



METİSİLİNE DİRENÇLİ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* SUŞLARININ ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARI VE PULSED FIELD JEL ELEKTROFOREZ YÖNTEMİ İLE TIPLENDİRİLMELERİ

TYPING OF METHICILLIN RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* STRAINS
BY ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITIES AND PULSED FIELD GEL
ELECTROPHORESIS METHOD

Sıtkı Doğa ELÇİ*

LumiLabs, Anafartalar Mahallesi Şehit Teğmen Kalmaz Caddesi Ege Han No: 28/45 Ulus –
ANKARA

ÖZ

Amaç: Bu çalışma, Ekim 2003-Mart 2004 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Erişkin ve Onkoloji Hastaneleri'nde yatan hastalardan izole edilen Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşlarının, fenotipik bir yöntem olan antibiyotik duyarlılık testi ve genotipik bir yöntem olan Pulsed Field Jel Elektroforezi (PFGE) ile tiplendirilmeleri amacıyla gerçekleştirildi.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada kullanılan izolatların antibiyotik duyarlılıkları MIK yöntemi ile saptandı. Söz konusu bakteriler, genomları *SmaI* restriksiyon endonükleaz ile kesildikten sonra PFGE ile karakterize edildi.

Sonuç ve Tartışma: İki tanesi (*Ant1* ve *Ant2*) yaygın olmak üzere toplam 9 antibiyotip belirlendi. PFGE kullanılarak yapılan çalışma sonucunda bir baskın tip (Tip A) belirlendi. Bu baskın tipin dışında daha az örnekle temsil edilen üç tip (Tip B, C, D) tespit edildi. Tip A'nın 8, tip B'nin 2 ve tip C'nin 5 tane alt tipi belirlenmiştir. Çalışma tarihleri arasında MRSA'ya bağlı bir epidemi oluşmadığı belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, tiplendirme çalışmalarında PFGE tekniğinin, antibiyotik seyirlerinin karşılaştırılmasıyla yapılan fenotipik tiplendirme yönteminden daha hassas olduğunu göstermektedir.

Anahtar kelimeler: antibiyotik duyarlılığı; genotiplendirme; hastane enfeksiyonları; metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*; pulsed field jel elektroforezi

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Sıtkı Doğa ELÇİ
e-mail: dogaelci@lumilabs.com.tr

ABSTRACT

Objective: This study was carried out for typing of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains, isolated from patients hospitalized at Hacettepe University Adult and Oncology Hospitals between October 2003-March 2004, by using the phenotypic method of antibiotic susceptibility testing and the genotypic method of Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE).

Material and Method: Antibiotic susceptibilities of isolates used in the study were determined by MIC method. The bacteria were characterized by PFGE after their genomes were fragmented by using *Sma*I restriction endonuclease.

Result and Discussion: Nine antibiotypes were identified, two of which were common (Ant1 and Ant2). A dominant type (Type A) was identified as the result of the PFGE analysis. Three other types (Type B, C, D) were presented with fewer examples than this predominant type. Type A has 8, type B has 2, and type C has 5 subtypes. It has been determined that no MRSA epidemic has occurred in the particular study period. The results obtained indicate that the PFGE technique in typing studies is more sensitive than the phenotypic typing method of comparing antibiotic susceptibility patterns.

Keywords: antibiotic susceptibility; genotyping; hospital acquired infections; methicillin resistant *Staphylococcus aureus*; pulsed field gel electrophoresis

GİRİŞ

1878 yılında Robert Koch tarafından tanımlanan ve 1881 yılında Alexander Ougston tarafından fare ve kobaylarda hastalık yaptığı gösterilen stafilokoklar; o dönemlerde insanlarda çok ağır seyreden, tedavisi güç, ölümcül enfeksiyonlara neden olmaktaydı. Alexander Fleming'in 1928 yılında penisilini keşfetmesinden ve bu antibiyotiğin 1940 yılında klinik kullanıma girmesinden sonra stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde önemli aşamalar kaydedildi. Ancak, penisilinin yaygın olarak kullanımıyla birlikte, bu antibiyotiği etkisiz kılan dirençli suşlar ortaya çıkmaya başladı. Stafilokoklarda penisilin direnci 1940'lı yılların ortalarından itibaren artışını sürdürdü, 1950'li yıllarda ise penisiline ilaveten tetrasiklin, eritromisin ve streptomisin gibi antibiyotiklere direnç gelişimi rapor edildi. 1960'lı yılların mucizevi antibiyotiği olarak görülen metisilin keşfiyle stafilokokların tedavisinde o yıllarda büyük başarı sağlanmıştı. Bilim adamları bu başarının keyfini uzun süre çıkartamadılar çünkü 1961 yılında, stafilokoklarda metisilin direnci rapor edildi. [1]

Staphylococcus aureus, diğer antibiyotiklerin yanı sıra, pek çok bakterinin direnç geliştiremediği metisilini bile etkisiz kılmıştır. Günümüzde MRSA enfeksiyonları sadece glikopeptid antibiyotiklerle tedavi edilebilmektedir. Bu antibiyotikler pahalı oldukları gibi insan hücrelerine de zararlıdır. MRSA oranının artmasına paralel olarak, glikopeptid antibiyotiklerin kullanımıyla birlikte, glikopeptidlere dirençli *S. aureus* suşlarının miktarının artması olağandır. Bu noktada, MRSA suşlarının miktarındaki artışın kontrol altına alınmasının önemi anlaşılmaktadır. Günümüzde direnç sorununun giderek yaygınlaşması ile birlikte MRSA'ların hastane içindeki yayılımları tüm dünyada hastane enfeksiyonu salgınlarına yol açan çok ciddi bir sorun haline gelmiştir [2].

