

## *Staphylococcus aureus*'larda metisilin direnci ve enfeksiyonlar

Volkan ÖZAVCI, Şükrü KIRKAN

Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın

Geliş Tarihi / Received: 08.05.2012, Kabul Tarihi / Accepted: 13.12.2012

**Özet:** *Staphylococcus aureus*, normal insan ve hayvan florasının bir bölümünü oluşturan gram pozitif bir bakteridir. *Staphylococcus aureus* izolatlarının en önemli habitatı insanlarda burun mukozası ve hayvanlarda deridir. *S.aureus* hayvanlarda mastitis, artrit, otitis, epidermitis ve üriner sistem enfeksiyonları gibi enfeksiyonlara neden olurken insanlarda hastane enfeksiyonları, gıda zehirlenmeleri, osteomyelitis, poliartrit, endokarditis, toksik şok sendromu, folikülitis, konjunktivitis, idrar yolları enfeksiyonları, pnömoni, haşlanmış deri sendromu (Scalded Skin Syndrome- SSS) gibi çok sayıda enfeksiyona neden olmaktadır. Hemen herkes hayatları süresince *S.aureus* enfeksiyonlarının bazı tiplerine sahip olmaktadır. *Stafilokok* enfeksiyonlarının tedavisinde *stafilokok* türleri arasındaki antibiyotiklere direnç yaygınlığı önemli bir sorundur. Yeni antibiyotiklerin klinik kullanıma girmesinden kısa bir süre sonra mikroorganizmanın direnç kazandığı, bununla birlikte penisilin çok yaygın kullanılmasının sonucunda penisilini parçalayan *stafilokok* suşlarının ortaya çıktığı da bilinmektedir. Metisilin-dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) tüm dünyada hastane enfeksiyonlarından en sık izole edilen "Çoğul antibiyotik Dirençli" mikroorganizmadır. MRSA izolatlarında çoklu direnç gün geçtikçe artmaktadır. Otuz yıldan daha uzun süre MRSA tedavisinde kullanılan vankomisine de bu günlerde direnç gelişmiştir. Derlememizde türlere göre MRSA epidemiyolojileri, MRSA virulens mekanizmaları, metisilin direnç mekanizmaları ve MRSA suşlarının tiplendirilmeleri hakkında bilgiler verilecektir.

**Anahtar kelimeler:** Metisilin direnci, moleküler tiplendirme, *Staphylococcus aureus*, virulens faktörleri.

### Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and infections

**Summary:** *Staphylococcus aureus* is a kind of gram positive bacteria, which builds a part of normal human and animal flora. The most important life space of *S.aureus* is human nasal mucosa and animal skin. *S.aureus* causes some infections like mastitis, arthritis, otitis, epidermitis and urinary system infections on animals. On the other hand, it causes many infections such as hospital infections, food poisoning, osteomyelitis, polyarthritis, endocarditis, Toxic Shock Syndrome (TSS), folliculitis, conjunctivitis, urinary infections, pneumonia, Scalded Skin Syndrome (SSS). Nearly everyone hosts some types of *S.aureus* infections throughout their lifespan. In the cure of *Staphylococcus* infections, resistance of antibiotics extence among *Staphylococcus* strains is an important problem. After a short period of starting to clinical use of new antibiotics, this microorganism gained resistance and because of the fact that peniciline is used widely too much, it is known that *Staphylococcus* strains, which can break peniciline, occured. Methicillin Resisted *Staphylococcus aureus* (MRSA) is mostly isolated from hospital infections "Multiple Resistant Antibiotic" microorganism in the whole world. Multiple resistance of MRSA isolates increases day by day. Even vancomycin which has been used in the cure of MRSA for more than 30 years gained resistance currently, too. In our composition, MRSA epidemiology, Sequencing of MRSA virulence mechanisms, methicillin resistant mechanisms and MRSA strains are going to be informed according to their species.

**Key words:** Methicillin resistance, molecular typing, *Staphylococcus aureus*, virulence factors.

### Giriş

*S.aureus* insan ve hayvanlar için önemli bir patojendir ve hem insan da hem de hayvanda deri hastalıklarından ve bakteriyemiden sorumlu olmaktadır. Stafilokoklarda penisilin direnci 1940'lı yılların ortalarında artmış, 1950'li yıllarda penisilin yanı sıra tetrasiklin, eritromisin ve streptomisin gibi diğer antibiyotiklere de direnç gelişimi gözlenmiştir. *Staphylococcus aureus* izolatlarının en önemli ha-

bitatı insanlarda burun mukozası ve hayvanlarda deri olmaktadır. Hayvanlarda mastitis, artrit, otitis, epidermitis ve üriner sistem enfeksiyonları gibi enfeksiyonlara neden olurken insanlarda hastane enfeksiyonları, gıda zehirlenmeleri, osteomyelitis, poliartrit, endokarditis, toksik şok sendromu, folikülitis, konjunktivitis, idrar yolları enfeksiyonları, pnömoni, haşlanmış deri sendromu (Scalded Skin Syndrome- SSS) gibi çok sayıda enfeksiyona neden olmaktadır (27, 39, 40).

