ark. 2000, Woo ve ark. 2001, Anđ Küçüker ve ark. 2002).

Bakterilerin 16S rRNA sekansına dayalı moleküler identifikasyonu veteriner klinik sahada karşılaşılan bakterilerin tanımlanmasında da kullanılmaya başlanmıştır (Chai ve ark. 2003). Özellikle veteriner rutin teşhis laboratuvarlarında KNSların tür düzeyinde identifikasyonları zor ve zaman alıcı olduğundan bu yöntem tercih edilmektedir.

Türkiye’de veteriner sahada stafilokokların tür düzeyinde identifikasyonlarının yapılmasında sekans analizinin kullınıldığı ilk çalışma Kaynarca ve Türkyılmaz tarafından gerçekleştirilirken; bunu tarafından yine aynı yörede klinik ve subklinik mastitislere neden olan bulaşıcı ve çevresel aerobik patojen bakteriyel etkenlerin sekans analizi kullanılarak identifikasyonlarının yapıldığı bir diğer çalışma izlemiştir (Türkyılmaz ve ar. 2010). Her iki çalışmada da özellikle identifikasyonları güç ve zaman alıcı mikroorganizmaların tür düzeyinde identifikasyonlarının yapılmasında sekans analizi kullanılmasının faydalı ve pratik bir yöntem olduğu bildirilmiştir. Sekans yöntemi için bakterinin izolasyonu, bunlardan DNA ekstraksiyonu ve PCR ile 16S rRNA geninin çoğaltılarak sekanslanması gerekmektedir (Ludwig ve Schleifer 1992).

1. 7. Stafilokoklarda Metisilin Direncinin Belirlenmesi

Metisilin direncinin en kısa sürede doğru olarak saptanmasının bu infeksiyonların kontrol altına alınmasında ve tedavisinde doğru antibiyotiğin seçilmesinde büyük önem taşımaktadır. Metisilin direncinin heterojen olarak ortaya çıkması, klinik mikrobiyoloji laboratuvarında bu suşların saptanmasını zorlaştırmaktadır. Uygunsuz saklanmış betalaktam antibiyotik tozlarının kullanımı, inkübasyon süresinin kısa tutulması (24 saat yerine 18 saat), inkübasyon derecesinin 37°C olması veya inokulum miktarının az olması yanlış sonuçların elde edilmesine yol açabilir (Chambers 1988, Hackbarth ve ark. 1997). Günümüzde metisilin direncinin saptanmasında *mecA* geninin moleküler yöntemlerle saptanması altın standart olarak kabul edilmektedir. Ancak bu yöntemlerin klinik laboratuvarlarda uygulanması zor ve pahalıdır. Bu nedenden dolayı klinik laboratuvarlarda *S. aureus* izolatlarında metisilin direncinin saptanmasında çeşitli fenotipik yöntemler kullanılmaktadır.

1. 7. 1. Disk Difüzyon Yöntemi: Disk difüzyon yöntemi, klinik laboratuvarlarda en sık kullanılan yöntemdir (Brown ve ark. 2005). En çok oksasilin ve sefoksitin disk difüzyon yöntemleri kullanılmaktadır. Oksasilin disk difüzyon yönteminde MRSA izolatlarının saptanması amacıyla 1 µg oksasilin diski kullanılmaktadır. 0.5 McFarland bulanıklığa ayarlanmış olan bakteri süspansiyonundan Mueller-Hinton agar (MHA)'ya ekim yapıldıktan sonra, plaklar 35°C'de 24 saat inkübe edilmektedir. Oksasilin disk difüzyon yöntemi için CLSI tarafından belirlenen direnç sınır değerlerine göre inhibisyon zon çapı ≤ 10 mm olan izolatlar dirençli, 11-12 mm olan izolatlar orta düzeyde duyarlı, ≥ 13 mm olan izolatlar ise duyarlı olarak kabul edilmektedir (CLSI 2007). Bazı *S. aureus* izolatları yüksek miktarda beta-laktamaz enzimi oluştururlar (McDougal ve Thornsberry 1986). Bu suşlar metisiline dirençli olmamalarına rağmen, disk difüzyon testiyle metisiline sınırda dirençli olarak saptanırlar. Bu nedenle testin duyarlılığını arttırmak amacıyla besiyerine %5 NaCl eklemek, inkübasyon süresini 48 saate uzatmak, yüksek inokulum kullanmak ya da inkübasyon derecesini 35°C'den 30°C'ye azaltmak gibi girişimler beta-laktamaz yapımını arttırabilir ve duyarlı suşların dirençli olarak saptanmasına yol açabilir. Sefoksitin disk difüzyon yöntemi ise son yıllarda gündeme gelmiştir. Yapılan çalışmalarda, oksasilin disk difüzyon yöntemiyle elde edilen sonuçlara göre bu yöntemin duyarlılık ve özgüllüğünün daha yüksek olduğu bulunmuştur (Felten ve ark. 2002, Skov ve ark. 2003, Swenson ve Tenover 2005, Pottumarthy ve ark. 2005). Ayrıca, sefoksitin disk difüzyon yönteminin oksasilin disk difüzyon yöntemine göre değerlendirilmesinin daha kolay olduğu bildirilmiştir (Swenson ve Tenover 2005). Bu yöntemde 30 µg sefoksitin diski kullanılmaktadır. 0.5 McFarland bulanıklığa ayarlanmış olan bakteri süspansiyonundan MHA'ya ekim yapıldıktan sonra, plaklar 35°C'de 24 saat inkübe edilmektedir (CLSI 2007).

1. 7. 2. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi: Bu yöntemde %2 NaCl içeren Mueller-Hinton sıvı besiyeri kullanılmaktadır CLSI, testte kullanılacak olan inokulum miktarının 5×10^5 cfu/mL olmasını ve 24 saat 35°C'de inkübasyonu önermektedir. Antibiyotik olarak oksasilin tercih edilmektedir. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi için CLSI tarafından belirlenen direnç sınır değerlerine göre MİK değeri ≤ 2 µg/mL olan izolatlar duyarlı, ≥ 4 µg/mL olan izolatlar ise dirençli olarak kabul edilmektedir (CLSI 2007).

1. 7. 3. Agar Tarama: Bu yöntemde, 6 µg/mL oksasilin ve %4 NaCl içeren MHA'ya 0.5 McFarland bulanıklığa ayarlanmış olan bakteri süspansiyonundan ekim

yapılır. Plaklar 24 saat 35°C’de inkübe edilir. Herhangi bir koloni üremesi halinde test edilen suş metisiline dirençli olarak kabul edilir. Testin duyarlılık ve özgüllüğü oldukça yüksektir (CLSI 2007).

1. 7. 4. E-Test Yöntemi: E-test yöntemi (AB Biodisk, Solna, İsveç) de mikrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemlerine benzer şekilde test koşullarından etkilenmektedir. Üretici firma tarafından %2 NaCl içeren MHA’ya 0.5 McFarland bulanıklığa ayarlanmış olan bakteri süspansiyonundan ekim yapılması önerilmektedir (Skov ve ark. 2003).

1. 7. 5. Lateks Aglutinasyon: Oldukça kısa bir sürede sonuç veren lateks aglutinasyon testi, PBP2a saptanmasını temel alan bir yöntemdir. Koloni süspansiyonlarından PBP2a ekstraksiyonu yapıldıktan sonra lateksle kaplanmış olan *PBP2a* monoklonal antikorlarla aglutinasyon saptanır. *S. aureus* için testin duyarlılık ve özgüllüğü oldukça yüksektir (Velasco ve ark. 2005).

1. 7. 6. Kromojenik Yöntemler: Son yıllarda MRSA’ların saptanmasında kromojenik enzimatik substratları içeren kromojenik besiyerleri denenmektedir. Bunlar arasında MRSA-ID (bioMerieux), MRSA Select (Bio-Rad) ve ORSAB (Oxoid) gibi değişik kromojenik besiyerleri yer almaktadır. Ancak yapılan çalışmalarda oldukça farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bu konuda daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır (Louie ve ark. 2006, Stoakes ve ark. 2006, van Hal ve ark. 2007).

Ayrıca stafilokokların tanısında etkenin biyokimyasal özelliklerinin ortaya konulduğu ticari sistemler de kullanılmaktadır. API Staph (BioMerieux- Vitek), Minitek Gram positif panel (BD Microbiology System), ID 32 Staph (BioMerieux), Rapidec Staph (BioMerieux-Vitek), Vitek1 (BioMerieux) ve Vitek 2 sistem (BioMerieux) örnek olarak verilebilir (Bilgehan 2000).

1. 7. 7. Moleküler Yöntemler: MRSA izolatlarının saptanmasında *mecA* geninin PCR temelli yöntemlerle araştırılması altın standart olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte, *mecA* geni bulunan, ancak bunu eksprese etmeyen duyarlı suşların bulunabileceği unutulmamalıdır (Swenson ve Tenover 2005, Velasco ve ark. 2005).

PCR, üç değişik sıcaklıkta çalışan basamakların bir döngü halinde tekrarlanması ile gerçekleştirilir. İlk basamak denatürasyondur. Bu basamakta 94°C'ye kadar ısıtılan DNA'nın iki zinciri birbirinden ayrılır. İkinci basamak birleşmedir (annealing). Sıcaklığın düşürülmesi ile primerler çoğaltılacak bölgenin uçlarında yer alan kendilerine özgül dizileri tanır, hidrojen bağları kurarak bağlanır. Primerlerin ortamdaki derişimlerinin, kalıp DNA'dan milyonlarca kez daha fazla olması sayesinde, ayrılan kalıp DNA zincirleri tekrar birbirlerine değil, primerler kalıp DNA zincirlerine bağlanırlar. Primerlerin özgül olarak bağlanması için kullanılan sıcaklık genellikle 50-70°C arasında değişir. Üçüncü basamak primerlerin uzamasıdır (extension). Karışım, DNA polimerazın çalıştığı optimum sıcaklığa getirildiğinde primerlere bağlanmış olan enzim molekülleri, bunların 3 ucuna, kalıp DNA'ya uygun nükleotitleri ekleyerek DNA sentezi yaparlar. Bu üç basamak bir döngüyü oluşturur ve her tekrarlanışında iki primer arasında kalan özgül DNA parçasının her iki zincirinin birer kopyası çıkarılmış olur. Çoğaltılan DNA parçaları birçok değişik yöntemle belirlenebilir. Bunlardan en yaygın olarak kullanılanı agaroz jel elektroforezdir (Köksal 2001, Nolte ve Caliendo 2003).

Bu yöntemlerden biri de ticari olarak geliştirilmiş, nükleik asit amplifikasyonu ile birlikte eş zamanlı artış gösteren floresans sinyalin ölçülmesiyle kısa sürede sonuç veren real-time PCR yöntemidir. Konvansiyonel yöntemler 48 saatten daha fazla süre almakla birlikte, PCR ve real time PCR teknikleri kullanılarak MRSın daha kısa sürede ve daha güvenli bir şekilde identifikasyonları yapılmaktadır (Huletsky ve ark. 2004). Moleküler teknikler rutin tanı laboratuvarlarında MRS suşlarının identifikasyonunda antimikrobiyal duyarlılık testleri ile beraber sıklıkla uygulanmaktadır, antimikrobiyal duyarlılık testleri tek başlarına MRS'ların belirlenmesinde yeterli değildir (Trindade ve ark. 2003). MRS suşlarının PCR tekniği ile basit bir şekilde identifikasyonları 2-4 saat içerisinde yapılabilir.

Multipleks PCR (MPCR) birçok hedef gen aynı PCR reaksiyon miskinde çoklu oligonükleotid primerleri kullanılarak amplifikasyonu gerçekleştirilmektedir. PCR primerlerinin sayısı PCR koşullarından (annealing ısısı, dNTP konsantrasyonu, Mg²⁺ konsantrasyonu, template DNA konsantrasyonu vs.) büyük oranda etkilenir. MPCR ideal bir DNA amplifikasyon yöntemi olmasına rağmen kontaminasyon, çapraz reaksiyonlar, nonspesifik bant oluşumu, optimizasyonunun zor olması gibi dezavantajları da bulunmaktadır (Van Pelt-Verkuil ve ark. 2008).

MRSA suşlarının MPCR ile tiplendirilmesi yöntemleri daha önceden çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Ito ve ark 2001, Oliviera ve ark. 2002, Zhang ve ark. 2005, Boye ve ark. 2007, Kondo ve ark. 2007). MPCR tiplendirme yönteminde MRS'ların *SCCmec*'in mobilitesini sağlayan, kasetin bakteriyel genoma integrasyon ve eksizyonundan sorumlu *ccr* gen kompleksinin karakterizasyonuna dayanır (Ito ve ark. 2001). *ccr* gen kompleksi ile birlikte class A, B, C, D olarak dört grupta incelenen *mec* kompleksi (Ito ve ark 2004) *SCCmec* tiplerine göre HK-MRSA ve TK-MRSA olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (Zhang 2005). MPCR infeksiyon kontrol stratejilerinin belirlenmesinde ve epidemiyolojik çalışmalarda salgınlar esnasında klonal ilişkinin belirlenmesinde faydalıdır (Chongtrakool ve ark. 2006) .

Epidemiyolojik araştırmalarla öncelikle fenotipik yöntemlerle MRSA suşları belirlendikten sonra etkenin moleküler karakterizasyonu genotipik yöntemler kullanılarak yapılabilmektedir. Bu amaçla genotipik tiplendirme yöntemlerinden sıkça faydalanılmaktadır. Genotiplendirme yöntemleri ile etkenlerin alt tiplendirmeleri yapılmakta, klonal yakınlıkları belirlenmekte ve bir patojenin doğadaki yayılma yolları ve kaynakları tam olarak belirlenerek etkili kontrol ve eradikasyon stratejileri geliştirilebilmektedir (Derbentli 1996). MRSA suşlarının epidemiyolojik tiplendirilmesi, var olandan farklı yeni bir suşun farkına varılmasının yanı sıra yayılmasını önlemek ve kontrol altına almak için önemlidir (Hsu ve ark. 2001).

Genotipik tiplendirme yöntemleri aşağıdaki gibi özetlenebilir:

i) Kromozomal DNA analizine dayanan yöntemler (Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), Single Strand Conformational Polymorphism (SSCP), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), RFLP sonrası prob hibridizasyonu),

ii) Ekstrakromozomal DNA analizine dayanan yöntemler (Plasmid profil analizi (PPA), amplifikasyona dayanan yöntemler (Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD),

iii) Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile amplifikasyona dayalı yöntemler (PCR)-RFLP, PCR AFLP, REP-PCR, Stafilokokal Kromozomal Kaset (*SCCmec*) Analizi),

iv) Sekansa dayalı yöntemler (Multi Lokus Sequences Typing (MLST), stafilakokal protein A (*spa*) ve koagülaz gen polimorfizm (*coa*) analizi) olarak özetlenebilir. Bu tekniklerin her birinin ayırım gücü, tekrarlanabilirlik ve tiplendirilebilirliklerine göre avantajları ve dezavantajları vardır (Bannerman 2003, Peacock 2005, Alen ve ark. 2006).

Yurdumuzda MRSA suşlarının moleküler epidemiyolojilerinin çalışıldığı en kapsamlı çalışma Yıldız ve ark tarafından 2010 yılında bildirilmiştir. Çalışmada Türkiye'de 2005- 2007 yılları arasında izole edilen 12 farklı coğrafi bölgelerdeki 12 hastaneden izole edilen 397 suşun moleküler epimeyolojik analizleri yapılmış 8 ulusal 4 bölgesel klon varlığı bildirilmiştir. 359 suşun SCCmec Tip III, 4 suşun Tip I ve 30 suşun Tip IV olduğu; 4 suşunda tiplendirilmesinin yapılamadığını bildirmişlerdir. Ulusal klonların hepsinin ST239, bölgesel klonun bir tanesi ST97 üç tanesinin de ST737 olduğu; yalnızca 5 suşun PVL pozitif olduğu bunlardan ikisinin ST80 ve SCCmec Tip IV oldukları bir tanesinin SCCmec type IV and ST8 olduğu bildirilmişlerdir. Bu çok merkezli çalışma Türkiye'de en yaygın ulusal MRSA klonunun ST239-SCCmec III (bu klon Brezilya klonu olarak bilinmektedir); bölgesel klon ST737 SCCmec IV olarak belirlenmiştir. (Yıldız ve ark. 2010). Yurdumuzda veteriner sahada bu konuda yapılmış en detaylı moleküler epidemiyolojik çalışma Türkyılmaz ve ark. tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışmada Aydın yöresinde izole edilen *S. Aureus* suşlarında metisilin direnç oranının sefoksitin direncinin MRSA suşlarında %17,2 olduğu bildirilirken; moleküler tiplendirme yöntemleri içerisinde altın standart olarak kabul edilen PFGE yöntemi ile suşlar arasındaki klonal ilişki incelenmiş alt tipleri ile birlikte üç pulsotip belirlenmiştir. Pulsotip B olan suşların SCCmecTip IV, t190 ve ST8 olduğu; pulsotip A ve C'nin ise SCCmec TipIII, t030 ve ST 239 (pulsotip A) ve ST239 benzeri (pulsotip C) oldukları belirlenmiştir. Çoklu antibiyotik direncine sahip oldukları belirlenen tüm suşların hiçbirisinde PVL toksin genine de rastlanmadığı bildirilmiştir. Çalışmada 16 MRSA suşunun 14'ünün hastane kaynaklı MRSA ST239-III olduğu ve bunun MRSA'nın insanlardan hayvanlara bulaşmış olabileceğini gösterdiği vurgulanırken; MRSA ST8/IV suşlarının varlığının yörede toplum kökenli suşların da bulunduğunu gösterdiği bildirilmiştir (Türkyılmaz ve ark. 2010).

1. 8. MRS İnfeksiyonlarında Tedavi

Moleküler epidemiyolojik çalışmalar, bütün türlerde gözlenen direnç artışlarının, direnç genlerinin toplumda sık olarak bulunan epidemik klonlar tarafından alınmasına

bağlı olduğunu göstermektedir. Bu klonlar hastane ortamına girdiğinde de özellikle sağlık çalışanlarının elleriyle ortama ve hastadan hastaya yayılmaktadır (Witte ve ark. 2008).

Gram pozitif bakterilerin kazandığı ve kazanmakta olduğu antibiyotik direnci günümüz bilim dünyasının en çok ilgi duyduğu alanlardandır. *S. aureus*, intrinsek virülansı, yaşamı tehdit edici infeksiyonlara neden olabilmesi ve çevresel koşullara üstün adaptasyon yeteneğiyle en çok ilgi çeken patojen olma özelliğini korumaktadır (Ünal 2009). *S. aureus*'un en iyi bilinen özelliklerinden birisi klinik kullanıma yeni giren antibiyotiklere bile kısa sürede etkin direnç mekanizmaları geliştirebilmesidir. *S. aureus*'un direnç geliştirme serüveni ilk olarak sülfonamidlerle başlamıştır. En son olarak da glikopeptid direnci gelişmiştir. Geliştirilen yeni ilaçlara *S. aureus*'un geliştirdiği direnç mekanizmaları insanlıkla bakteriler arasındaki savaşın en çarpıcı örneklerinden birisidir (Barton ve ark. 2006, Bishop ve ark. 2006). Stafilokoklar antibiyotiklere hızlı direnç geliştirdiklerinden, uygun antibiyotiğin seçimi için antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması gerekmektedir. Direnç gelişimi özellikle *S. aureus* suşlarında daha sık görülmektedir. *S. aureus*'un neden olduğu bakteriyemi, pnömoni, endokardit ve osteomyelit gibi ağır seyirli infeksiyonlarda yüksek dozlarda ve uzun süreli antibiyotik uygulanması buna neden olabilmektedir (Bannerman 2003, Rice ve ark. 2003, Peacock 2005, Moreillon ve ark. 2005, Gülay 2008).

Günümüzde stafilokok suşlarının çoğunun beta-laktamaz üretmeleri nedeniyle penisilin G tedavide kullanılamaz duruma gelmiştir. Aynı zamanda MRS suşlarının çoğu, başta diğer beta-laktam antibiyotikler olmak üzere, aminoglikozidlere ve tetrasikline de dirençlidir (Rice ve ark. 2003, Peacock 2005, Gür 2008). Stafilokok infeksiyonlarında kullanılan başlıca antibiyotikler arasında penisilinaza dirençli penisilinler (antistafilokokal penisilinler) olan metisilin, nafsilin ve izoksazolil penisilinler (kloksasilin, dikloksasilin, flukloksasilin ve oksasilin) yer almaktadır. Bu antibiyotikler beta-laktamazların hidrolizine dirençlidirler. Etkinlikleri stafilokok infeksiyonları ile sınırlıdır, bu nedenle “anti-stafilokokal penisilinler” de denilmektedir. Metisilin direnci, PBP2a denen protein varlığına bağlıdır. PBP2a'yı kodlayan gen bakteriyel kromozom üzerinde taşınmaktadır. Stafilokoklarda metisilin direnci, beta-laktamlara genel direncin ifadesidir. Bu nedenle MRSla oluşan infeksiyonların tedavisinde beta-laktam antibiyotikler önerilmemektedir (Rice ve ark. 2003, Peacock 2005, Ayaz 2008). Bunların dışında beta-laktamaz inhibitörlü kombine penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler, aminoglikozidler, trimetoprim-

sülfametoksazol (TMP-SMZ), kinolonlar, kloramfenikol, tetrasiklin, rifampisin ve glikopeptidler (vankomisin, teikoplanin, istosetin, avoparsin) tedavide en çok tercih edilen antibiyotikler arasındadır (Sakarya 2008, Usluer 2008).

Yurdumuzda MRSA'ların moleküler epidemiyolojilerinin incelendiği sınırlı sayıda çalışma bulunmakla beraber; hayvanlarda özellikle MRKNSın moleküler tiplendirme yöntemlerinden birisi olan SCC*mec* analizi ile incelendiği bir çalışma, şu anki bilgilerimize göre, bulunmamaktadır. Bu çalışma subklinik mastitisli sığır sütlerinden ve burun sıvılarından (bu sığırlardan ve bu sığırlar ile yakın temasta bulunan sektör çalışanlarından alınan) izole edilen stafilokok suşlarında metisilin direncinin belirlenmesi, metisilin dirençli *S. aureus*'un diğer metisilin dirençli stafilokoklardan ayırt edilmesi için kullanılabilecek tripleks PCR yöntemi geliştirilmesi, MRS suşlarının SCC*mec* tiplerinin MPCR ile incelenmesi ve böylece MRS'ların SCC*mec* tiplerinin Aydın yöresindeki durumunun belirlenebilmesi için gerçekleştirilmiştir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2. 1. GEREÇ

2. 1. 1. İzolasyon Örnekleri

2. 1. 1. 1. Süt: Bu çalışmada, 2010 Ocak–Mayıs tarihleri arasında, Aydın ili ve çevresinde bulunan, 15 küçük ve orta ölçekli (1–20 baş arası sağmal inek) sığır işletmesi ziyaret edildi. İşletmelerin hepsinde makine ile sağım işlemi yapılmıyordu. Çalışmada hepsi laktasyon döneminde olan, son üç ayda antibiyotik tedavisi almamış, en az bir doğum yapmış, 3–9 yaşlı, Holştayn ırkı, 129 inek kullanıldı ve subklinik mastitisli olan ineklerin belirlenebilmesi amacı ile Kalifornia Mastitis Testi (CMT) yapıldı. Subklinik mastitisli olarak belirlenen 56 inekten 145 süt örneği alındı.