Tiplendirme çalışmalarından elde edilen bilgiler hastanelerde ve toplumda hastalığın yayılmasını anlama ve kontrol altına almada oldukça yararlıdır. Tiplendirme yöntemleri fenotipik ve genotipik yöntemler olmak üzere ayrılır. Fenotipik yöntemler; antibiyotik duyarlılıkları, biyotipleme, serotipleme, bakteriyosin tiplene, faj tiplene, multilokus enzim elektroforezi, hücresel proteinlerin poliakrilamid jel elektroforezi ve immunoblot fingerprinting'den oluşur. Genotipik yöntemler ise; plazmit fingerprinting, RFLP (Restriksiyon Fragmanı Uzunluk Polimorfizmi), PFGE, bölgeye özgü PZR-RFLP (Polimeraz Zincir Reaksiyonu – Restriksiyon Fragman Polimorfizmi), PZR-MP (Polimeraz Zincir Reaksiyonu – Erime Profili), REP-PZR (Tekrarlı Gendiş Palindromik Eleman – Polimeraz Zincir Reaksiyonu), RAPD (Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA), ARDRA (Amplifiye Edilmiş Ribozomal DNA Restriksiyon Analizi), AFLP (Amplifiye Edilmiş Fragman Uzunluk Polimorfizmi), VNTR (Tandem Tekrarlarının Değişken Numaraları), MLST (Multilokus Dizi Tiplendirme), mikrodizi ve WGS (Tüm Genom Dizileme) analizlerinden oluşur. [3], [4]

Tüm mikroorganizmalar için kullanılabilen antibiyogram tekniği yaygın ve standardize olduğu için birçok hastane salgınında temel tiplendirme aracı haline gelmiştir [5]. Bu tekniğin temel dezavantajı direnç ekspresyonundaki çeşitliliğidir [6]. Bu durum tekniğin ayırım gücünü ciddi şekilde etkilemektedir. Ayırım gücü; tiplene yönteminin bir türün farklı suşları arasında etkin ayırım yapabilme özelliğidir [7]. Sadece antibiyotik duyarlılık seyirleri incelenerek iki mikroorganizma arasındaki klonal ilişkiyi göstermek mümkün değildir. Enfeksiyon kontrol ekibince gerekli görülen durumlarda klonal bir ilişkiyi araştırmak için moleküler tiplendirme yöntemlerine başvurulabilir [8].

Bu çalışma kapsamında, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde yatan hastalardan Ekim 2003 – Mart 2004 tarihleri arasında izole edilen MRSA örnekleri antibiyotik duyarlılıkları testi ve genomlarının SmaI kesimini takiben Pulsed Field Jel Elektroforezi (PFGE) yöntemleri kullanılarak tiplendirilmiştir. Çalışmanın sonraki aşamasında, söz konusu bakteri klonlarının kökeni, hastanedeki yayılımı ve zaman içindeki prevalansı incelenip hastane içindeki epidemiyolojik sürveyans ve kontrol yöntemlerinin yeterliliği değerlendirilmiştir. Böylelikle, çalışmadan elde edilen bilgilerin ilgili bölümlerdeki yaygın suşların kontrol altında tutulmasında fayda sağlaması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar

Ekim 2003 – Mart 2004 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Erişkin ve Onkoloji Hastanelerinde yatan 66 hastaya ait kan, derin trakeal aspirasyon, püy, ameliyat materyali, boğaz salgısı, yara, bronkoalveolar lavaj, torasentez mayi, balgam, idrar, kateter ve dren mayiyi içeren

klirik örneklerden izole edilen ve Phoenix otomatik bakteri tanımlama sistemiyle (BD Diagnostic Instrument Systems, Franklin Lakes, NJ) tanımlanan 128 MRSA örneği çalışmada kullanılmak üzere -80°C’de stoklandı.

Bakterilerin Kontrolü

-80°C’de saklanan stoklar açıldı ve kanlı agara tek koloni ekimi yapıldı.

I. Gözle yapılan inceleme sonrasında kontaminasyon şüphesi olan petrilere ayrıldı. Bu petrilere tekrar tek koloni ekimleri yapıldı ve örnekler gram boyama, katalaz [9], koagülaz ve DNaz [10] testleriyle teyit edildi.

II. Kontaminasyon şüphesi yoksa %20 gliserol içeren Müller Hinton Broth’a tek koloniden ekim yapıldı.

Antibiyotik Dirençlerinin ve Seyirlerinin Belirlenmesi

Çalışmada kloramfenikol, siprofloksasin, eritromisin, gentamisin, penisilin, rifampisin, sulfametaksazol + trimetoprim, vankomisin, oksasilin, tikarsilin antibiyotiklerinin direnç seyirleri üretici firmanın talimatlarına göre klinik laboratuvar standartları ulusal komitesinin verdiği standartlar [11] esas alınarak belirlendi. Antibiyotik duyarlılıkları Phoenix otomatik bakteri tanımlama sistemiyle (BD Diagnostic Instrument Systems, Franklin Lakes, NJ) saptandı.