Dirençli bakteriler arasında en patojen olanı 2005 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde 19000 insanın ölümüne neden olan MRSA türüdür. MRSA bu ölümcül özelliğini kısmen de olsa karotenoidler adıyla bilinen ve MRSA'nın bağışıklık sistemimize karşı koymak amacıyla yararlandığı bir tür kimyasala borçludur. Metisilin 1950 yılında ilk olarak insanlarda penisilin-dirençli stafilokokal enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaya başlanması ile tanındı. 1970'de methisilin dirençli *S.aureus* ABD ve diğer mevcut hastanelerde ciddi sporadik problem olarak ortaya çıkmıştır. 1990 yılında ise nazokomiyal hastalık olarak tüm dünyada ciddi bir hastalık boyutuna gelmiştir (3).

## MRSA epidemiyolojisi

### İnsanlarda MRSA epidemiyolojisi

MRSA *Staphylococcus aureus* suşları iki grupta incelenebilir: Hastahane ile ilişkili MRSA (Hospital-Associated MRSA, HCA-MRSA) suşları ve Toplumdan Edinilen MRSA (Community-acquired MRSA, CA-MRSA) suşları. HCA-MRSA cerrahi veya cerrahi dışı yaraları olanları ya da kateterize hastaları etkiler. CA-MRSA, HCA-MRSA'dan daha az sayıda antibiyotiğe dirençlidir. Bazı CA-MRSA suşları deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarına neden olabilen ve "Panton-Valentine Lökosidin" (PVL) olarak bilinen bir toksin de taşıyabilir. PVL pozitif CA-MRSA büyük ölçekli topluluklarda kolaylıkla bulaşabilir. MRSA izolatu eğer SCCmec tip IV geni içeriyorsa ve filogenetik olarak hastane kaynaklı, MRSA klonal soy ile bilinen bir bağlantısı yoksa toplumsal kaynaklı MRSA olarak nitelendirilir. SCCmec geni V. allotip'i tanımlanmış ayrıca toplum kaynaklı MRSA ile ilintili bulunmuştur (6, 20).

### Hayvanlarda MRSA epidemiyolojisi

Hayvan orjinli *S.aureus* ve Koagülaz Negatif Stafilokoklarda (KNS; *S.intermedius*, *S.felis*, *S.schleiferi*, *S.simulans*, *S.sciuri*, *S.hominis*, *S.xylopus*, *S.haemolyticus*, *S.epidermidis* ve *S.saprophyticus*) mecA geni ve metisilin dirençliliği belirlenmiştir (13, 24).

### 1. Kedi ve köpeklerde MRSA epidemiyolojisi

Çoğu araştırma göstermiştir ki köpeklerden ve kedilerden izole edilen en yaygın koagülaz-pozitif stafilokok türü *S.intermedius*'tur (28, 32). *S.aureus*

sağlıklı köpek tüylerinde kolayca kolonize olabilen bir etkidir (9).

### 2. Atlarda MRSA epidemiyolojisi

Bir yaş altı atlarda endemik olarak MRSA taşıyıcılığı bulunabilmekte ve bu hayvanların ülke içi ya da ülkeler arası sevkiyatlarında rezervuar olması kaygı verici olarak ifade edilmektedir. Kanada Veteriner Araştırma Hastanesi at kliniklerinde üç yılı kapsayan bir çalışma başlatılmış; 2002 yılında 17, 2003 de 10 ve 2004 de 36 atta MRSA kolonizasyonu tespit edilmiştir. At izolatu olan CMRSA'ların (Kanada Epidemik MRSA) moleküler tiplendirilmesine yönelik farklı bir çalışmada ise 79 MRSA'nın 75.i tiplendirilmiş bunlardan 72 sinin CMRSA-5/SCC mecA-IV. Tip olduğu ve bu türün toplum kökenli MRSA tipleri arasında yer aldığı bildirilmiştir (42).