2. 1. 1. 2. Burun Sıvı: Süt örneği alınan subklinik mastitisli 56 inekten, bu inekler ile yakın temasta olan 29 bakıcıdan, bu işletmeler ile ilgilenen 5 subklinik mastitisli Veteriner Hekim’den toplam 90 burun sıvı örneği alındı.

2. 1. 2. Besiyerleri, Ayıraçlar, Solusyonlar ve Antibiyotik Diskleri

2. 1. 2. 1. Besiyerleri

2. 1. 2. 1. 1. Blood Agar (Merck 1. 10886)

Blood Agar..... 40 g
Distile su..... 1000 ml

Karışımın pH’sı 7,2–7,4’e ayarlanmış, onbeş dakika otoklav edildikten sonra, 50°C’ye kadar soğutulup, içine %7 oranında steril koyun kanı ilave edildi.

2. 1. 2. 1. 2. Mannitol Salt Phenol Red Agar (MSA) (Merck 1.05404)

MSA ayırt edici ve seçici bir besiyeridir. Stafilokokların saf olarak elde edilmesi ve laboratuvarında tanımlanabilmesi açısından önemli olan mannitol fermantasyonunun gözlenebilmesi için MSA kullanıldı.

Mannitol Salt Phenol Red Agar.....	108 g
Distile su.....	1000 ml

Karışımın pH'sı 7,2–7,4'e ayarlanıp, onbeş dakika otoklavda sterilize edildikten sonra, 50°C'ye kadar soğutulup petrilere döküldü.

2. 1. 2. 1. 3. Mueller-Hinton Agar (MHA) (Oxoid CM 129)

Mueller-Hinton Agar.....	38 g
Distile su.....	1000 ml
pH: 7,3±0,2	

Besiyeri 38 g olacak şekilde distile su içinde kaynatılarak eritilip, otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilip otoklav sonrası 45–50°C'a soğutulup steril petri kutularına 12,5 ml olacak şekilde döküldü.

2. 1. 2. 1. 4. Brain Heart Infusion Broth (BHIB) (%20 Gliserinli) (Oxoid CM 0225)

BHIB	8 g
Gliserin	20 ml
Distile su.....	80 ml

Karışımın pH'sı 7,2–7,4'e ayarlanıp, 0,5 ml miktarda ependorf tüplere dağıtıldıktan sonra 121°C'de onbeş dakika otoklavda sterilize edildi.

2. 1. 2. 1. 5. Trypton Soya Broth-TSB (%7,5 Tuzlu) (Oxoid CM 129)

TSB.....	8 g
NaCl.....	75 g
Distile su.....	1000 ml

Karışımın pH'sı 7,2–7,4'e ayarlandı. 5 ml miktarda tüplere dağıtıldı. 121°C'de onbeş dakika otoklavda sterilize edildi.

2. 1. 2. 1. 6. Stuart Transport Medium (BBL™)

Kullanılan besiyerinin içeriği aşağıda verilmiştir.

Sodium Thioglycollate	1.0 g
Sodium Glycerophosphate	10.0 g
Calcium Chloride	0.1 g
Methylene Blue	2.0 mg
Agar	3.0 g

2. 1. 2. 2. Ayıraç ve Solusyonlar

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

Disodium EDTA-2H ₂ O.....	186,1 g
--------------------------------------	---------

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

2. 1. 2. 2. 2. TBE (Tris, Borik Asit, EDTA, pH: 8,0) Buffer

2. 1. 2. 2. 2. 1. TBE (10x, Stok Solusyon)

Tris Base.....	121, 10 g
Borik Asit	61,83 g
EDTA	5,84 g

Distile su ile hacim 1000 ml'ye tamamlanarak 121°C'de onbeş dakika otoklav edilip, pH 8,0'e ayarlanarak buzdolabında saklandı.

2. 1. 2. 2. 2. 2. TBE (0,5x, Kullanma Solusyonu)

10x TBE.....	50 ml
Distile Su.....	950 ml

Karıştırılıp kullanma solusyonu hazırlandı.

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

Bromofenol mavisi.....	25 mg
Sükroz	4 g
H ₂ O	10 ml'ye

tamamlandı.

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

Tris Base	121 g
-----------------	-------

Tris base 800 ml distile suda eritilip, yaklaşık olarak 60 ml HCl asit ilave edilerek pH: 7,6'ya ayarlanarak karışım 1000 ml'ye tamamlandı. 121°C'de onbeş dakika otoklav edildi.

2. 1. 2. 2. 5. Lizis solusyonu

Bakteriyel DNA ekstraksiyonu amacı ile kullanılan lizis solusyonu aşağıdaki gibi hazırlandı:

Lysozyme (5000 units ml ⁻¹).....	0,5 ml
Lysostaphin (500 units ml ⁻¹).....	0,5 ml
EDTA (0,5 M).....	0,2 ml
Tris (1M).....	0,1 ml
Distile su.....	8,7 ml

(CDS 2009).

2. 1. 2. 3. Antibiyotik Diskleri

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

2. 1. 3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

2. 1. 3. 1. Kullanılan Cihazlar

PCR 96 örnek kapasiteli Eppendorf MasterCycler kademeli termal döngüleme cihazında gerçekleştirilmiştir.

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

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

2. 1. 3. 3. Primerler

Metisilin dirençli stafilokok suşlarının belirlenmesinde kullanılan primerler, dizileri, ampikon büyüklükleri ve primerlerin alındığı kaynaklar Çizelge 2. 1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2. 1. Tripleks PCR'da kullanılan primerler, dizileri, ampikon büyüklükleri ve kaynak

Primer	Dizi (5'-3')	Ampikon büyüklüğü (bp)	Kaynak
16S20 16S1390	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG GAC GGG CGG TGT GTA CAA	1371	Sghir ve ark. 1998, Suau ve ark. 1999
nuc F1 nuc R1	GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC	279	Kim ve ark. 2001
MECA P4 MECA P7	TCCAGATTACAACCTTCACCAGG CCACTTCATATCTTGTAACG	162	Oliveira ve ark. 2001

SCC*mec* tipi belirlenmesinde kullanılan primerler ve ampikon uzunlukları Çizelge 2. 2.'de verilmiştir.

Çizelge 2. 2. SCCmec tipi belirlenmesinde kullanılan primerler dizilimleri, amplikon büyüklükleri ve SCCmec Tipi

Primer	Dizi (5'-3')	Amplikon büyüklüğü (bp)	SCCmec Tipi
CIF2 F2 CIF2 R2	TTCGAGTTGCTGATGAAGAAGG ATTTACCACAAGGACTACCAGC	495	I
KDP F1 KDP R1	AATCATCTGCCATTGGTGATGC CGAATGAAGTGAAAGAAAGTGG	284	II
MECI P2 MECI P3	ATCAAGACTTGCATTTCAGGC GCGGTTTCAATTCACTTGTC	209	II, III
DCS F2 DCS R1	CATCCTATGATAGCTTGGTC CTAAATCATAGCCATGACCG	342	I, II, IV
RIF4 F3 RIF4 R9	GTGATTGTTTCGAGATATGTGG CGCTTTATCTGTATCTATCGC	243	III
RIF5 F10 RIF5 R13	TTCTTAAGTACACGCTGAATCG GTCACAGTAATTCCATCAATGC	414	III
IS431 P4 pUB110 R1	CAGGTCTCTTCAGATCTACG GAGCCATAAACACCAATAGCC	381	IA
IS431 P4 pT181 R1	CAGGTCTCTTCAGATCTACG GAAGAATGGGGAAAGCTTCAC	303	IIIA
MECA P4 MECA P7	TCCAGATTACAACCTCACCAGG CCACTTCATATCTTGTAACG	162	mec pozitif
Type V-F Type V-R	GAACATTGTTACTTAAATGAGCG TGAAAGTTGTACCCTTGACACC	325	V
mecI-F mecI-R	CCCTTTTATACAATCTCGTT ATATCATCTGCAGAATGGG	146	Class A mec
ccrAB-β2 ccrAB-α2 ccrAB-α3 ccrAB-α4	ATTGCCTTGATAATAGCCTCT AACCTATATCATCAATCAGTACG TAAAGGCATCAATGCACAAACAC AGCTCAAAAGCAAGCAATAGAAT	700 1000 1600	Tip 1 ccr Tip 2 ccr Tip 3 ccr

2. 1. 4. Elektroforez Cihazı

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

2. 1. 4. 1. Agarose Jel Hazırlanışı

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

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

ısısında soğumaya bırakıldı. Soğutulan jel, kalıptan çıkarılarak, elektroforez tankına dikkatlice yerleştirildi.

2. 1. 4. 2. Marker

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

2. 1. 4. 3. PstI Enzimi İle Kesilmiş Lambda Faj DNA'sının Hazırlanışı

30 µl λ DNA (Fermentas)

30 µl 10x Buffer

4 µl PstI enzimi (Fermentas)

236 µl enjeksiyonluk distile su

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

2. 1. 4. 4. Etidyum Bromür

Elektroforez işleminden sonra görüntüleme için jelin boyanmasında Sigma marka %1'lik Ethidium Bromür 500 ml 0,5x TBE içerisine 100 µl miktarında eklenerek kullanıldı.

2. 1. 4. 5. Standart Suşlar

Tüm testlerde kalite kontrol suşları olan metisilin duyarlı *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ve metisilin dirençli *S. aureus* N315 (SCCmec Tip II) suşları kontrol olarak kullanıldı.

2. 2. Yöntem

2. 2. 1. Örneklerin Alınması

2. 2. 1. 1. Sütler: Her süt örneği alınırken, meme başları su ve sünger yardımı ile temizlenip kurulandı ve %70'lik alkol ile silindi. Eller sabunla yıkandıktan sonra sonra eldiven giyilip meme başındaki saprofit bakterileri uzaklaştırmak için ilk birkaç ml süt atıldı (Baştan 2002). Steril enjektörler içine 5 ml alındı.

2. 2. 1. 2. Burun Sıvap: Sürüntüler her iki taraf burun konkasının 1/3'lük ön kısmından serum fizyolojikle ıslatılmış steril pamuk eküvyonlarla sağa ve sola birkaç kez çevirmek suretiyle alınarak Stuart Transport Medium'a konuldu.

Alınan tüm örnekler soğuk zincir altında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Teşhis Laboratuvarına aynı gün getirilip laboratuvar çalışmalarına başlandı. İncelemesi yapılan tüm sığır ve insan materyalleri hayvan sahipleri bilgilendirilip, izin alınarak temin edildi.

2. 2. 2. Stafikok İzolasyonu

Laboratuvara getirilen örneklerden stafilokokların saf olarak elde edilmesi amaçlanmıştır. Bunun için, burun sıvap örnekleri önce %7,5 tuzlu TSB'a ekilip 37°C'de 24 saat inkube edilmiş, buradan MSA'a; süt örnekleri ise doğrudan MSA'a ekilmiştir. MSA'da 24-48 saatlik inkübasyon sonunda üreyen stafilokok suşları, fenotipik özelliklerinin incelenebilmesi için kanlı agara pasajlandı. Stafilokok suşlarının morfolojik ve biyokimyasal özellikleri standart laboratuvar işlemleri uygulanarak gerçekleştirildi (Murray 2003).

2. 2. 2. 1. Stafilokok Suşlarının Fenotipik İdentifikasyonu

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

2. 2. 2. 1. 2. Basitrasin Duyarlılık Testi: Katalaz pozitif mikroskobik olarak Gram pozitif kok görünümündeki mikroorganizmalar *Micrococcaceae* grubunda kabul edildi. Bu suşlardan tek bir koloni TSB'da üretildikten sonra MHA'a ekim yapılmış ve ekim bölgesinin üzerine basitrasin diski yerleştirildi. 37°C'de 18–24 saat inkübe edildikten sonra basitrasine dirençli suşlar *Staphylococcus* spp. olarak ayrıldı (Koneman ve ark 1997).

2. 2. 2. 1. 3. Koagulaz Testi: Çalışmada, kullanılan bakterilerin koagulaz testleri tüpte gerçekleştirildi. Bunun için incelenecek koloni , içerisinde 0,8 ml serum fizyolojik ve 0,2 ml EDTA'lı tavşan plazması (Bactident Coagulase, 1.13306.0001 Merck) bulunan bir tüpe ekildi. 37°C'deki benmaride bırakılarak 1, 2, 4, 8 ve 24. saatlerde pıhtının oluşması gözlemlenmiştir. Koagulaz enzimine sahip türlerin kan plazmasını koagüle etmesi sonucunda test tüpünde katılaşma meydana gelirse, test sonucu koagulaz pozitif stafilokok (KPS), katılaşma meydana gelmiyorsa koagulaz negatif stafilokok (KNS) olarak değerlendirildi.

Elde edilen tüm KPS ve KNS suşları daha sonra kullanılmak üzere, %20 gliserinli BHIB içerisinde -80°C'de saklandı.

2. 2. 2. 1. 3. 4. Metisilin Dirençli Stafilokok Suşlarının Belirlenmesi

İzole edilen stafilokok suşlarının metisilin dirençleri sefoksitin diski kullanılarak Kirby-Bauer disk diffüzyon yöntemine (Bauer 1966) göre MHA kullanılarak belirlendi. Bunun için izole edilen suşlar %7 koyun kanlı agar besi yerine pasajlanıp, 24 saat inkübasyona bırakıldı. Elde edilen yeni kültürlerden TSB besiyerlerine 0,5 McFarland'a (10^8 bakteri/ml) uygun süspansiyonlar hazırlandı. Her bakteri türü için ayrı hazırlanan süspansiyonlardan 15 dakika içinde steril eküvyon ile inokulum tekniğe uygun olarak 25 ml steril MHA'a yayılarak ekimleri yapıldı. Ekim yüzeyinin kuruması için oda ısısında 10-15 dak. beklendikten sonra antibiyotik diski ucu alevden geçirilmiş olan pensle besi yerine yerleştirildi. 37°C'de 18 saat inkübe edilen suşların inhibisyon zon çapları ölçülerek; sonuçlar duyarlı (S) orta derecede duyarlı (I) ve dirençli (R) olarak yorumlandı. Zon çapı *S. aureus* için 19 mm, diğer stafilokoklar için 24 mm'den küçük veya eşit olan suşlar MRS olarak belirlendi (CLSI 2006).

2. 2. 2. 2. Stafilokok Suşlarının Genotipik İdentifikasyonu

Tüm stafilokok suşlarının 16S rRNA, *nuc* ve *mecA* genleri spesifik primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. PCR için öncelikle MRS suşu olan kromozomal DNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir.

2. 2. 2. 2. 1. DNA Ekstraksiyonu

Stafilokok suşlarından DNA ekstraksiyon işlemi aşağıdaki gibi yapılmıştır (CDS 2007).

1. Kanlı agarda saf üretilen taze kültürden bir öze dolusu alınarak 100 µl lizis solusyonu içerisinde süspanse edildi.
2. Süspansiyonlar 37°C 30 dak inkübe edildi.
3. Thermal blokda 95°C’de 10 dak bekletildi.
4. Tüpler buz üzerine alındı. 1 ml phenol/chloroform isoamyl alcohol (25:24:1) ilave edildikten sonra iyice karıştırıldı.
5. 13 000 rpm’de 30 dakika santrifüj edildi.
6. Üstte toplanan bulutsu tabaka başka bir ependorf tüpüne alındıktan sonra üzerine soğuk 1 ml ethanol eklendi.
7. -20°C’de yarım saat beklendikten sonra 13 000 rpm’de 30 dakika santrifüj edildi.
8. Üst sıvı atıldıktan sonra pelet etüvde kurutuldu daha sonra üzerine 50 µl steril distile su eklenerek PCR’da kullanıldı.

2. 2. 2. 2. 2. PCR

2. 2. 2. 2. 2. 1. Sekans Analizi İçin 16S rRNA Geni Amplifikasyonu

Metisilin direcine sahip tüm stafilokok suşlarının 16S fragmanı öncelikle universal primerler ile çoğaltıldıktan sonra sekans analizi sonrasında tür ayrımı yapıldı. Universal primerler olarak, tüm bakterilerden 16S fragmanını çoğaltmaya yarayan primerler kullanıldı. Bu primerlerle 16S rRNA için yaklaşık olarak 1600 bazlık genin büyük kısmı çoğaltıldı ve sekans analizine tabi tutularak gen bankası ile karşılaştırma sonrasında tür ayrımı yapıldı.

Bir örnek için PCR amplifikasyonu 30 µl toplam hacimde, son konsantrasyon 10X Taq enzimi tampon çözeltisi 1X, magnesium klorür (MgCl₂) 2 mM, dNTP 0,2 mM, primer (her biri için) 0,4 pmol, Taq DNA polimerase 1,5 U olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Kullanılan malzemeler ve volümler Çizelge 2. 3.'de belirtilmiştir.

Çizelge 2. 3. Mastermiksın hazırlanma oranları

Malzeme (Ticari)	İstenen Son Konsantrasyon	10 örnek (µl)	60 örnek (µl)
Buffer (10X)	1 X	30	180
MgCl ₂ (25mM)	2 mM	24	144
dNTP (10mM)	0,2 mM	6	36
Primer - F (100 pmol)	0,4 pmol	1,2	7,2
Primer - R (100 pmol)	0,4 pmol	1,2	7,2
Taq Polimeraz (5U)	0,3 µl / 50 µl	1,8	10,8
dH ₂ O	Son Volüme Tamamlanır	235,8	1414,8
TOPLAM		300	1800

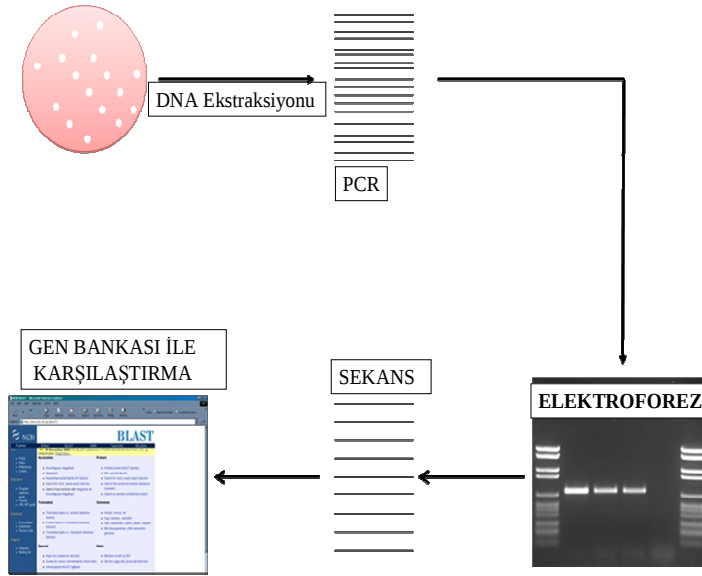
Mastermiks hazırlandıktan sonra 0,2 mL'lik tüpler, örnek adedi kadar numaralandırılıp, içlerine 28'er µl hazırlanan mastermiksden ilave edilmiştir. Daha sonra, ekstraksiyonu yapılan DNA'dan 2'şer µl alınıp, ilgili tüplerin içerisine eklenmiş ve ağızları sıkıca kapatılmıştır. Hazırlanan tüpler daha sonra termal döngüleme cihazlarına yüklenip, programlanmıştır. Program 94°C'da 10 dakikalık ön denatürasyonu takiben 35 siklus 94°C 1 dakika, 50°C 1 dakika ve 72°C 1 dakikada tamamlandıktan sonra, 72°C'de 5 dakika ile sona erdirilmiştir (Çizelge 2. 4.).

Çizelge 2. 4. PCR işlemine ait ısı döngü ve süre diyagramı

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süresi
Başlangıç Denatürasyon	1	94°C	10 dk
Denatürasyon	35	94°C	1 dk
Bağlanma		50°C	1 dk
Uzama		72°C	1 dk
Son Uzama	1	72°C	5 dk

Elde edilen ampliconlar sekans analizleri için 96 kuyucuklu pleyt içerisinde Macrogen (Macrogen Inc.,1001 World Meridian Venture Center, #60-24, Gasan-dong, Geumchun-gu, Seoul, 153-781, Korea) firmasına gönderildi. Firma saflaştırmayı takiben ABI Primse cihazı ile sekans analizini gerçekleştirdi. Elde edilen sekanslar gen bankası ile karşılaştırıldı. Bu amaçla National Center of Biotechnology Information'ın web sayfasındaki (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Nucleotide-Nucleotide BLAST programı

kullanıldı. Bakterilerin 16S rRNA sekansına dayalı moleküler identifikasyonunda yapılan tüm işlemler aşağıda şematize edildi. Sekans analizi sonucunda KNS suşlarının tür düzeyinde identifikasyonları gerçekleştirilirken; KPS suşlarının identifikasyonları da doğrulandı. Tüm testlerde kalite kontrol suşları olan metisilin duyarlı *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ve metisilin dirençli *S. aureus* N315 (SCCmec Tip II) suşları kontrol olarak kullanıldı. Metisilin dirençli olduğu belirlenen 59 stafilokok suşuna sekans analizi yapıldı. Bakterilerin 16S rRNA sekansına dayalı moleküler identifikasyonunun yapılışı Şekil 2. 1.'de gösterilmiştir.



Şekil 2. 1. Bakterilerin 16S rRNA sekansına dayalı moleküler identifikasyonu

2. 2. 2. 2. 2. Tripleks PCR

Fenotipik olarak disk difüzyon testi ile metisilin dirençli olarak bulunan stafilokok suşları ile *S. aureus* suşlarını birbirlerinden ayırmak amacıyla tripleks PCR gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar aynı zamanda sekans analizi ile de doğrulandı. Tripleks PCRda metisilin direnci için spesifik *mecA* geni, *S. aureus* için spesifik *nuc* geni ve tüm bakterilerin 16S rRNA genini çoğaltan 16S üniversal primerleri kullanılarak MRSA suşları ve diğer MRS belirlendi. Tripleks PCR metisilin dirençli olarak bildirilen 59 suş için uygulandı.

Bir örnek için PCR amplifikasyonu 50 µl toplam hacimde, son konsantrasyon 10X Taq enzimi tampon çözeltisi 1X, MgCl₂ 2 mM, dNTP 0,4 mM, primer (her biri için) 0,4

pmol, Taq DNA polymerase 3 U olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Kullanılan malzemeler ve miktarları aşağıdaki Çizelge 2. 5.'de belirtilmiştir.

Çizelge 2. 5. Mastermiksin hazırlanma oranları

Malzeme (Ticari)	İstenen Son Konsantrasyon	10 örnek (µl)	60 örnek (µl)
Buffer (10X)	1 X	50	300
MgCl ₂ (25mM)	2 mM	40	240
dNTP (10mM)	0,2 mM	20	120
16S Primer - F (100 pmol)	0,4 pmol	1,2	7,2
16S Primer - R (100 pmol)	0,4 pmol	1,2	7,2
mec Primer - F (100 pmol)	0,4 pmol	1,2	7,2
mc Primer - R (100 pmol)	0,4 pmol	1,2	7,2
nuc Primer - F (100 pmol)	0,4 pmol	1,2	7,2
nuc Primer - R (100 pmol)	0,4 pmol	1,2	7,2
Taq Polimeraz (5U)	0,6 µl / 50 µl	3,6	21,6
dH ₂ O	Son Volüme Tamamlanır	379,2	1075,2
TOPLAM		500	1800

Mastermiks hazırlandıktan sonra ardından 0,2 mL'lik tüpler, örnek adedi kadar numaralandırılıp, içlerine 46'şar µl hazırlanan mastermiksten ilave edildi. Daha sonra, ekstraksiyonu yapılan DNA'dan 4'er µl alınıp, ilgili tüplerin içerisine eklenmiş ve ağızları sıkıca kapatıldı. Hazırlanan tüpler daha sonra termal döngüleme cihazlarına yüklenip, programlandı. Program 94°C'da 10 dakikalık denatürasyonu takiben 35 siklus 94°C 1 dakika, 50°C 1 dakika ve 72°C 1 dakikada tamamlandıktan sonra, 72°C'de 10 dakika ile sona erdirildi (Çizelge 2. 6.).