Genotipik Seyirlerin Belirlenmesi

Çalışma gününe kadar %5 Gliserollü Brain Heart Infusion Broth’da -80 °C’de stoklanan örneklerden DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen DNA’lar SmaI (Sigma, Almanya) restriksiyon endonükleaz ile kesildikten sonra PFGE’ye tabi tutuldular [12].

Agaroz Disklerin Hazırlanışı

PFGE’de bozulmamış DNA gerekli olduğundan, DNA’da kırılmalara yol açabilen geleneksel DNA izolasyonu bu yöntem için uygun değildir [13]. Bu alışmada, DNA’nın hasar görmesini engellemek için bakteriler agaroz diskler içine hapsedildi.

Mueller-Hinton Broth’da 37 °C’de gece boyunca üretilen örnekler 4000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Her örnek 1 ml PIV (10mM Tris pH 8.0, 1.0M NaCl) ile yıkandı ve 1,5 ml’lik ependorf tüplerine aktarıldı. Tüpler 14.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatantlar atıldı. Her örneğe 300µl PIV tamponu (10mM Tris pH 8.0, 1.0M NaCl) konularak PIV – bakteri karışimleri hazırlandı. Ayrıca, PIV tamponu (10mM Tris pH 8.0, 1.0M NaCl) içinde %1,5’lik düşük erime noktalı agaroz (Sigma, Almanya) hazırlandı. Bu agarozun 200µl’sine daha

önceden hazırlanan PIV – bakteri karışımından 200µl eklendi. 150µl'lik pipet kullanılarak karışımdan 8 tane disk hazırlandı. Diskler 4°C'de polimerize edildi.

DNA izolasyonu

Önce EC solüsyonu (6mM Tris pH 8.0, 1M NaCl, 100mM EDTA pH 8.0, %0,2 Na-deoksikolat, %0,5 Na-laurylsarkozin) hazırlandı. Daha sonra, bu solüsyon kullanılarak EC – lizis solüsyonu (EC solüsyonu, 50 µg/ml RNaz A, 100 µg/ml lizozim, 50 µg/ml lizostafin) hazırlandı. Her suş için hazırlanan 8'er adet disk 1,25'er ml EC-lizis solüsyonunda 1 gece boyunca 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında EC – lizis solüsyonu boşaltıldı ve suş başına 1 ml ESP solüsyonu (0,5 M EDTA, 0,5 M NaOH, 0,034 M sarkozil, 1mg/ml proteinaz K) konuldu. Diskler 56 °C'de 1 gece inkübasyona bırakıldılar. İnkübasyon sonrasında ESP solüsyonu boşaltıldı ve yıkama işlemini gerçekleştirmek için disklerin bulunduğu her falkon tüpüne 10 ml Tris – EDTA (10mM tris pH 7.5, 1mM EDTA pH 8.0) konuldu. Falkon tüpleri Shaker'da 100 rpm.'de 30 dakika çalkalandı ve Tris – EDTA boşaltıldı. Bu yıkama işlemi 5 kere tekrarlandı.

DNA'nın kesimi

PFGE için restriksiyon enzimi seçilirken uyulması gereken temel bir kural vardır: Adenin-Timin zengin genomlara PFGE uygulanmadan önce söz konusu genom Guanin-Sitozin zengin bölgeleri tanıyan restriksiyon enzimleriyle kesilir böylece daha büyük fragmanlarla çalışmak mümkün olur [14]. *S. aureus* genomundaki Adenin-Timin konsantrasyonu % 63 – 65 arasındadır. Bu nedenle çalışmamızda, tanıma bölgesi CCC↓GGG olan SmaI restriksiyon enzimi kullanıldı. Her örnek için 20 ünite SmaI (Sigma, Almanyaya) ve 43 µl SmaI tamponu (Sigma, Almanyaya) kullanılarak karışım hazırlandı. Bu karışım disklere dağıtıldı ve DNA 37 °C'de bir gece inkübasyona bırakıldı (in-situ kesim). Sonuçta; tek bir disk için 2,5 ünite SmaI ve 5,375µl 1xSmaI tamponu (33mM Tris-asetat pH 7,9; 10mM Mg(Oac)₂; 66mM KOAc; 0,5 mM dithiothreitol) kullanılmış oldu.

PFGE

PFGE yönteminin değişik tipleri bulunmaktadır. Çalışmamızda, çok fazla sayıda DNA örneğini düz çizgiler halinde ayırmakta oldukça kullanışlı olan “contour – clamped homogenous electric field” tipi kullanıldı. Bu sistemde, altıgen biçiminde yerleştirilmiş elektrotlardan jelle değişik aralıklarla 120° lik açı oluşturan farklı iki yönden elektrik akımı uygulanmaktadır.