### 3. Domuzlarda MRSA epidemiyolojisi

Hollanda'da 9 farklı domuz kesimhanesinde 540 sağlıklı domuzun burun mukozasından kesim öncesi sürüntü numunesi alınmış ve örneklerin 209'unda (%39)'unda MRSA tespit etmişlerdir (33).

### 4. Büyük ve küçükbaş hayvanlarda MRSA epidemiyolojisi

1997-2004 tarihlerinde Kore'de 153 farklı çiftlikte, 3047 mastitisli inek sütünden 835 *S.aureus* ve 763 koagülaz-negatif *stafilokok* (KNS) izole edilmiştir. Bu izolatlardan metisilin dirençliliği araştırıldığında 21 (%2,5) *S.aureus* ve 19 (%2,4) KNS'de dirençlilik tespit edilmiştir. 2001 yılında 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 sürülerinden 5 MRSA izolasyonu yapılmıştır (22). Portekiz'de, sublinik mastitisli ineklerden izole edilen 9 *S.epidermidis* suşunda metisilin dirençliliği belirlenmiştir (34). Ülkemizde ise sığırlarda yapılan bir çalışmada, mastitisli süt örneklerinden 2 MRSA ve 1 MRKNS suşu izole edilmiştir (25).

### MRSA virulans mekanizması

Kollajen bağlayan protein ve fibronektin bağlayan protein yapıları, *S.aureus*'un virulansını etkileyen faktörlerdir (36). *S.aureus*'un salgıladığı protein-A, Ig G nin Fc kısmına bağlanarak kompleman sistemini bloke eder ve nötrofilleri parçalayan lökosidin adlı maddeyi de salgılar. Ayrıca *S.aureus*, inflammas-

yonu tetikleyerek hem PG-E2 üzerinden T lenfositlerinin çoğalmasını engeller, hem de ortama gelen nötrofillerin ve monositlerin içine girerek yaşamına bu şekilde devam edebilir. Makrofajların içinde mikroorganizmaların yok edildiği fagolizozom yapılarına değil daha korunaklı olan makropinozom yapılarının içine girer. Başka bir deyişle içinde yaşayabileceği konak hücrelerini, inflamasyon oluşturup önce kendi üzerine çeker daha sonra içlerine girerek kendini vücudun savunma mekanizmalarından korur. Bu şekilde kronik enfeksiyonların da temelini atmış olmaktadır. Her organizmada yüzey moleküllerini kodlayan birer gen yapısı vardır (ica, cna, map genleri) ve mikroorganizmaların her birinde farklı olabilen bu gen yapıları virülansı tayin eden en önemli faktörlerdendir. Bir başka deyişle enfeksiyondan sorumlu olan mikroorganizmanın genetik koduna göre tedaviden elde edeceğimiz başarı da değişmektedir. Farklı mutantlar farklı tedavilere farklı yanıtlar verecektir. Örneğin *S.epidermidis*'in ica gen mutasyonu sonrası virülansı azalır ve daha kolay eradike edilebilen enfeksiyonlar oluşturur. Ayrıca stafilokokların yüzeyinde Yapışkan Matriks Moleküllerini Tanıyan Mikrobik Yüzey Bileşenleri (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules, (MSCRAMM) denen bir grup protein, bu sümüksü yapısı ile sıkı bir bağlantı kurar ve glikokaliks (biofilm) oluşur. Bu bağlantıda teikoik asit yapısının da rolü büyüktür (18). Biyofilm tabakasının ana maddesi N-asetil glukozamindir ve iki farklı polisakkarit yapısı oluşturur. Tip 2 polisakkarit yapısı hücreler arası agregasyondan sorumlu olup diğer ismi polisakkarit interselüler adezindir (PIA). Bu yapı, hidrofilik yüzeylere fizikokimyasal başlarla tutunma özelliğine sahip olan komponenttir. *Stafilokok* enfeksiyonlarında adı geçen bu moleküllerin bilinmesi, tedavide yeni modaliteler geliştirilmesi açısından önemlidir. Çünkü bu yapılar pürifiye edilmiş halleri ile canlılara injekte edildiği zaman koruyucu bağışıklık sağlayabilirler (*Stafilokok* aşısı) (31).