Çizelge 2. 6. PCR işlemine ait ısı döngü ve süre diyagramı

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süresi
Başlangıç Denatürasyon	1	94°C	10 dk
Denatürasyon	35	94°C	1 dk
Bağlanma		50°C	1 dk
Uzama		72°C	1 dk
Son Uzama	1	72°C	10 dk

2. 2. 2. 2. 2. 3. SCCmec Multipleks PCR

PCR için öncelikle SCCmec primer miski hazırlandı: KDP F1, KDP R1, RIF4 F3 ve RIF4 R9 primerleri 200 nM; CIF2F2, CIF2 R2, MECI P2, MECI P3, RIF5 F10, RIF5 R13, pUB110 R1 ve pT181R1 primerleri 400 nM; DCS F2, DCS R1, MECA P4, MECA P7 ve IS431 P4 primerleri de 800 nM konsantrasyonda olacak şekilde kullanıldı. Mastermiksin her 50 µl'si için bu primer miskinden 1 µl ilave edilerek PCR

gerçekleştirildi (Oliveira ve De Lencastre 2002). Multipleks PCR metisilin dirençli olduğu belirlenen 59 suşun hepsine uygulandı.

Bir örnek için PCR amplifikasyonu 30 µl toplam hacimde, son konsantrasyon 10X Taq enzimi tampon çözeltisi 1X, MgCl₂ 2 mM, dNTP 0,2 mM, master misin her 50 µl'si için 1 µl SCCmec primer miksi, Taq DNA polymerase 1,5 U olacak şekilde gerçekleştirildi. Kullanılan malzemeler ve miktarları aşağıdaki Çizelge 2. 7.'de belirtilmiştir.

Çizelge 2. 7. Mastermiksin hazırlanma oranları

Malzeme (Ticari)	İstenen Son Konsantrasyon	10 örnek (µl)	60 örnek (µl)
Buffer (10X)	1 X	30	180
MgCl ₂ (25mM)	2 mM	24	144
dNTP (10mM)	0,2 mM	6	36
SCCmec primer miks	1 µl / 50 µl	6	36
Taq Polimeraz (5U)	0,3 µl / 50 µl	1,8	10,8
dH ₂ O	Son Volüme Tamamlanır	232,2	1393,2
TOPLAM		300	1800

Mastermiks hazırlandıktan sonra 0,2 mL'lik tüpler, örnek adedi kadar numaralandırılıp, içlerine 28'er µl hazırlanan mastermiksdan ilave edildi. Daha sonra, ekstraksiyonu yapılan DNA'dan 2'şer µl alınıp, ilgili tüplerin içerisine eklenmiş ve ağızları sıkıca kapatıldı. Hazırlanan tüpler daha sonra termal döngüleme cihazlarına yüklenip, programlandı. Program 94°C'da 4 dk başlangıç denatürasyonu takiben 30 siklus 94°C 30 sn, 53°C 30 sn ve 72°C 1 dk'da tamamlandıktan sonra, 72°C'de 5 dk ile sona erdirildi (Çizelge 2. 8.).

Çizelge 2. 8. PCR işlemine ait ısı döngü ve süre diyagramı

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

Oliveira ve Lancastre'nin (2002) bildirdiği multipleks PCR yöntemi kullanılarak SCCmec TipI, II, III ve IV tespiti yapıldı.

mecA geni pozitif bulunduğu halde multipleks PCR ile bant gözlenmeyen bir suş Zhang ve ark.'nın (2005) bildirdikleri SCC*mec* Tip V primerleri kullanılarak SCC*mec* tipi bir kez daha kontrol edildi. Ayrıca yine Zhang ve ark.'nın (2005) bildirdikleri *mec* kompleks (class A) ve *ccr* kompleks (A2B2) primerleri kullanılarak pozitif kontrol olarak kullanılan *S. aureus* N315 (SCC*mec* Tip II) suşunun hem SCC*mec* Tip II olarak tiplendirilen bir *S. epidermidis* suşu hem de doğruluğu kontrol edildi.

2. 2. 2. 2. 3. Amplikonların Elektroforez Tankına Yüklenmesi

6x loading dye boyasından pipetin ucuna 1 µl kadar alınıp, daha sonra elde edilen 5 µl PCR ürünleriyle karıştırıldı. Oluşturulan karışımdan 6 µl alınarak, jeldeki uygun pozisyonadaki kuyucuğa yüklendi.

2. 2. 2. 2. 4. Yürütme

Hazırlanmış olan jele, istenilen örnekler ve markerların yüklemesi yapıldıktan sonra, elektroforez tankının kapağı kapatılıp, elektrotlar uygun pozisyonlara bağlanarak, 100 voltluk akımda 30 dakika yürütüldü.

2. 2. 2. 2. 5. Görüntüleme

Otuz dakikalık elektroforez süresinin ardından elde edilen jel, dikkatli bir şekilde etidyum bromürde 15 dakika boyanmaya bırakılmıştır. Süre sonunda boyanan jel, bilgisayara bağlı durumdaki transilluminatör cihazındaki odacığa yerleştirilerek, UV ışığı altında fotoğraflanıp, değerlendirildi.

2. 2. 2. 2. 6. Görüntüleme Sonrasında Değerlendirme

Tripleks PCR'da 16S universal primerleri için 1371 bp, *nuc* primerleri için 279 bp, *mecA* primerleri için 162 bp uzunluğunda bant arandı.

SCC*mec* tip tayini için gerçekleştirilen multipleks PCR'da değerlendirme Oliveira ve deLancestre (2002)'a Çizelge 2. 2.'de belirtildiği gibi yapıldı. Buna göre tüm *mec* geni pozitif suşlar 162 bp uzunluğunda bant oluşturdu. Tip I (342, 381 ve 495 bp); tip II (209, 284 ve 342 bp); tip III (209, 243, 303 ve 414 bp) ve tip IV (342 bp bant oluşturan amplikonlar) SCC*mec* tipine sahip suşlar tespit edildi. *mecA* geni pozitif olup multipleks PCR ile tiplendirilemeyen bir suş Zhang ve ark. (2005) tarafından bildirilen SCC*mec* Tip V primerleri ile 325 bp uzunluğunda bant oluşturdu ve Tip V olarak değerlendirildi.

3. BULGULAR

3. 1. İzolasyon

3. 1. 1. Sütler: Çalışmada 15 işletmeden 129 ineğe ait 516 meme lobunun subklinik mastitis yönünden CMT ile kontrol edilmesi sonucunda CMT pozitif reaksiyon (1+, 2+, 3+) 56 ineğe ait 145 süt örneğinde subklinik mastitis saptandı. Çalışmada incelenen ineklerde subklinik mastitis oranı %43,4 (56/129); sütlerde %28,1 (145/516) olarak belirlendi (Çizelge 3. 1.).

Subklinik mastitisli 56 ineğe ait 145 sütün incelenmesi sonucunda 39 inekten alınan 90 süttten stafilocok izolasyonu yapıldı. Çalışmada subklinik mastitisli ineklerin %69,4'ünden (39/56) ve sütlerin %62,0 (90/145) stafilocok izolasyonu yapıldı.

3. 1. 2. Burun Sıvapları: Otuz dört insan ve 56 inek olmak üzere toplam 90 nazal sıvap örneğinin hepsinden stafilocok izolasyonu yapıldı.

3. 2. Metisilin Direnci

3. 2. 1. Süt Kökenli Stafilocoklarda

Çalışmada stafilocok izolasyonu yapılan 39 ineğe ait 90 süt örneğinin incelenmesi sonucunda 14 ineğe ait 21 süt örneğinde MRS suşu belirlenmiştir. İneklerin %35,6 (14/39) ve sütlerin %23,3 (21/90) metisilin dirençli stafilocok varlığı tespit edildi. Sütlerden izole edilen metisilin dirençli izolatların dağılımı Çizelge 3. 1.'de verilmiştir.

Çizelge 3. 1. Sütlerden izole edilen metisilin dirençli izolatların dağılımı

İşletme Bilgileri	Süt Sığırcılığı İşletmeleri		Toplam
	Küçük Ölçekli	Orta Ölçekli	
Fiziksel muayene yapılan işletme/inek sayısı	9/66	6/63	15/129
CMT pozitif inek/ Meme lobu sayıları	36/94	20/51	56/145
CMT pozitif inek /süt%	54,5/30,2	31,7/26,0	43,4/28,1
Stafilokok izole edilen inek/Süt örneği sayısı	27/64	12/26	39/90
MRS izole edilen inek/süt sayısı	11/15	3/6	14/21

3. 2. 2. Burun Kökenli Stafilokoklarda

3. 2. 2. 1. İnsanlarda

Otuzdört insandan 36 stafilokok suşu izole edilirken, bunlardan 18 bireye ait 20 stafilokok suşunda metisilin direnci tespit edildi. İncelenen bireylerin %52,9’unda (18/34) nazal taşıyıcılığı MRS belirlendi. Çalışmada nazal sıvap alınan 5 Veteriner Hekim’in 1 tanesinden MRS suşu izolasyonu yapılamaz iken; 4 tanesinden 6 suş izole edildi.

3. 2. 2. 2. Sığırlarda

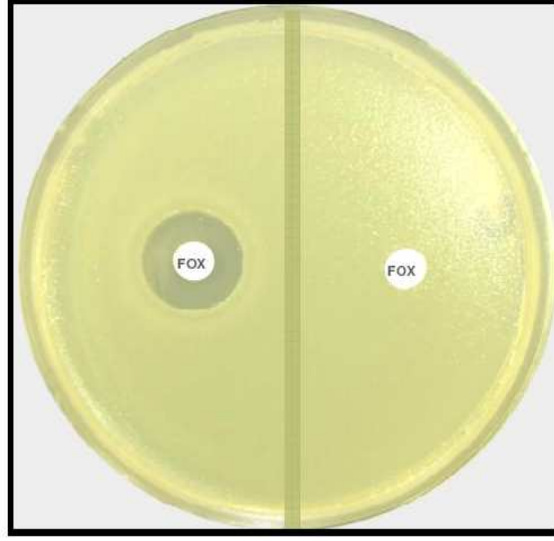
Elli altı sığır burun sıvabının hepsinden bir stafilokok suşu izole edildi. Sığırlarda nazal taşıyıcılık oranı %32,1 (18/56) olarak belirlenmiştir. Çizelge 3. 2.’de burun sıvaplarından izole edilen MRS dağılımı verilmiştir.

Çizelge 3. 2. Burun sıvaplarından izole edilen MRS dağılımı

Tür		Alınan Burun Sıvap Sayısı	İzole edilen Stafilokok Sayısı	MRS/birey sayısı	Nazal Taşıyıcılık %
İnsan	Bakıcı	29	29	14/14	52,9
	Vet. Hekim	5	6	6/4	
İnek		56	56	18/18	32,1
TOPLAM		90	91	38/36	40,0

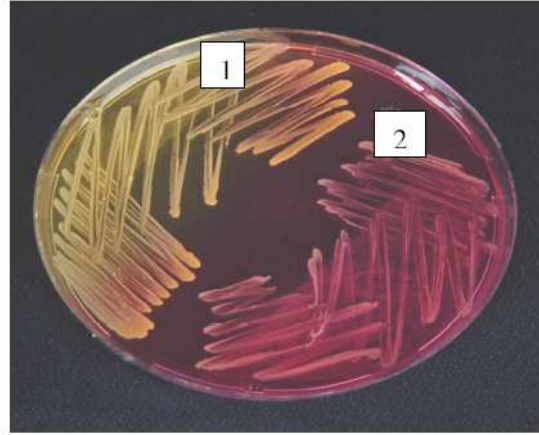
Çalışmada 28 inekten toplam 39 (21 süt, 18 burun sıvap)MRS izolasyonu yapılmıştır. Bu ineklerden 14 tanesinin yalnızca burnundan, 11 tanesinin yalnızca sütünden, 3 tanesinin hem sütünden hem burnundan MRS izolasyonu yapılmıştır (Çizelge 3. 4.).

Metisilin dirençli ve metisilin duyarlı birer stafilokok suşunun disk disk difüzyon yöntemi ile görünümü Resim 3. 1.'de gösterilmiştir.



Resim 3. 1. Metisilin duyarlı ve dirençli birer stafilokok suşu

Mannitol Salt Agarda üreyen mannitol fermentasyonu pozitif ve negatif birer suşun koloni görünüşleri Resim 3. 2'de gösterilmiştir.

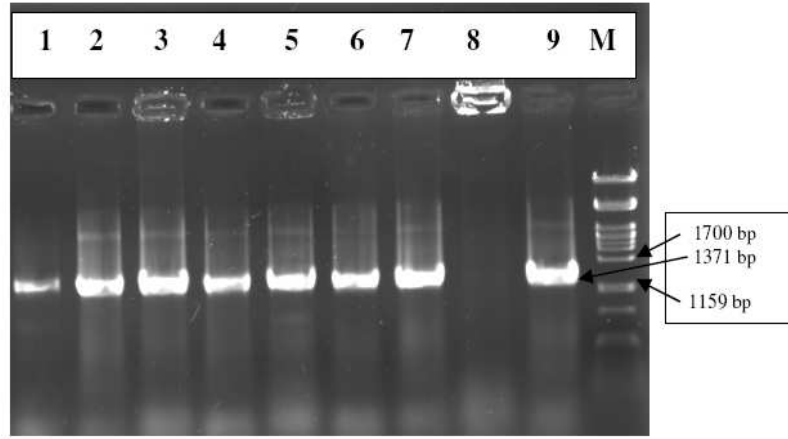


Resim 3. 2. MSAda mannitol pozitif (*S. aureus*, 1) ve mannitol negatif (*S. chromogenes*, 2).

3. 3. PCR

3. 3. 1. 16S rRNA PCR

16S üniversal primerleri kullanılarak yapılan PCR'da 1371 bp uzunluğunda bant görülmüştür (Resim 3. 3.).



Resim 3. 3. 16S primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PCR. **1–7:** Stafilocok izolatları, **8:** Negatif Kontrol (DNA’sız master miks) **9:** Pozitif Kontrol (*S. aureus* N315 suşu), **M:** PstI enzimi ile kesilmiş lambda faj DNA’sı

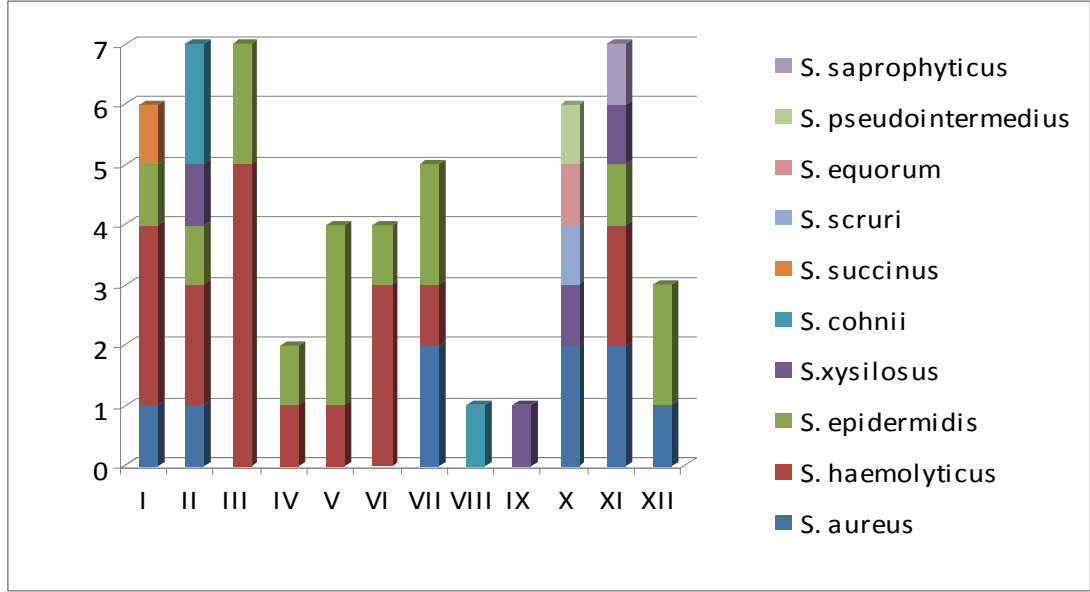
Sekans analizi sonucunda 47 KNS suşunun tür düzeyinde identifikasyonları gerçekleştirilirken; 12 KPS suşlarının identifikasyonları da sekans analizleri sonrasında doğrulandı (Çizelge 3. 3.).

Çizelge 3. 3. İdentifiye edilen stafilocok türlerinin dağılımı

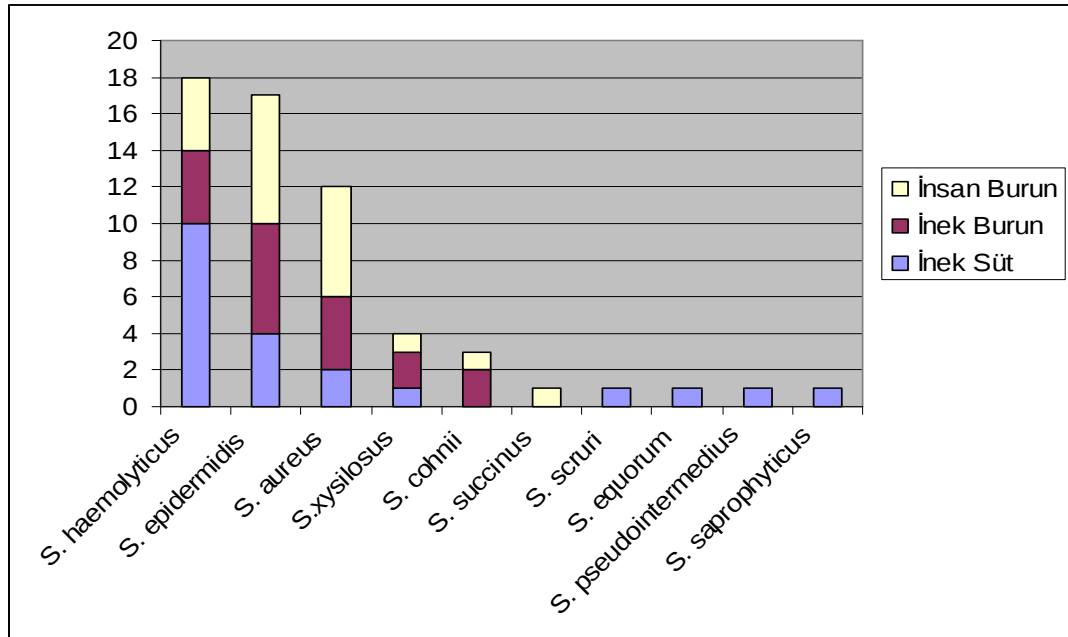
Tür	Sayı	%
<i>S. haemolyticus</i>	18	30,50
<i>S. epidermidis</i>	17	28,80
<i>S. aureus</i>	12	20,30
<i>S. xylosus</i>	4	6,70
<i>S. cohnii</i>	3	5,10
<i>S. equorum</i>	1	1,72
<i>S. sciuri</i>	1	1,72
<i>S. succinus</i>	1	1,72
<i>S. pseudointermedius</i>	1	1,72
<i>S. saprophyticus</i>	1	1,72
Toplam	59	100,0

Çizelge 3. 3.’de de görüldüğü gibi toplam 59 suş ve 10 stafilocok tür izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen toplam 59 *Staphylococcus* suşu. içerisinde 18 *S. haemolyticus* (% 30,5), 17 *S. epidermidis* (%28,8),12 *S. aureus* (%20,3), 4 *S. xylosus* (%6,7), 3 *S. cohnii* (%5,1), birer tane de (%1,7) *S. equorum*, *S. sciuri*, *S. succinus*, *S. pseudointermedius* ve *S. saprophyticus* identifiye edilmiştir. Şekil 3. 1.’de identifiye edilen

stafilokok türlerinin işletmelere göre dağılımı, Şekil 3. 2.'de stafilokok türlerine göre süt, insan ve burun sıvıplarının dağılımı verilmiştir.



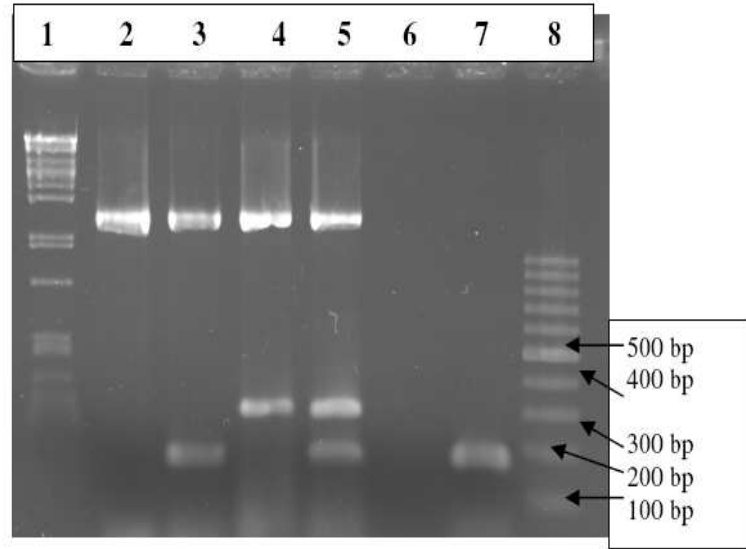
Şekil 3. 1. İdentifiye edilen stafilokok türlerinin işletmelere göre dağılımı



Şekil 3. 2. Stafilokok türlerine göre materyallerin dağılımı

3. 3. 2. Tripleks PCR

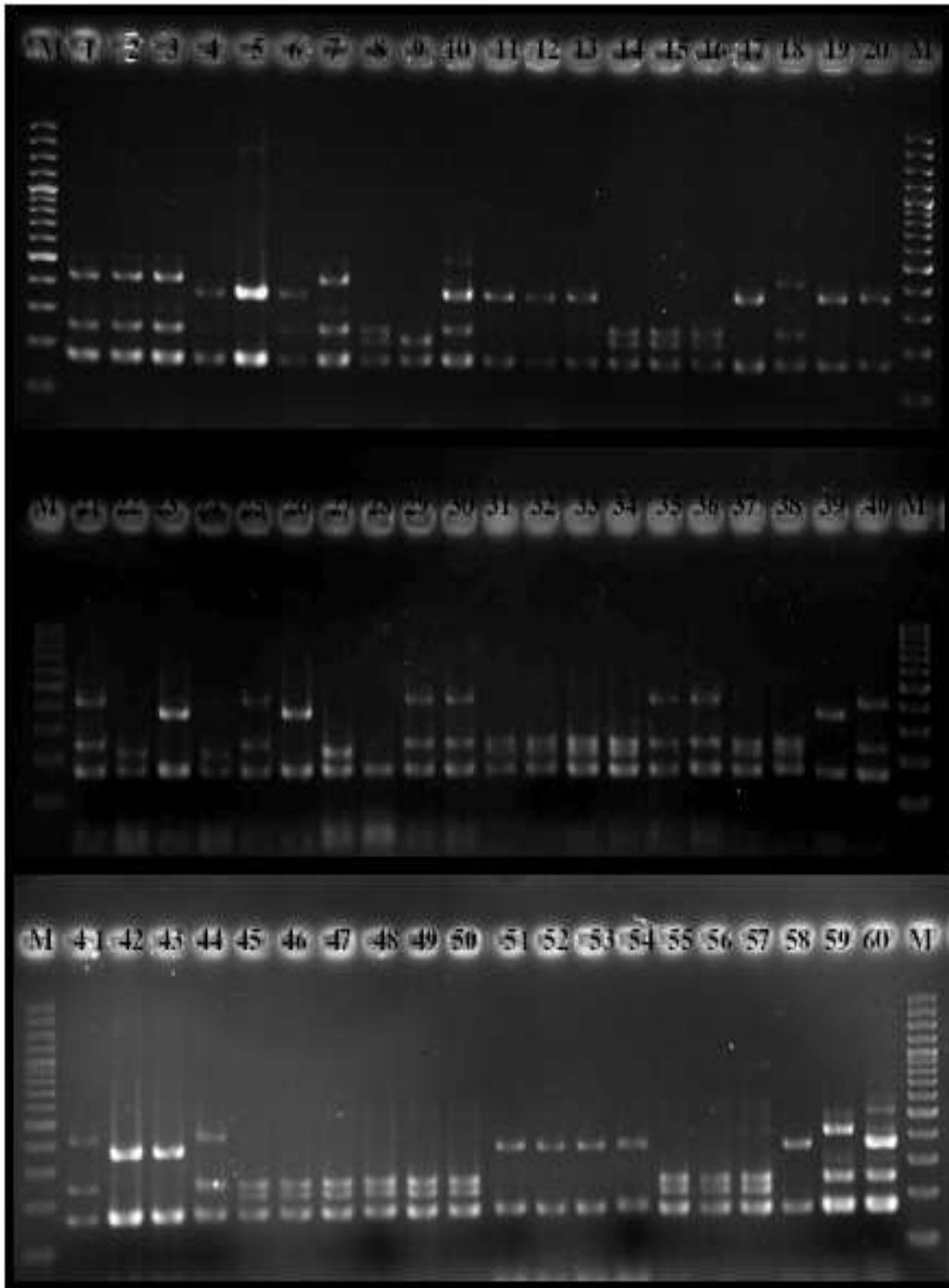
Fenotipik olarak metisilin dirençli olarak belirlenen 59 stafilokok izolatu 16SrRNA, *mecA* ve *nuc* genlerinin birlikte değerlendirilebilmesi amacı ile tripleks PCR gerçekleştirildi. Buna göre metisilin dirençli tüm suşlar genotipik olarak da doğrulanmıştır.