Gene Navigator TM System (Amersham Biosciences, Piscataway, New Jersey, USA) pulsed field jel elektroforezinin tankı 0,5 x TBE (1M Tris Baz; 1M Borik Asit; 0,2M EDTA pH=8) tamponu ile dolduruldu. %1,1'lik yüksek erime noktalı agaroz jel (Genaxis Biotechnology, Spechbach, Almanyaya), hazırlanan DNA diskleri ve Pulse marker 50 – 1000 kb (Sigma, Almanyaya) ile yüklendi.

Yürütme işlemi 5-40 sn. değişim aralıklarında, 2,7 Volt/cm voltaj derecesinde, 22 saat boyunca 12 °C'de gerçekleştirildi.

Boyama ve bant seyirlerinin değerlendirilmesi

Jel, etidyum bromür çözeltisiyle (1 µg/ml) 1,5 saat boyunca boyandıktan sonra 30 dakika suda yıkandı. Jel daha sonra, 260nm dalga boyunda görüntüledi ve görüntüler kaydedildi. Elde edilen bant seyirleri, gözle Wang ve arkadaşlarının belirttiği kriterlere göre değerlendirildi [15]. Buna göre; büyüklükleri ve sayıları aynı olan bantların oluşturduğu seyirleri gösteren izolatlar aynı tip olarak değerlendirildiler. Farklı tipler, baş harflerle belirtilen gruplara dahil edildiler (A, B...). Ana seyirden en fazla üç bantla farklılık gösteren seyre sahip olan izolatlar aynı ana tipin alt tipleri olarak değerlendirildi ve aynı baş harfe değişik numaralar eklenerek oluşturulan alt gruplara (A₁, A₂,...) dahil edildiler. Ana seyirden dört veya daha fazla bantla farklılık gösteren seyre sahip olan izolatlar değişik bir tip olarak değerlendirildiler ve farklı bir baş harfle belirtilen farklı gruplara (B, C...) dahil edildiler.

Klonların Kökenlerinin Tanımlanması

Hastadaki MRSA enfeksiyonu hastaneye yatıştan en fazla 72 saat sonra ortaya çıkmışsa veya hastanede ortaya çıkmamakla birlikte, hasta taburcu olduktan sonra 10 gün içinde ortaya çıkmış ve hasta bu nedenle hastaneye tekrar kabul edilmişse; enfeksiyon nozokomiyal olarak değerlendirildi [16,17].

Epidemilerin Belirlenmesi ve Prevalansın Saptanması

Epidemilerin belirlenmesinde kullanılan gruplandırma yaklaşımında, aynı klonla enfekte olan vakalar aynı grup içine dahil edilir. Bir grup, endemik veya epidemik durumlarda oluşabilir. Grubun içinde zaman ve mekan boyutunda epidemiyolojik birlik olmalıdır. Gruplandırma yaklaşımında ayrıntılı alt sınır verisi gerekmez, vakaların sayısı yeterlidir. Epidemi durumunda bir popülasyondaki enfektif kaynakların sayısı sabitse, net vaka çoğalma oranı artarak 1'i geçer. Budapeşte'deki Ulusal Travmatoloji Enstitüsü'nde, bir koğuştaki haftada üç yeni enfeksiyon vakası MRSA için epidemik eşik olarak belirlenmiştir. Bunun nedeni, net vaka çoğalma oranının biri geçmesi için bir vakanın iki yeni vaka oluşturmasının gerekmesidir. [18]

Salgın suşuyla aynı seyiri gösteren izolatlar epidemiyolojik olarak ilişkilidir. İzolat, salgın suşuyla yakından ilişkiliyse yani aralarında 2 – 3 bantla belirlenen bir fark varsa, yüksek olasılıkla epidemiyolojik olarak salgının bir parçasıdır [19].

Bu çalışmada, yukarıda belirtilen kriterlere göre, aynı tiplerin zaman içindeki sayısal miktarındaki değişim incelenerek klonal epidemilerin varlığı değerlendirildi. Daha sonra, Hacettepe Üniversitesi Hastanesi Servisleri içinde görülen MRSA'ların 6 aylık periyot prevalansı Formül 1 kullanılarak hesaplandı.

$$\text{Periyot prevalans} = \frac{(\text{hastanede yatan enfekte veya kolonize birey sayısı})}{(\text{toplam yatak gün sayısı/toplam gün sayısı})}$$

Formül 1. Hacettepe Üniversitesi Hastanesi Servisleri içinde görülen MRSA'ların 6 aylık periyot prevalansının hesaplanmasında kullanılan formül.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Çalışmada, fenotipe dayanan bir tiplendirme yöntemi olan antibiyotik duyarlılık seyirleri ve genotipi esas alan PFGE yöntemi kullanıldı.

Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Aynı antibiyotik seyrini gösteren izolatlar aynı numarayla belirtilen antibiyotip grubuna dahil edildiler. Farklı antibiyotik seyrini gösteren izolatlar farklı numaralarla belirtilen farklı antibiyotip grubuna dahil edildiler. Aynı hastadan izole edilen farklı tipler değerlendirmeye katılırken, aynı hastadan izole edilen aynı tiplerden sadece bir tanesi değerlendirmeye alındı. Böylece, toplam 66 hastaya ait 71 örnek değerlendirilebildi. Sonuçta; 2 tanesi (Ant1 ve Ant2) yaygın olmak üzere 9 antibiyotip belirlendi (Tablo 1).

Tablo 1. Antibiyotik seyirleri ve antibiyotiplerin dağılımı.