## Stafilokoklarda metisilin direnç mekanizmaları

### Penisilin bağlayıcı protein (pbp2a) sentezi nedeniyle oluşan direnç

MRSA suşlarında metisiline hassas *stafilokok* (MSS) suşlarından farklı olarak ek bir PBP vardır ve PBP2a olarak adlandırılmaktadır. PBP2a, 2

kb'lik DNA segmentine lokalize bir gen olan *mecA* geni tarafından kodlanmaktadır ve beta-laktam antibiyotiklere afinitesi diğer PBP'lerden daha düşüktür. *mecA* geni regülasyonunu sağlayan *mecI* (represör gen) ve *mecRI* (sinyal dönüştürücü gen) genleriyle beraber stafilokokal kaset kromozomu (staphylococcal cassette chromosome-SCC) ismi verilen genetik yapının üzerinde taşınır. *mecRI* ve *mecI*'nin plazmid aracılı stafilokokal beta-laktamaz geni olan *blaZ*'nin ekspresyonunda rolü olan *blaR1* ve *blaI* ile protein sekans homolojisi yüksektir. Bu da *mecA*'nın regülatör genlerini, *blaZ* sisteminden aldığını düşündürmektedir (17, 41). SCC; *Stafilokok* türleri arasında genetik madde alışverişine aracılık eden hareketli bir elemandır (8, 15, 17). SCC*mec*, *mec* gen kompleksi (*mecA* ve regüle edici genler) ve *ccr* kompleksinden oluşmuştur. *mec* gen kompleksi metisilin direncinden sorumludur (15, 21). SCC*mec* kasetinde ikinci ana genetik yapı olan *ccr* gen kompleksi kasetin bakteriyel genoma integrasyonu ve ekzisionundan sorumludur. Bunlar invertaz/rezolvaz ailesinden *ccrA*, *ccrB* ve yeni tanımlanan *ccrC* olmak üzere üç farklı rekombinaz kodlayan genlerdir (15, 44). Günümüze kadar SCC*mec*'in 5 farklı tipi tanımlanmıştır. Tip I, tip II ve tip III Ito ve ark. (19) tarafından, tip IV Ma ve ark. (29) tarafından ve tip V yine Ito ve ark. (20) tarafından tarif edilmiştir.

**SCC*mec* Tip I;** Sınıf B *mec* gen kompleksi ve tip I *ccr* gen kompleksinden oluşmaktadır. Metisilin ve ağır metaller dışındaki ilaçlara karşı direnç geni taşımamaktadır (19).

**SCC*mec* Tip II;** Sınıf A *mec* gen kompleksi ve tip II *ccr* kompleksinden oluşmaktadır. Sınıf B *mec* klindamisin ve streptogramin B'ye karşı dirençten, pUB110 ise aminoglikozidlere karşı dirençten sorumludur (19).

**SCC*mec* Tip III;** Sınıf A *mec* gen kompleksi ve tip III *ccr* gen kompleksinden oluşmaktadır.  $\Psi$ Tn554 kadmiyuma karşı dirençten, pT181 tetrasiklin ve civaya karşı dirençten sorumludur (19).

**SCC*mec* Tip IV;** Sınıf B *mec* gen kompleksi ve tip 2 *ccr* gen kompleksinden oluşmaktadır. Bu yapı küçük olup *mecA* dışında direnç geni taşımaz (29, 44). SCC*mec* Tip V ; Sınıf C *mec* gen kompleksi ile *ccrC* içermektedir. Sadece metisilin direnci kodlayan genlere sahiptir (20, 44). SCC*mec* tiplerinden, Tip I, II ve III genellikle hastane kökenli, Tip IV ve V ise toplum kökenli MRSA izolatlarında bulunmaktadır (12).

Stafilokoklarda metisilin direnci fenotipik olarak iki farklı biçimde karşımıza çıkabilmektedir:

**a- Homojen direnç:** Bakteri kolonisini oluşturan tüm bakteriler mecA genini taşırlar ve hepsinde mecA geni fonksiyoneldir (8, 14, 41).

**b- Heterojen direnç:** Klinik uygulamada daha sık görülen ancak tespiti güç olan direnç türüdür. Bu direnç türünde, mecA geni taşımalarına rağmen, 104 yada 108 bakteriden birinde direncin olması durumu görülmektedir (4, 6, 31).

### **Yüksek miktarda beta laktamaz salgılanmasıyla oluşan direnç**

Tüm beta-laktam antibiyotiklere karşı gelişen direncin temel nedeni kromozomal mecA geninin kodladığı PBP2a olarak adlandırılan yeni bir PBP'dir. PBP'lerdeki bu değişiklik tüm betalaktamlara çapraz dirençten sorumludur. PBP'nin beta-laktam antibiyotiklerine afinitesi diğer PBP'lerden daha düşüktür (41).