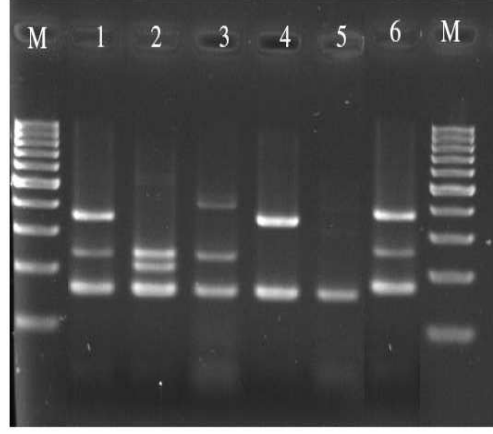
Resim 3. 4. Tripleks PCR. **1:** Marker (PstI enzimi ile kesilmiş lambda faj DNA'sı) **2:** *Staphylococcus* spp., 16S rRNA 1371 bp pozitif **3:** *Staphylococcus* spp. (16S rRNA 1371 bp pozitif) ve *mec* pozitif (162 bp) **4:** 16S rRNA 1371 bp pozitif ve *nuc* pozitif (279 bp) *S. aureus* suşu **5:** 16S rRNA 1371 bp pozitif, *mec* pozitif (162 bp) ve *nuc* pozitif (279 bp) *S. aureus* suşu **6:** *mec* PCR Negatif Kontrol (MSS: *S. aureus* ATCC 29213) **7:** *mec* PCR Pozitif Kontrol (MRS: *S. aureus* N315 suşu), **8:** Marker (100 bp DNA ladder)

3. 3. 3. Multipleks PCR

MRS suşları multipleks PCR ile SCC*mec* tipleri belirlenmiş (Oliviera ve de Lencastre 2002) ve Resim 3. 7. toplu, Resim 3. 8.'da ise özet olarak sunulmuştur.

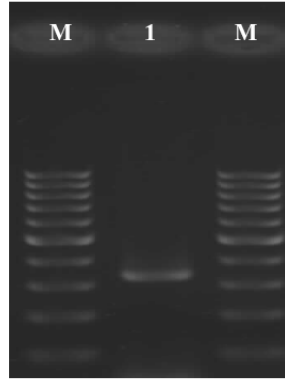


Resim 3. 5. Tüm suşların *SCCmec* tiplerinin toplu görünümü M: Marker: 100 bp DNA ladder, 6,10 no'lu suş *SCCmec* tip II (284 bp, 342 bp); 1, 2, 3, 7, 18, 21, 25, 29, 30, 35, 36, 40, 41, 44, 59 no'lu suşlar *SCCmec* tip III (243 bp, 414 bp); 9, 22, 24, 27, *SCCmec* tip III (209 bp); 8, 14, 15, 16, 31, 32, 33, 34, 37, 38, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 56, 57 no'lu suşlar *SCCmec* tip III (209 bp, 243 bp); 4, 5, 11, 12, 13, 17, 19, 20, 23, 26, 39, 42, 43, 51, 52, 53, 54, 58 no'lu suşlar *SCCmec* tip IV (342 bp); 28 *SCCmec* tip belirlenemedi (166 bp).



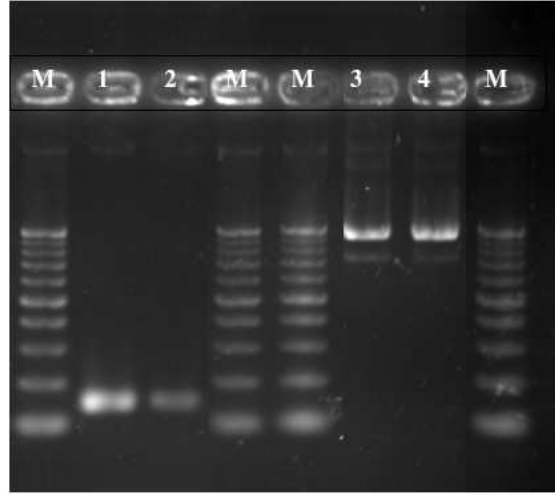
Resim 3. 6. SCCmec Tipleri **M:** Marker: 100 bp DNA ladder, **1:** SCCmec tip II (284 bp, 342 bp; 10 nolu suş); **2:** SCCmec tip III (209 bp, 243 bp; 8 nolu suş); **3:** SCCmec tip III (243 bp, 414 bp; 1 nolu suş); **4:** SCCmec tip IV (342 bp; 4 nolu suş); **5:** SCCmec tipi belirlenemedi (166 bp; 28 nolu suş); **6:** Pozitif Kontrol SCCmec tip II (284 bp, 342 bp; *S. aureus* N315 suşu);

SCCmec tipi multipleks PCR ile belirlenemeyen 28 nolu *S. epidermidis* suşu Zhang ve ark. tarafından bildirilen SCCmec Tip V primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PCR’da 325 bp uzunluğunda bant görüntülediği için SCCmec Tip V olarak tiplendirildi (Resim 3. 7).



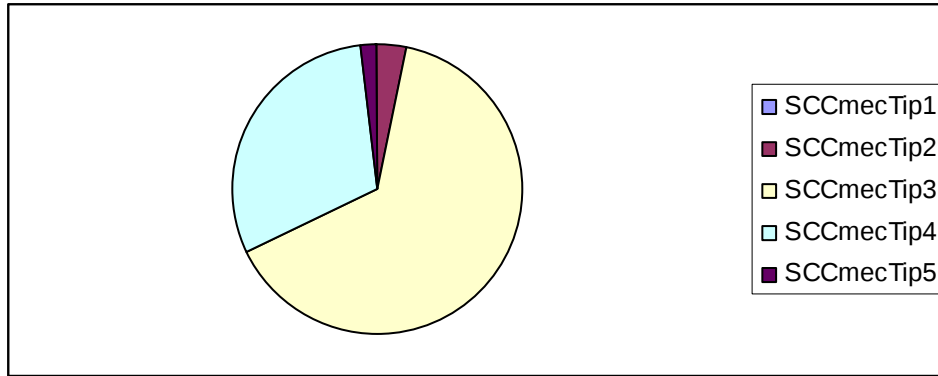
Resim 3. 7. **M:** Marker: 100 bp DNA ladder, **1:** SCCmec Tip V (325 bp, 28 nolu suş)

SCCmec tipi multipleks PCR ile Tip II olarak belirlenen 10 nolu *S. epidermidis* suşu ve pozitif kontrol suşu olan *S. aureus* N315 suşu Zhang ve ark. tarafından bildirilen *mec* kompleks (class A) ve *ccr* kompleks (A2B2) primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PCR ile SCCmec Tip II oldukları tekrar doğrulandı.



Resim 3. 8. *mec* kompleks (1, 2) ve *ccr* kompleks (3, 4) primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PCR görüntüleri **M**: Marker: 100 bp DNA ladder, **1**: SCCmec Tip II (146 bp, 10 nolu suş) **2**: Pozitif kontrol (146 bp, *S. aureus* N315); **3**: SCCmec Tip II (1000 bp, 10 nolu suş), **4**: Pozitif kontrol (1000 bp, *S. aureus* N315).

Tüm MRS suşlarının SCCmec tiplerinin bakteri türlerine göre dağılımı Şekil 3. 3. ve Çizelge 3. 4.'de gösterilmiştir.



Şekil 3. 3. Tüm izolatların SCCmec tiplerinin dağılımı

Çizelge 3. 4. Tüm MRS suşlarının SCCmec tiplerinin dağılımı

SCC <i>mec</i> Tip	Top lam (n=59)	<i>S.</i> <i>haemolyti</i> <i>cus</i> (n=18)	<i>S.</i> <i>epidermi</i> <i>dis</i> (n=17)	<i>S.</i> <i>aureus</i> (n=12)	<i>S.</i> <i>xylo</i> <i>sus</i> (n=4)	<i>S.</i> <i>ohnii</i> (n=3)	<i>S.</i> <i>equor</i> <i>um</i> (n=1)	<i>S.</i> <i>sciuri</i> (n=1)	<i>S.</i> <i>succin</i> <i>us</i> (n=1)	<i>S.</i> <i>pseudointer</i> <i>medius</i> (n=1)	<i>S.</i> <i>saproph</i> <i>yticus</i> (n=1)
I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
II	2	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
III	38	16	7	9	3	1	1	0	0	0	1
IV	18	2	8	2	1	2	0	1	1	1	0
V	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

Tüm MRS suşlarının SCCmec tiplerinin işletmelere göre dağılımı Çizelge 3. 5.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3. 5. İşletmelere göre tüm verilerin toplu sunumu

	Materyal	Sekans Sonucu	SCCmec Tipi
1. İŞLETME			
1.	İ1 S	<i>S. haemolyticus</i> ¹	III
2.	İ1 S	<i>S. haemolyticus</i> ²	III
3.	İ2 S	<i>S. epidermidis</i> ¹	III
4.	İ3 BS	<i>S. haemolyticus</i> ³	IV
5.	B1 BS	<i>S. succinus</i>	IV
6.	B2BS	<i>S. aureus</i> ⁴	II
2. İŞLETME			
7.	İ4S	<i>S. haemolyticus</i> ⁴	III
8.	İ4S	<i>S. haemolyticus</i> ⁵	III
9.	İ5S	<i>S. aureus</i> ²	III
10.	İ5S	<i>S. epidermidis</i> ²	II
11.	İ4 BS	<i>S. xylosus</i> ¹	IV
12.	İ5 BS	<i>S. cohnii</i> ⁴	IV
13.	B3 BS	<i>S. cohnii</i> ²	IV
3. İŞLETME			
14.	İ6 S	<i>S. haemolyticus</i> ⁶	III
15.	İ6 S	<i>S. haemolyticus</i> ⁷	III
16.	İ7 S	<i>S. haemolyticus</i> ⁸	III
17.	İ8 S	<i>S. epidermidis</i> ³	IV
18.	İ8 S	<i>S. haemolyticus</i> ⁹	III
19.	İ9 BS	<i>S. haemolyticus</i> ¹⁰	IV
20.	İ10 BS	<i>S. epidermidis</i> ⁴	IV
4. İŞLETME			
21.	İ11 S	<i>S. haemolyticus</i> ¹¹	III
22.	B4 BS	<i>S. epidermidis</i> ⁵	III
5. İŞLETME			
23.	İ12 S	<i>S. epidermidis</i> ⁶	IV
24.	İ13 BS	<i>S. epidermidis</i> ⁷	III
25.	B5 BS	<i>S. haemolyticus</i> ¹²	III
26.	B6 BS	<i>S. epidermidis</i> ⁸	IV
6. İŞLETME			
27.	İ14 S	<i>S. haemolyticus</i> ¹³	III
28.	İ15 BS	<i>S. epidermidis</i> ⁹	V
29.	B7 BS	<i>S. haemolyticus</i> ¹⁴	III
30.	B8 BS	<i>S. haemolyticus</i> ¹⁵	III
7. İŞLETME			
31.	İ16 BS	<i>S. epidermidis</i> ¹⁰	III
32.	İ17 BS	<i>S. aureus</i> ³	III

33.	İ18 BS	<i>S. epidermidis</i> ¹¹	III
34.	İ19 BS	<i>S. aureus</i> ⁴	III
35.	B9 BS	<i>S. haemolyticus</i> ¹⁶	III
8. İŞLETME			
36.	İ20 BS	<i>S. cohnii</i> ³	III
9. İŞLETME			
37.	B10 BS	<i>S. xylosus</i> ²	III
10. İŞLETME			
38.	İ21 S	<i>S. aureus</i> ⁵	III
39.	İ21 S	<i>S. sciuri</i> ¹	IV
40.	İ22 S	<i>S. equorum</i> ¹	III
41.	İ22 S	<i>S. xylosus</i> ³	III
42.	İ22 S	<i>S. pseudointermedius</i> ¹	IV
43.	İ23 BS	<i>S. aureus</i> ⁶	IV
11. İŞLETME			
44.	İ24 S	<i>S. saprophyticus</i>	III
45.	İ25 S	<i>S. haemolyticus</i> ¹⁷	III
46.	İ26 BS	<i>S. xylosus</i> ⁴	III
47.	İ25 BS	<i>S. haemolyticus</i> ¹⁸	III
48.	İ27 BS	<i>S. aureus</i> ⁷	III
49.	B11 BS	<i>S. epidermidis</i> ¹²	III
50.	B12 BS	<i>S. aureus</i> ⁸	III
12. İŞLETME			
51.	İ28 BS	<i>S. epidermidis</i> ¹³	IV
52.	B13 BS	<i>S. aureus</i> ⁹	IV
53.	B14 BS	<i>S. epidermidis</i> ¹⁴	IV
VETERİNER			
54.	Vet. Hek. 1BS	<i>S. epidermidis</i> ¹⁵	IV
55.	Vet. Hek. 1BS	<i>S. aureus</i> ¹⁰	III
56.	Vet. Hek. 2 BS	<i>S. epidermidis</i> ¹⁶	III
57.	Vet. Hek. 3 BS	<i>S. aureus</i> ¹¹	III
58.	Vet. Hek. 4 BS	<i>S. epidermidis</i> ¹⁷	IV
59.	Vet. Hek. 4 BS	<i>S. aureus</i> ¹²	III

İ: İnek S: Süt

B: Bakıcı BS: Burun Sıvı

Tüm MRS suşlarının SCCmec tiplerinin bakteri türlerine göre dağılımı Çizelge 3. 6.'da verilmiştir.

Çizelge 3. 6. Bakteri türlerine göre tüm verilerin toplu sunumu

Materyal No	İşletme N o	Tür	Materyal			SCC <i>mec</i>	Sekans Sonucu
			Burun Sıvı		Sığır Süt		
			İnsan	Sığır			
1	1	İ1			X	III	<i>S. haemolyticus</i> ¹
2	1	İ1			X	III	<i>S. haemolyticus</i> ²
4	2	İ3		X		IV	<i>S. haemolyticus</i> ³
7	2	İ4			X	III	<i>S. haemolyticus</i> ⁴
8	2	İ4			X	III	<i>S. haemolyticus</i> ⁵
14	3	İ6		X		III	<i>S. haemolyticus</i> ⁶
15	3	İ6			X	III	<i>S. haemolyticus</i> ⁷
16	3	İ7			X	III	<i>S. haemolyticus</i> ⁸
18	3	İ8			X	III	<i>S. haemolyticus</i> ⁹
19	3	İ9		X		III	<i>S. haemolyticus</i> ¹⁰
21	4	İ11			X	III	<i>S. haemolyticus</i> ¹¹
25	5	B5	X			III	<i>S. haemolyticus</i> ¹²
27	6	İ14			X	III	<i>S. haemolyticus</i> ¹³
29	6	B7	X			III	<i>S. haemolyticus</i> ¹⁴
30	6	B8	X			III	<i>S. haemolyticus</i> ¹⁵
35	7	B9	X			III	<i>S. haemolyticus</i> ¹⁶
45	11	İ25			X	III	<i>S. haemolyticus</i> ¹⁷
47	11	İ25		X		III	<i>S. haemolyticus</i> ¹⁸
3	1	İ2			X	III	<i>S. epidermidis</i> ¹
10	2	İ5			X	II	<i>S. epidermidis</i> ²
17	3	İ8			X	IV	<i>S. epidermidis</i> ³
20	3	İ10		X		IV	<i>S. epidermidis</i> ⁴
22	4	B4	X			III	<i>S. epidermidis</i> ⁵
23	5	İ12			X	IV	<i>S. epidermidis</i> ⁶
24	5	İ13		X		III	<i>S. epidermidis</i> ⁷
26	5	B6	X			IV	<i>S. epidermidis</i> ⁸
28	6	İ15		X		V	<i>S. epidermidis</i> ⁹
31	7	İ16		X		III	<i>S. epidermidis</i> ¹⁰
33	7	İ18		X		III	<i>S. epidermidis</i> ¹¹
49	11	B11	X			III	<i>S. epidermidis</i> ¹²
51	12	İ28		X		IV	<i>S. epidermidis</i> ¹³
53	12	B14	X			IV	<i>S. epidermidis</i> ¹⁴
54		VH1	X			IV	<i>S. epidermidis</i> ¹⁵
56		VH2	X			III	<i>S. epidermidis</i> ¹⁶
59		VH4	X			IV	<i>S. epidermidis</i> ¹⁷
6	1	B2	X			II	<i>S. aureus</i> ¹
9	2	İ5			X	III	<i>S. aureus</i> ²
32	7	İ17		X		III	<i>S. aureus</i> ³
34	7	İ19		X		III	<i>S. aureus</i> ⁴
38	10	İ21			X	III	<i>S. aureus</i> ⁵
43	10	İ23		X		III	<i>S. aureus</i> ⁶

48	11	I27		X		III	<i>S. aureus</i> ⁷
50	11	B12	X			III	<i>S. aureus</i> ⁸
52	12	B13	X			IV	<i>S. aureus</i> ⁹
55		VH1	X			III	<i>S. aureus</i> ¹⁰
57		VH3	X			III	<i>S. aureus</i> ¹¹
59		VH4	X			III	<i>S. aureus</i> ¹²
11	2	I4		X		IV	<i>S. xylosus</i> ¹
37	9	B10	X			III	<i>S. xylosus</i> ²
41	10	I22			X	III	<i>S. xylosus</i> ³
46	11	I26		X		III	<i>S. xylosus</i> ⁴
12	2	I5		X		IV	<i>S. cohnii</i> ¹
13	2	B3	X			IV	<i>S. cohnii</i> ²
36	8	I20		X		III	<i>S. cohnii</i> ³
5	1	B1	X			IV	<i>S. succinus</i> ¹
39	10	I21			X	IV	<i>S. sciuri</i> ¹
40	10	I22			X	III	<i>S. equorum</i> ¹
42	10	I22			X	IV	<i>S. pseudointermedius</i> ¹
44	11	I24			X	III	<i>S. saprophyticus</i> ¹
TOPLAM			20	18	21	59	

Sığır ve insan kökenli MRS suşlarında SCCmec Tiplerinin görülme oranları karşılaştırmalı olarak Çizelge 3.7.de verilmiştir.

Çizelge 3.7. Sığır ve İnsan kökenli MRS izolatlarının SCCmec Tiplerine göre dağılımı

	39 sığır kökenli MRS izolatı	%	20 insan kökenli MRS izolatı	%
Tip II	1	%2.6	1	%5
Tip III	26	%66.6	12	%60.0
Tip IV	11	%28.2	7	%35.0
Tip V	1	%2.6	-	-

TARTIŞMA

Sağlıklı bireylerde nazal mukozada da kolonize olabilen stafilokoklar, insan ve hayvanlarda infeksiyonlara neden olan en önemli etkenlerden birisi olup; özellikle metisilin dirençli suşlar tedavisi güç, morbidite ve mortalitesi yüksek infeksiyonlara yol açarlar (Fluit 2002). Stafilokokların sığırlarda neden olduğu en önemli infeksiyonların başında mastitis gelmektedir. Mastitisin önemi, yol açtığı yüksek ekonomik kayıptan kaynaklanmaktadır. Türkiye ve dünyada yapılan pek çok çalışmada, stafilokoklar sığır mastitislerinden en sık izole edilen etken olarak bildirilmektedir (Giannechini ve ark. 2002, Sghir ve ark. 2004, Lakew ve ark. 2009, Tel ve ark. 2009, Türkyılmaz ve ark. 2010).