	CC	CIP	E	GM	P	RA	SXT	TC	OX	VA	SAYI	YAKLAŞIK%
ANT1	D	R	D	R	R	R	D	R	R	D	22	31,0
ANT2	R	R	R	R	R	R	D	R	R	D	30	42,3
ANT3	R	R	R	D	R	R	D	R	R	D	2	2,8
ANT4	D	R	R	R	R	R	D	R	R	D	7	9,8
ANT5	R	R	R	R	R	D	R	R	R	D	6	8,4
ANT6	D	R	R	R	R	D	R	R	R	D	1	1,4
ANT7	R	D	D	D	R	D	D	R	R	D	1	1,4
ANT8	D	R	D	D	R	D	D	D	R	D	1	1,4
ANT9	D	D	D	D	R	D	D	R	R	D	1	1,4
										TOPLAM	71	100,0

- Ant, antibiyotip; CC, kloramfenikol; CIP, siprofloksasin; E, eritromisin; GM, gentamisin; P, penisilin; RA, rifampisin; SXT, sülfametoksazol + trimetoprim; TC, tikarsilin; OX, oksasilin; VA, vankomisin. R, dirençli; D, duyarlı.

Bu çalışma kapsamında değerlendirilen MRSA izolatlarının %100'ü vankomisine, %14'ü rifampisine, %90,2'si sülfametoksazol + trimetoprim, %2,8'i siprofloksasine, %7'si gentamisine, %35,2'si eritromisine duyarlı olarak tespit edilirken; Ocak 2004-Aralık 2011 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Erişkin ve Onkoloji Hastanelerinde yatan, MRSA bakteriyemisi saptanan 99 hastanın kan kültürlerinden izole edilen MRSA'ların %100'ü vankomisine, %5,1'i rifampisine, %100'ü sülfametoksazol + trimetoprim, %5,1'i siprofloksasine, %6,1'i gentamisine ve %26,2'si eritromisine duyarlı olarak tespit edilmiştir [20]. İki çalışma arasındaki, rifampisin ve eritromisin dirençliliklerindeki farklılık dikkate değerdir. Bu durum, Hastane içindeki söz konusu antibiyotiklere karşı direncin artışıdaki bir trend olarak değerlendirilebileceği gibi; çalışılan materyaller arasındaki farklılığa bağlı olarak, invazif suşlardaki direnç oranının görece yüksekliğinden de köken alabilir. Konuyla ilgili olarak ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bakterilerin Kontrolü

Stoklar açıldıktan sonra bakteriler kontrol edildi. Tüm örneklerin Gram (+) kok ve katalaz (+) olduğu görüldü. Az sayıda örnek koagülaz (-) sonuç verdi, bu örneklerin teyidi DNaz testiyle yapıldı.

Genotipik Seyirlerin Ve Genotiplerin Belirlenmesi

Hazırlanan örnekler kullanılarak yapılan PFGE sonucu elde edilen jeller boyanıp 260nm dalga boyunda görüntülendiler ve seyirler tespit edildi. Bant seyirleri, Wang ve ark. (2002)'nin belirttiği kriterlere göre değerlendirildi [15]. Aynı hastadan izole edilen farklı tipler değerlendirilirken, aynı hastadan izole edilen aynı tiplerden sadece bir tanesi değerlendirmeye alındı. Böylece, toplam 66 hastaya ait 85 örnek değerlendirilebilmiş oldu. Sonuçta; 85 örneğin 53 tanesini bünyesinde barındıran bir baskın tip belirlendi (Tip A). Bu baskın tipin dışında daha az örnekle temsil edilen üç tip (Tip B, C, D) tespit edildi. Tip A'nın 8, tip B'nin 2 ve tip C'nin 5 tane alt tipi mevcuttur. 16 farklı klonun izolat sayıları Tablo 2'de gösterilmiştir.

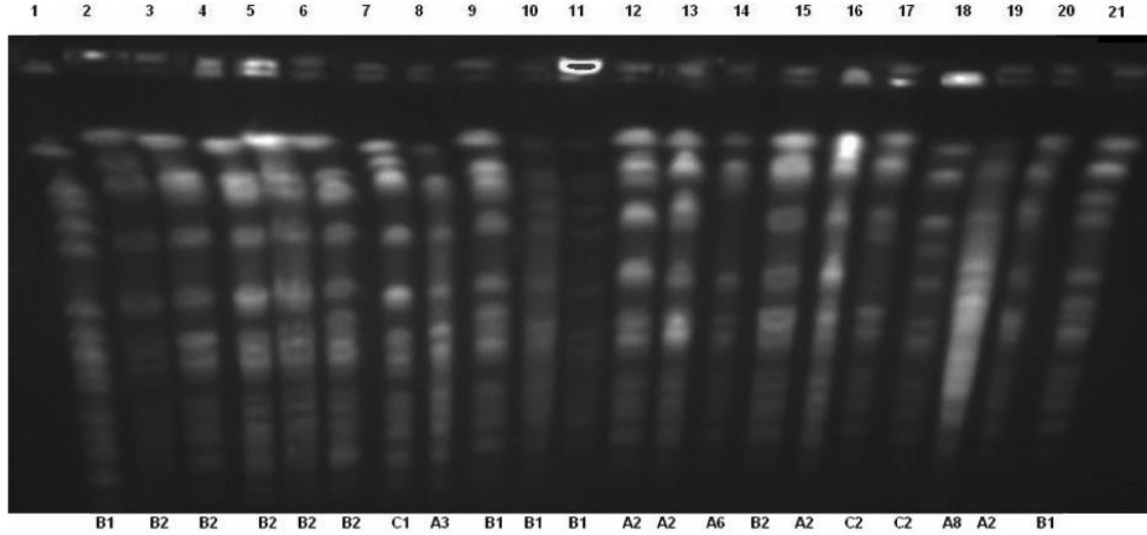
Tablo 2. Tipler ve içerdikleri izolat sayılarının dağılımı.