### **PBP'lerde beta laktam antibiyotik afinitesinde azalma ile oluşan direnç**

Son yıllarda mecA geni taşımadıkları halde metisiline dirençli stafilokoklar incelendiğinde, bu bakterilerin mevcut PBP'lerinin beta laktam antibiyotiklere düşük afinite gösterdikleri saptanmıştır. Ayrıca mecA negatif olmasına rağmen oksasilin MİK değerleri 8-16 mg/L civarında olan suşlar bulunabilmektedir. Bunların bir kısmı beta-laktamazın aşırı üretiminden [Borderline resistant *S.aureus* (BORSA)], bir kısmı da var olan PBP'lerdeki (özellikle PBP2 ve PBP4) nokta mutasyonlarından [Moderately resistant *S.aureus* (MODSA)] veya PBP4'ün (düşük molekül ağırlıklı PBP) aşırı sentezinden kaynaklanabilir (35, 41).

### **Metisilin direncini etkileyen internal faktörler**

#### **1. Belirli uzunluktaki glikan zincirleri**

PBP2a, PBP2'nin transglikozilaz aktivitesine bağlıdır. Beta laktamlar yüksek molekül ağırlıklı PBP'lerin transpeptidaz "domain"ini inhibe ederken, transglikozilaz "domain"ine bir etki göstermezler (39).

#### **2. Normal peptid konfigürasyonu için gerekli kök peptidler**

UDP-N-asetil tripeptid sentatazi kodlayan gen olan murE (femF)'nin inaktivasyonu sonucunda da me-

tisilin direncinde azalma olur. Nedeni hücre duvarı öncülleri havuzundaki UDP-bağlı muramil pentapeptidlerin azalması ve UDP-bağlı muramil dipeptidlerin birikmesidir (41).

### **3. Intakt olmak için gerekli pentaglisin çapraz köprüleri**

Glikan zincirlerini birbirine bağlayan pentaglisin çapraz köprülerinin yapımından femA, femB ve femX sorumludur. FemX birinci glisini, femA ikinci ve üçüncü glisinleri ve femB de dördüncü ve beşinci glisinleri köprüye sokar (41).

### **4. Metisilin direncini etkileyen eksternal faktörler**

Tuz konsantrasyonu, pH, ozmolarite ve ortam ısısı metisilin direncini etkileyen eksternal faktörlerdendir (41).

### **MRSA suşlarının tiplendirilmesi**

#### **Pulsed-field jel elektroforezi (PFGE)**

Pulsed-field jel elektroforezis (PFGE), *S.aureus* ve diğer birçok patojen bakterilerin genetik farklılıklarını araştırmak için moleküler epidemiyolojide kullanılan önemli bir genetik tiplendirme metodudur. Sıvı veya katı besiyerinde üretilen bakteriler, düşük erime ısılı agaroz karıştırılıp küçük kalıplar içine dökülmektedir. Agaroz içine karıştırılan bakteri hücreleri, deterjan ve enzim yardımıyla parçalanarak (in situ-lysis) DNA izolasyonu yapılmaktadır. Liziz işlemini takiben agaroz kalıpları iyice yıkanarak veya diyalize edilerek protein ve karbon hidrat gibi kontaminantların uzaklaştırılması sağlanır. Büyük olan kromozomal DNA agaroz jel içinde tutulu kalır. Agaroz içindeki bakteriyel DNA, nispeten az sayıda ve büyük parçalar oluşturan bir restriksiyon enzimi (RE) ile kesime uğratılmaktadır (in situ-digestion). Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile genomun kesilmesinden sonra agaroz jel elektroforez yöntemi ile ayırma işlemi gerçekleştirilir. Meydana gelen fragmentlerin konvansiyonel elektroforez sistemlerle ayrılması çok zordur. PFGE sistemlerinde bu fragmentleri ayırmak mümkün olabilmektedir. Sistemlerde başlangıç vuruşları kısadır ve elektroforez devam ettiği sürece artar. Bant paternleri bir görüntüleme sistemi aracılığı ile değerlendirilir. Counter clamped homogenous electric field electrophoresis (CHEF), PFGE'nin dünyada en yaygın kullanılan modelidir (4).