Hayvanlar, insanlarda infeksiyon oluşturan birçok mikroorganizmanın kaynağı veya rezervuarıdır. İnsanlarda önemli, hatta letal infeksiyonlara yol açan stafilokokların kaynaklarından biri sığırlardır. Mastitisli veya sağlıklı sığır sütlerinde ve sığırların mukoz membranlarında bulunan stafilokoklar kolaylıkla insanlara bulaşabilmektedir. Dolayısıyla sığır kökenli stafilokok suşlarının taşıdıkları özellikler insan infeksiyonlarını doğrudan etkilemektedir. Bu suşların taşıdıkları virulans faktörleri yanında, bulaşı sonrasında insan sağlığını en çok etkileyecek özellik antimikrobiyal dirençliliğidir. Hayvanlardan klonal yayılma veya horizontal gen transferi yoluyla insanlara veya insan suşlarına geçen antibiyotik dirençliliği en güncel araştırma konuları arasındadır. Bu kapsamdaki konuların başında da metisilin dirençliliği gelmektedir. Özellikle sığır kökenli stafilokok suşlarının taşıdığı metislin direnç özelliği, insanlardaki MRS infeksiyonlarının epidemiyolojisinde önemli bir yer tuttuğunu göstermiş ve bu konuda daha fazla araştırma yapılması gerekliliğini ortaya koymuştur. Bu nedenle gerçekleştirilen bu çalışmada, yöremizde sığır ve insanlardan izole edilen stafilokoklarda *mecA* geni varlığının ve *SCCmec* tiplerinin saptanması ile Aydın yöresinde toplum kökenli ve hastane kökenli metisilin dirençli stafilokok suşlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Ülkemizde mastitislerin etiyolojileri üzerine birçok araştırma yapılmıştır. Türkiye’de farklı bölgelerde yapılan çalışmalarda farklı subklinik mastitis görülme oranları bildirilmiştir ve bu oranlar %43 ile %72 arasında değişmektedir (Arda ve İstanbulluoğlu 1979, Kuyucuoglu and Uçar 2001, Beytut ve ark. 2002, Tel ve ark. 2009). Bu çalışmada da ineklerde subklinik mastitis oranı %43,4 gibi yüksek bir oranda bulunmuştur. Bu durumun,

çalışmada süt örneklerinin tamamının aile tipi işletmelerden alınmasına, yörede yıl boyu hava sıcaklığı ile nemin yüksek olmasına, bölgedeki yetiştiricilerin sağım hijyeni ve kurallarını bilmemesinden ya da uygulamamasından ve kuru dönem tedavi alışkanlığının olmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Mastitis hem insan hem hayvan sağlığını hem de süt verimini olumsuz etkilediği için hastalığın etiyolojisi ve kontrolü üzerindeki çalışmalar sıklıkla yapılmaktadır (Gilot ve ark. 2002). Mastitise neden olan etkenlerin oranları yöresel farklılıklar gösterebilmekle birlikte; bu çalışmada da yapılan diğer çalışmalara benzer şekilde, subklinik mastitisli ineklerden yüksek oranda (%69,4) stafilokok türü izolasyonu yapılmıştır (Türütoğlu ve ark. 1995, Kuyucuğlu ve Uçar 2001, Beytut ve ark. 2002, Bademkiran ve ark. 2005, Tel ve ark. 2009, Ünal ve Yıldırım 2010). Türkiye’de ve dünyada değişik yıllarda yapılan çalışmalarda mastitislerde *S. aureus* genellikle tür düzeyinde en sık izole edilen mastitis etkeni olmuştur (Giannechini ve ark. 2002, Shitandi ve ark.. 2004, Tel ve ark. 2009, Kaynarca ve Türkyılmaz 2010, Ünal ve Yıldırım 2010). *S. aureus*’un ülkemizde yapılan önceki çalışmalarda izolasyon oranları %28,3 ile %73 arasında değişmektedir (Türütoğlu ve ark. 1995, Kuyucuğlu ve Uçar 2001, Beytut ve ark. 2002, Bademkiran ve ark. 2005, Tel ve ark. 2009, Ünal ve Yıldırım 2010). Bu çalışmada *S. aureus*, *S. haemolyticus* ve *S. epidermidis*’den sonra üçüncü en yüksek izole edilen etken olmuştur. Koagulaz negatif stafilokokların eskiden derinin normal florasında bulunan zararsız patojenler olduğu kabul edilmekle birlikte; günümüzde mastitise neden olan önemli fırsatçı patojen bir grup mikroorganizma oldukları bilinmektedir (Taponen ve Pyörala 2009). Çalışmada koagulaz negatif stafilokokların tür düzeyinde belirlenmesi 16SrRNA fragmanı PCR ile çoğaltıldıktan sonra gerçekleştirilen sekans analizi ile yapılmış ve *S. aureus* ile birlikte 10 stafilokok türü identifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Sekans analizi ile KNSların tür düzeyinde identifikasyonlarının gerçekleştirilmesinin pratik ve uygulanabilir bir yöntem olduğu düşünülmektedir.

Metisilin direncinin belirlenmesi için dünyada fenotipik veya genotipik çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu çalışmada metisilin direnci öncelikle fenotipik olarak sefoksitin diski kullanılarak Kirby-Bauer disk difüzyon metodu ile belirlenmiştir. Bir sefamisin türevi olan sefoksitin *mecA* genini diğer penisilinlere göre daha iyi eksprese ettirdiği gösterilmiştir (Swenson ve ark. 2005). Bazı araştırmacılar sefoksitin disk difüzyon testinin oksasilin disk difüzyon testinden daha yararlı olduğunu, *mecA* gen varlığı ile

uyumun daha iyi olduğunu bildirmişlerdir (Felten ve ark. 2002, Cauwelier ve ark. 2004). CLSI antibiyotik duyarlılık testleri alt komitesi CLSI yayını M100-S15'te hem disk difüzyon hem de dilüsyon bölümlerindeki stafilokok tablosunda (Tablo 2C) sefoksitin disk difüzyon yöntemini yeni test olarak ilave etmiştir (CLSI 2005). Günümüzde metisilin direncinin belirlenmesinde tek başına oksasilin diski yeterli kabul edilmemekte, sefoksitin diskinin kullanımı ve *mecA* geninin varlığının da PCR ile doğrulanması gerekmektedir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre inek ve bakıcı izolatlarından fenotipik olarak metisilin dirençli olarak belirlenen 59 stafilokok izolatı 16SrRNA, *mecA* ve *nuc* genlerinin birlikte değerlendirilebilmesi amacı ile tripleks PCR gerçekleştirilerek, metisilin dirençli suşlar genotipik olarak da doğrulanmıştır. Doğru uygulandığında metisilin dirençliliğinin saptanmasında fenotipik testler oldukça güvenilir sonuçlar vermesine rağmen, PCR tabanlı moleküler yöntemler metisilin dirençliliğinin belirlenmesinde altın standart olarak kabul edilmektedir. Tek başına PCR fenotipik yöntemle saptanan metisilin dirençliliğinin doğrulanmasına hizmet ederken, SCC*mec* tiplerinin belirlenmesi için gerçekleştirilen multipleks PCR metisilin direnç tiplerini belirleyerek MRS epidemiyolojisine ışık tutmaktadır.

Metisilin dirençli stafilokokların özelliklerinin tam olarak tanımlanması yalnızca bakterinin genetik yapısının incelenmesi ile değil aynı zamanda bakteri tarafından taşınan heterojen ve karmaşık bir yapı olan *mec* elemanının belirlenmesi ile olmaktadır. Moleküler tiplendirme yöntemleri MRSA suşlarının epidemiyolojilerinin incelendiği son yıllardaki çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadırlar ve MRSA klonları arasındaki evrimsel ilişkinin daha iyi anlaşılmasına yardımcı olmaktadır. MRSA'nın hızlı bir şekilde yayılımının önüne geçmek için genotiplendirme metotları ile doğru bilginin elde edilmesi gerekmektedir. Bu amacı yerine getirebilmek için birçok moleküler teknik geliştirilmiştir. Bu tekniklerin başında PFGE, MLST, SCC*mec* ve *spa* tiplendirme sayılabilmektedir (Deurenberg ve ark. 2007).

Hayvanlarda ilk MRSA suşu 1972 yılında mastitisli sığırlarda bildirilmiştir (Devriese ve Hommeze 1975). İlerleyen yıllarda da bu sayı artmıştır (Juhász-Kaszanyitzky ve ark 2007, Leonard ve Markeley 2008). 1997-2004 yılları arasında Kore'de 153 farklı çiftlikte, 3047 mastitisli inek sütünden 835 *S. aureus* ve 763 KNS izole edilmiştir. Bu izolatların metisilin dirençliliği araştırıldığında 21 (%2,5) *S. aureus* ve 19 (%2,4) KNS'de dirençlilik tespit edilmiştir (Moon ve ark 2007). 2001 yılında ise Macaristan'da yapılan

antibiyotik dirençliliğine yönelik bir araştırmada, hayvanlarda ve hayvansal ürünlerde hiçbir vakada *mecA*-pozitif stafilokok izole edilememiş ancak 2004 de devam eden bu çalışmada, sığır sürülerinde 5 MRSA izolasyonu yapılmıştır (Kaszanyitzky ve ark. 2003). Vanderhaeghan ve ark. ise Belçika’da yaptıkları çalışmalarında klinik ve subklinik mastitisli sütlerde yaklaşık %10 olarak bulmuşlar ve ülkelerinde MRSA oranının beklenmedik bir şekilde yüksek çıktığını vurgulamışlardır (Vangerhaeghan ve ark. 2010). Türkiye’de mastitisli süt örneklerinde metisilin direncinin incelendiği sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda metisilin direnci fenotipik yöntemler kullanılarak belirlenmiştir ve bu çalışmalar arasında MRSA tespitinde oransal açıdan farklılıklar bulunmaktadır Ak ve ark. (2000) İstanbul’da ve Güler ve ark. (2005). Konya’da izole ettikleri mastitise neden olan stafilokok suşlarında oksasillin direnci bulunmadığını bildirirlerken; Kireççi ve Çolak (2002) Erzurum yöresinde metisilin dirençli 5 (%5,8) suş olduğunu bildirmiştir. Hadimli ve ark. (2001), 78 *S. aureus* izolatının 14 tanesinin (%17,9), Uçan ve Aslan (2002) 75 *S. aureus* izolatından bir tanesinde metisilin direnci saptamışlardır. Türütoğlu ve ark. (2006) ise Burdur yöresinde %17,5 MRSA olduğunu bildirmişlerdir. Bu konuda en yüksek oranlar Aydın ilinden bildirilmiştir. Kırkan ve ark. (2005) Aydın yöresinde yaptıkları çalışmada inceledikleri *S. aureus* suşlarında oksasillin direncinin %60 olduğunu bildirmişlerdir. *mecA* geninin yalnızca fenotipik olarak disk difüzyon yöntemi ile belirlenmesi yeterli değildir hatalı pozitif ve negatif sonuçlar çıkabileceğinden elde edilen bulguların moleküler yöntemlerle de doğrulanması oldukça önemlidir (Murakami ve ark. 1991). Yurdumuzda veteriner sahada bu konuda yapılmış en kapsamlı moleküler epidemiyolojik çalışma Türkyılmaz ve ark. (2010) tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışmada sefoksitin direncinin MRSA suşlarında %17,2 olduğu bildirilmiştir. Çalışmada 16 MRSA suşunun 14’ünün hastane kaynaklı MRSA ST239-III olduğu ve bunun MRSA’nın insanlardan hayvanlara bulaşmış olabileceğini gösterdiği vurgulanırken; MRSA ST8/IV suşlarının varlığının yörede toplum kökenli suşların da bulunduğunu gösterdiği bildirilmiştir. Kaynarca ve Türkyılmaz ise yine aynı yörede 2008 Ocak–2009 Nisan tarihleri arasında 23 işletmeden 152 sağmal inekten alınan 339 mastitisli süt örneği toplamışlar ve izole ettikleri 154 stafilokok suşunun 16 (%10,4) tanesinin (6 KPS ve 10 KNS) metisilin dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise CMT ile pozitif olarak bulunan 56 ineğe ait 145 süt örneği incelenmiş, bu ineklerin 14 tanesine ait sütlerin 21’inden (21/145=%14,5) MRS izolasyonu yapılmıştır. Bu yüksek oranın sebebi aslında yaklaşık bir buçuk yıl önce Kaynarca ve Türkyılmaz tarafından incelenen ve fenotipik olarak pozitif olan işletmelerin tekrar kontrol edilmiş olması olabilir. İşletmedeki

hayvanlar değişmesine rağmen bu işletmedeki bakıcılar aynı olup; yine aynı veteriner hekimler tarafından işletmeler kontrol edilmektedir. Bu durum pozitif bulunan 12 işletmede sağım hijyenine dikkat edilmediğini ayrıca insandan hayvana da bir bulaşma olabileceğini akla getirmektedir. Bu durumu ayrıca izolatların çoğunun hastane kökenli olması da desteklemektedir. Bakıcıların el ve burunlarından izole edilen *S. aureus* izolatlarının, inek meme başı derisi ve mastitisli inek sütlerinden izole edilenlerle genetik yakınlıkta olabildiği Türkiye ve dünyada yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Fox ve ark. 1991, Roberson ve ark. 1998, Ünal ve İstanbulluoğlu 2009). Mastitisin kontrolünde her zaman vurgulandığı gibi sağım hijyeninin önemi oldukça fazladır. Bu konunun açıklığa kavuşturulabilmesi için PFGE, *spa* veya MLST gibi daha ileri moleküler teknikler kullanılarak çalışmalar yapılması ve insan ile sığır izolatlarının aynı mı farklı mı olduklarının belirlenmesi gerekmektedir. Son yıllarda MRS'ların izolasyonunda meydana gelen artışlar, stafilokok infeksiyonlarının ve antibiyotiklere karşı mikroorganizmalardaki direnç gelişiminin kontrolü için etkili stratejiler geliştirmek gereğini ortaya çıkarmıştır. Bu nedenle, MRS epidemiyolojisinin, patogenezinin ve popülasyon genetiğinin iyi bilinmesini gerekmektedir.

Stafilokoklarda *mecA* geninin yaygın dağılımı daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Pierre ve ark., 1990, Beatriz A 2007) Bu çalışmada da, daha önceki çalışmalara benzer şekilde, klinik örneklerden izole edilen stafilokoklarda dört tip SCC*mec* tipi varlığı belirlenmiştir. Bu çalışmada aynı zamanda yurdumuzda veteriner sahada ilk kez SCC*mec* Tip II, III, IV ve V'in varlığı *S. aureus* ve diğer MRS'larda ilk kez belirlenmiştir. 59 adet MRS suşunun *mecA* geni varlığı spesifik primerler kullanılarak PCR ile doğrulanmış ve pozitif sonuç elde edilmiştir. *S. aureus* N315 suşu (SCC*mec* Tip II) PCR'da pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. KNS'ların identifikasyonu hem fenotipik hem de moleküler yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada metisilin dirençli suşlar fenotipik olarak sefoksitin diski kullanılarak belirlenmiş ve elde edilen MRS suşlarına koagülaz testi yapılmıştır. Bu izolatlara ayrıca tripleks PCR uygulanarak MRSA, MRS ve MSS türlerinin ayrımı yapılmıştır. Ayrıca tüm izolatların yalnızca 16S rRNA fragmanları universal primerler kullanılarak gerçekleştirilen bir PCR ile çoğaltılmış, elde edilen ampliconlara ticari bir firma tarafından sekans analizi yaptırılmış ve elde edilen sonuçlar bir daha doğrulanmıştır. Tripleks PCR'ın pratik, kolay, uygulanabilir olduğu düşünülmektedir.

Metisilin direncinden sorumlu olan *mecA* geni staphylococcal cassette chromosome *mec* olarak adlandırılan büyük hareketli genetik element üzerinde yer alır ve beta-laktam antibiyotiklere karşı düşük affiniteye sahip olan penisilin bağlayan protein 2a'yı (PBP2a) kodlar. SCC*mec* iki temel gen kompleksinden oluşmaktadır: *mecA* ve regülatör genleri içeren *mec* kompleksi, SCC*mec*'in yer değiştirmesinden sorumlu *ccr* kompleksi. Bu komplekslerin yapısal kompozisyonuna göre şu an için SCC*mec*'nin sekiz tipi (I-VIII) belirlenmiştir (IWG-SCC 2009). Metisilin dirençli stafilokok suşlarında SCC*mec* tipi multipleks PCR teknikleri ile belirlenmekte (Oliveira ve Lencastre 2002) ve epidemiyolojik açıdan önem taşımaktadır. SCC*mec* Tip I-III hastanede edinilmiş stafilokok suşlarında; Tip IV ve V ise toplum kökenli stafilokok suşlarında bulunmaktadır (Zaoutis ve ark. 2006). Farklı ülkelerde sıklıkla görülen SCC*mec* tipleri bulunmaktadır. SCC*mec* tip II Japonya ve Kore'de, tip III Suudi Arabistan, Sri Lanka, Singapur, Çin, Tayland ve Hindistan gibi diğer bazı Asya ülkelerinde bildirilirken (Changtrakol ve ark. 2006); tip I özellikle Hırvatistan'da (Budimir ve ark.2006) ve İsviçre'de (Blanceve ark. 2007), tip IV İspanya'da (Laplana ve ark. 2007), Portekiz (Amorim ve ark. 2007), Almanya (Menecke ve ark. 2008), Yunanistan (Chini 2008), Belçika (Hallin ve ark. 2008), İrlanda (Shore ve ark. 2005), İsviçre (Qi ve ark. 2005), Danimarka (Faria ve ark. 2005), Fransa (Lina ve ark. 2006) ve Finlandiya (Vainio ve ark. 2008), tip II ve IV ABD'de en yaygın tipler olarak bildirilmiştir (O'Brien ve ar. 2005, Kılıç ve ark. 2006). Türkiyede insanlarda en çok görülen SCC*mec* tipinin tip III olduğu; %82,1 (Kılıç ve ark. 2008) ve %90,4 (Yıldız ve ark. 2010) gibi yüksek oranlarda bulunduğu olduğu yapılan iki önemli araştırma ile bildirilmiştir. Veteriner sahada yurdumuzda yine benzer şekilde mastitisli sığır sütlerinden izole edilen *S. aureus* suşlarında insanlardakine benzer şekilde tip III en yüksek oranda bulunmuştur (Türkyılmaz ve ark. 2010). Yurdumuzda veteriner sahada bu konunun açıklığa kavuşturulabilmesi için daha fazla materyalin incelendiği çoklu merkezli çalışmaların yapılmasında fayda bulunmaktadır.

Çizelge 4. 1. Bazı ülkelerde MRSA'nın SCCmec tiplerine göre dağılımı

Ülke	Çalışma Yılı	Suş Sayısı	Tipi	Oranı
Hrvatistan	2006	82	Tip I	%89
Portekiz	2007	280	Tip IV	%80
Japonya, Kore	2006	615	Tip IIA	Japonya %93 Kore %53
(Tayland, Çin, Srilanka, Hindistan, Filipinler, Singapur, Vietnam, Suudi Arabistan, Endonezya)	2006	370	Tip IIIA	%83
İsviçre	2007	2256	Tip IV	%86
İspanya	2007	177	Tip IVA	%47,5
Yunanistan	2008	694	Tip IV	%70,3
Almanya	2008	100	Tip IV	%30
Danimarka	2005	81	Tip IV	%84
Fransa	2006	172	Tip IV	%50
Finlandiya	2008	44	Tip IV	%48
ABD	2005	76	Tip II ve Tip IV	%71
Türkiye	2008	385	Tip III	%82,1
Türkiye	2010	397	Tip III	%90,4

PFGE, *spa* ve MLST gibi yöntemler daha ayırt edici olmasına ve epidemiyolojik bilgi vermesine rağmen (Enright ve ark. 2000, Tang ve ark. 2000) HK-MRSA veya TK MRSA izolatlarının belirlenmesinde tek yöntem SCCmec tiplendirme metodudur (Kılıç ve ark. 2008). Bu çalışmada da multipleks PCR ile metisilin dirençli suşların SCCmec tipleri belirlenmiştir. *S. aureus*'ta *mecA* geni varlığının incelendiği çalışma sayısı çok olmakla birlikte, KNS türlerinde bu konunun incelendiği daha az sayıda yayın bulunmaktadır (Pierre ve ark. 1990). Beatriz ve ark. 129 MRKNS izolatu içinde *mecA* geninin varlığı yönünden PCR ile incelendiğinde tüm suşlar pozitif tespit edilmiş, 87 adet *S. epidermidis*, geri kalan 42 KNS suşunun 15'i *S. haemolyticus*, 13'ü *S. hominis*, 12'si *S. capitis* ve 1'i *S. sciuri* ve 1 tanede identifiye edilemeyen KNS suşu bulduklarını bildirmişlerdir. Aynı çalışmada dört SCCmec tipi için yapılan multipleks PCR ile (%28 SCCmec tip I, %3 tip II, %52 tip III, %3 tip IV) bulunmuş aynı yöntemle suşların %13'ü tiplendirilememiş (Beatriz ve ark. 2007). Yurdumuzda veteriner sahada KNSının SCCmec tiplerinin incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Türkyılmaz ve ark. (2010) inceledikleri mastitis kökenli 16 adet *S. aureus* suşunun iki tanesinin SCCmec Tip IV diğer 14 tanesinin Tip III olduğunu

bildirmişlerdir. Bu çalışma *S. aureus*'lar dışında diğer KNS suşlarının da incelendiği materyal sayısı açısından da kapsamlı bir çalışma olmakla birlikte; veriler toplu değerlendirildiğinde izole edilen 59 MRS arasından 38 suş tip III, 18 suş tip IV, 2 suş tip II, 1 suş tip V olarak bulunmuştur. Süt orjinli 21 MRS suşu belirlenmiş 10 *S. haemolyticus* suşunun hepsinin SCCmec Tip III, 4 *S. epidermidis* suşunun birinin Tip II, birinin tip III, ikisinin Tip IV; 2. *S. aureus* suşunun Tip III, 1 *S. xylosus* suşunun Tip III, birer *S. sciuri* ve *S. pseudointermedius* suşunun SCCmec Tip IV ve birer *S. equorum* ve *S. saprophyticus* suşunun SCCmec Tip III olduğu tespit edilmiştir. Türkyılmaz ve ark. tarafından (2010) yapılan çalışmaya benzer bir şekilde süt orjinli izolatların yaklaşık %87,5 gibi büyük bir kısmının (16 izolattan 4 tanesinin) SCCmec Tip III elemanı taşıması bu suşların insanlardan hayvanlara geçmiş olabileceğini yani humanoz olabileceğini düşündürmektedir. Bunun sebebi, yani insandan hayvana bulaşın nedeni, büyük olasılıkla hayvanlarla ilgilenen kişilerin sağım hijyenine dikkat etmemeleri olabilir. KNS suşları direnç genlerinin rezervuarıdır, muhtemelen bunları *S. aureus*'a taşıma yeteneğindedirler. *S. aureus* ve KNS'ların SCCmec bölgeleri arasındaki benzerlik stafilokok türleri arasında horizontal geçişin olduğunu düşündürmektedir.

Multipleks PCR ile tiplendirilemeyen bir adet bir sığır burun sıvabı orijinli *S. epidermidis* suşu Zhang ve ark.nın bildirdikleri yöntem kullanılarak Tip V olarak tiplendirilmiş ve bu izolat Türkiye'de ilk SCCmec Tip V suşu olmuştur. Özellikle süt ve burun sıvaplarından izole edilen *S. haemolyticus* suşlarının büyük bir çoğunluğunun SCCmec Tip III olması bu izolatlar arasında klonal ilişki bulunabileceğini düşündürmüştür. Bu konunun daha iyi anlaşılabilmesi için PFGE gibi yöntemlerle yeni araştırmaların yapılması gerekmektedir. Vautor ve ark. (24), keçi sütlerinden üretilen peynirlerden izole edilen *S. aureus*' larla sağım işlemini yapan insanların ellerinden izole edilen *S. aureus*'ların aynı pulsotipte bulunduğunu belirlemişler ve sağımçıların ellerinin bir çiftlikte *S. aureus* bulaşmasında rol alabildiklerini belirtmişlerdir. Zadoks ve ark. (2002), 70 adet inek meme başı derisi, 4 adet sağımçı eli, 34 adet sağım makinası ve 117 adet inek sütü kökenli *S. auerus* izolatlarını PFGE metodu ile tiplendirmişlerdir. Meme başı derisinden izole edilen *S. aureus* izolatlarının bakıcıların ellerinden izole edilen az sayıdaki izolatlarla ise aynı pulsotipte olduklarını belirlemişler ve insan izolatlarının inek meme başı derisine bulaşmasında süt sağım makinalarının rol alabileceğini ortaya koymuşlardır.