TİP	İZOLAT SAYISI	ALT TİPLER (İZOLAT SAYISI)
A	53	A1 (10), A2 (7), A3 (29), A4 (3), A5 (1), A6 (1), A7 (1), A8 (1)
B	22	B1 (10), B2 (12)
C	9	C1 (3), C2 (3), C3 (1), C4 (1), C5 (1)
D	1	

Bulgularımıza benzer şekilde, Hacettepe Erişkin Hastanesi'nde Ocak 2004 ile Ocak 2012 tarihleri arasında, erişkin hastaların hastane kaynaklı ve / veya sağlık hizmeti ile ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonlarından izole edilen toplam 131 adet MRSA suşunun PFGE seyirlerinin sunulduğu

çalışmada, suşlardan 76 tanesini bünyesinde barındıran 4 ana grubu (A, B, C, D) kapsayan 23 farklı klon tespit edilmiştir [21].

Alt-tiplerin bazılarının jel görüntüsü Şekil 1’de verilmiştir.



Şekil 1. SmaI enzimiyle kesilerek elde edilmiş bazı PFGE seyirleri ve bu seyirlerin oluşturduğu tipler.

- Yürütme işlemi 5-40 sn. değişim aralıklarıyla, 2,7 Volt/cm voltaj derecesinde, 22 saat boyunca 12 °C’de yapılmıştır. [(1) B1 tipi (2) B2 tipi (3) B2 tipi (4) B2 tipi (5) B2 tipi (6) B2 tipi (7) C1 tipi (8) A3 tipi (9) B1 tipi (10) B1 tipi (11) B1 tipi (12) A2 tipi (13) A2 tipi (14) A6 tipi (15) B2 tipi (16) A2 tipi (17) C2 tipi (18) C2 tipi (19) A8 tipi (20) A2 tipi (21) B1 tipi].

Tiplendirme çalışmalarının sonucunda, aynı antibiyotipe sahip izolatların değişik genotipleri gösterebilirken, aynı genotipe sahip izolatların da değişik antibiyotik seyirlerine sahip olabildikleri görülmüştür. Baskın PFGE A tipine ait izolatlar; Ant2 en yoğun olmak üzere Ant1, Ant2, Ant3 ve Ant4 antibiyotik duyarlılıkları seyirleriyle temsil edilmektedirler. A tipine ait izolatların hepsi CIP, P, RA ve TC antibiyotiklerine dirençli ancak SXT ve VA’ya karşı duyarlıdır.

Klonların Kökenleri

MRSA’nın epidemiyolojisi, çeşitli çalışmalarda bildirildiği üzere [22]-[25], toplum kökenli MRSA suşlarının ortaya çıkmasıyla değişiklik göstermeye başlamıştır.

Çalışmamızda, PFGE ile değerlendirilen 85 örnekten 9 tanesinin (%10,6) toplum kaynaklı kalan 76 örneğin (%89,4) ise hastane kaynaklı olduğu tespit edildi. A1, A2, A4, A6, A7, A8, B2, C1, C3, C5 ve D tiplerini temsil eden izolatların hepsinin hastane kaynaklı; A5, C4 ve C5 izolatlarının ise sadece toplum kaynaklı olduğu tespit edildi. A3 tipine ait örneklerin %93,1’inin, B1 tipine ait

örneklerin %70,0'nun ve C2 tipine ait örneklerin %66,7'sinin hastane kaynaklı olduğu belirlendi (Tablo 3).

Tablo 3. Alt tiplerin kaynaklarına göre dağılımları.

		Kaynak		
		Toplum	Hastane	Toplam
ALT TIP	A1	-	10	10
	A2	-	7	7
	A3	2	27	29
	A4	-	3	3
	A5	1	-	1
	A6	-	1	1
	A7	-	1	1
	A8	-	1	1
	B1	3	7	10
	B2	-	12	12
	C1	-	3	3
	C2	1	2	3
	C3	-	1	1
	C4	1	-	1
	C5	1	-	1
	D	-	1	1
	Toplam		9	76

Epidemiler ve Prevalans

Belirlenen kriterlere göre, çalışma tarihleri arasında MRSA'ya bağlı bir epidemi belirlenmemiştir. Bu sonuç, enfeksiyon hemşireleriyle görüşülerek doğrulanmıştır.