### SCCmec tiplendirme

Son 10 yıl içinde, metisilin direncinin, metisiline duyarlı *S.aureus* (MSSA) suşlarının “Stafilokokal kaset kromozom (Staphylococcal Cassette Chromosome)” mec (SCCmec) adlı genetik elemanı edinmeleri ile geliştiği ortaya çıkarılmıştır. Gerçekte SCC'ler, *stafilokok* türleri arasında bir genetik aktarım aracı olan genomik bir adadır. SCCmec ise, metisilin direnci taşıyan özel bir SCC tipidir (23). Günümüze kadar sekiz farklı SCCmec tipi tanımlanmıştır. Tip I, Tip II, Tip III, Tip IV, Tip V, Tip VI, Tip VII ve Tip VIII SSCmec, sırasıyla sınıf B mec ve tip 1 ccr, sınıf A mec ve tip 2 ccr, sınıf A mec ve tip 3 ccr, sınıf B mec ve tip 2 ccr, sınıf C2 mec ve tip 5 ccr, sınıf B mec ve tip 4 ccr, sınıf C1 mec ve tip 5 ccr, sınıf A mec ve tip 4 ccr gen komplekslerinden oluşmaktadır (10).

### Multilokus dizi tiplendirme (multilocus sequence typing, MLST)

MLST, temel metabolik fonksiyonu kodlayan “housekeeping” genlerdeki değişikliğin DNA dizi analizi ile gösterilmesidir. Yedi “housekeeping” genin yaklaşık 450-500 baz çiftlik fragmentlerinin dizi analizi çıkarılmaktadır. Hedef gene ait her bir lokus için, her farklı dizilim farklı bir allel numarası ile gösterilmekte ve böylece suşa ait bir allelik profil tanımlanmaktadır. MLST çok fazla avantaja sahip olmasına rağmen çeşitli zorluklara da sahiptir. Bu zorlukların basında 7 allel üzerinde çok düşük hata oranına sahip dizi analizi yapma zorunluluğu gelmektedir. Çoğu laboratuvar için bunları sağlayabilmek oldukça pahalı ve zaman alan bir süreçtir (1, 30).

### Spa dizi tiplendirme

Spa Dizi Tiplendirme yöntemi, Protein A geninin kısa tekrar bölgesi [short sequece repeat (SSR)] veya polimorfik X bölgesinin dizi analizine dayanmaktadır (26, 38). Polimorfik X bölgesi değişken 24 baz çiftlik tekrarları içermektedir ve C terminal hücre duvarı bağlanma dizisinin kodladığı bölgeye yerleşmektedir (37). SSR bölgesinin çeşitliliği, tekrarlayan dizilerin duplikasyonu ve delesyonu ile ortaya çıkmaktadır (7). spa SSR bölgesinin dizi analizi, MLST yöntemindeki birçok avantajın kombinasyonudur. Fakat spa tiplemesinin tek lokusu içermesinden beri hastane salgın araştırmalarında daha hızlı ve pratik olmuştur (16).

MRSA suşlarının tiplendirilmesinde PFGE, yüksek frekanslı restriksiyon endonükleaz enzimleri tarafından çoğaltılan kromozomal DNA kıyaslaması için imkan sağlamaktadır (43). Teorik olarak her bakteri PFGE ile tiplendirilebilir ve elde edilen sonuçlar tekrarlanabilir özelliktedir (2).

Günümüzde FIGE (field-inversion gel electrophoresis) ve CHEF (contour-clamped homogeneous electric field) gibi PFGE’i içeren birçok teknik MRSA suşlarının tiplendirilmesinde kullanılmaktadır. FIGE daha basit ve daha ucuz bir tekniktir ve 0.1’den 200 Kb. arasındaki fragmentlerin ayrımı için en iyi yöntem olarak görülmektedir. Bu sistemde forward ve reverse yönler arasında elektriksel alan basitçe artırılmakta ve başlangıç elektriksel uyarım, reverse uyarım müddetince üç kez tekrarlanmaktadır. CHEF, 3Mb ve üzeri fragment seperasyonu için en iyi yöntemdir ve 120o açıda üniform elektrik alanı oluşturmak için hegzagonal elektrot düzeni içermektedir. Bu yolla, fragmentler düz bir hat üzerinde küçük oranlarda sapmayla ya da hiç sapma göstermeden hareket etmektedirler (5).

Multilokus sekans tiplendirme tekniği (MLST) seçici olarak boyanabilen proteinlerin elektroforezisini kapsayan fenotipik tiplendirme tekniği olan Multilokus enzim elektroforezis (MLEE) tekniğinden türetilmiştir. *Staphylococcus aureus* için kullanılan MLST tekniği, Enright ve ark.’larının kullandığı PFGE ile onaylanmıştır (11).

Moleküler tiplendirme teknikleri, MRSA epidemilerinin tanısında önemli bir yer tutmaktadır ve MRSA salgınlarında özellikle tercih edilen yöntemler olmalıdırlar.