Sağlıklı bireylerin %10-35'i persistan taşıyıcıdır ve bir suşu her zaman taşırlar. %20-75 intermitan taşıyıcı iken %5-50 oranında kişi neredeyse hiçbir zaman taşıyıcılık göstermez (Kluytmans ve ark. 1997). Persistan taşıyıcılık çocuklarda erişkinlerden daha fazladır ve çoğu kişide 10-20 yaşlar arasında intermitan taşıyıcılığa dönüşür. Dünyada ve yurdumuzda insanlarda sağlıklı kişilerde nazal MRSA taşıyıcılığı ile ilgili pek çok çalışma yapılmıştır (Kluytmans ve Wertheim 2005). Nazal MRS taşıyıcılığı gerek toplum kaynaklı, gerekse hastane kaynaklı stafilokokal infeksiyonların oluşumunda önemli bir risk faktörüdür. Nazal sıvaplardan izole edilen MRSA suşları üzerinde çok çalışılmıştır, ancak KNS suşlarında metisilin direnci ile ilgili çok az çalışma vardır. Yapılan bir çalışmada insanlarda Cezayir, Mali, Moldova ve Kamboçya gibi farklı çevre koşullarına sahip olan ülkelerdeki MRKNS suşlarında SCCmec yapıları incelenmiştir. Bu ülkelerdeki nazal MRKNS taşıyıcılığı sırasıyla %29, %17, %11 ve %31 olarak bulunmuştur. 75 *S.epidermidis* (%78), 19 *S. haemolyticus* (%20) ve birer *S. hominis* ve *S. cohnii* (%1'er) olmak üzere 96 suş incelenmiş ve 4 farklı SCCmec tipi bulunduğu bildirilmiştir. Bunlardan 28'i (%29) Tip IV, 25'i Tip V (%26) ve 1'i (%1) Tip III olarak belirlenmiş; 15 suş (%44) tiplendirilememiştir (Ruppe ve ark. 2009). Von Eiff ve ark.'nın yaptıkları çalışmada nazal kolonize suşlar ile daha sonra gelişen bakteriyemi etkenlerinin %80'den fazla vakada aynı genotipe sahip olduğu saptanmıştır (vonEiff ve ark. 2001).

Çeşitli hayvan türlerinde de nazal taşıyıcılığın incelendiği pek çok çalışma bulunmaktadır (Kireççi 2009). Ancak özellikle sığırlarda ve onlarla ilgilenen sektör çalışanlarında nazal MRS taşıyıcılığının birlikte incelendiği çalışma sayısı oldukça sınırlıdır (Kireççi ve Çolak 2002, Bochev ve Russenova 2005). Ünal ve Yıldırım (2010) yaptıkları çalışmada 12 bakıcı kökenli izolatın 3 tanesinde metisilin direnci belirlemişlerdir. Metisiline dirençli suşlar sefalosporinler de dahil tüm β -laktam antibiyotiklere dirençlidirler. β -laktamazlara dayanıklı olan antibiyotiklere direnç gelişimi Veteriner Hekimlikte henüz bir sorun teşkil etmezken, bu antibiyotiklerin kullanımının artmasıyla birlikte direnç gelişimi görülebilmektedir. Bu çalışmada 56 sığırdan burun sıvapları ve bu sığırlar ile yakından ilgilenen 35 saha çalışanından nazal sıvap alınmıştır. Sığırlarda nazal taşıyıcılık oranı %32,1 (18/56), sektör çalışanlarında ise %52,9 (18/34) olarak belirlenmiştir. Nazal taşıyıcılık oranları yöreden yöreye değişebilmektedir.

Aseptomatik taşıyıcı insanlardan, veteriner hastanelerinde tedavi gören hayvanlara MRSA bulaşabilmektedir. İrlanda veteriner kliniğinde bir köpekte cerrahi

operasyon sonrası MRSA izolasyonu yapılmış ve ameliyatı gerçekleştiren veterinerin nazal florasında da aynı suş tespit edilmiştir (Leonard ve ark. 2006). Loeffler ve ark. (2005) de veteriner hastanelerinde, hastane çalışanlarının %17,9'unda MRSA taşıyıcılığı saptamışlar ve bu personelin bulaşmada rol aldıkları belirtmişlerdir (Loeffler ve ark. 2005). Bu çalışmalar, yakın temas sonrası hayvan ile hayvan sahibi arasında MRSA bulaşmanın olduğunu ortaya koymaktadır. Sonuç olarak hayvanlar etkeni nazal olarak bulundurabilmekte ve MRSA geniş bir rezervuar potansiyeline ulaşarak insanoğluna karşı varlığını daha da güçlendirmektedir.

Sahada çalışan veteriner hekimler incelendiğinde ise oldukça dikkat çekici bir durum ortaya çıkmaktadır. Çalışmada incelenen 15 işletmeden 12 tanesinde MRS izolasyonu yapılmıştır. Bu işletmelerle beş veteriner hekim ilgilenmektedir. Bu hekimlerden işe başlayan bir tanesi hariç, dört tanesinin MRS taşıyıcısı olduğu belirlenmiştir. Birinci ve dördüncü hekimden 1 *S. aureus* (SCCmec tip Tip III) ve 1 *S. epidermidis* (Tip IV), 2. hekimden 1 *S. epidermidis* (Tip III), üçüncü hekimden *S. aureus* (Tip III) izolasyonu yapılmıştır. İşletmelerle ilgilenen 14 bakıcı incelendiğinde ise 4 *S. haemolyticus* izolatının hepsi Tip III, 4 *S. epidermidis* izolatının 3 tanesi Tip III bir tanesi Tip IV, 3 *S. aureus* izolatının bir tanesi Tip II, 1 tanesi SCCmec tip Tip III, 1 tanesi Tip IV, 1 *S. xylosus* Tip III, bir *S. cohnii* Tip IV, ve 1 *S. succinus* izolatı ise Tip IV olduğu belirlenmiştir. Dolayısı ile hayvanlarla yakın teması bulunan sektör çalışanlarından izole edilen MRS'ların 13 tanesi hastane kökenli, yalnızca üç tanesi toplum kökenli izolat olarak belirlenmiştir. Hastane kökenli izolatların fazlalığı oldukça dikkat çekici olarak düşünülmektedir.

Sığır nazal sıvıpları değerlendirildiğinde ise yine benzer bir tablo ile karşılaşılacaktır. 4 adet *S. haemolyticus* izolatının 3'ü SCCmec tip Tip III, bir tanesi Tip IV; 6 *S. epidermidis* suşunun 3'ü Tip III, ikisi Tip IV, 1'i Tip V, 4 *S. aureus* suşunun hepsi tip III, 2 *S. xylosus* suşunun 1'i Tip IV, 1'i Tip III; 2 *S. cohnii* suşunun ise 1'i tip IV, 1'i tip III olarak belirlenmiş ve yine hastane kökenli izolat sayısının 12 toplum kökenli izolat sayısının ise 6 olduğu bulunmuştur. Hem insan hemde sığır izolatları arasında hastane kökenli suşların oranının fazla olması bu suşların yine bir şekilde insandan hayvana geçebileceğini (humanoozis) düşündürmüştür.

Günümüzde MRS, insanlar ve hayvanlarda son derece önemli patojenler haline gelmiştir. MRSA suşlarının esas kaynağı infekte veya kolonize hastalardır. Esas taşıyıcılık, burun taşıyıcılığıdır. Taşıyıcılık kişinin kendisi için bir risk oluşturmakla birlikte epidemiyolojik öneme de sahiptir. Hem mastitisli sığırlardan hem de onların bakıcılarından MRS suşu izole edilmesi; hastane kökenli MRS klonlarının köpeklerde ve mastitisli sığır sütlerinde bulunması MRS suşlarının insan ve hayvanlar arasında bulaşabildiği yani zoonotik önemlerinin olduğunu göstermiştir (Morgan 2008). Özellikle de veteriner hekimler, hayvan bakıcıları ve aileleri hayvanlarla yakın temas halindedirler. Ev ya da çiftlikte beslenen evcil hayvanlar MRS kaynakları ile temas sonrası etkeni alarak rezervuara dönüşebilir, bu surette insanlarda MRS infeksiyonlarına ya da nökslere neden olabilirler (Duijkeren ve ark. 2004). Bu çalışmada incelenen materyal sayısı az olmakla beraber MRS izolatlarında SCC_{mec} Tip III en sık olarak görülen tiptir. Hastane kökenli suş sayısı 40, toplum kökenli suş sayısı 19'dur.

5. SONUÇ

Yöremizde mastitis tedavisinde metisilin direncinin de dikkate alınmasının yararlı olacağı düşünülmekle birlikte; özellikle bakıcı ve veteriner hekimler arasında burun taşıyıcılığı oranının yüksek olması, sektör çalışanlarının tarama testleri ile kontrol edilmesi gerekliliğini de ortaya koymaktadır.

Çalışmada, özellikle KNS gibi identifikasyonu zor olan mikroorganizmaların sekans analizi ile tür düzeyinde belirlenmesinin faydalı, uygulanabilir pratik bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır. Uygulanan tripleks PCR yönteminin MRSA ve diğer MRSLarın ayırımında uygulanılabilecek kullanılabilir bir yöntem olduğu düşünülmektedir. Çalışmada MRS izolatlarının SCC*mec* multipleks PCR ile tiplendirilmesi sonucunda Aydın yöresinde hem insanlarda hem hayvanlarda hastane kökenli izolatların fazla olduğu görülmüştür. Hastane kökenli izolatların önemi çoklu antibiyotik direnç profiline sahip olmalarından kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte yine hem insanlarda hem hayvanlarda toplumda kazanılmış kökenlerin varlığı da belirlenmiştir. Hastanede kazanılmış ve ya toplumda kazanılmış olan izolatların ayırt edilmesince multipleks PCR yönteminin pratik bir yöntem olduğu daha önce diğer araştırmacılar tarafından belirtildiği gibi bir kez daha ortaya konulmuştur.

Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde şu an için toplum kaynaklı ve hastane kaynaklı MRS infeksiyonunun yöremizde önümüzdeki yıllarda sorun oluşturabileceği düşünülebilir. Çalışmada, aynı işletmelerde aynı SCC*mec* tipine sahip aynı tür stafilokok suşlarının varlığı belirlenmiştir. Bundan sonra yapılacak olan diğer çalışmalarda, bu izolatların aynı mı farklı mı olduklarının belirlenebilmesi için PFGE, *spa* analizi ve MLST gibi daha ileri moleküler teknikler kullanılarak suşlar arasındaki klonal ilişkinin belirlebimesi ve dünyadaki görülen diğer klonlar ile yöremizde görülen klonların karşılaştırılmasının yapılması önerilmektedir.

ÖZET

Sığırlardan ve Sektör Çalışanlarından İzole Edilen Metisilin Dirençli

Stafilokoklarda SCCmec Tiplerinin Belirlenmesi

Bu çalışma sığır ve insan kaynaklı metisilin dirençli stafilokokların stafilokokal kaset kromozom *mec* (SCC*mec*) tiplerini belirlemek amacıyla gerçekleştirildi. Çalışma materyalini subklinik mastitisli inek sütlerinden ve burunlarından izole edilen sırasıyla 90 ve 56, veteriner ve çiftlik işçilerinin burunlarından izole edilen 35 stafilokok suşu oluşturdu. Sefoksitin disk difüzyon testiyle, süt, sığır burun ve insan burun suşlarında metisilin dirençliliği sırasıyla %23,3, %32,1 ve %57,1 olarak bulundu. Bu suşların *S. aureus* oldukları ve metisilin dirençlilikleri, *mecA*, *nuc* ve 16S rRNA genine yönelik tripleks PCR ile doğrulandı. 16S rRNA sekans analizi ile incelenen 59 metisilin dirençli stafilokok içinde 10 tür (18 *S. haemolyticus*, 17 *S. epidermidis*, 12 *S. aureus*, 4 *S. xylosus*, 3 *S. cohnii*, 1 *S. equorum*, 1 *S. sciuri*, 1 *S. succinus*, 1 *S. pseudointermedius*, 1 *S. saprophyticus*) identifiye edildi. Bu suşların SCC*mec* tipleri *mec* ve *ccr*, IS elementi ve plazmidler için multipleks PCR ile incelendi. SCC*mec* Tip II 2, Tip III 38, Tip IV 18 ve Tip V 1 metisilin dirençli stafilokok suşunda bulundu. SCC*mec* Tip II ve III'ü içeren 40 suş hastane kökenli olarak değerlendirilirken, SCC*mec* Tip IV ve V'i kapsayan 18 suş toplum kökenli olarak değerlendirildi. SCC*mec* Tip III ve IV sığır suşlarının sırasıyla %66,6 ve %28,2'sinde, insan suşlarının %60 ve 35'inde saptandı. Hemen tüm *S. haemolyticus* ve *S. aureus* suşlarının hastane kökenli SCC*mec* tiplerini taşıdığı belirlendi. Sığır ve insan stafilokok suşlarının taşıdığı SCC*mec* tipleri arasındaki benzerlik ve sığırlarda hastane kökenli SCC*mec* tiplerinin yüksek oranda bulunması, insanların sığırlardaki metisilin dirençli stafilokokların kaynağı olabileceğini düşündürdü.

Anahtar kelimeler: Stafilokok, metisilin, SCC*mec*, sığır, insan.

SUMMARY

Determination of SCCmec types in methicilline resistant staphylococci isolated from cows and farm workers*

This study was conducted to determine staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCCmec) types of methicilline resistance staphylococci isolated from cattle and humans. In the study, staphylococci from the milk (n=90) and nasal samples (n=56) of cows with subclinic mastitis, and from nasal samples (n=35) of veterinarians and farm workers were used. By using cefoxitin disc diffusion test, methicilline resistance was detected in 23.3%, 32.1% and 57.1% of milk, bovine nasal and human nasal strains, respectively. Phenotypical characteristics of these strains were confirmed by triplex PCR by means of *mecA*, *nuc* and 16S rRNA genes. Ten *Staphylococcus* spp. (18 *S. haemolyticus*, 17 *S. epidermidis*, 12 *S. aureus*, 4 *S. xylosus*, 3 *S. cohnii*, 1 *S. equorum*, 1 *S. sciuri*, 1 *S. succinus*, 1 *S. pseudointermedius* ve 1 *S. saprophyticus*) among 59 methicilline resistant staphylococci were identified by 16S rRNA sequence analysis. SCCmec types of these strains were investigated by multipleks PCR, for *mec* and *ccr* genes, associated IS element and plasmids. SCCmec Type II was found in 2, Type III in 38, Type IV in 18 and Type V in 1 methicilline resistant staphylococci. While 40 strains including Type II and III were defined as hospital-acquired, 19 strains including Type IV and V as community-acquired. SCCmec Type III and IV were found in 66.6% and 28.2% of bovine strains respectively, and in 60.0% and 35.0% of human strains. Almost all strains of *S. haemolyticus* and *S. aureus* strains carried hospital-acquired type SCCmec. The similarity of SCCmec types harboured by staphylococcus strains from cattle and human and higher prevalence of hospital-acquired SCCmec types in cattle suggested that humans may be source of methicilline resistant strains of cattle.

Key words: *Staphylococcus*, methicilline, SCCmec, cattle, human

KAYNAKLAR

Aanensen D. MLST *Staphylococcus aureus*. Imperial College. Erişim Adresi: <http://saureus.mlst.net/misc/info.asp>. Erişim Tarihi: 15. 06. 2009

Ak S, Horoz H, Ilgaz A. *Trakya bölgesinde sığır mastitislerinden sorumlu bulaşıcı ve çevresel bakteriyel etkenler ve antibiyotik duyarlılıkları*. Ist Üniversitesi Veteriner Fakóltesi Dergisi, 2000; 26, 353–365.

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

Allen KD, Anson JJ, Parsons LA, Frost LG. *Staf carriage of methicillin-resistant Staphylococcus aureus and the home environment, a case report*. Journal of Hospital Infection, 1997; 35: 307-11.

Amorim ML, Faria NA, Oliveira DC, Vasconcelos C, Cabeda JC, Mendes AC ve ark. *Changes in the clonal nature and antibiotic resistance profiles of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates associated with spread of the EMRSA-15 clone in a tertiary care Portuguese hospital*. Journal of Clinical Microbiology, 2007;45:2881–88.

Anderseson MD. *DNA 6X Loading Dye*. Cancer Center. Erişim Adresi:<http://www.mdanderson.org/education-and-research/departments-programs-and-labs/labs/dent-laboratory/protocols/dna-6x-loading-dye.html>) Erişim Tarihi: 10.05.2010.

Anđ Küçüker AM, Tümbay E, Anđ Ö, Erturan Z. *Tıbbi Mikrobiyoloji*. (Franz H, Kayser A, Bienz A, Eckert J, Zinkernagel RM) 9. Baskı. Nobel Tıp Kitapevleri. 2002; 210.

Appelbaum PC. *MRSA-the tip of the iceberg*. Clinical Microbiology and Infection, 2006;12:3-10.

Appelbaum PC. *Microbiology of antibiotic resistance in Staphylococcus aureus*. Clinical Microbiology and Infection, 2007 ; 45:165-70.

Arbeit RD. *Laboratory procedures for theepidemiologic analysis of microorganisms*. In: Muray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Yolken RH. Manual of Clin Microbiology, 6. basım.Washington D.C.1995; 190-208.

Archer G L, Climo M W. *Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1994;38: 2231-7.

Archer GL,Climo MW. *Staphylococcus epidermidis and other coagulase-negative staphylococci*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Principles and Practice of Infectious Diseases. 6.baskı. Philadelphia. Churchill Livingstone, 2005; 2352-60.

Arda M ve Istanbuluođlu E. *The studies on isolation and identification of aerobic and anaerobic bacteria, mycoplasma and fungi, and determination of the most effective*

antibiotics and fungicides against these microorganism. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 1979; 26: 14-29.

Arıkan S, Tunçkanat F, Özalp M, Günalp A. *Staphylococcus aureus* suşlarında bazı makrolid antibiyotiklere ve trimetoprim-sulfametoksazole duyarlılığın metisilin direnciyle karşılaştırılması olarak değerlendirilmesi. Mikrobiyol Bülteni, 1995;29:333-7.

Atay T, Gülay Z. *Comparison of PB2A latex agglutination test with disk diffusion, MecA PCR and vitek for the detection of methicillin resistant staphylococcus aureus isolates.* ANKEM Dergisi, 2004;18:205-08.

Ayaz C. *Beta laktamların genel özellikleri ve penisilinler.* In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2008;266-78.

Aygün F, Hatipoğlu N, Somer A, Keser M, Tuğrul MZ, Salman N ve ark. (2007) *Toplum Kökenli MRSA; Bir Olgu Sunumu.* Ulusal Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi Poster Bildiriler 1. Bölüm, Çocuk Enfeksiyonları Dergisi, 2007;1:107-25.

Bademkiran S, Yeşilmen S, Gürbulak K. *Sütçü ineklerde günlük sağım sayısının klinik mastitis ve süt verimi üzerine etkisi.* YYÜ Veteriner Fakültesi Dergisi, 2005;16: 17–21.

Baba T, Takeuchi F, Kuroda M. *Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA.* Lancet, 2002; 359: 1819-27.

Bachi BB, Rohrer S. *cFactors influencing methicillin resistance in staphylococci.* Archives Microbiology, 2002;178:165-71.

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

Baştan A. *İneklerde meme hastalıkları.* 1. baskı. Hatipoğlu Yayınevi ANKARA, 2002;441-7.

Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Tenover FC. *Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method.* American Journal of Clinical Pathology, 1966; 44: 493.

Beatriz Mombach, Machado MP, Reiter KC, Paiva RM ve Barth AL. *Distribution of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) types I, II, III and IV in coagulase-negative staphylococci from patients attending a tertiary hospital in southern Brazil.* Journal of Medical Microbiology, 2007; 56:1328–1333.

Beretta AL, Trabasso P, Stucchi RB, Moretti ML. *Use of molecular epidemiology to monitor the nosocomial dissemination of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a university hospital from 1991 to 2001.* Brazilian Journal of Medical Biological Research, 2004;37:1345-51.

Barton M, Hawkes M, Moore D. *Guidelines for the prevention and management of community associated methicillin resistant Staphylococcus aureus: a perspective for Canadian health care practitioners.* Canada Journal Infection Disease Medical Microbiology, 2006;17:4-24.

Berglund C, Mölling P, Sjöberg L, Söderquist B. *Predominance of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) type IV among methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in a Swedish county and presence of unknown SCCmec types with Panton-Valentine leukocidin genes.* Clinical Microbiology and Infection, 2005;11:447-56.

Berglund C, Ito T, Ikeda M, Xue Ma X, Bo So, and Hiramatsu K. *Novel type staphylococcal Casette Chromosome mec in a methicilin- resistant Stapylococcus aureus strain isolated in Sweden.* Antimicrobiol Agents and Chemotherapy, 2008;3512-16.

Beytut E, Aydın F, Ozcan K, Genç O. *Pathological and bacteriological investigations on bovine mastitis in Kars region and its surrounds.* Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 8. baskı, 2002; 111-12.

Biçer AT. *Hastane İzolatı Staphylococcus aureus ve Koagülaz Negatif Staphylococcus Suşlarında Metisilin Direncinin Farklı Yöntemlerle Araştırılması.* T.C. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilimdalı, Uzmanlık Tezi, Adana, 2009.

Bilgehan H. *Gram olumlu koklar, Klinik Mikrobiyolojik Tanı.* Fakülteler Kitabevi, İzmir, 2002;31: 496-523

Bilgehan H. *Klinik Mikrobiyolojik Tanı.* İzmir, Barış Yayınları, 3.Basım, 2002; 35-5.

Bishop E, Melvani S, Howden BP, Charles PG, Grayson ML. *Good clinical outcomes but high rates of adverse reactions during linezolid therapy for serious infections: a proposed protocol for monitoring therapy in complex patients.* Antimicrobiol Agents and Chemotherapy, 2006; 50:1599-602.

Blanc DS, Petignat C, Wenger A, Kuhn G, Vallet Y, Fracheboud D ve ark. *Changing molecular epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a small geographic area over an eight-year period.* Journal of Clinical Microbiology, 2007;45:3729–36.

Bochev I, Russenova N. *Resistance of staphylococcus spp. strains isolated from goats with subclinical mastitis.* Bulgarian journal of veterinary medicine, 2005;8:109-18.

Boyle-Vavra, Ereshefsky SB, Wang CC ve Daum RS. *Successful multiresistant community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus lineage from Taipei, Taiwan, that carries either the novel staphylococcal chromosome cassette mec (SCCmec) type V or SCCmec type IV.* Journal of Clinical Microbiology, 2005;43:4719–30.

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

Bozca B, Coşkun A, Avcı M, Biçer ÇK, Özgenç O. *Stafilokoklarda metisiline direnç oranları.* Aknem Derg, 2008; 22: 20-22.

Brown DF, Edwards DI, Hawkey PM ve ark. *Joint Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy; hospital infection society; infection nontrol Nurses association: Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA).* Journal of Antimicrobiol Chemotherapy, 2005;56:1000-18.

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

Cauwelier B, Gordts B, Descheemaeker P, Van Landuyt H. *Evaluation of a Disk Diffusion Method with Cefoxitin (30 microg) for Detection of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus.* European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases, 2004;23: 867–8.

Cengiz AT, Ustaçelebi Ş. *Staphylococcus.* Temel ve Klinik Mikrobiyoloji Kitabından. Güneş Kitabevi, Ankara. 1999;339-346.