Ülkemizde çeşitli hastanelerde yapılan çalışmalarda MRSA sıklığı %9-48 arasında değişmektedir [26]. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde yatan hastalardaki MRSA'nın 6 aylık periyot prevalansı Formül 1 kullanılarak yaklaşık %13 olarak hesaplanmıştır. Yatan hastalardaki MRSA kolonizasyonu veya enfeksiyonunun prevalansının görece düşük olmasından ve söz konusu dönemde herhangi bir epideminin meydana gelmemesinden dolayı hastane içinde uygulanmakta olan epidemiyolojik sürveys ve kontrol yöntemlerinin etkili olduğu yorumu yapılmıştır.

Ayırım Gücü

Emek-yoğun olması, prosedürü gerçekleştirmek için birden çok gün ve sonuçları yorumlamak için vasıflı personel gerektirmesi, PFGE metodunun dezavantajlarıdır [27]. Uygulama ve sonuçların yorumlanmasında kullanılan yöntemler arasındaki farklardan ötürü laboratuvarlar arası karşılaştırmanın güç olmasına rağmen, suşlar arasındaki ilişkiyi açıkça ortaya koyabilmesinden dolayı, günümüzde tiplendirmenin altın standardı olarak kabul edilen PFGE yönteminin [4], [28], antibiyotipleme metoduna kıyasla ayırım gücü oldukça yüksektir [29].

Ayırım gücü, tiplendirme yönteminin ilişkisiz suşları ayırt etme yeteneğidir [30]. Hunter ve Gaston (1988), tiplendirme sistemlerinin ayırıcı yeteneklerini ölçmek için Simpson'un çeşitlilik indeksini (SID) [31] kullanmayı önermişlerdir. Bu indeks, bir popülasyondan rastgele seçilmiş iki suşun farklı tiplere ait olma olasılığını göstermektedir [28]. Grundmann ve ark. (2001), SID'nin güven aralıklarını (CI) belirlemek için bir yöntem ortaya koymuş [32], böylece tiplendirme tekniklerinin ayırım güçlerinin daha objektif olarak değerlendirilebilmesini mümkün kılmışlardır [28]. Çalışmamızda, PFGE'nin alt tip düzeyindeki SID değeri 0,83 (%95 CI: 0,79 – 0,87) olarak hesaplanırken antibiyotipleme yönteminin SID değerinin 0,72 (%95 CI: 0,66 – 0,78) olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç, çalışma kapsamında uygulanan PFGE'nin alt tip düzeyinde ayırım gücünün antibiyotipleme yöntemine göre daha yüksek olduğunu kantitatif olarak ortaya koymaktadır.

1980'lerin sonlarından bu yana, Güney ve Doğu Avrupa'daki, Latin Amerika ve Amerika Birleşik Devletleri'ndeki bazı hastanelerden ve 1957-1972 arasında Birleşik Krallık ve Danimarka'dan izole edilen büyük (>5,000) uluslararası *S. aureus* koleksiyonundan seçilen 116 MRSA suşunun PFGE ve çeşitli DNA sekansı veri analizi yöntemleri ile tiplendirildiği çalışmada, PFGE yönteminin alt tip düzeyinde %99,51 (%95 CI: 99.20-99.81) SID değeriyle, en yüksek ayırım gücüne sahip olduğu belirlenmiştir [28]. Söz konusu SID değerinin çalışmamızda elde ettiğimiz ilgili değerden farklı olarak daha yüksek bulunmasının, ilgili laboratuvarlar arasındaki protokol farklılığının yanında, Faria ve ark. [28] tarafından yapılan çalışmada kullanılan geniş örneklemin oldukça yüksek genetik çeşitlilik içermesinden kaynaklanmış olabileceği yorumu yapılmıştır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma "Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus* Suşlarının Antibiyotik Duyarlılıkları Ve Pulsed Field Jel Elektroforezi İle Tiplendirilmesi" isimli yüksek lisans tez çalışmasının bir kısmıdır ve Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından 0302601008 No'lu Araştırma Projesi kapsamında desteklenmiştir.

Söz konusu projenin yürütücülüğünü yapan çok değerli hocam Prof.Dr. Erol AKSÖZ ve çok değerli danışmanım Prof.Dr. Nilüfer AKSÖZ başta olmak üzere, laboratuvarlarını açarak bu çalışmanın deneysel kısımlarının gerçekleştirilebilmesinde önemli katkılar sağlayan Prof.Dr. Gülşen HASÇELİK'e ve Prof.Dr. Ömrüm UZUN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

KAYNAKLAR

1. Haznedaroğlu, T. (2013). MRSA Korunma Ve Kontrol. <http://docplayer.biz.tr/7038727-Metisilin-direncli-s-aureus-mrsa-korunma-ve-kontrol.html>
2. Dilek, N. (2005). Enfeksiyon kapan hastanelere neşter. Aksiyon Haftalık Haber Dergisi. 10 (570): 1-5. Retrived November 13, 2005, from <http://www.aksiyon.com.tr/detay.php?id=22379>
3. Durmaz, R. (2001). Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Sti., İstanbul, p.142.
4. Ranjbar, R., Karami, A., Farshad, S., Giammanco, G.M., Mammina, C. (2014). Typing methods used in the molecular epidemiology of microbial pathogens: a how-to guide. *The New Microbiologica*, 37(1), 1–15.
5. Montesinos, I., Salido, E., Delgado, T., Cuervo, M., Sierra, A. (2002). Epidemiologic genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis at a university hospital and comparison with antibiotyping and protein a and coagulase gen polymorphisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 2119-2125.
6. Blanc, D.S., Petignat, C., Moreillon, P., Wenger, A., Billie, J., Francioli, P. (1996). Quantitative antibiogram as a typing method for the prospective epidemiological surveillance and control of MRSA: comparison with molecular typing. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 17, 654-659.
7. Durmaz, R. (2001). Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Sti., İstanbul, p.143.
8. Şardan, Y.Ç. (2003). Hastanelerde salgın incelemesi. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi*,7, 100-106.
9. Bilgehan, H. (1990). Klinik Mikrobiyoloji. Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları, Barış Yayınları, İzmir, p.184-204.
10. Collins, C.H., Lyne, P.M. Grange, J.M. (2001). Collin's and Lyne's Microbiological Methods, Oxford University Press Inc., Newyork, p.110-111.