### Sonuç

İnsan ve hayvan sağlığında önemli bir patojen olarak yerini alan MRSA hem insan da hem de hayvan da deri hastalıklarından ve hayati tehlike oluşturan bakteriyemiden sorumlu olmaktadır. *Stafilokok* enfeksiyonlarının tedavisinde *stafilokok* türleri arasındaki direnç yaygınlığı önemli bir sorundur. Yeni antibiyotiklerin klinik kullanıma girmesinden kısa bir süre sonra mikroorganizmanın direnç kazandığı bununla birlikte penisilinin çok yaygın kullanılmasının sonucunda penisilini parçalayan *stafilokok* suşlarının ortaya çıktığı da bilinmektedir. Bu durum MRSA enfeksiyonların tedavisinde antibiyotik seçiminin direnç durumuna göre belirlenmesinin öne-

mini ortaya koymaktadır. Hastalıkların teşhisinde antibiyogram testlerinin uygulanması, moleküler bazlı tiplendirme metodlarının kullanılması, doğru ve etkili ilaç seçimi, direnç artışının önlenmesi ve tedavi şansının yüksek tutulması bakımından oldukça fayda sağlamaktadır.

## Kaynaklar

1. **Aanensen DM, Spratt BG**, (2005). *The multilocus sequence typing network: mlst.net*. Nucleic Acids. Res. 33: 728-733.
2. **Arbeit RD**, (1999). *Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms*. In: Murray PM, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. eds. Manual of clinical microbiology. Washington. ASM Press.
3. **Ayliffe GA**, (1997). *The progressive intercontinental spread of methicillin resistant Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis. 24, 74-79.
4. **Birren Bruce, Lai Eric**, (1993). *Pulsed Field Gel Electrophoresis: A practical guide*. San Diego, California: Academic Press Inc.
5. **Birren BW, Lai E**, (1993). *Pulsed field gel electrophoresis: a practical guide*. San Diego. Academic Press.
6. **Boyle Vavra S, Ereshefsky B, Wang CC**, (2005). *Successful multiresistant community associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus lineage from Taipei, Taiwan, that carries either the novel staphylococcal chromosome cassette mec (SCCmec) type V-T or SCCmec type IV*. J Clin Microbiol. 43, 4719-4730.
7. **Brigido MDM, Barardi CR, Bonjardin CA**, (1991). *Nucleotide sequence of a variant Protein A of Staphylococcus aureus suggests molecular heterogeneity among strains*. J Basic Microbiol. 31, 337-345.
8. **Chambers HF**, (1997). *Methicillin resistance in staphylococci: molecular and bio chemical basis and clinical implications*. Clin Microbiol Rev. 10,781-91.
9. **Cox HU, Newman SS, Roy AF**, (1984). *Species of Staphylococcus isolated from animals infections*. Cornell Veterinarian. 74, 124-135.
10. **Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE**, (2007). *The molecular evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect. 13, 222-235.
11. **Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SC, Spratt BG**, (2000). *Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 38, 1008-1015.
12. **François P, Renzi G, Pittet D**, (2004). *A novel multiplex real-time PCR assay for rapid typing of major staphylococcal cassette chromosome mec elements*. J Clin Microbiol. 42, 3309-3312.
13. **Gortel K, Campbell KL, Kakoma I**, (1999). *Methicillin resistance among staphylococci isolated from dogs*. Am J Vet Res. 60, 1526-1530.
14. **Gür D, Topçu AW, Söyletir G**, (2008). *Bakterilerde antibiyotiklere karşı direnç infeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi*. İstanbul Nobel Tıp Kitapevleri, s. 243-257.
15. **Hanssen AM, Ericson Sollid JU**, (2006). *SCCmec in staphylococci: genes on the move*. FEMS Immunol Med Microbiol. 46, 8-20.
16. **Harmsen D, Claus H, Witte W**, (2003). *Typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management*. J Clin Microbiol. 41, 5442-5448.
17. **Hiramatsu K, K Okuma, X X Ma**, (2002). *New trends in Staphylococcus aureus infections: glycopeptide resistance in hospital and methicillin resistance in the community*. Curr Opin Infect Dis. 15, 407-413.
18. **Hussain FM, Boyle-Vavra S, Daum RS**, (2001). *Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus colonization in healthy children attending an outpatient pediatric clinic*. Pediatr Infect Dis J. 20,763-767.
19. **Ito T, Katayama Y, Asada K**, (2001). *Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 45, 1323-1336.
20. **Ito T, Ma XX, Takeuchi F**, (2004). *Novel type V staphylococcal cassette chromosome mec driven by a novel cassette chromosome recombinase, ccrC*. Antimicrob Agents Chemother. 48, 2637-2651.
21. **Ito T, Okuma K, Ma XX**, (2003). *Insights on antibiotic resistance of Staphylococcus aureus from its whole genome: genomic island SCC*. Drug Resist Update. 6, 41-52.
22. **Kaszanyitzky EJ, Janosi S, Egyed Z**, (2003). *Antibiotic resistance of staphylococci from humans, food and different animal species according to data of the Hungarian resistance monitoring system in 2001*. Acta Vet Hung. 51, 451-64.
23. **Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K**, (2000). *A new class of genetic element, Staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 44, 1549-1555.
24. **Kawano J, Shimizu A, Saitoh Y**, (1996). *Isolation of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from chickens*. J Clin Microbiol. 34, 2072-2077.
25. **Kireççi E, Çolak A**, (2002). *Kuru dönem başlangıcında subklinik mastitisli ineklerden izole edilen stafilocok suşlarında metisilin direnci*. Kafkas Üniv Vet Fak Derg. 8, 98-100.
26. **Kurt D Reed, Mary E Stemper, Sanjay K Shukla**, (2007). *Pulsed-field gel electrophoresis of MRSA in methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) protocols ebook MRSA protocol*. Yinduo Ji. 321,59-70.
27. **Leonard FC, Markey BK**, (2007). *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in animals: a review*. Vet. J. doi:10.1016/j.tvjl.2006.11.008.