Centers for Disease Control and Prevention. *Staphylococcus aureus with reduced susceptibility to vancomycin-United States.* MMWR, 1997;46:765-66.

Çelik İ, Cihangiroğlu M, Sevim E, Çabalak M, Akbulut A. *Sağlık çalışanlarının burunlarından izole edilen koagülaz pozitif ve negatif Stafilokoklarda metisilin direnci ve slime pozitifliği.* Fırat Tıp Dergisi, 2005;10: 123-6.

Centers for Disease Control and Prevention. *Staphylococcus resistant to vancomycin.* United States, MMWR, 2002;51:565-7.

Centers for Disease Control and Prevention. *Laboratory Detection of Oxacillin/Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus.* Erişim Adresi: http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/ar_lab_MRSA.html. Erişim Tarihi: 25. 06. 2009

Centers for Disease Control and Prevention. *Antibiotic resistance.* Erişim Adresi: (www.cdc.gov/ncidod/dhqp/ar_MRSA_ca_clinicians.html). Erişim tarihi: 10,06.2010.

Çetinkaya Y, Ünal S. *Stafilokok nazal taşıyıcılık: Önemi ve Tedavisi.* Hastane Enfeksiyonları Dergisi, 1999;3:22-32.

Çetinkaya Şardan Y. *Metisilin dirençli Staphylococcus aureus enfeksiyonlarının epidemiyolojisi ve kontrolü.* Hastane Enfeksiyonları Dergisi, 2004;4:205-17.

Chai H, Archambault M, Prescott JF. *16S Ribosomal RNA Sequence-Based Identification of Veterinary Clinical Bacteria.* Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2003;15: 465–69.

Chambers HF. *Methicillin-resistant staphylococci.* Clin Microbiol Rev, 1988; 1: 173–86.

Chambers HF. *Methicillin resistance in staphylococci: Molecular and biochemical basis and clinical implications.* Clinical Microbiology Reviews, 1997;10:781-91.

Chini V, Petinaki E, Meugnier H, Foka A, Bes M, Etienne J ve ark. *Emergence of a new clone carrying Panton- Valentine leukocidin genes and staphylococcal cassette chromosome mec type V among methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Greece.* Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 2008; 40:368–72.

Chongtrakool P, Ito T, Ma XX, Kondo Y, Trakulsomboon S, Tiensasitorn C ve ark. *Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains isolated in 11 Asian countries: a proposal for a new nomenclature for SCCmec elements.* Antimicrobiol Agents and Chemotherapy, 2006;50:1001–1012.

Clinical and Laboratory Standards Institute. *Antimikrobik Duyarlılık için Uygulama Standartları*; Edt Gür D. 18. Bilgi Eki, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını, Ankara Ocak, 2002.

Clinical and Laboratory Standards Institute. *2006 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 15th informational supplement. Approved standard M100-S16.* Wayne, PA, 2006.

Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Seventeenth informational supplement. M100-S17.* Wayne, PA, 2007.

Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Nineteenth Informational Supplement. CLSI Document M100-S18* Pennsylvania, 2008; 28:110-14.

Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Nineteenth Informational Supplement. CLSI Document M100-S19* Pennsylvania, 2009;29:52-59.

Cox RA, Conquest C. *Strategies for the management of healthcare staf colonized with epidemic methicillin-resistance S.aureus.* Journal of Hospital Infection , 1997; 34:117-20.

de MARTINO, Lucido M, Mallardo K, Facello B, Mallardo M, Iovane G, Pagnini U, Tufano M., Catallanotti P. *Methicillin resistant staphylococci isolated from healthy horses and horse persone in Italy.* Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2010;22: 77-82.

Derbentli Ş. *Stafilokok ve enterokoklarda antibiyotik duyarlılık deneylerinin özellikleri.* Ankem Dergisi, 1996;10: 211–19.

Derbentli Ş. *Cerrahi infeksiyonlarda dirençli gram pozitif bakteri sorunu.* ANKEM Dergisi, 2004;18:215-21.

Derbentli Ş. *Sitafilokoklarda antibiyotik direnci: 2003-2004 Türkiye haritası.* ANKEM Dergisi, 2005;19:54-60.

Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE. *The molecular evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* Clinical Microbiology and Infection, 2007;13:222-35.

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

Doğan Ö, Çırak YA, Engin D, Türet S. *Methicillin resistance and in-vitro susceptibility to various antibiotics of staphylococci isolated from clinical samples* . ANKEM Dergis, 2005;1:39-42.

Duarte C, Oliveira ve Hermínia de Lencastre. *Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*. Antimicrobiol Agents and Chemotherapy, 2002;46: 2155–61.

Duijkeren E, Wolfhagen M, Box ATA, Heck M, Wannet WJB, Fluit AC. *Human-to-dog transmission of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Emerging Infectious Diseases, 2004;10:2235-37.

Duquette RA, Nuttall TJ. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in dogs and cats: an emerging problem?* Journal of Small Animal Practice, 2004; 45:591-97.

Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA ve Stobberingh EE. *The molecular evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Clinical Microbiology and Infection, 2007;13:222–35.

Deurenberg RH, Stobberingh EE. *The evolution of Staphylococcus aureus* .Department of Medical Microbiology, University Hospital Maastricht, P. Debyelaan 25, 6229 HX Maastricht, The Netherlands. Erişim: www.staphylococcus.net/Pages/SCCmecTypingEN.html. Erişim Tarihi: 19.06.2010

Dufourcq, Chhor Nareth, Jean-Louis Sarthou, Antoine Andreumont, and Raymond Ruimy. *Diversity of Staphylococcal Cassette Chromosome mec Structures in Methicillin-Resistant Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus haemolyticus Strains among Outpatients from Four*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, February, 2009;53:442-449.

Durmaz R. *Polimeraz zincir reaksiyonunun tipleri*. Durmaz R. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji, 2001;35-43.

Dündar V, Dündar DÖ. *Stafilokok Enfeksiyonları*. In: Topçu AW, Söyletir G, DoğanayM. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 2008;2065-77.

Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. *Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of Staphylococcus aureus*. Journal Clinical of Microbiology, 2000; 38:1008–15.

Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H ve Spratt BG. *The evolutionary history of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)*. Proceedings of the National. Academy of Sciences USA, 2002;99:7687–92.

Esel D, Doganay M, Alp E, Sumerkan B (2003) *Prospective evaluation of blood cultures in a Turkish University Hospital: epidemiology, microbiology and patient outcome*. Clinical Microbiology and Infection, 2003;9:1038-44.

Faria NA, Oliveira DC, Westh H, Monnet DL, Larsen AR, Skov R ve ark. *Epidemiology of emerging methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in Denmark: a nationwide study in a country with low prevalence of MRSA infection.* Journal Clinical of Microbiology, 2005;43:1836– 42.

Felten A, Grandy B, Lagrange PH, Casin I. *Evaluation of three techniques for detection of low level methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA): A disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the vitek 2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test.* Journal Clinical of Microbiology, 2002;40: 2766–71.

Fındık A, Akan N, Onuk EE, Çakıroğlu D, Çiftçi A. *Methicillin resistance profile and molecular typing of Staphylococcus aureus strains isolated from noses of the healthy dogs.* Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 2009; 15, 925–30.

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

Fluit AC, Schmitz FJ, European SENTRY Participant Group and J. Verhoef. *Frequency of isolation of pathogens from bloodstream, nosocomial pneumonia, skin and soft tissue, and urinary tract infections occurring in European patients.* European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases, 2002;20:188–91.

Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology 1. baskı, by Mosby, Inc, 2002.

Foster T. *Staphylococcus.* Erişim: (<http://gsbs.utmb.edu/microbook/ch012>, Erişim Tarihi: 17.06.2010.

Fox LK, Gershman M, Hancock DD, Hutton C. *Fomites and reservoirs of Staphylococcus aureus causing intramammary infections as determined by phage typing: The effect of milking time hygiene practices.* Department of Veterinary Clinical Medicine and Surgery, Washington State University, Pullman, 1991;81:183-93.

François P , Renzi G, Pittet D. *A novel multiplex real-time PCR assay for rapid typing of major staphylococcal cassette chromosome mec elements.* Journal of Clinical Microbiology, 2004; 42:3309-12.

Freborg N.B, Cauliez B., Lemeland, J.F. *Evidence for nasal carriage of methicillin-resistant staphylococci colonizing intravascular devices.* Journal of Clinical Microbiology, 1999;37:1182-85.

Giannechini R, Concha C, Rivero R, Delucci I, López MJ. *Occurrence of clinical and sub-clinical mastitis in dairy herds in the west littoral region in Uruguay.* Acta Veterinaria Scandinavica, 2002;43, 221-30.

Gill SR, Fouts DE, Archer GL. *Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant Staphylococcus aureus strain and biofilm-producing methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis strain.* Journal of Bacteriology, 2005;87:2426-38.

Gilot P, Lina G, Cochard T, Poutrel B. *Analysis of the genetic variability of genes encoding the RNA III-activating components Agr and TRAP in a population of Staphylococcus aureus strains isolated from cows with mastitis.* Journal of Clinical Microbiology, 2002;40:4060-67.

Goni P, Vergara Y, Ruiz J, Albizu I, Vila J, Gomez- Lus R. Antibiotic resistance and epidemiological typing of *Staphylococcus aureus* strains from ovine and rabbit mastitis. International Journal of Antimicrob Agents, 2004;23:268-72.

Grüneberg RN. *Anti-Gram positive agents: What we have and what we would like.* Drugs, 1997;6:29-38.

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

Gülay Z. *Antibakteriyel ilaçların etki mekanizmaları.* In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2008;227-43.

Gülbandılar A. *Kütahya yöresinde burun mukozasındaki Staphylococcus aureus taşıyıcılığının ve antibiyotik duyarlılığının araştırılması.* Fen Bilimleri. Dergisi, 2009;18: 1302-55.

Güler L, Ok Ü, Gündüz K, Gülcü Y, Hadimli HH. *Antimicrobial susceptibility and coagulase gene typing of Staphylococcus aureus isolated from bovine clinical mastitis cases in Turkey.* Journal of Dairy Science, 2005;88:3149–54.

Gündeş SG, Karadenizli A, Willke A. *Hastane enfeksiyonu etkeni olarak izole edilen Staphylococcus aureus suşlarında çoğul antibiyotik direncinin değerlendirilmesi.* Enfeksiyon Dergisi, 2001;:303-6.

Gür D. *Bakterilerde antibiyotiklere karşı direnç.* Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2008;243-257.

Hacıbektaşoğlu A, Eyigün CP ve Özsoy MF. *Gıda elleyicilerinde burun ve boğaz portörlüğü.* Mikrobiyoloji Bülteni, 1993;27: 62-70.

Hackbarth CJ, Chambers HF. *blaI and blaR1 regulate β -lactamase and PBP 2a production in methicillin resistant Staphylococcus aureus.* Antimicrobiol Agents and Chemotherapy, 1993;37:1144–9.

Hackbarth CJ, Miick C, Chambers HF. *Altered production of penicillin-binding protein 2a can affect phenotypic expression of methicillin resistance in Staphylococcus aureus.* Antimicrobiol Agents and Chemotherapy, 1994;38:2568-71.

Haddadin AS, Fappiano SA, Lipset PA. *Methicillin resistant Staphylococcus aureus in the intensive care unit.* Journal of Postgraduate Medicine , 2002;78:385-92.

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

Haley R W, Hightower A W, Khabbaz R F, Thornsberry C, Martone WJ, Alle J R. *The emergence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in U.S.A hospitals.* Annals of Internal Medicine, 1982;97:297-308.

Hallin M, Denis O, Deplano A, De Ryck R, Cre`vecœur S, Rottiers S ve ark. *Evolutionary relationships between sporadic and epidemic strains of healthcare-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* Clinical Microbiology and Infection, 2008;14:659–69.

Hanssen AM, Ericson Sollid JU (2006) *SCCmec in staphylococci. genes on the move.* FEMS Immunol Med Microbiol, 46:8-20.

Hartman BJ, Tomasz A. *Expression of methicillin resistance in heterogeneous strains of Staphylococcus aureus.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1986;29:85-92.

Haznedaroğlu T. *Metisilin dirençli S. aureus (MRSA).* Erisim: <http://www.gata.edu.tr/infkom/MRSA.pdf> . Erişim Tarihi: 06.05.2010.

Henze U, Sidow T, Wecke J, Labischinski H, Berger-Bachi B. *Influence of femB on methicillin resistance and peptidoglycan metabolism in Staphylococcus aureus.* Journal of Bacteriology, 1993;175:1612-20.

Heusser R, Ender M, Berger B-Bachi ve McCallum N. *Mosaic staphylococcal cassette chromosome mec containing two recombinase loci and a new mec complex, B2.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2007;51:390–93.

Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H. *Dissemination in Japanese hospitals of strains of Staphylococcus aureus heterogeneously resistant to vancomycin.* Lancet, 1997;350:1670-73.

Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T. *The emergence and evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* Trends in Microbiology, 2001;9:486-93.

Hiramatsu K, Katayama Y, Yuzawa H. *Molecular genetics of methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* International Journal of Medical Microbiology, 2002;292:67-74.

Holden, MT, Feil EJ, Lindsay JA. *Complete genomes of two clinical Staphylococcus aureus strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance.* Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, 2004;101:9786-91.

Hsu RB, Chen ML, Chang SC. *Perfusionist-transmitted bacterial mediastinitis in a heart transplant recipient.* Texas Heart Institute Journal, 2001;28:60-2.

Ito T, Katayama Y, Hiramatsu K. *Cloning and nucleotide sequence determination of the entire mec DNA of pre-methicillin-resistant Staphylococcus aureus N315.* Antimicrobial Agents and Chemother, 1999;43:1449-58.

Ito T, Katayama Y, Asada K. *Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome in methicillin resistant Staphylococcus.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2001;45:1323-36.

Ito T, Okuma K, Ma XX. *Insights on antibiotic resistance of Staphylococcus aureus from its whole genome: genomic island SCC.* Drug Resist Update, 2003;6:41-52.

Ito T, XX Ma, Takeuchi F, K Okuma, H Yuzawa ve Hiramatsu K. *Novel type V staphylococcal cassette chromosome mec driven by a novel cassette chromosome recombinase, ccrC.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2004;48:2637–51.

International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). *Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec): Guidelines for Reporting Novel SCCmec elements.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009;12:4961–67.

İnan M, Özgenç O, Oran E, Sancaktaroğlu İ. *Koagülaz pozitif ve koagülaz negatif stafilocokların in vitro antibiyotik duyarlılıklarının araştırılması.* Enfeksiyon Dergisi, 1992;6:303-6.

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

Jevons MP. *Celbenin resistant Staphylococci.* Journal of Medical Biography, 1961;1:124-5.

Jorgense JH, Turnidge JD. *Susceptibility testing methods: Dilution and disk diffusion methods.* In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. Manual of Clinical Microbiology. 8. baskı, Washington DC: ASM Pres, 2003;1108-27.

Juhász-Kaszanyitzky É, Jánosi S, Somogyi P, Dán Á, Bloois LG, Duijkeren E, Wagenaar JA. *MRSA Transmission Between Cows and Humans.* Emergins Infetious Disases, 2007;13: 630–2.

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

Kaleli İ, Özen N, Yalçın AN, Aksit F. *Hastane personeline burunda Staphylococcus aureus taşıyıcılığının saptanması.* Enfeksiyon Dergisi, 1997;11:243 .

Kaleli İ, Şengül M, Özen N, Aksit F. *Staphylococcus aureus suşlarının çeşitli antibiyotiklere duyarlılığı.* Enfeksiyon Dergisi, 1998;12:351-4.

Karabiber N. *Normal popülasyonda ve hastane laboratuvar personeline Staphylococcus aureus burun taşıyıcılığı.* Mikrobiyol Bülteni, 1998;22:105.

Karabiber N, Dinç M. *Çeşitli klinik örneklerden izole edilen MRSA suşlarının antibiyotiplendirilmesi ve eritromisin zon içi üreme gösteren MRSA suşları.* Ankem Dergisi, 2007;21: 50-58.

Kaşıfoğlu N, Kiremitçi A, Durmaz G, Akgün Y, Metintaş S. Beş yıllık dönemde Gram pozitif bakteri izolatlarının direnç oranlarındaki değişim (Özet). XXXII.Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Antalya. Kongre Kitabı, 2006;s.419.

Kawamura Y, Hou XD, Sultana F. *Distribution of Staphylococcus species among human clinical specimens and emended description of Staphylococcus caprae.* Journal of Clinical Microbiology, 1998;36:2038-42.

Kaszanyitzky EJ, Janosi S, Egyed Z, Agost G, Semjen G. Antibiotic resistance of staphylococci from humans, food and different animal species according to data of the Hungarian resistance monitoring system in 2001. Acta Veterinaria Hungarica, 2003;51:451-64.

Katayama Y, Ito T ve Hiramatsu K. A new class of genetic element, staphylococcal cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2000;44:1549-55.

Katayama, Y., T. Ito, and K. Hiramatsu. Genetic organization of the chromosome region surrounding mecA in clinical staphylococcal strains: role of IS431-mediated mecI deletion in expression of resistance in mecA-carrying, low-level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. Antimicrobia Agents and Chemotherapy, 2001;45:1955-63.

Kaya E. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi. Bakterilerin Sınıflandırılması Erişim Adresi: <http://tip.erciyes.edu.tr/> Erişim tarihi: 15. 06. 2009

Kaynarca S, Türkyılmaz S. *Methicillin Resistance and Slime Positivity of Staphylococci Isolated from Bovine Mastitis.* Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 2010;16: 567-72.

Kilic A, Guclu AÜ, Senses Z, Bedir B, Aydoğan H, Basustaoglu AC. *Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) characterization and panton-valentine leukocidin gene occurrence for methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Turkey, from 2003 to 2006.* Antonie van Leeuwenhoek, 2008;94:607-614.

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

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

Kireççi E. *Evcil hayvanlarda MRSA taşıyıcılığı* S.D.Ü. Tıp Fak. Derg, 2009;16: 45-49.

Kırkan Ş, Göksoy EÖ, Kaya O. *Identification and antimicrobial susceptibility of Staphylococcus aureus and coagulase negative staphylococci from bovine mastitis in the Aydın region of Turkey.* Turkish Journal of Veterinary Animal Sciences, 2005;29:791-96.

Kloos WE, Bannerman TL. *Update on clinical significance of Coagulase-Negative Staphylococci.* Clinical Microbiology Reviews , 1994;7: 117-140.

Kluytmans JL, Wertheim HF. *Nasal carriage of S. aureus and prevention of nosocomial infections.* Infection, 2005;1:33.

Kluytmans JA, Wertheim HF. *Nasal carriage of Staphylococcus aureus and prevention of nosocomial infections.* Infection, 2005;33:3-8.

Kluytmans J, Van Belkum A, Verbrugh H. *Nasal carriage of Staphylococcus aureus: Epidemiology of underlying mechanisms and associated risks.* Clinical Microbiology Reviews, 1997;10:505-20.

Kobayashi N, Taniguchi K, Urasawa S. *Analysis of diversity of mutations in the mecI gene and mecA promoter/operator region of methicillin-resistant Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1998;42:717-20.

Kocazeybek B. *The evaluation of the nosocomial bacteremia in a private university hospital (a six-year prospective study).* İnfeksiyon Dergisi ,2001;15:145-54.

Kollef MH, Micek ST. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: a new community-acquired pathogen?* Current Opinion in Infectious Disease, 2006;19:161-68.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. *Gram-positive cocci: Part-1: Staphylococci and related organisms. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology.* The Lippincott, New York, Fifth Edition, 1997; 539–76.

Korten V. *Hastane enfeksiyonlarına yol açan bakterilerde direnç sorunu, Uzun Ö : Gram Pozitif Kok Enfeksiyonları. Sorunlar ve Çözümler, İmmunsuprese Hastalar, Güneş Kitapevi, Ankara, 2003; 23-6.*

Köksal F. *Nükleik asit çoğaltma yöntemleri.* Durmaz R. Uygulamalı moleküler mikrobiyoloji, 2001;15-34.

Köksal F, Samastı M. *Kan kültürlerinden izole edilen stafilokoklarda antibiyotik direnci.* ANKEM Dergisi, 2002;16:10-3

Kuroda M, Ohta T, Uchiyama T. *Whole genome sequencing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* Lancet, 2001;357:1225-40.

Kuwahara-Arai K, Kondo N, Hori S, Tateda-suzuki E, Hiramatsu K. *Suppression of methicillin resistance in a mecA containing pre-methicillin-resistant Staphylococcus aureus strain is caused by the mecI mediated repression of PBP 2' production.* Antimicrob Agents and Chemotherapy, 1996;40:2680-5.

Kuyucuoğlu Y, Uçar M. *Determination of the subclinical and clinical mastitis rates in dairy cows, of Afyon region and effective antibiotics.* Veteriner Hekimler Mikrobiyoloji Dergisi, 2001;1: 19-24.

Lakew M, Tolosa T, Tigre W. *Prevalence and major bacterial causes of bovine mastitis in Asella, South Eastern Ethiopia.* Tropical Animal Health and Production, 2009; 41:1525-30.

Laplana LM, Cepero MA, Ruiz J, Zolezzi PC, Calvo MA, Erazo MC ve ark. *Molecular typing of Staphylococcus aureus clinical isolates by pulsed-field gel electrophoresis, staphylococcal cassette chromosome mec type determination and dissemination of antibiotic resistance genes.* International Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2007;30:505–13.

Lee JH. *Methicillin (Oxacillin)-resistant Staphylococcus aureus strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans.* Appl Environ Microbiology, 2003;69:6489-94.

Leonard FC, Abbott Y, Rossney A, Quinn PJ, O'Mahony R, Markey BK. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from a veterinary surgeon and five dogs in one practice.* Veterinary Record, 2006;158:155-59.

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

Lilenbaum W, Nunes EL, Azeredo MA. *Prevalence and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from the skin surface of clinically normal cats.* Lett Appl Microbiol, 1998;27:224-28.

Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, Bes M, Peter MO, Gaudochon V, Vandenesch F, Etienne J. *Involvement of Panton-Valentine Leukocidin-Producing Staphylococcus aureus in Primary Skin Infections and Pneumonia.* Clinical Infectious Diseases, 1999;29: 1128–32.

Lina G, Durand G, Berchich C, Short B, Meugnier H, Vandenesch F ve ark. *Staphylococcal chromosome cassette evolution in Staphylococcus aureus inferred from ccr gene complex sequence typing analysis.* Clinical Microbiology and Infection, 2006;12:1175–84.

Loeffler A, Boag AK, Sung J, Lindsay JA, Guardabassi L, Dalsgaard A ve ark. (2005) *Prevalence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus among staff and pets in a small animal referral hospital in the UK.* Journal Antimicrobial Chemotherapy; 56:692-97.

Lodise TP, McKinnon PS. *Clinical and economic impact of methicillin resistance in patients with Staphylococcus aureus bacteremia.* Diagnostic Microbiology Infectious Disease, 2005;52:113-22.

Looney, WJ. *Small colony variants of Staphylococcus aureus.* British Journal Biomedical Science, 2000; 57:317-22.

Louie L, Soares D, Meaney H, Vearncombe M, Simor AE. *Evaluation of a new chromogenic medium, MRSA select, for detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* Journal of Clinical Microbiology, 2006;44:4561-3.

Lowy FD. *Staphylococcus aureus infections.* New England Journal of Medicine, 1998;339:520–32.