11. National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2003). Approved Standard M7-A6. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 6th ed. NCCLS, Wayne, Pa.
12. Lencastre, H., Couto, I., Santos, I., Melo-Cristino, J., Torres-Pereira, A., Tomasz, A. (1994). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in a Portuguese Hospital. Characterization of clonal types by a combination of DNA typing methods. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 13, 64–73.
13. Durmaz, R. (2001). Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Sti., İstanbul, p.161.
14. Birren, B., Lai, E. (1993). Pulsed Field Gel Electrophoresis, Academic Press Inc, California, p.90.
15. Wang, J.T., Chen, Y.C., Yang, T.L., Chang, S.C. (2002). Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Taiwan. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 42, 199-203.
16. Garner, J.S., Jarvis, W.R., Emori, T.G., Horan, T.C., Hughes, J.M. (1988). CDC Definitions for nosocomial infections, *American Journal of Infection Control*, 16(3), 128-140.
17. Aygün, G. (2009). Ülkemizde Hastane İnfeksiyonlarının Değerlendirilmesi: Güncel Durum, 14. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, 25-29 Mart, Antalya, Türkiye, 2009.
18. Filetoth, Z. (2003). Hospital-acquired Infection Causes and Control, Whurr Publishers Ltd., London, p.92
19. Durmaz, R. (2001). Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Sti., İstanbul, p.164.
20. Atmaca, Ö., Köşker, P.Z., Karahan, C., Çakır, B., Ünal, S. (2014). Erişkin ve Onkoloji Hastanelerinde Yatan Hastalarda Saptanan Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* Bakteriyemilerinde Risk Faktörleri (2004-2011), Antibiyotik Kullanımı ve İzolatların Antimikrobiyal Duyarlılıkları: Yuvalandırılmış Olgu-Kontrol Çalışması. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 48(4), 523–537.
21. Zarakolu, P., Metan, G., Karahan, Z.C., Tekeli, A., Ünal, S. (2016). Bacterial factors influencing the mortality for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) bacteremia. *Infectious Diseases*, 48(8), 649–650.
22. Faria, N.A., Oliveira, D. C., Westh, H., Monnet, D. L., Larsen, A. R., Skov, R., De Lencastre, H. (2005). Epidemiology of emerging methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in

- Denmark: a nationwide study in a country with low prevalence of MRSA infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 1836–1842.
23. Ho, P.L., Cheung, C., Mak, G.C., Tse, C.W., Ng, T.K., Cheung, C.H., Que, T.L., Lam, R., Lai, R.W., Yung, R.W., Yuen, K.Y. (2007). Molecular epidemiology and household transmission of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Hong Kong. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 57, 145–151.
 24. Kuehnert, M.J., Kruszon-Moran, D., Hill, H.A., McQuillan, G., McAllister, S.K., Fosheim, G., McDougal, L.K., Chaitram, J., Jensen, B., Fridkin, S.K., Killgore, G., Tenover, F.C. (2006). Prevalence of *Staphylococcus aureus* nasal colonization in the United States, 2001–2002. *The Journal of Infectious Diseases*, 193, 172–179.
 25. Tiemersma, E.W., Bronzwaer, S.L., Lyytikäinen, O., Degener, J.E., Schrijnemakers, P., Bruinsma, N., Monen, J., Witte, W., Grundman, H. (2004). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999–2002. *Emerging Infectious Diseases*, 10, 1627–1634.
 26. Çetinkaya, Y., Ünal, S. (1996). Metisilin dirençli *S. aureus* infeksiyonları epidemiyoloji ve kontrol. *Flora*, 1, 1-16.
 27. Goering, R.V. (2010). Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infection Genetics and Evolution*, 10, 866-875.
 28. Faria, N.A., Carrico, J.A., Oliveira, D.C., Ramirez, M., De Lencastre, H. (2008). Analysis of typing methods for epidemiological surveillance of both methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(1), 136–144.
 29. Durmaz, R. (2001). Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Sti., İstanbul, p.144-145.
 30. Hunter, P.R., ve Gaston, M.A. (1988). Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology*, 26, 2465–2466.
 31. Simpson, E.H. (1949). Measurement of species diversity. *Nature*, 163, 688.
 32. Grundmann, H., Hori, S., Tanner, G. (2001). Determining confidence intervals when measuring genetic diversity and the discriminatory abilities of typing methods for microorganisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 4190–4192.