28. Lilenbaum W, Nunes EL, Azeredo MA, (1998). Prevalence and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from the skin surface of clinically normal cats. Lett Appl Microbiol. 27, 224-28.
29. Ma XX, Ito T, Tiensasitorn C, (2002). Novel type of staphylococcal cassette chromosome mec identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. Antimicrob Agents Chemother. 46, 1147-1152.
30. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG, (1998). Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc Natl Acad Sci USA. 95, 3140-3145.
31. Maira-Litran T, Kropec A, Goldmann D, Pier GB, (2004). Biologic properties and vaccine potential of the staphylococcal poly N-acetyl glucosamine surface polysaccharide. Vaccine. 22, 872-879.
32. Medleau L, Long RE, Brown J, (1986). Frequency and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* species isolated from canine pyodermas. Am J Vet Res. 47, 229- 231.
33. Neeling AJ, Van Den Broek MJ, Spalburg EC, van Santen-Verheuevel MG, Dam-Deisz WDC, Boshuizen HC, van de Giessen AW, van Duijkeren E, Huijsdens XW, (2007). High prevalence of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. Vet Microbiol. 22, 366-372.
34. Nunes SF, Bexiga R, Cavaco LM, (2007). Technical Note: Antimicrobial Susceptibility of Portuguese Isolates of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in Subclinical Bovine Mastitis. J Dairy Sci. 90, 3242-46.
35. Peacock SJ, (2005). *Staphylococcus*. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. 10th Ed. Hodder Arnold, London, United Kingdom, p. 771-832.
36. Ryden C, Yacoub AI, Maxe I, (1989). Specific binding of bone sialoprotein to *Staphylococcus aureus* isolated from patients with osteomyelitis. Eur J Biochem. 184, 331-336.
37. Schneewind O, Model P, Fischetti VA, (1992). Sorting of Protein A to the staphylococcal cell wall. Cell. 70, 267-281.
38. Shopsis B, Gomez M, Montgomery SO, (1999). Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. J Clin Microbiol. 37, 3556-63.
39. Soll DR, Lockhart SR, Pujol C, (2003). Laboratory procedures for the epidemiological analysis of microorganism. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. Eds. In Manual of Clinical Microbiology. ASM press, Washington. p.139-161.
40. Ugur A, Ceylan Ö, (2003). Occurrence of resistance to antibiotics, metals, in clinical strains of *Staphylococcus aureus* spp. Arch Medical Res. 34, 130-136.
41. Ünal S, Ulusoy S, Usluer G, (2004). *Staphylococcus aureus* Direnç mekanizmaları. Önemli gram pozitif bakteri enfeksiyonları. Ankara Bilimsel Tıp Yayınevi. s.23-38.
42. Weese JS, Archambault M, Willey BM, Dick H, Hearn P, Kreiswirth BN, (2005). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Horses and Horse Personnel, 2000-2002. Emerg Infect Dis. 11, 430-435.
43. Weller TMA, (2000). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* typing methods: wich should be the international standard? J Hosp Infect. 44, 160-172.
44. Zhang K, McClure JA, Elsayed S, (2005). Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome mec types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 43, 5026-5033.