Ludwig W, Schleifer KH. *Bacterial Phylogeny Based on 16S 23sRNA Sequence Analysis.* FEMS Microbiology Reviews, 1997;15: 155–73.

Ma, X. X., T. Ito, C. Tiensasitorn, M. Jamklang, P. Chongtrakool, S. Boyle-Vavra, R. S. Daum, and K. Hiramatsu. Novel type of staphylococcal cassette chromosome mec identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2002;46:1147–1152.

Maes N, Magdalena J, Rottiers S, De Gheldre Y, Struelens MJ. *Evaluation of a triplex PCR assay to discriminate Staphylococcus aureus from coagulase-negative staphylococci and determine methicillin- resistance from blood cultures.* *Journal of Clinical Microbiology*, 2002; 40:1514–17.

Maltezou H, Giamarellou H. *Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections.* *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2006;27:87-96.

ManiAan F. *Asymptomatic nasal carriage of mupirocin-resistant, methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in a pet dog associated with MRSA infection in household contacts.* *Clinical Infectious Disease*, 2003;36:26-8.

Maple PAC, Hamilton-Miller JMT, Brumfitt W. *World-wide antibiotic resistance in methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* *The Lancet*, 1989;11: 537-40.

Maranan MC, Moreira B, Boyle-Vavra S, Daum RS. *Antimicrobial resistance in staphylococci.* *Infectious Disease Clinics of North America*, 1997;11:813-49.

Mariraju MVVS, Brunner DP, Wilkinson BJ. *Effects of temperature, NaCl and methicillin on penicillin binding proteins, growth, peptidoglycan synthesis and autolysis in methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* *Journal and Antimicrobial Chemotherapy*, 1987;31:1727-33.

Martins A, Cunha MLRS. *Methicillin resistance in Staphylococcus aureus and coagulase negative staphylococci: Epidemiological and molecular aspects.* *Microbiology Immunol Reviews*, 2007;51:787-95.

McDougal LK, Thornsberry C. *The role of beta-lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase resistant penicillins and cephalosporins.* *Journal of Clinical Microbiology*, 1986;23:832-9.

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

Mehndiratta PL, Bhalla P, Ahmed A, Sharma YD. *Molecular Typing of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Strains by PCR-RFLP of SPA gene: a Reference Laboratory Perspective.* *Indian Journal Medical Microbiology*, 2009;27: 116–122.

Mi-Na K, Pai CH, Woo JH. *Vancomycin intermediate Staphylococcus aureus in Korea.* *Journal of Clinical Microbiology*, 2000;38:3879-81.

Monecke S, Jatzwauk L, Weber S, Slickers P, Ehricht R. *DNA microarray-based genotyping of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains from Eastern Saxony.* *Clinical Microbiology and Infection*, 2008;14:534–45.

Moodley A, Guardabassi L. *Clonal spread of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci among horses, personnel and environmental sites at equine facilities.* Veterinary Microbiology, 2009;137, 397-401.

Moon KJS, Lee AR, Kang HM, Lee ES, Kim MN, Paik YH ve ark. *Phenotypic and Genetic Antibigram of Methicillin-Resistant Staphylococci Isolated from Bovine Mastitis in Korea.* Journal of Dairy Science, 2007;90:1176-85.

Moreillon P, Que Y, Glauser MP. *Staphylococcus aureus (Including Staphylococcal Toxic Shock)* In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Principles and Practice of Infectious Diseases. 6. baskı, Philadelphia: Churchill Livingstone, 2005;2321-51.

Moreillon P, Que Y, Glauser MP. *Staphylococcus aureus Including Staphylococcal Toxic Shock.* Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases 6. baskı, Elsevier Inc, 2005;2321-52.

Morgan M. *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus and Animals: Zoonosis or Humanosis.* Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2008;10:1093-1105.

Mulligan ME, Murray-Leisure KA, Standiford HC. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: a consessus review of the microbiology, pathogenesis and epidemiology with implications for prevention and management.* American Journal of Medical, 1993;94:313-28.

Murakami K, Minamide W, Wada K, Nakamura E, Teraoka H, Watanabe S. *Identification of methicilline resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction.* Journal Clinicalof Microbiology, 1991;29:2240-44.

Murray PR, Patrick R. *Manuel of clinical microbiology*, 8th ed. ASM Pres. Washington DC. Clinicalogy microbiol, 2003;1:3.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). *Methods for Dilution Antimicrobial Disk Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically.* Approved Standard. Wayne, Pennsylvania. 6. baskı. NCCLS, 2003;1:6-4.

Neeling AJ, van den Broek MJ, Spalburg EC, van Santen-Verheuvél MG, Dam-Deisz WD, Boshuizen HC ve ark. Veterinary Microbiology; 2007;122:366-72.

National Nosocomial Infections Surveillance System (NNIS). NNSI System Report, data summary from January 1992 through June 2004. American Journal Infection Control, 2004;32:470-485.

Nolte FS, Caliendo AM. *Molecular detection and identification of microorganisms.* In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. Manual of Clin Microbiol, 8th Ed. Washington DC. ASM, 2003;234-256.

Nouwen JL, van Belkum A, Verbrugh HA. *Determinants of Staphylococcus aureus nasal carriage.* Netherland Journal Medical, 2001;59:126-133.

Nunes SF, Bexiga R, Cavaco LM, Vilela CL. *Technial Note: Antimicrobial Susceptibility of Portuguese Isolates of Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis in Subclinical Bovine Mastitis.* Journal Dairy Science, 2007;90:3242-46.

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

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

Oliveira DC, de Lencastre H. *Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2002;46, 2155-61.

Oliveira DC, Milheiriço C, Lencastre H. *Redefining a Structural Variant of Staphylococcal Cassette Chromosome mec, SCCmec Type VI.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, October, 2006;10:3457-59.

O'Rourke K. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: an emerging problem in horses?* Journal American Veterinary Medical Assocation, 2003;223:1399-01.

Özkalp B, Baybek H. *Klinik örneklerden izole edilen S.aureus suşlarının çeşitli antibiyotiklere in vitro duyarlılıkları.* Genel Tıp Dergisi, 2003;13 :65-8

Öztürk R, Midilli K, Ergin S, Aygün G. *Cerrahpaşa Tıp Fakültesinde yatan hastalardan izole edilen stafilocokların antimikrobik maddelere duyarlılığı.* ANKEM Dergisi, 1996;10:48-51.

Pak SI, Han HR, Akira S. *Characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from dogs in Korea.* Journal of Veterinary Medical Science, 1999;61:1013-18.

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

Pierre J, Williamson R, Bornet M, & Gutmann, L. *Presence of an additional penicillin-binding protein in methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus haemolyticus, Staphylococcus hominis, and Staphylococcus simulans with a low affinity for methicillin, cephalothin, and cefamandole.* Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 1990;34:1691–94.

Ploy M, Grelaud C, Martin C. *First clinical isolate of vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus in a French hospital.* Lancet, 1998;351:1180-12.

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

Proctor RA, Peters G. *Small colony variants in staphylococcal infections: diagnostic and therapeutic implications.* Clinical Infectious Disases, 1998;27:419-23.

Qi W, Ender M, O'Brien F, Imhof A, Ruef C, McCallum N ve ark. *Molecular epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Zurich, Switzerland (2003): prevalence of type IV SCCmec and a new SCCmec element associated with isolates from intravenous drug users.* Journal of Clinical Microbiology, 2005;43:5164–70.

Quinn PJ, Carter ME, Markey BK, Cartey GR. *Bacteriology, Staphylococcus species.* Clinical Veterinary Microbiology. Section; London, England, 1998;118–126.

Rantakokko-Jalava K, Nikkari S, Jalava J. *Direct Amplification of RNA Genes in Diagnosis of Bacterial Infections.* Journal of Clinical Microbiology, 2000;38: 32–9.

Rice LB, Sahm D, Bonomo RA. *Mechanism of resistance to antimicrobial agents.* In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover MC. Ed. Manual of Clinical Microbiology 8. baskı; Washington DC, 2003;1074-01.

Rich M, Roberts L. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates from companion animals.* Veterinary Receviews, 2004;154:310.

Rich M, Roberts L, Kearns AM. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates from companion animals.* Veterinary Microbiology, 2005;105: 313–4.

Roberson JR, Fox LK, Hancock DD, Gay CC, Besser TE. *Sources of intramammary infections from Staphylococcus aureus in dairy heifers at first parturition.* Journal of Dairy Science, 1998;81:687-93.

Ruppé E, Barbier F, Mesli Y, Maiga A, Cojocar R, Benkhalfat M, Benchouk S, Hassaine H, Maiga I, Diallo A, Koumaré AK, Ouattara K, Soumaré S, Jean-Baptiste. *Diversity of Staphylococcal Cassette Chromosome mec structures in methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus haemolyticus strains among outpatients from four countries.* Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2009;53:442-49.

Ryffel C, Kayser FH, Berger-Bachi B. *Correlation between regulation of mecA transcription and expression of methicillin-resistance in staphylococci.* Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 1992;36:25-31-37.

Said-Salim B, Mathema B, Kreiswirth BN. *Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus: an emerging pathogen.* Infection Control Hospital Epidemiology, 2003;24:451-5.

Sakarya S. *Sefalosporinler.* In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2008;278-88.

Sancak B. *Staphylococcus aureus'ta metisilin ve vankomisin direnci.* Hacettepe Tıp Dergisi, 2007;38:127-134.

Sghir A, Antonopoulos D, Mackie RI. *Prevalence of bovine mastitis amongst small holder dairy herds in Kenya.* Israel Journal of Veterinary Medicine, 2004;59:1-6.

Sheagren JN, Schaberg DR. *Staphylococci in:* Gorbach SL, Barlett JG, Blacklow NR, 2. Infectious Diseases Philadelphia W.B. Saunders Company, 1998;1697-703.

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

Shopsin B, Kreiswirth BN. *Molecular epidemiology of methicillin resistant Staphylococcus aureus.* Emerging Infectious Disease, 2001;7:323-26.

Shore A, Rossney AS, Keane CT, Enright MC, Coleman DC. *Seven novel variants of the staphylococcal chromosomal cassette mec in methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates from Ireland.* Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2005;49:2070–83.

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

Skov R, Smyth R, Clausen M. *Evaluation of a cefoxitin 30 microg disc on Iso-Sensitest agar for detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2003;52:204-7.

Stephens AJ, Huygens F ve Giffard PM. *Systematic derivation of marker sets for staphylococcal cassette chromosome mec typing.* Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2007;51:2954–64.

Stoakes L, Reyes R, Daniel J ve ark. *Prospective comparison of a new chromogenic medium, MRSA Select, to CHROMagar MRSA and mannitol-salt medium supplemented with oxacillin or cefoxitin for detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* Journal of Clinical Microbiology, 2006;44:637-9.

Swenson JM, Fred CT, and the Cefoxitin Disk Study Group. *Results of disk diffusion testing with cefoxitin correlate with presence of mecA in Staphylococcus spp.* Journal of Clinical Microbiology, 2005;43:3818–23.

Swenson JM, Tenover FC. Cefoxitin Disk Study Group. *Results of disk diffusion testing with cefoxitin correlate with presence of mecA in Staphylococcus spp.* Journal of Clinical Microbiology, 2005;43:3818-23.

Şardan YÇ. *Metisilin dirençli Staphylococcus aureus infeksiyonlarının epidemiyolojisi ve kontrolü.* Hastane İnfeksiyonları Dergisi, 2000;4:205-07.

Takano T, Higuchi W, Otsuka T, Baranovich T, Enany S, Saito K, Isobe H, Dohmae S, Ozaki K, Takano M, Iwao Y, Shibuya M, Okubo T, Yabe S, Shi D, Reva I, Teng LJ ve Yamamoto T. *Novel characteristics of community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains belonging to multilocus sequence type 59 in Taiwan.* Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2008;52:837–45.

Tang YW, Waddington MG, Smith DH, Manahan JM, Kohner PC, Highsmith LM ve ark. *Comparison of protein A gene sequencing with pulsed-field gel electrophoresis and epidemiologic data for molecular typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* Journal of Clinical Microbiology, 2000;38:1347–51

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

Tel OY, Keskin O, Zonturlu KA, Kaya NBA. *Subclinical mastitis prevalence and determination of the antibiotics susceptibility in Şanlıurfa region.* FÜ Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi, 2009;23,101-06.

Telli M, Sümerkan B, Eşel D. *Staphylococcus aureus'ta metisilin direncinin belirlenmesinde sefoksitin disk, oksasilin disk, oksasilin agar tarama ve PB2a lateks testlerinin karşılaştırılması.* İnfeksiyon Dergisi, 2006;20: 93–6.

Tiemersma EW, Bronzwaer SL, Lyytikainen O, Degener JE, Schrijnemakers P, Bruinsma N, Monen J, Witte W, Grundman H. *European Antimicrobial Resistance Surveillance System Participants: Methicillin-resistant S.aureus in Europe, 1999-2002.* Emerging Infectious Diseases, 2004;10:1627-34.

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

Todar K. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* Erişim Adresi: <http://textbookbacteriology.com>. Erişim Tarihi: 14.04.2010.

Todar K (2005) *Staphylococcus* *Todar's Online Textbook of Bacteriology.* Erişim adresi; <http://textbookofbacteriology.net/staph.html>. Erişim Tarihi: 10.04.2008.

Töreci K, Gürler N, Çalangu S, Sarpel C, Eraksoy N, Özsüt H, Çetin ET. *Methicillin resistance in Staphylococcus aureus strains isolated in İstanbul,* ANKEM Dergisi, 1988;2:265-71.

Turnidge JD, Ferraro MJ, Jorgensen JH. *Susceptibility testing methods: General considerations.* In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. *Manual of Clinical Microbiology.* 8. baskı, Washington DC: ASM Pres, 2003;1102-07.

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

Tünger A. *Staphylococcus aureus. Mikrobiyoloji, patogenezi ve epidemiyoloji.* In: Ulusoy S, Usluer G, Ünal S. *Gram-Pozitif Bakteri Enfeksiyonları.* Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 2004;9-68.

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

Türkyılmaz S, Tekbıyık S, Oryasin E, Bozdoğan B. *Molecular Epidemiology and Antimicrobial Resistance Mechanisms of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Isolated from Bovine Milk.* Zoonoses Public Health, 2010;57:197–203.

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

Türütoğlu H, Ateşoğlu A, Salihoğlu H, Öztürk M. *Marmara Bölgesi süt ineklerinde mastitise neden olan aerobik etkenler.* Pendik Veteriner Mikrobiyolojisi, 1995;26:125-37.

Türütöglu H, Erçelik S, Öztürk D. Antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci isolated from bovine mastitis. *Bull. Veterinary Institute Pulawy, Ulusal Veteriner Kongresi, Antalya*, 2006;142-3.

Trülsch K, Grabein B, Schumann P. *Staphylococcus pettenkoferri* sp. nov., coagulase negative staphylococcal species isolated from human clinical specimens. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 2007;57:1543-48.

Uçan US, Aslan E. İnek mastitislerinden izole edilen koagülaz pozitif stafilocok suşlarının penisilin direnci ve bazı antibiyotiklere duyarlılıkları. *Veteriner Bilimleri Dergisi*, 2002;18:19-22.

Usluer G. Oksazolidinonlar. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2008;337-41.

Ünal N, İstanbulluoğlu E. İnsan ve sığır kökenli *Staphylococcus aureus* izolatlarının fenotipik ve genotipik özelliklerinin araştırılması. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2009;56:119-26.

Ünal N, Yıldırım M. İneklerin süt, meme başı derisi ve burun mukozalarından izole edilen stafilocok türlerinin antibiyotik direnç profilleri. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2020;16:389-96.

Ünal S. *Staphylococcus aureus*, Direnç Mekanizmaları. In: Ulusoy S, Usluer G, Ünal S. Grampozitif bakteri enfeksiyonları. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 2004;23-38.

Ünal S. Toplumda kazanılmış metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*. *Genetik Özellikler. Ankem Dergisi*, 2006;20:100-1.

Ünal S. MRSA Problemi, ANKEM Dergisi, 2009;23:1-12.

Ünlü G, Ünlü M. Yara örneklerinden soyutlanan *Staphylococcus aureus* kökenlerinin glikopeptid antibiyotiklere duyarlılığı. *İnfeksiyon Dergisi*, 2001;201:15:239.

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

Weese JS, Archambault M, Willey BM, Dick H, Hearn P, Kreiswirth BN ve ark. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses and horse personnel, 2000-2002. *Emerging Infectious Diseases*, 2005;11:430-35.

Weese JS, Rousseau J, Willey BM, Archambault M, McGeer A, Low DE. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses at a veterinary teaching hospital: frequency, characterization, and association with clinical disease. *Journal Veterinary Internal Medicine*, 2005;20:182-86.

Weese JS, Caldwell F, Willey BM, Kreiswirth BN, McGeer A, Rousseau J. An outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infections resulting from horse to human transmission in a veterinary hospital. *Veterinary Microbiology* 2006;16:160-64.

Velasco D, del Mar Tomas M, Cartelle M ve ark. *Evaluation of different methods for detecting methicillin (oxacillin) resistance in Staphylococcus aureus.* Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2005;55:379-82.

Wilailuckana C, Tribuddharat C, Tiensasitorn C. *Dicriminatory powers of molecular typing techniques for methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a university hospital, Thailan,* South East Asian Journal Trop Medical Public Health, 2006;37:327-34.

Wiley BM, Kreiswirth BN, McGeer A, Rousseau J ve ark. *An outbreak of methicillin-resistant Staphylococcus aureus skin infections resulting from horse to human transmission in a veterinary hospital.* Veterinary Microbiology, 2006;114:160-64.

Witte W, Cuny C, Klare I, Nübel U, Strommenger B. *Emergence and spread of antibiotic resistant Gram positive bacterial pathogens,* International Journal Medival Microbiology. Erişim Adresi:(www.sciencedirect.com). Erişim tarihi: 10.06.2010.

Woo PC, Leung AS, Leung KW, Yuen KY. *Identification of slide coagulase pozitive, tube coagulase negative Staphylococcus aureus by 16S ribosomal RNA gene Sequencing.* Molecular Pathology, 2001;54:244-7.

Wulf MW, van Nesn A, Eikelenboom-Boskamp A, de Vries J, Melchers W, Klaassen C, Voss A. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in veterinary doctors and students, the Netherlands.* Emerging Infectious Disases, 2006;12:1939-41.

Wulf MW, Sørnum M, van Nes A, Skov R, Melchers WJ G, Klaassen CHW, Voss A. *Prevalance of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Veterinarians: an international study.* Clinical Microbial Infection, 2008;14: 29-4.

Vainio A, Karde´n-Lilja M, Ibrahim S, Kerttula AM, Salmenlinna S, Virolainen A ve ark. *Clonality of epidemic methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains in Finland as defined by several molecular methods.* European Journal of Clinical Microbiology Infectious Disases, 2008;27:545-55.

Van Hal SJ, Stark D, Lockwood B, Marriott D, Harkness J. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) detection: comparison of two molecular methods (IDI-MRSA PCR assay and GenoType MRSA Direct PCR assay) with three selective MRSA agars (MRSA ID, MRSASelect, and CHROMagar MRSA) for use with infection-control swabs.* Journal of Clinical Microbiolgy, 2007;45:2486-90.

Velasco D, del Mar Tomas M, Cartelle M ve ark. *Evaluation of different methods for detecting methicillin (oxacillin) resistance in Staphylococcus aureus.* Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2005;55:379-82.

VITEK 2. Product Information bioMerièux. Durham, North Carolina 27704-0969/ USA. Erişim Adresi:ht tp: / /www. bi omer i eux. Com Erişim Tarihi:28.05.2010

Von Eiff C, Becker C, Machka K, Stammer H, Peters G. *Nasal carriage as a source of Staphylococcus aureus bacteremia.* New England Journal of Medicine, 2001;344:11-16.

Voss A, Loeffen F, bakker J, Klassen C, Wulf M. *Methicillin resistant Staphylococcus aureus in pig farming.* Emerging Infectious Disases, 2005;11:1965-66.

Yaşar N, Handan K, Atahan Ç, Şengül D. *İstanbul Tıp Fakültesinde Çeşitli Örneklerden izole edilen suşlarda glikopeptid direncinin araştırılması.* Aknem Dergisi, 2004;18: 209-212.

Yıldız A. *Laktasyondaki subklinik ve klinik mastitisli sütçü ineklerde lincomycin-neomycin kombinasyonu ile meme içi tedavisi.* F.Ü. Sağlık Bilimleri Dergisi, 2003;17:65-69.

Yıldız O, Kırdar S, Gülcü, Aktepe O, Karabiber N, Öncü S, Oktun Tatman M, Özyurt M, Şener AG, Coşkun A, Çoban AY, Arslan U, Özkütük N, Bayramoğlu G, Güdücüoğlu H, Bozdoğan B. *Molecular epidemiology of 397 methicillin resistant Staphylococcus aureus isolated from 12 hospitals in Turkey.* 110. General Meeting American Society for Microbiology, San Diego, California USA, San Diego Convention Center May, 2010;23–27.

YuQ, YinQ, Zhou R, Cheng X. *Resistant antibiotic analysis of methicillin resistant Staphylococcus,* Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao, 1997;28:329-33.

Zadoks RN, Van Leeuwen WB, Kreft D, Fox LK, Barkema HW, Schukken YH, Belkum A. *Comparison of isolates from bovine and human skin, milking equipment, and bovine milk by phage typing, pulsed-field gel electrophoresis, and binary typing.* Journal of Clinical Microbiology, 2002;40:3894–02.

Zaoutis TE, Toltzis P, Chu J, Abrams T, Dul M, Kim J, McGowan KL, Coffin SE. *Clinical and molecular epidemiology of community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections among children with risk factors for health care-associated infection: 2001-2003.* Pediatr Infect Dis J, 25:343-8.

Zhang K, McClure JA, Elsayed S. *Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome mec types I to V in methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* Journal of Clinical Microbiology, 2005;43:5026-33.

Zhang K, McClure JA, Elsayed S ve Conly JM. *Novel staphylococcal cassette designated type VIII, harboring class A mec and type 4 ccr gene complexes in a Canadian epidemic strain of methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2009;53:531-40.

ÖZGEÇMİŞ

1978’de Aydın’da doğdu. İlköğretimi Aydın, lise eğitimini İzmir’de tamamladı. Akdeniz Üniversitesi Sağlık Yüksekokulun’nda başladığı üniveriste eğitimini Adnan Menderes Üniversitesi’nde tamamladı. 1997-2002 tarihleri arası Akdeniz Üniversitesi Hastanesi; reanimasyon ybü, organ transplantasyon ünitesinde çalıştı. 2001’den beri Adnan Menderes Üniversitesi Araştırma Hastanesi’nde, şuanda da Enfeksiyon Kontrol Birimi’nde çalışmaktadır. İngilizce bilmektedir.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca çalışma disiplini ve bilim aşkıyla bana örnek ve destek olan danışman hocam Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Süheyla TÜRKYILMAZ'a, çalışmalarımda desteklerini gördüğüm Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Osman KAYA ve diğer Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri'ne, sahip olduğu engin bilgi ve tecrübeleri ile Bilim ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'ndeki öğrencilere ve öğretim üyelerine daima ışık olan ADÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Bülent BOZDOĞAN'a, tezim için materyal toplamada yardımcı olan Uzm. Vet. Hek. Seyhan KAYNARCA'ya, çalışmam boyunca destekleri olan herkese ve koşulsuz yanımda olan sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim.