

T.C.

MERSİN ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN MRSA
SUŞLARINDA PANTON-VALENTİNE LÖKOSİDİN VİRÜLANS
FAKTÖRÜNÜN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
BELİRLENMESİ**

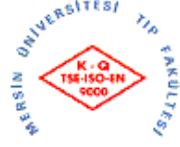
Dr. Müge ŞİMŞEK

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Nuran DELİALİOĞLU

MERSİN - 2010



T.C.

MERSİN ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN MRSA
SUŞLARINDA PANTON-VALENTİNE LÖKOSİDİN VİRÜLANS
FAKTÖRÜNÜN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
BELİRLENMESİ**

Dr. Müge ŞİMŞEK

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Nuran DELİALİOĞLU

Bu tez, BAP-TF TTB (MŞ) 2009–1 TU kodlu proje olarak Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir

MERSİN - 2010

TEŞEKKÜR

Tıpta uzmanlık eğitimim süresince her konuda yardımlarını ve desteğini esirgemeyen Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın hocam Prof. Dr. Gürol EMEKDAŐ'a ve başta danışman hocam Sayın Doç. Dr. Nuran DELİALİOğLU olmak üzere değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Candan ÖZTÜRK, Sayın Prof. Dr. Gönül ASLAN, Sayın Doç. Dr. Feza OTAđ ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Seda TEZCAN'a eğitim ve öğretimime katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Eđitim sürem boyunca pek çok şey paylaőtığım değerli asistan, biyolog ve teknisyen arkadaşlarıma,

Uzmanlık eğitimim sürecinde sonsuz sabır ve anlayış gördüğüm sevgili eşim ve biricik kızım Duru'ya, hayatım boyunca desteklerini hep yanımda hissettiğim anne ve babama sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Müge ŞİMŞEK

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	5
ABSTRACT	6
GİRİŞ VE AMAÇ	7
GENEL BİLGİLER	9
Tarihçe	9
Sınıflama	9
Morfolojik ve Kimyasal Özellikleri	12
Üreme ve Kültür Özellikleri	12
Biyokimyasal Özellikleri	13
<i>Staphylococcus aureus</i>	14
Genom Yapısı	16
Virulans Faktörleri	16
Kapsül	17
Hücre Duvarı	17
Enzimler	20
Toksinler	22
<i>S. aureus</i> 'ün Neden Olduğu Hastalıklar	28
<i>S. aureus</i> 'ün Laboratuvar Tanısı	32
Antibiyotik Direnci	35
Stafilokok enfeksiyonlarında kullanılan antibiyotikler ve direnç mekanizmaları	40
Metisilin Direncinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler	47
Fenotipik Yöntemler	47
Moleküler yöntemler	49
GEREÇ VE YÖNTEM	50
Örneklerin Toplanması ve İzolasyonu	50
Klinik Örneklerden İzolasyon ve identifikasyon	50
Metisilin direnci tespiti	51
Disk difüzyon yöntemi	51

E-Test yöntemi	52
Tuz Agar Tarama Yöntemi	54
DNA'nın elde edilmesi	54
<i>MecA</i> Polimeraz Zincir Reaksiyonu	54
Panton-Valentine Lökosidin Polimeraz Zincir Reaksiyonu	56
Polimeraz Zincir Reaksiyonu Ürünlerinin Görüntülenmesi	57
Kullanılan Cihaz ve Gereçler	58
Cihazlar	58
Kullanılan antibiyotikler	59
Kitler	60
Besiyerleri	60
PZR Tekniğinde Kullanılan Gereçler	60
Elektroforetik Analiz Solüsyonları	60
BULGULAR	62
İstatistiksel Analiz	68
TARTIŞMA	69
SONUÇ ve ÖNERİLER	75
KAYNAKLAR	76
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	89
ŞEKİL VE RESİMLER DİZİNİ	91
TABLolar DİZİNİ	92

ÖZET

Staphylococcus aureus, nozokomiyal ve toplumdan kazanılmış enfeksiyonların en önemli etkenlerindedir. Özellikle metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşlarının neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde güçlükler yaşanmaktadır. MR, fenotipik yöntemlerle her zaman doğru olarak belirlenememektedir. Bu nedenle Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile *mecA* geninin tespit edilmesi, stafilokoklarda MR'yi açığa çıkarmak için altın standart olarak kabul edilmektedir. Stafilokokların virülansta rol oynayan çeşitli enzim, hemolizin ve toksinleri bulunmaktadır. Bunlar içerisinde bulunan ve bir nonhemolitik lökositin olan Panton-Valentine Lökositin (PVL), virülansta önemli role sahiptir. PVL, ökaryotik hücre membranında porlar oluşturmak suretiyle lökosit ve makrofajları parçalamakta ve fagositozu engellemektedir.

Eylül 2008 ile Eylül 2010 tarihleri arasında, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda çeşitli klinik örneklerden izole edilen ve Clinical and Laboratory Standards Institute'nin (CLSI) önerdiği şekilde oksasilin disk difüzyon testi sonucu MR bulunan 190 adet *S. aureus* suşu çalışmaya alınmıştır. Bu suşlara aynı zamanda sefoksitin disk difüzyon testi, oksasilin agar tarama, oksasilin E test, sefoksitin E test ve MR'den sorumlu *mecA* geninin saptanması için PZR yöntemi uygulanmıştır. MRSA suşlarında PVL gen bölgesi PZR yöntemiyle araştırılmıştır.

MRSA olarak değerlendirilen 190 suşun tümünde *mecA* geni tespit edilirken, oksasilin agar tarama, oksasilin E test, sefoksitin disk difüzyon testi ve sefoksitin E test ile 188'i MR olarak bulundu. Toplam 190 adet MRSA suşunun 170'i hastane kaynaklı, 20'si toplum kaynaklıydı. Toplam 6 adet (%3,16) MRSA izolatında PVL geni saptandı. Bunların 5'inin (%2,94) hastane kaynaklı ve 1'inin (%5) toplum kaynaklı olduğu görülmüştür. PVL geni taşıyan MRSA'ların çoklu antibiyotik direncine sahip olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak; PVL pozitif hastane kaynaklı MRSA suşları daha virülan ve çoklu ilaç dirençli olduğu için araştırılmalı ve buna göre önlemler alınmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Antibiyotik direnci, *mecA*, MRSA, PVL.

ABSTRACT

The Detection of Panton-Valentine Leukocidine Virulans Factor In MRSA Strains Isolated From Clinical Specimens by Molecular Methods

Staphylococcus aureus is the most important factor of nosocomial and infections. Especially the treatment of infections that are due to methicillin resistance (MRSA) strains are becoming harder. MR can not be always determined by phenotypical methods. So, the determination of *mecA* gene with the polymerase chain reaction (PCR) method is accepted the gold standard for establishing the methicillin resistance of staphylococcus. Staphylococcus have various enzymes, toxins and hemolysin as virulence factors. Panton-Valentine Leukocidin (PVL) as a non-hemolytic leukocidin is one of these factors and have important role at virulence. PVL leads to pore formation on the cell membranes, destroys macrophages and leucocytes and interrupting phagocytosis.

A total of 190 *S. aureus* strains isolated from specimens which were detected to be methicillin-resistant by using the disc diffusion method with oxacillin by using the methods suggested from Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) were included in the study. These specimens were collected from Mersin University Faculty of Medicine Microbiology Laboratory from september 2008 to september 2010. Although cefoxitin disc diffusion test, oxacillin agar screen, oxacillin E test, cefoxitin E test and PCR method for determining *mecA* gene which is responsible for MR are evaluated at these strains. PVL gene region is analysed with PCR method at MRSA strains.

MecA gene is detected at all 190 strains determined as MRSA. By using oxacillin agar screen, oxacillin E test, cefoxitin disc diffusion test, cefoxitin E test 188 strains determined as MRSA. The 20 strains were community-acquired and 170 strains were hospital-acquired of the total 190 strains. PVL gene is determined at 6 (%3.16) MRSA isolates. 5 (%2.94) of these were hospital-acquired and one of these (%5) was community-acquired. The MRSA strains that has PVL gene seems to have multiple antibiotic resistance.

As a result hospital-acquired PVL positive MRSA strains must be researched and take cautions for them because they have multiple antibiotic resistance and more virulence.

Key words: Antibiotic resistance, *mecA*, MRSA, PVL.

GİRİŞ VE AMAÇ

Stafilokoklar, nozokomiyal ve toplumdan kazanılmış enfeksiyonların en önemli etkenlerindedir. Ciddi stafilokok enfeksiyonları, yaşamı tehdit eden komplikasyonlara sebep olması nedeniyle halen önemli bir sorun olmaya devam etmektedir. Özellikle metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşlarının neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde güçlükler yaşanmaktadır¹.

S. aureus, toplumun %30-70'inde nazal florada kommensal olarak bulunmasına rağmen deri çatlaklarını veya müköz membranları enfekte ederek ve primer enfeksiyon odağından kan yoluyla yayılarak birçok enfeksiyona neden olmakta, ayrıca besin zehirlenmesinde de etken olarak karşımıza çıkmaktadır².

Stafilokoklarda metisilin direnci; *Staphylococcal Cassette Chromosome* (SCC) adı verilen genetik yapının üzerinde bulunan *mecA* (SCCmec) geni tarafından düşük afiniteli bir penisilin bağlayan protein (PBP) olan PBP2a sentezlenmesi sonucu ortaya çıkmaktadır. Kromozomunda *mecA* geni taşıyan suşlar, tüm beta-laktam antibiyotiklere intrinsek direnç gösterirler. *MecA* genine bağlı olarak gelişen metisilin direnci homojen veya heterojen direnç olarak ortaya çıkabilmektedir. Heterojen direnç tipiyle daha sık karşılaşılmaktadır^{3,4}.

Stafilokokların çeşitli enzim, hemolizin ve toksinleri bulunmaktadır. Bunlar içerisinde bulunan ve bir nonhemolitik lökositin olan Panton-Valentine Lökositin (PVL); ökaryotik hücre membranında porlar oluşturmak suretiyle lökosit ve makrofajları parçalamakta, fagositozu engellemektedir. Bu nedenle virülansta önemli role sahiptir. PVL, elektroforetik olarak birbirinden farklı F (hızlı) ve S (yavaş) 2 protein komponentinden oluşmuştur. Bu PVL proteinleri, üç farklı gama hemolizinle yaptığı kombinasyonlar sonucu çift komponentli, altı farklı toksin meydana getirirler. Bu toksinler değişen derecelerde hemolitik aktiviteye sahip olmakla birlikte hepsi de etkin şekilde lökosit lizisine neden olurlar ve *S. aureus*'un kromozomuna entegre olmuş profajlarla taşınmaktadır^{5,6}.

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında metisilin direncinin tespiti için Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)'ın önerdiği yöntemler; sefoksitin ve oksasilin disk difüzyon, oksasilin agar tarama, E-test veya dilüsyon ile oksasilin ve sefoksitin minimal inhibitör konsantrasyon (MIK) belirleme testleridir. Sefoksitin disk testinin okunması daha kolaydır ve bu nedenle tercih edilmektedir. Metisilin direncinin tespitinde hatalı sonuç alınması ciddi klinik

problemlere neden olmaktadır. Yanlış duyarlı sonuç bildirilmesi, tedavide başarısızlığa ve MRSA suşlarının yayılımına sebep olurken, yanlış dirençli sonucun bildirilmesi de sağlık bakım masraflarında artış, gereksiz izolasyon önlemleri ve gereksiz glikopeptid antibiyotik kullanımına sebep olmaktadır. Bu nedenle MRSA suşlarının doğru ve hızlı tanımlanması gereklidir^{7,8}.

Metisilin direncinin heterojen ekspresyonundan dolayı, MRSA suşları fenotipik yöntemlerle her zaman doğru olarak tanımlanamamaktadır. Bu nedenle PZR tekniği ile *mecA* geninin tespit edilmesi, stafilokoklarda metisilin direncini açığa çıkarmak için altın standart olarak kabul edilmektedir. Fakat her laboratuvarın moleküler teknikleri uygulayabilme olanağı bulunmamaktadır³.

Bu çalışmada, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'na çeşitli klinik ve polikliniklerden gönderilen örneklerde üreyen MRSA suşlarında, metisilin direncinin CLSI'nın önerdiği klasik yöntemlerle saptanmasının ardından, moleküler yöntemle *mecA* geni araştırıldı. *MecA* pozitif saptanan örneklerde PVL gen bölgesinin tespiti ve bu genin varlığının antibiyotik direnç paternine etkisinin araştırılması amaçlandı.

GENEL BİLGİLER

Stafilokoklar *Micrococcaceae* ailesi içerisinde yer alırlar. Doğada yaygın olarak bulunurlar. Stafilokokların çoğu sıcakkanlı hayvanların derisinde, deri ile ilişkili bezlerin kanallarında ve mukozalarında doğal olarak barınırlar ve birçoğu fırsatçı patojendirler. Normalde vücut florasında yer alırlar. Ancak gerekli şartların oluşması ile birlikte basit yüzeysel bir enfeksiyondan hayatı tehdit eden ciddi hastalıklara kadar geniş bir spektrumda klinik tablolara neden olabilirler^{9,10}.

Tarihçe

Stafilokoklar ilk olarak 1878'de Robert Koch tarafından ışık mikroskopunda tanımlanmıştır. Pasteur, stafilokokları 1880'de sıvı besiyerinde üretmiştir. İskoçya'lı bir cerrah olan Alexander Ougston, 1881'de fare ve kobaylar için patojen olduklarını vurgulamış ve bu mikroorganizmalara; üremeleri sırasında birbirlerinden ayrılmayıp, üzüm salkımına benzeyen düzensiz kümeler oluşturmaları nedeniyle "*Staphylococcus*" (*Staphyle*: üzüm salkımı) adını vermiştir. 1884'de stafilokokları ilk kez insandan izole eden Rosenbach, beyaz renkli kolonilere *Staphylococcus albus*, sarı-portakal rengi kolonilere ise *Staphylococcus aureus* adını vermiştir^{11,12}.

Alexander Fleming'in 1928'de penisilini bulması ve 1940'da Florey ve Chain tarafından penisilinin üretilmesiyle birlikte stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde önemli bir aşama kaydedilmiştir. Penisilinaz üretimi ilk olarak 1940'da Abraham Chain tarafından *Escherchia coli*'de bildirilmiştir. *S. aureus* suşlarında ise penisilin direncini 1944'de Kirby tanımlamıştır¹³.

İlk MRSA izolatları 1961 yılında İngiltere'den bildirilmiştir. MRSA suşları özellikle 1980'li yıllarda hastane kaynaklı salgın etkeni olarak bildirilirken, çoklu antibiyotik direnciyle de karşılaşmıştır. Direnç probleminin artmasıyla birlikte MRSA tüm dünyada nozokomiyal epidemilere yol açan ciddi bir sağlık sorunu haline gelmiştir^{14,15}.

Sınıflama

Micrococcaceae familyası içinde yer alan stafilokoklar, genetik ve kemotaksonomik analizler sonucunda *Firmicutes* filumunda, Aile V ve Cins 1 içerisinde sınıflandırılmıştır. Aile V (*Staphylococcaceae*) içerisinde aynı zamanda *Gemella*, *Macrococcus* ve *Salinicoccus*'da bulunur¹⁰.

Staphylococcus cinsi içinde bugüne kadar 35 tür tanımlanmış olup, bunlardan 17 tanesi klinik örneklerden izole edilmiştir¹⁶. Patojenik stafilokokların

bazıları koagülaz enzimi üretirler ve bu enzim stafilokokların laboratuvar tanısında kullanılır. Koagülaz pozitif *S. aureus* ile koagülaz negatif *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus*, insanlarda en sık enfeksiyona neden olan stafilokoklardır. İnsanlarda en sık klinik tablo oluşturan türler *S. aureus*, *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus*'tur¹⁰.

S. epidermidis, koagülaz negatif stafilokoklar içinde %50 - %80 arasında değişen oran ile en sık hastalık etkeni olarak karşımıza çıkan türdür. Endokardiyal kapak tutulumu ve venöz kateter tutulumu hariç *S. epidermidis* enfeksiyonları neredeyse tümüyle hastane kaynaklıdır. Ek olarak endokardiyal kapak tutulumu veya kateter enfeksiyonu olan hastalarda, üriner sistem enfeksiyonları, cerrahi yara enfeksiyonları, serebrospinal şant enfeksiyonları, çeşitli prostetik cihaz enfeksiyonları, ve oftalmik enfeksiyonlara da neden olabilmektedir. *S. epidermidis* genomunda, PSA/A adı verilen yüksek molekül ağırlıklı bir kapsüler polisakkarit ve ekstrasellüler moleküllerin, bakterinin yabancı cisimler ve plastik yüzeylere adhezyonundan sorumlu olduğunu göstermiştir¹⁰.

S. saprophyticus, seksüel olarak aktif olan genç ve sağlıklı kadınlarda üriner sistem enfeksiyonuna neden olmaktadır. Doğurgan çağıdaki kadınlarda, *Escherichia coli*'den sonra ikinci sıklıkla primer komplikasyonsuz sistit etkenidir. Üriner sistem enfeksiyon etkeni olan diğer bakteriler gibi üreaz enzimi salgılayabilmektedir. Üriner sistem epiteline diğer vücut bölgelerinden daha fazla afinite gösterir¹⁰.

Bugüne kadar tanımlanmış stafilokok tür ve alt türleri tablo 1'de gösterilmiştir. Bu türlerin arasında insanlarda klinik örneklerden izole edilen stafilokoklar şu şekilde sıralanabilir: *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. hominis*, *S. simulans*, *S. lugdunensis*, *S. schleiferi*, *S. capitis*, *S. auricularis*, *S. cohnii*, *S. sciuri*, *S. xylosus*, *S. saccharolyticus*, *S. pasteurii*¹⁰.

Tablo 1. Stafilokok tür ve alt türleri¹⁷.

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

Morfoloji ve Kimyasal Özellikleri

Staphylococcus cins ismi, mikroskopik görünümüleri üzüm salkımına benzediklerinden dolayı Yunanca'da üzüm salkımı anlamına gelen "staphilé" kelimesinden türetilmiştir. Düzensiz kümeler, bazen çift ya da 3-4'lü gruplar halinde görülebildiği gibi sıvı besiyerinde ürediklerinde streptokoklar gibi zincir şeklinde de görülebilirler. Bu görünümüleri ile streptokoklara benzeyen stafilokoklar, katalaz testinin pozitif olması ile ayırt edilirler. Çapı 0.5-1.5µm, 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* ve *S. aureus subsp. anaerobius* hariç), oksidaz negatif (*S. sciuri*, *S. lentus* ve *S. vitulinus* hariç), kapsülsüz mikroorganizmalardır. Ancak nadiren kısıtlı bir kapsül formasyonu oluşturabilirler¹⁶.

Üreme ve Kültür Özellikleri

Stafilokokların çoğu %7,5-10 NaCl içeren besiyerlerinde, 18-45°C'de kolaylıkla üreyebilmektedirler. Optimal üreme ısısı 37°C olmakla birlikte pigment oluşumu için en iyi ısı 20-25°C'dir¹¹.

Stafilokoklar katı besiyerinde (Kanlı agar, triptik soy agar, nutrient agar veya beyin kalp infüzyon agar) 18-24 saatlik inkübasyondan sonra 1-3 mm büyüklüğünde yuvarlak, düzgün, düşük konveks ve parlak görünümde koloni oluştururlar. Bu tür besiyerlerinden 18-24 saat içinde izole edilen *S. aureus* kolonileri, 4-6 mm çapında, pigmente (krem rengi, sarı-portakal rengi), S tipi, yuvarlak, hafif kabarıktır ve çoğunluğu kanlı agarda beta hemoliz oluşturur. Belirgin kapsül oluşturan suşlar parlak ve ıslak görünüme sahip olabilir. *S. aureus*'un kanlı besiyerinde küçük, pigmentsiz ve hemoliz oluşturmeyen koloniler şeklinde üreyen küçük koloni varyantları tanımlanmıştır. KNS kolonileri hafif konveks kabarık, S tipi, parlak, ve genellikle pigmentsizdir. Kuvvetli slime 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^{16,17}.

Biyokimyasal Özellikleri

Bütün stafilokoklar katalaz testi pozitifdir. Katalaz testi; lam üzerinde %3'lük H₂O₂ ile mikroorganizmanın karşılaştırılması sonucu, hızlı bir şekilde gaz çıkışını gösteren köpürmenin gözlenmesine dayanmaktadır¹⁸.

Plazmayı pıhtılaştırma özelliğini gösteren koagülaz deneyi, *S. aureus*'u diğer stafilokoklardan ayırt etmede kullanılmaktadır. *S. aureus* koagülaz pozitifdir. Koagülaz pozitif olan diğer stafilokoklar; *S. intermedius*, *S. lugdunensis*, *S. hyicus*, *S. delphini*, *S. lutrae* ve *S. schleiferi subsp*'dir ancak bu bakterilerle klinikte sık karşılaşılmamaktadır¹⁰.

Ekstraselüler bir proenzim olan koagülaz, plazmada koagülaz reaktif edici faktör ile birleşerek aktifleşir ve plazmanın pıhtılaşmasına kadar giden bir dizi reaksiyon başlatır. Bu şekilde mikroorganizmanın çevresini saran kalın fibrin tabakası oluşur ve bu tabaka yardımıyla bakteri konak savunma sisteminin fagositozundan korunmuş olur¹⁰.

Serbest ve bağlı (clumping faktör, kümeleştirici faktör) olmak üzere iki çeşit koagülaz vardır. Bu koagülazların sonuçları aynı olmakla birlikte antijenik yapı, etki mekanizmaları ve saptanma yöntemleri farklıdır¹¹. Lam ve tüp olmak üzere iki farklı yöntemle koagülaz varlığı saptanır. Lam deneyi ile stafilokokların yüzeylerinde bağlı halde bulunan koagülaz saptanmaktadır. Hemen hemen bütün *S. aureus* suşları bağlı koagülaz pozitifdir. Lam koagülaz deneyi negatif olan suşlara mutlaka tüp koagülaz testi yapılmalıdır. Çünkü bağlı koagülaz üretmeyen suşlar serbest koagülaz üretmektedir ve tüp koagülaz testi ile bu serbest koagülaz saptanmaktadır¹⁰.

Nadiren bazı *S. aureus* suşları koagülaz negatif olabilmektedir. Böyle durumlarda diğer ayırt edici testler oldukça yardımcı olabilmektedir ki, bunlardan birisi DNase testidir. *S. aureus* hem DNase, hem de *nuc* geni tarafından kodlanan termostabil nükleaz üretebilmektedir¹⁰.

Stafilokoklar glukozu fermentatif olarak parçalar ve son ürün olarak laktik asit oluştururlar. Ayrıca laktöz, sükroz, mannoz, trehaloz ve maltozu da fermente edebilirler. Mannitolü ise sadece *S. aureus* fermente eder¹¹. Mannitole etki deneyi, koagülaz testinden sonra *S. aureus*'u diğer stafilokoklardan ayırt etmede kullanılan en önemli deneylerden biridir. *S. aureus* mannitolü parçalayarak asit oluşturur¹¹.

Stafilokokların çoğunluğu %7.5-10 NaCl içeren basit besiyerlerinde üreyebilirler. Suşların optimal üreme ısıları 30-37°C ve pH 7-7.5 arasındadır. Furazolidon ve lizostafine duyarlı olmalarına karşın, basitrasin ve lizozime direnç gösterirler. *S. aureus* ısıya ve kuruluğa dayanıklıdır. Stafilokoklar dezenfektan ve antiseptiklere duyarlıdır. Kuarterner amonyum klorür bileşikleri etkin bir şekilde dezenfeksiyonda kullanılabilir. Ayrıca alkol ve iyot gibi antiseptiklere de oldukça duyarlıdır¹⁷.

Staphylococcus aureus

S. aureus; doğada oldukça yaygın olan, tozda toprakta, eşya üzerinde, insan ve hayvan deri, burun mukozası ve ağız florasında bulunan, antibiyotiklere çok çabuk direnç geliştirebilmesi nedeniyle günümüzde stafilokok türleri arasında özel bir yere sahiptir¹². Hastane enfeksiyonlarının başta gelen etkenlerindedir. Bunun yanında her geçen gün toplum kökenli enfeksiyonlardan da daha yüksek oranda izole edilmektedir¹⁹. Basit yüzeysel enfeksiyonlardan, derin yerleşimli, hayatı tehdit eden apseler, pnömoni, osteomyelit, sepsis ve endokardit gibi yaygın ve ciddi seyreden çok çeşitli enfeksiyonlara neden olmakta, ayrıca ekzotoksinleri sayesinde yerleştiği bölgeden uzak sistemleri de etkileyebilmektedir²⁰.

Son 30 yılda teknolojinin gelişmesiyle birlikte, *S. aureus*'un hedef dokulara adhezyon ve invazyonundan, salgıladığı enzimler ve toksinlerinden sorumlu moleküler ve genetik özellikler ortaya konmuştur (tablo 2). Genetik çalışmalar ile birkaç *S. aureus* suşunun tam genom sekansının ortaya çıkarılması bu özelliklerin belirlenmesinde önemli bir aşama olmuştur²⁰.

MRSA enfeksiyonlarının epidemiyolojisi ve patogeneğinde nazal taşıyıcılık önemlidir. Çalışmalar *S. aureus*'un izole edilebileceği en uygun bölgenin burun olduğunu göstermiştir. Nazal *S. aureus* tedavi edildiğinde mikroorganizma vücudun diğer bölgelerinden de kaybolmaktadır²¹. Nüfusun yaklaşık %20'si sürekli olarak en az bir suş taşımaktadır (persistan taşıyıcılık). Nüfusun çoğu (%60) belli aralıklarla taşıyıcı olmaktadır (intermittan taşıyıcılık). Sıklıkla bu kişilerin burunlarından her seferinde farklı suş izole edilmektedir. Nüfusun %20'den daha az bir kısmı ise taşıyıcı değildir. Persistan taşıyıcılık çocuklarda yetişkinlerden daha siktir. Nazal taşıyıcılık oranları toplumlara göre değişmekle birlikte genel olarak %32.7 olarak tespit edilmiştir^{22,23}.

Tablo 2. *S. aureus*'un patogenezinde rol oynayan ekstrasellüler faktörler²⁰.

Gen	Yerleşim	Ürün	Fonksiyon
Yüzey Proteinleri			
<i>Cpa</i>	Kromozom	Protein A	Antifagositoz
<i>Cna</i>	Patojenite Adacıkları	Kollajen BP A	Kollajene bağlanma
<i>fnbA</i>	Kromozom	Fibronektin BP A	Fibronektin bağlama
<i>fnbB</i>	Kromozom	Fibronektin BP B	Fibronektin bağlama
<i>clfA</i>	Kromozom	Kümeleştirici Faktör A	Fibronektin bağlama
<i>clfB</i>	Kromozom	Kümeleştirici Faktör B Laktoferrin BP	Fibronektin bağlama Laktoferrin bağlama
Kapsül polisakkaritleri			
<i>cap5</i>	Kromozom	Polisakkarid kapsül	Antifagositoz
<i>cap8</i>	Kromozom	Polisakkarid kapsül	Antifagositoz
Sitotoksinler			
<i>Hla</i>	Kromozom	α -hemolizin	Hemolizin, sitotoksin
<i>Hlb</i>	Kromozom	β -hemolizin	Hemolizin, sitotoksin
<i>Hld</i>	Kromozom	δ -hemolizin	Hemolizin, sitotoksin
<i>Hlg</i>	Kromozom	γ -hemolizin	Hemolizin, sitotoksin
<i>lukS/lukF</i>	Bakteriyofaj	PVL lökotoksin	Lökotoksin
Süperantijenler			
<i>Sea</i>	Bakteriyofaj	Enterotoksin	Besin zehirlenmesi, TŞS
<i>Seb</i>	SaPI3	Enterotoksin	Besin zehirlenmesi, TŞS
<i>Sec</i>	SaPI4	Enterotoksin	Besin zehirlenmesi, TŞS
<i>Sed</i>	Plazmid	Enterotoksin	Besin zehirlenmesi, TŞS
<i>Eta</i>	ETA faj	Eksfoliyatif toksin A	Haşlanmış deri sendromu
<i>Etb</i>	Plazmid	Eksfoliyatif toksin B	Haşlanmış deri sendromu
<i>Tst</i>	SaPI1, 2, <i>bov</i>	Toksik Şok Toksini	Toksik şok sendromu
Enzimler			
<i>splA-F</i>	Kromozom	Serin proteaz benzeri	Proteaz
<i>Ssp</i>	Kromozom	V8 proteaz	Yayıma faktörü
<i>Aur</i>		Metalloproteaz	Yapısal enzim?
<i>sspB</i>		Sistein proteaz	Yapısal enzim?
<i>Scp</i>		Stafopain proteaz	Yayıma, beslenme
<i>Geh</i>	Kromozom	Gliserol ester hidrolaz	Yayıma, metabolizma
<i>Lip</i>		Lipaz	Yayıma, metabolizma
<i>Fme</i>	Kromozom	FAME	Yağ asidi metabolizması
<i>Plc</i>		Fosfolipaz C	Yayıma faktörü
<i>Nuc</i>	Kromozom	Nükleaz	Metabolizma
<i>Hys</i>	Kromozom	Hyaluronidaz	Yayıma faktörü
<i>Coa</i>	Kromozom	Koagülaz	Koagülasyon
<i>Sak</i>	Bakteriyofaj	Stafilokinaz	Plazminojen aktivatörü

Genom Yapısı

S. aureus, gen çalışmaları en çok kullanılan mikroorganizmadır. *S. aureus*'un kromozomal haritasının ortaya konması 1975 yılında NCTC 8325 suşunda yapılan çalışmalarla başlamıştır²⁴. Sonraki çalışmalarda Pulsed Field Jel Elektroferez (PFGE) ve sekans hibridizasyon dizi analizi tekniklerinin gelişmesiyle bu suşun genomunun fiziksel haritası çıkarılmıştır²⁵.

S. aureus genomu yaklaşık 2.8 mega baz çifti (bç) uzunluğundadır ve genomun %84.5'ini oluşturan 2600 *Open Reading Frame (ORF)* bölgesi içermektedir. G+C oranı %33'tür. Antibakteriyel direnç ve virülans faktörleri fajlar, plazmidler, patojenite adacıkları ve SCC genleri tarafından kodlanmaktadır²⁵.

Karşılaştırmalı genom çalışmalarında, *S. aureus* N315 suşu ile *Bacillus subtilis* veya *Bacillus halodurans*'ın kromozomlarının %50'den fazlasının benzer olduğu gösterilmiştir. Bu benzerlik iki mikroorganizmanın aynı atadan geldiklerini ve daha sonra farklılaştıklarını düşündürmektedir. Değişmemiş olan genlerin, büyüme, karbonhidrat metabolizması ve çoğalmadan sorumlu olan genler oldukları tespit edilmiştir. Farklılaşan genler ise sadece *B. subtilis*te bulunan spor yapma ile ilgili genler ve *S. aureus*'ta bulunan virülans ve adaptasyonla ilgili genlerdir. *S. aureus*'un diğer genlerinin yaklaşık %40'ı henüz bilinmeyen veya global gen data bankasındaki proteinler ile benzerlik göstermeyen dizilerden oluşmaktadır²⁶.

S. aureus; yüzeyinde bulunan faj reseptörleri nedeniyle özgül fajlarla lizise duyarlılıklarına göre 4 gruba ayrılmakta ve epidemiyolojik çalışmalarda önemli olan bu özellikleri kullanılmaktadır. Örneğin grup 2 (faj tip 3A, 3B, 3C, 55 ve 71 faj reseptörlerini içerir) daha sık eksofoliyatif toksin salgılayarak deri enfeksiyonlarına neden olmakta iken; grup 1 (faj tip 29, 52, 52A, 79 ve 80 faj reseptörlerini içerir) daha sık Toksik Şok Sendromu Toksini-1 (TŞST-1) salgılayabilmektedirler¹⁹.

Virülans Faktörleri

S. aureus virülansı en yüksek olan stafilokok türüdür. Ancak enfeksiyon olup olmaması mikroorganizmanın virülansı ile konak savunma sisteminin oluşturacakları dengeye bağlıdır. Stafilokokların virülansında rol oynayan faktörler; kapsül, hücre duvar yapıları, yüzey proteinleri, toksinleri ve enzimleridir¹¹.

Kapsül

Klinik örneklerden izole edilen *S. aureus* izolatlarının %90'dan fazlasında polisakkarit yapıda bir mikrokapsül bulunmaktadır. İn vitro olarak saptanabilse de in vivo şartlarda daha belirgin hale gelmektedir. Elektron mikroskopi çalışmalarında kapsül formasyonu kalp pillerinde, peritoneal ve intravenöz kateterlerde gösterilmiştir. Bu ekzopolisakkarit, bakteriyi fagositozdan korur ve konak hücrelerine, özellikle de kateterler gibi yabancı cisimlere adherensini kolaylaştırır¹⁷.

Stafilokoklarda 11 mikrokapsüler polisakkarit serotipi tanımlanmıştır. Bunlardan tip 5 ve tip 8 insanlardaki *S. aureus* enfeksiyonlarının %70-80'inde görülmektedir. Penisiline dirençli *S. aureus* suşlarının büyük çoğunluğu tip 5 kapsül içerirken, toksik şok sendromu toksini üreten suşların çoğunda tip 8 kapsül bulunmaktadır. Tip 1 ve tip 2 serotipler oldukça fazla miktarda kapsül oluşturmakta ve kültür plaklarında mukoid koloni şeklinde görünmektedirler. Ancak bu serotipler klinik örneklerden nadiren izole edilirler¹⁷.

Hücre Duvarı

S. aureus'un hücre duvarı 3 bölümden oluşmaktadır.

- 1- Peptidoglikan tabaka
- 2- Teikoik asit
- 3- Yüzey proteinleri

Peptidoglikan tabaka

Peptidoglikan tabaka hücre duvarının esas yapısını oluşturmaktadır. Hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilerde bulunan karmaşık bir makromoleküldür. Peptidoglikan; birden fazla tabakadan oluşmuş dayanıklı ve kompleks bir yapıdır. Sitoplazmik membranın dışında yer alır, bakteriyeye şekli verir ve onu ozmotik basınçtan korur. Çok sayıdaki çapraz bağ içeriği, hücre duvarının sağlamlığını artırarak konak savunmasına katkı yapar ve farklı fiziksel koşullara karşı koyabilmesini ve canlı kalabilmesini sağlar²⁷.

Diğer Gram pozitif mikroorganizmalarla benzer olarak *S. aureus*'un da hücre duvarının %50'sinden fazlası peptidoglikandır. İnsan hücrelerinde bulunmayıp bakteri hücresinde bulunduğundan antibakteriyel ilaçlar için iyi bir hedef oluşturmaktadır²⁷.

Bu tabaka üç bölümden oluşur. Bunların ilki β 1-4 glikozid bağları ile bağlanan N-asetil glukozamin (NAG) ve N-asetil muramik asit (NAM) alt

gruplarından oluşan disakkarid yapısıdır. İkinci tabaka NAM'a bağlı D ve L aminoasitlerinden oluşmuş pentapeptid zincirdir. Bu pentapeptid yapısı sırasıyla; L-alanin, D-glutamat, L-lizin, D-alanin, D-alanin şeklindedir. Üçüncü sıradaki L-lizin stafilokoklar ve streptokoklar için tipiktir ancak diğer birçok mikroorganizmalarda ve Gram negatif mikroorganizmalarda bunun yerine diaminopimelik asit bulunur. Son tabakada ise pentapeptid yan zincirleri, pentaglisin köprüleri ile birbirlerine çapraz bağlanır. Çapraz bağlar hücre duvarının sağlamlılığı ile yakından ilişkilidir ve bu bağların yapısı türler arasında farklılık gösterir. *S. aureus*'ta çapraz bağlantı oranı yüksektir ve bu özellik bakterinin lizozim enzimine karşı dirençli olmasını sağlar¹⁶.

Transglikozilaz; disakkarid pentapeptidlerin birbirlerine bağlanmalarını sağlar. Transpeptidaz; pentapeptid köprüler oluşturarak peptidoglikan yapının retiküler bir yapı kazanmasını sağlar. D-karboksipeptidaz; pentapeptid yapısındaki son D-alaninin zincirden ayrılmasına neden olur. Beta-laktam antibiyotikler, peptidoglikan sentezini, spesifik olarak karboksipeptidaz 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. *S. aureus*'ta PBP1, PBP2, PBP3, PBP4 olmak üzere dört tane PBP vardır²⁸.

Peptidoglikan tabaka, adhezyon molekülleri, fibronektin-bağlayan protein, kollajen-bağlayan protein ve kümeleştirici faktör gibi birçok molekül için bağlantı bölgesidir¹⁹.

Teikoik asit

Hücre duvarında ikinci bölüm teikoik asittir. Hücre duvarı ağırlığının %30-50'lik kısmını oluşturur. Teikoik asit suda eriyebilen, fosfodiester bağları ile bağlanarak uzun zincirler oluşturan, antijenik yapıda, şeker-alkol-fosfat polimerleridir. Peptidoglikan tabakasındaki NAM molekülüne fosfodiester bağlarıyla kovalent olarak bağlanmıştır. Hücre duvarında aktif enzimlerin ve diğer proteinlerin bağlandığı yer olarak *S. aureus*'un metabolizmasında oldukça önemli fizyolojik görevleri vardır. Stafilokokların türe özgü antijenleri teikoik asitlerdir. Mukozalarda bulunan özgül reseptörleri (fibronektin, fibrinojen, laminin, trombospondin, vitronektin, elastin, sialoprotein ve kollajen) ile birleşerek stafilokokların konağa adherensini sağlar^{10,16}.

Ribitol teikoik asit ve lipoteikoik asit olmak üzere iki tiptir. Ribitol teikoik asit hücre duvarından uzanır. Lipoteikoik asit (Gliserol teikoik asit) ise hücre membranından uzanır. Lipoteikoik asitte, ribitol teikoik asitten farklı olarak poligliserol fosfat bulunmaktadır ve plazma membranındaki diaçilgliserol molekülleriyle bağlanarak bütünlüğün korunmasına yardımcı olur. Lipoteikoik asit, makrofaj ve diğer bağışıklık hücrelerinden sitokinlerin salınımını başlatarak inflamasyonda rol oynar^{10,20}.

Yüzey proteinleri

Protein A, elastin, kollajen, kümeleşme faktörü (clumping faktör) ve fibronektin bağlayan proteinler, hücre duvarı yerleşimi ve kimyasal yapı açısından birbirlerine benzeyen stafilkoksik yüzey proteinleridir. Bu proteinler stafilkokların konak dokularında kolonize olmasında en önemli faktörlerdir¹¹.

Protein A, peptidoglikan yapının en dışındaki hücre duvarı komponentidir ve bu yapı sadece *S. aureus*'ta bulunmaktadır. Yüzey proteinlerinin bir prototipi olan protein A, hücre duvarının yaklaşık %7'sini oluşturur. Büyük bir kısmı peptidoglikan yapıya kovalan olarak bağlanmıştır. Bir kısmı ise hücre dışı ortama salınmaktadır. En önemli özelliği, IgG3 dışındaki tüm IgG ve IgA2 ile bazı IgM'lerin Fc reseptörleri ile birleşebilmesidir. Bu şekilde mikroorganizmayı fagositoza karşı korumaktadır. Ayrıca hücre dışına salgılanan protein A aynı reseptörlere bağlanarak komplemanın aktive olmasına neden olur¹¹.

Protein A'dan başka birçok yüzey proteini de virülansta rol oynar. Bunlardan bazıları tablo 3'te gösterilmiştir²⁰.

Tablo 3. *S. aureus*'un bazı yüzey proteinleri²⁰.

Gen	Protein	Fonksiyon	Enfeksiyondaki rolü
<i>spa</i>	Protein A	Antikorların Fc parçasına bağlanır	Deneysel sepsis
<i>clfA</i>	Kümeleştirici faktör	Fibrinojene bağlanma	Deneysel osteoartrit
<i>clfB</i>	Kümeleştirici faktör	Fibrinojene bağlanma	Deneysel endokardit
<i>cna</i>	Kollajen bağlayan protein	Kollajene bağlanma	Deneysel osteoartrit
<i>fna</i>	Fibronektin bağlayan protein	Fibronektine bağlanma	Deneysel endokardit
<i>fnb</i>	Fibronektin bağlayan protein	Fibronektine bağlanma	İnvazyon
<i>sdrC</i>	Serin-aspartat tekrar proteini	Fibronektine bağlanma	-
<i>sdrD</i>	Serin-aspartat tekrar proteini	Muhtemelen fibrinojene bağlanır	-
<i>sdrE</i>	Serin-aspartat tekrar proteini	Muhtemelen fibrinojene bağlanır	-
<i>pls</i>	Plazmine duyarlı protein	Nazal mukoza hücrelerine bağlanma	Nazal mukozada kolonizasyon
<i>fmtB</i>	Metisiline direncini etkileyen protein	Muhtemelen hücre duvarı yapısında rol oynar	Metisilin direncinin ortaya çıkmasına katkı sağlar
<i>sasA</i>	Protein A yüzey proteini	Bilinmiyor	-
<i>sasA</i>	Protein A yüzey proteini	Bilinmiyor	-
<i>sasB</i>	Protein B yüzey proteini	Bilinmiyor	-
<i>sasC</i>	Protein C yüzey proteini	Bilinmiyor	-
<i>sasE</i>	Protein E yüzey proteini	Bilinmiyor	-
<i>sasF</i>	Protein F yüzey proteini	Nazal mukoza hücrelerine bağlanma	İnvaziv hastalıklarla ilişkili
<i>sasG</i>	Protein G yüzey proteini	Bilinmiyor	İnvaziv hastalıklarla ilişkili
<i>sasI</i>	Protein I yüzey proteini	Bilinmiyor	-
<i>sasJ</i>	Protein J yüzey proteini	Bilinmiyor	-
<i>sasK</i>	Protein K yüzey proteini	Bilinmiyor	-

Enzimler

1- Katalaz: *S. saccharolyticus* ve *S. aureus subsp. anaerobius* hariç tüm stafilokoklar tarafından üretilen, hidrojen peroksidi (H₂O₂) oksijen ve suya ayırıştırıran bir enzimdir. Bakteriler, bu enzim sayesinde fagositlerin içinde toksik oksijen radikalleri tarafından öldürülmeye direnç kazanır¹⁷.

2- Koagülaz: Stafilokoklar tarafından üretilen bir plazma pıhtılaşma proteinidir. Serbest koagülaz ve bağlı (clumping factor) koagülaz olmak üzere iki

tip koagülaz bulunur. Serbest koagülaz, “*coagulase-releasing factor (CRF)*” ile birleşerek trombine benzer yapıdaki stafilotrombini oluşturur. Bu molekül fibrinojeni aktive ederek fibrin polimerizasyonunu başlatır. Bu şekilde mikroorganizmanın çevresi sıkı bir fibrin yumağı ile sarılmış olur. Böylece *S. aureus* konak bağışıklık sisteminin fagositer hücrelerinden korunmuş olur. Bağlı koagülaz (Clumping factor, kümeleştirici faktör); fibrin ve fibrinojene bağlanma ve enzimatik aktivite ile fibrinojeni fibrine dönüştürme yeteneğindedir. Bunun sonucu mikroorganizma serbest koagülazda olduğu gibi bir fibrin ve fibrinojen ağı ile sarılarak fagositoya karşı kendini korumuş olur¹⁰.

3- Hyalüronidaz: *S. aureus* suşlarının %90'ı tarafından üretilir. Konak bağ dokusu matriksinde asit mukopolisakaritlerden olan hyalüronik asiti parçalayarak mikroorganizmanın kolayca yayılmasını sağlar. Antijenik özelliğe sahip bir enzimdir¹⁰.

4- Fibrinolizinler (stafilokinaz): Plazmada bulunan plazminojeni aktif formu olan plazmine dönüştürürler. Plazmin; fibrin polimerlerini çözer ve komşu dokulara yayılımı sağlar¹⁰.

5- Lipaz: Tüm *S. aureus* ve bazı koagülaz negatif stafilokoklar tarafından salgılanmaktadır. Bu enzim dokuda bulunan lipid yapıyı parçalayarak bakterinin deri ve deri altı bölgelere yerleşmesini ve hyalüronidaz ile birlikte dokulara yayılmasını sağlamaktadır¹⁰.

6- Fosfolipaz C (Phosphatidyinositol-specific Phospholipase C, Lesitinaz): Hücrelerin kompleman ve onun biyoaktif ürünlerine karşı duyarlılığını artırır ve bunun sonucu olarak hücreler daha çabuk parçalanır. Özellikle erişkin tip solunum zorluğu sendromu ve dissemine intravasküler koagülasyon tanısı bulunan hastalardan izole edilen suşlarda saptanan bir enzimdir. Bu suşlar antimikrobiyal ajanlara özellikle de penisiline daha dirençlidir^{17,29}.

7- Deoksiribonükleaz ve fosfodiesteraz: *S. aureus* suşlarının %90'dan fazlasında bulunurlar. Her iki enzim de hem endo hem ekzonükleaz aktivitesine sahiptir. Nükleik asitleri 3'-fosfomononükleotidlere parçalayan fosfodiesterazlardır. DNase ısıya dirençli bir enzimdir^{17,18}.

8- Beta-laktamaz (penisilinaz): *S. aureus* en az 3 farklı tip β -laktamaz üretmektedir. β -laktamazlar, β -laktam halkasındaki amid bağına parçalayarak β -laktam antibiyotiklerin etkilerini inhibe ederler. Penisilin, ampisilin ve diğer β -

laktam antibiyotiklere karşı gelişen direncin büyük kısmı bu yolla ortaya çıkmaktadır. Bu direnç geni esas olarak plazmidlerle taşınmaktadır¹⁶.

9- Slime faktör: Amorf kapsül yapısında, glikokaliks materyali olup %40 karbonhidrat, %27 protein içermektedir. Çok kuvvetli antijenik yapıda olduğundan, tavşanlara enjekte edildiğinde çok yüksek titrede antikor cevabı elde edilir. Slime pozitif stafilokok suşlarının daha virülan ve antibiyotiklere daha dirençli oldukları bildirilmektedir. Slime faktör hücresel immün yanıtı baskılar, opsonizasyonu, nötrofil kemotaksisini ve nötrofil fagositozunu inhibe eder^{11,17}.

Toksinler

I- Sitolitik Toksinler

Stafilokoklar, konak hücre morfolojisini ve/veya fonksiyonunu etkileyen çok sayıda ekstrasellüler toksin üretebilir. Bu toksinler sayesinde stafilokoklar yoğun enflamatuar yanıt olan bölgelerde üremelerini sürdürebilirler. Bunlardan en iyi tanımlananları hemolizinler ve lökosidindir¹¹.

A- Hemolizinler: *S. aureus* antijenik özellik bakımından farklı dört adet hemolizin üretmektedir. Bunlar; α (alfa), β (beta), δ (delta), γ (gama) hemolizinler olarak isimlendirilirler¹¹.

1- Alfa hemolizin (Alfa toksin): *S. aureus*'un en sık oluşturdukları hemolizin tipidir. 33 kDa ağırlığında olup üremenin geç logaritmik fazında salgılanmaktadır. Bakteriyel kromozomlarda ve plazmidlerde kodlanmaktadır. Hücre membranında porlar açılmasına neden olarak potasyum ve diğer küçük moleküllerin hücre dışına çıkmalarına, sodyum ve kalsiyum iyonlarının hücre içine girmelerine neden olur. Sonuçta ozmotik denge bozularak hücre lizise uğrar. Alfa-hemolizin özellikle tavşan olmak üzere birçok hayvan eritrositleri, trombositler, polimorfonükleer lökositler ve makrofajlar üzerine oldukça toksik etkilidir. Monositler bu toksine dirençlidirler. Antijeniktir ve antitoksini ile etkisi sonlandırılabilir. *S. aureus*'un koyun kanlı agarda yaptığı β hemoliz, büyük ölçüde α -hemolizin tarafından oluşturulmaktadır¹⁶.

2- Beta hemolizin (Beta toksin, sfingomiyelinaz C): Stafilokokal sfingomiyelinaz olup 35 kDa ağırlığındadır. En iyi koyun eritrositlerine, daha az olarak da insan ve tavşan eritrositlerine litik etki gösterir. Aktivitesi için magnezyum iyonuna gereksinimi vardır. 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 toksoid haline getirilebilir¹⁶.

3- Gama hemolizin (Gama toksin): 3 kDa ağırlığındadır. *S. aureus* suşlarının %97'sinden fazlasında, koagülaz negatif stafilokokların %50-70 kadarında bulunmaktadır. Deterjan benzeri bir etkiye sahip küçük moleküllerin agregatıdır. Hücre membranında zamanla genişleyen kanallar açarak sitoplazma içeriğinin dışarı sızmasına yol açar^{10,11}. Özellikle stafilokokal kemik enfeksiyonlarında kanda bu toksine karşı antikor düzeyinin yüksek bulunması, toksinin bu hastalıklarda etkili olduğunu düşündürmektedir^{17,28}.

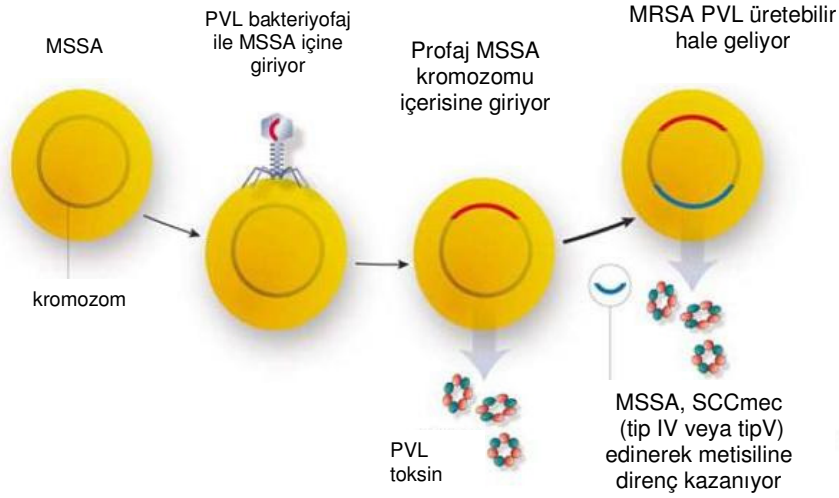
4- Delta Hemolizin (Delta toksin): S ve F olmak üzere iki farklı bileşenden oluşur. Diğer hücrelerin yanı sıra lökositleri de lizise uğratabildiği için *lökosidin* olarak da bilinir. Hücre membran bütünlüğünü bozar ve adenilat siklazı aktive ederek cAMP salınımına neden olur. Bu enzimatik aktivite, Stafilokoksik Toksik Şok Sendromu (STŞS) 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 bulunabilmektedir¹⁷.

B- Panton-Valentine Lökosidin (PVL): Lökosidinler; γ -hemolizinle birlikte *S. aureus* suşlarının %99'unda üretilmekte ve *luk-E*- *luk-D* ve *Luk-M* adı verilen gen bölgelerinde kodlanmaktadır. Lökosit membranlarında porlar oluşturarak toksik etki göstermektedirler¹⁸.

PVL, tanımlanmış birkaç γ -hemolizin homologundan biridir. γ -hemolizin hemen hemen bütün *S. aureus* suşlarında yapılmasına karşın PVL suşların %2-3'ünde üretilmektedir. Gama hemolizin kanlı agar besiyerlerinde gösterilemez. Bu durum agarın inhibitör etkisine bağlıdır³⁰.

PVL, ökaryotik hücre membranında porlar oluşturmak suretiyle tavşan ve insan lökositleri ile makrofajlarını parçalamakta ve fagositozu engellemektedir. Virülansta önemli role sahiptir ve ilk olarak toplum kaynaklı (TK) MRSA izolatlarında saptanmıştır. İki farklı PVL proteini üç farklı γ -hemolizin ile kombinasyonlarla çift komponentli, altı farklı toksin meydana getirir. Bu toksinler değişen derecelerde hemolitik aktiviteye sahip olmakla birlikte hepsi de

etkin şekilde lökosit lizisine neden olurlar ve *S. aureus*'un kromozomuna entegre olmuş profajlarla taşınmaktadır³⁰ (Şekil1).



Şekil 1. PVL üretebilen TK-MRSA'nın ortaya çıkışı³¹.

PVL ve γ -hemolizin komponentlerinin *S. aureus* genomunun farklı iki bölgesi tarafından kodlanmakta olduğu ve sonuçta iki farklı toksin ürettiği anlaşılmıştır. İki toksini de üretebilen *S. aureus* suşları, üç S bileşeni (*HlgA*, *HlgC* ve *LukS-PV*) ve iki F bileşeni (*HlgB* ve *LukF-PV*) kodlayan gen bölgelerine sahiptir^{32,33}.

PVL'yi kodlayan genler *lukS-PV* ve *lukF-PV* olarak adlandırılır. Her iki bileşen de kristal özelliktedir. *LukS-PV* ve *lukF-PV*, *S. aureus* genomunun iki bağımsız *ORF* bölgesini içeren *EcoRV* lokusunda yer almaktadır. PVL proteinlerinin lökotosik olduğu ancak hemolitik aktivitelerinin olmadığı ortaya çıkarılmıştır. *LukS-PV* gen bölgesi, 32 kDa molekül ağırlığında, 312 aminoasit ve 28 sinyal peptidi içermektedir. *LukF-PV* proteini ise 325 aminoasit ve 24 sinyal peptidi içermektedir. Moleküler ağırlığı 34 kDa'dır³⁴.

γ -hemolizin ve PVL alt gruplarının tek başlarına hemolitik ve lökotosik aktiviteleri yoktur. Ancak ikili gruplar haline geldiklerinde eritrositler üzerine değişik derecelerde litik etkileri olabilmektedir. En yüksek hemolitik aktivite, *HlgA-HlgB* kompleksinde görülmüştür. Bununla birlikte altı kombinasyonun hepsinin lökositler üzerine oldukça etkili biçimde toksik etkileri vardır. PVL,

inflamatuvar yanıtı γ -hemolizinler'den daha güçlü uyarmaktadır. Toksin yapısındaki S alt grup, F alt gruba göre, inflamatuvar yanıtı daha güçlü uyarmaktadır³⁵.

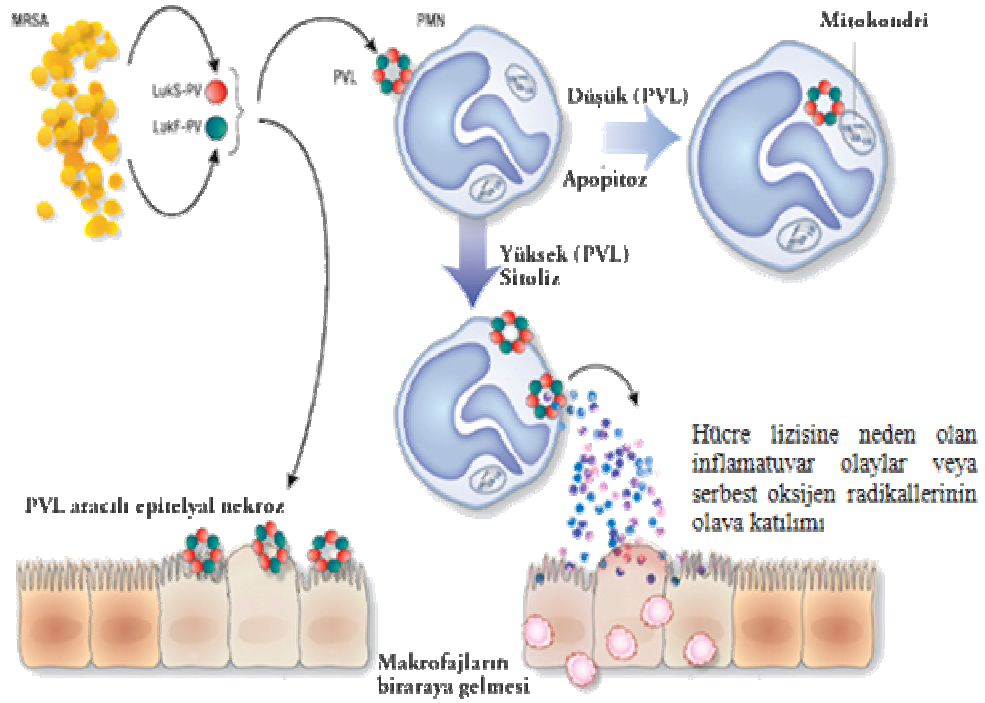
S. aureus suşlarının sadece %2-3'ünde üretilen PVL'nin fronküloz, primer cilt apseleri ve ciddi deri nekrozlarıyla giden enfeksiyonlar ve özellikle çocuklarda görülen ciddi nekrotizan pnömoni gibi hastalıklarla ilişkili olduğu gösterilmiştir. İnsan polimorfonükleer lökositleri (PMNL) ve makrofajları üzerine güçlü litik etkileri nedeniyle PVL'nin önemli bir virülans faktörü olduğu düşünülmektedir³². PVL üreten TK-MRSA suşları da üretmeyenlere oranla daha ciddi seyreden enfeksiyonlara neden olurlar. Örneğin pnömonilerle ilişkili PVL pozitif *S. aureus* enfeksiyonlarında sepsis, yüksek ateş, lökopeni, plevral effüzyon ve ölüm daha sık görülmektedir. Benzer şekilde deri ve yumuşak doku enfeksiyonları ve nekrotizan pnömoniyeye neden olan epidemik TK-MRSA suşlarının PVL pozitif olduğu da gösterilmiştir. PVL'nin patogenezdaki etkileriyle ilgili kanıtlar sınırlıdır. Ancak PVL'nin toksik etkisiyle lizise uğrayan lökositlerden açığa çıkan otolitik enzimler ve serbest oksijen radikallerinin doku nekrozuna neden olduğu düşünülmektedir^{31,36}.

PVL'nin S ve F komponentleri *S. aureus* tarafından ayrı ayrı salgılanmaktadır. Başlangıçta *lukS*-PV bileşeni PMNL üzerine henüz bilinmeyen bir reseptöre bağlanır. Bunu, *lukF*-PV bileşeninin S komponenti üzerine bağlanarak dimer yapının oluşumu izler. Sırasıyla *lukS*-PV ve *lukF*-PV bileşenleri birbirleri üzerine bağlanarak PMNL lizisine neden olan heptamer halka yapısını oluşturur. *LukS*-PV bileşeni PMNL üzerine bağlandığında protein kinaz tarafından fosforile edilir ve Ca^{+2} kanalları aktive olur. Bu durum interlökin ve diğer inflamatuvar mediatörlerin üretimi ve salınımı için tetik sinyali oluşturur. Ortamda bulunan PVL konsantrasyonu fazla ise, hücre membranında porlar oluşarak PMNL'ler lizis olur. Ancak PVL konsantrasyonu az ise, PVL'ye özel bir yolakla hücre apoptoza uğrar (Şekil 2). Bu olayın mitokondri membranında por oluşumu nedeniyle ortaya çıktığı düşünülmektedir³⁶.

PVL pozitif *S. aureus* suşlarının neden olduğu nekrotizan pnömonilerde sıklıkla nötropeni saptanır. Bu durum PVL'nin PMNL üzerine sitolitik etkileri ile açıklanmaktadır^{37,38}.

PVL'nin doku nekrozu ve ağır sepsisteki rolü henüz aydınlatılamamıştır. PVL ile ilişkili lizis ve apoptoz, *S. aureus*'un konak savunmasının ilk

basamağından kurtulmasını açıklayabilir ancak epitel hücreleri PVL'ye dirençlidirler. PMNL lizisiyle ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri ve lizozomal granüllerdeki hidrolitik enzimlerin bu süreçte etkili olabilecekleri düşünülmektedir³¹.



Şekil 2. PVL'nin doku nekrozundaki rolü³¹.

II- Enterotoksin

Mide asidi, enzimleri ve ısıya dirençli, 100°C'ye 30 dakika dayanabilen, polipeptid yapısında maddelerdir. *S. aureus*, 15'ten fazla süperantijen özelliği gösteren enterotoksin üretmektedir. Enterotoksin; makrofaj ve yardımcı T hücrelerinden, sırasıyla IL-1 ve IL-2 salınımını uyarıp, sindirim kanalında bir süper antijen olarak davranır. *S. aureus* suşlarının %35-50'sinin bu toksinleri oluşturabildiği saptanmıştır. Özellikle pasta, kek gibi karbonhidratlı ve proteinli besinler üzerinde üreyen stafilkoklar tarafından salgılanır. Ortamda CO₂ olması toksin üretimini artırmaktadır. Enterotoksin A, B, C, D, E, H ve I şeklinde isimlendirilirler¹⁰. Besin zehirlenmelerinde en sık karşılaşılan tipler enterotoksin

A ve D'dir. Enterotoksin B pseudomembranöz enterokolite neden olmaktadır^{17,28}.

III- Eksfoliyatif Toksin (ET) (Eksfoliyatin, Epidermolitik Toksin)

Antijenik ve biyokimyasal özelliklerine göre iki tipe ayrılır. Eksfoliyatif toksin A (ET-A); ısıya duyarlı ve plazmid orijindir, eksfoliyatif toksin B (ET-B) ise ısıya dirençlidir ve yapısal geni kromozomaldır. Bu iki protein biyokimyasal ve immünolojik olarak farklı olmasına rağmen benzer biyolojik aktiviteye sahiptir. Stafilokoklar ET-A veya ET-B proteinlerinden birisini ya da her ikisini salgılayabilirler^{17,28}.

Her iki toksin de proteolitik özelliğindedir. ET, proteolitik etki ile derinin stratum granulozum tabakasında desmoglein I reseptörlerine bağlanıp intrasellüler mukopolisakkarit matriksin çözülmesine neden olur. Bunun sonucu olarak stratum granulozum, alt tabakalardan ayrılır. Derinin bu görünümü yanık benzeri bir tablo oluşturur. Bu tabloya "stafilokokal haşlanmış deri sendromu (SHDS) " ya da "Ritter Sendromu" adı verilir. Toksinler tek başlarına aktiftirler. Dolayısıyla herhangi birini salgılayan *S. aureus* suşları SHDS'ye neden olabilirler. Nadir olarak görülen SHDS, daha çok çocuk yuvaları gibi küçük grupları etkilemektedir. ET-A ve ET-B proteinlerini kodlayan *eta* veya *etb* gen bölgeleri taşıyıcılığının, tüm stafilokokal taşıyıcılığa göre daha az oranda olması (%0-2) bu durumu açıklayabilir²⁰. Eksfoliyatif toksinin sitolitik aktivitesi olmadığından enfeksiyon bölgesinde güçlü inflamatuvar yanıt görülmez²⁰.

IV- Toksik Şok Sendromu Toksini-1 (TŞST-1)

TŞST-1 22 kDA molekül ağırlığında, ısı ve tripsin gibi proteazlara dirençli, stafilokokal süperantijenler olarak bilinen toksin grubunun bir parçasıdır. Süperantijenite özelliği, antijenik özgüllüğe gerek olmaksızın direkt olarak T lenfositlerin proliferasyonunu ve sitokinlerin salınımını stimüle etme yeteneğidir. Bu toksinlerin hepsi de MHC class II molekülü yoluyla poliklonal T lenfositlerin proliferasyonuna neden olmaktadır³⁹. TŞST-1; sistemik olarak salınır ve TŞS neden olur. T lenfosit proliferasyonu ve monositlerden IL-1 salınımını uyarır. Lenfosit ve monositlerden salınan sitokinlerin, hızlı sistemik yayılımları, TŞS'deki multisistem organ yetmezlikleri ile sonuçlanmaktadır. *S. aureus* suşlarının %5-25'i TŞST-1 geni taşır. Son yıllarda KNS'lere bağlı toksik şok sendromu da bildirilmiştir¹⁷.

TŞS'nin, yüksek emicilik özelliği olan tamponların kullanımıyla ilişkisi 1980 yılında tanımlanmıştır. Bu tamponların kullanımlarının ve satılmalarının yasaklanması ile birlikte vaka sayısında ve mortalitede azalma görülmüştür¹⁸.

***Staphylococcus aureus*'un Neden Olduğu Hastalıklar**

S. aureus'un neden olduğu hastalıklar 3 grupta toplanabilir.

a) Deri ve Yumuşak Doku Enfeksiyonları

- Follikülit, fronkül ve karbonkül
- İmpetigo
- Selülit
- Hidradenitis süpürativa,
- Mastit
- Yara enfeksiyonları

b) Toksinlere Bağlı Olarak Ortaya Çıkan Enfeksiyonlar

- TŞS
- SHDS
- Besin zehirlenmesi

c) Sistemik Stafilokok Enfeksiyonları

- Bakteriyemi ve endokardit, perikardit
- Menenjit
- Pulmoner enfeksiyonlar
- Kemik, kas ve eklem enfeksiyonları

Deri ve Yumuşak Doku Enfeksiyonları:

Follikülit; kıl folikülü kanallarının tıkanması ile karakterize, kendi kendini sınırlayan iyi huylu enfeksiyon odağıdır. Küçük, kızarık ve ağrılıdır. Sistemik belirti vermez¹⁰.

Fronkül; yüz, boyun, koltuk altı, kalçalar gibi kıl foliküllerinin yoğun olduğu bölgelerde daha sık görülmektedir. Ağrılı, sert, ortasında nekrotik bölümü olan kabarık lezyonlardır. İçerisinde püy birikir ve bazen spontan olarak, bazen de cerrahi insizyon ile drene olur. Lezyon hızlı bir şekilde geriler. Bazen çevresinde kendiliğinden inokülasyon sonucu uydu nodüller oluşabilir. Genç yetişkinlerdeki fronküloz vakaları ile PVL üreten *S. aureus* arasında ilişki bulunmuştur. Böyle vakalar kısa zamanda hayatı tehdit edici nekrotizan pnömoni riski altında olabilirler¹⁰.

Karbonkül; fronkül gibi kıl foliküllerinden başlar ancak deri altı dokulara da ulaşabilen, daha derin yerleşimli lezyonlardır. Ağrılı, kızamık nodül olarak başlar. Hızla ilerleyerek 1 cm çapında, hipertrofik skar dokusu ile çevrili, sert nodüller oluşur. Üzerinde birden fazla püü drenaj delikleri bulunabilir. Genellikle ense, yüz, boyun, aksilla, bacak üst kısımları ve gluteal bölgelerde görülür. Sıklıkla otoinokülasyondan kaynaklanan ikinci bir odak vardır. Uzun süre tekrarlayan lezyonlar görülebilir. Sistemik bulgular olmasa da, bazen bakteremiye neden olabilir. Tekrarlayan ve tedaviye dirençli karbonkül vakalarında, nazal taşıyıcılık ve ailesel bağışıklık sorunları araştırılmalıdır¹⁰.

İmpetigo; en sık stafilokoklarla ortaya çıkmaktadır ancak %20'si *Streptococcus pyogenes* tarafından oluşturulur. Genellikle çocuklarda görülen, yüz ve eller gibi vücudun açık bölgelerini tutan, yüzeysel derinin enfeksiyonudur. Hastalık önce bir makül olarak başlar. Zamanla makül üzerinde içi yoğun sıvı ile dolu veziküller oluşur. Veziküller çabucak yırtılarak ayrılır ve çevresinde eritem olan, yaklaşık 1cm çaplı, tabanları ıslak görünen, tipik sarı kurutlarla kaplı lezyonlar şeklinde görülür. Veziküller eritemlerle seyreden diğer hastalıklarla (Herpes simplex virüsü gibi) karıştırılabilir de hastalığın başlangıcı tipiktir. Sistemik semptomlar gözlenmez ancak bölgesel lenfadenopati görülmesi kuraldır. Yüksek oranda bulaşıcılığı olduğundan dolayı, antimikrobik tedavi başlanana kadar hasta çocuğun diğer çocuklardan izole edilmesi gerekmektedir. Ortak eşyaların kullanılması ve direkt temasla bulaşır. İmmün yetmezliklerde daha ağır ve atipik seyredebileceği unutulmamalıdır²⁰.

Selülit; deri ve deri altı bağ dokusunun enfeksiyonudur¹⁰.

Hidradenitis Süpürativa; koltukaltı, perine ve genital bölgelerde görülen, ter bezlerinin piyojenik enfeksiyonudur. Lezyonlar fronkül benzeri gruplar halinde görülür. Birden fazla drenaj açıklığı olabilir. Skar bırakarak iyileşir¹⁹.

Mastit; daha çok emziren annelerde ve doğumdan sonraki ilk 2-3 haftada ortaya çıkar. Görülme sıklığı %1-3'tür. Meme üzerinde kızarıklık, şişlik, sertlik ve ağrı vardır. Süt kanallarında apse oluşumları vardır ve yoğun bir akıntı tabloya eşlik eder. Yüksek ateş ve genel semptomlar görülebilir^{18,19}.

Yara enfeksiyonları; *S. aureus*'a bağlı olarak %15-20 oranında görülmektedir. *S. aureus* deride kolonize olabilen bir bakteridir, bu nedenle cerrahi sonrası oluşan yara enfeksiyonlarında özel bir öneme sahiptir^{10,20}.

Cerrahi sonrası enfeksiyonlar, insizyon bölgesinde iki gün veya daha sonra ortaya çıkan ödem, eritem ve ağrı ile karakterizedir. Lezyonun büyüklüğüne göre sistemik semptomlar görülebilir. *S. aureus*'a bağlı yara enfeksiyonlarına predispozan faktörler arasında; yaş, şişmanlık, diyabet, beslenme bozuklukları, bağışıklık sistemi bozuklukları, steroid ya da immünsüpresif ilaç kullanımı, uzun süreli hastane yatışları ve vücudun başka bir bölgesinde *S. aureus* enfeksiyonu ya da kolonizasyonu sayılabilir. Enfeksiyonun dokulara invazyon derecesine bağlı olarak klinik belirtiler gözlenir¹⁹.

Toksinlere Bağlı Olarak Ortaya Çıkan Enfeksiyonlar

TŞS; tampon kullanımı, vajinal enfeksiyonlar, gebeliği önleyici rahim içi araç kullananlar, düşüklükler, doğum, cerrahi yara enfeksiyonları ve osteomyelitler sonrasında görülebilen bir hastalıktır. Olguların %50'sinde TŞST-1 üreten *S. aureus* suşları sorumlu iken diğer %50'sinden enterotoksin B ve C üreten suşların sorumlu olduğu anlaşılmıştır. Şiddetli kas ağrısı, ateş, kusma ve ishal en belirgin semptomlardır. Güneş yanığına benzer yaygın eritem, konjonktival kızarıklık, hipotansiyon, hipovolemik şok görülür¹⁰⁻¹².

SHDS; çoğunlukla yeni doğan ve bir yaşın altındaki çocuklarda görülür. *S. aureus*'un eksfoliyatif toksini sorumludur. Erişkinlerde nadiren görülür. Nazofarenks, göbek veya üriner sistemde enfeksiyon oluşturan, epidermolitik toksin üreten *S. aureus* suşları, enfeksiyonun 24-48. saatinde deride yaygın büller oluşturur. Sağlam görünen deri hafif bir sürtünme ile soyulur hale gelir (Nikolsky belirtisi). Daha sonra içleri steril duru sıvı ile dolu büller oluşur. Sonra büller parçalanır, yerlerinde yaygın, kırmızı, nemli, çıplak bölgeler kalır. 3-5 gün içinde soyulan yerler kurur ve 10 günde yeni epidermis ile kaplanarak çoğu kez iyileşir. Fakat ciddi sıvı ve elektrolit kaybı sonucu hipovolemi ve sepsis oluşabilir^{10,12}.

Besin zehirlenmesi; genellikle yiyecek işçilerinin ellerinde kolonize olmuş *S. aureus* suşlarının yiyeceklere bulaşması ve bu yiyecekler üzerine salgılanan ısıya dirençli enterotoksinlerin yiyeceklerle birlikte tüketilmesi ile ortaya çıkar. Genellikle bol karbonhidratlı ve sütlü tatlılar, tavuk eti, patates salataları ve dondurma gibi yiyeceklerle bulaşmaktadır. Besinler genel olarak normal görünüşte ve kokudadırlar. Kısa bir inkübasyon sürecinden (2-6 saat) sonra bulantı ve kusma ile başlamaktadır. Daha sonra bulantı kusmanın eşlik ettiği karın ağrısı ve sulu ishal başlar. Ateş ve nörolojik bulgular tipik olarak

bulunmaz. Salgınlar halinde görülmektedir. Hastalık daha çok stafilokokal enterotoksin A, B ve C ile oluşur¹⁹.

Sistemik Stafilokok Enfeksiyonları

Bakteriyemi; hastane kaynaklı (HK) ve toplum kaynaklı (TK) olmak üzere iki grupta incelenmektedir. Hastane kaynaklı bakteriyemiler hastaneye yatıştan 48-72 saat sonra ya da hastaneden çıkıştan sonraki ilk 10 gün içerisinde başlayan bakteriyemileri ifade eder. Toplum kaynaklı bakteriyemiler ise hastaneye yatışta var olan ya da ilk 24-72 saat içerisinde başlayan bakteriyemileri ifade eder. Uzun süre hastanede yatış *S. aureus*'a bağlı bakteriyemi olasılığını artırmaktadır. HK-MRSA bakteriyemilerinde mortalite oranı %80 civarındadır¹⁹. TK-MRSA'lara bağlı bakteriyemiler ise genellikle sellülit, osteomyelit ve pnömoni gibi bir odaktan kaynaklanırlar. Hastalık genellikle ürperme ve titremelerle başlar. Fizik muayenede ateş, peteşiler ve subkonjonktival hemoraji yanında ileri olgularda nekrotik deri lezyonları ve ekstremitelerde gangren görülebilir^{10,12}.

Endokardit; en çok mitral kapağı tutar, ancak aort kapağı tutulumunda prognoz daha kötüdür. Yüksek ateş, kalpte yeni üfürümler veya üfürümlerde değişme, yaygın metastatik enfeksiyonlar ve emboliler, miyokardiyal abse, perikardit ve akut bakteriyel menenjit hızla gelişebilir^{10,12}.

Perikardit; penetran göğüs travması sonrası veya hematojen yayılımla meydana gelir. Septisemi ve endokardit sırasında ani göğüs ağrısı, perikardiyal sürtünme sesi, kontrol edilemeyen kalp yetmezliği perikarditi düşündürmelidir^{10,12}.

Menenjit; bakteriyemi komplikasyonu, travma veya intratekal implant kolonizasyonu sonucu görülür. Klinik özellikleri diğer bakteriyel menenjitlerle aynıdır^{10,12}.

Pulmoner enfeksiyonlar; aspirasyon veya hematojen yayılım sonrası meydana gelir. Akciğer absesi ve plevral empiyem gibi komplikasyonlara yol açabilir. Toplumdan kazanılmış *S. aureus* pnömonileri genellikle influenza epidemilerinden sonra görülür. Hastane kökenli *S. aureus* pnömonileri ise genellikle entübasyon sonrası veya aspirasyona bağlı görülür^{11,12}.

Osteomyelit; yenidoğanda umbilikal enfeksiyon sonrası hematojen yayılımla ve özellikle alt ekstremitelerde görülür. Yüksek ateş ve uzun kemiklerin metafiz bölgesinde ağrı ile ortaya çıkar. Yetişkinlerde ise *S. aureus*

bakteriyemisi daha çok vertebral osteomyelitte neden olur. Ateş, bel ağrısı sık görülür. Etkilenen vertebraların perküsyonu şiddetli ağrıya neden olur. Komşuluk yoluyla oluşan osteomyelit genellikle cerrahi ve travma sonrası görülür. Genellikle erken dönemde dışarı fistülize olur. Protez eklem enfeksiyonlarında erken dönemde etken *S. aureus*'tur. Protez enfeksiyonu yeni bir operasyonla protezin değiştirilmesini gerektirir^{10-12,40}.

Septik artrit; için puberte öncesi yaş grubunda başlıca etken *S. aureus*'tur. Yetişkinlerde de bakteriyemi sonrası özellikle romatoid artritli kişilerde septik artrit görülmektedir. Eklem şiş, sıcak ve ağrılıdır. Hareket ve dokunmak ağrıya yol açar. En sık diz, kalça, el bileği, omuz ve parmak eklemlerinde görülür^{11,40}.

Septik bursit; daha çok dirsek ve diz eklemlerinde görülür. Çevresindeki deri kızarıklık, sıcak ve ödemlidir ancak eklem rahatça hareket edebilmektedir. Etken genellikle travma sonrası direkt olarak bulaşır⁴⁰.

Piyomiyozit; iskelet kasının pürülan bir enfeksiyonudur. Ateş ve kas ağrısı ile gider. Tutulan kaslar ağrılı şiş ve tahta sertliğindedir. Sıklıkla künt travma hikayesi bulunur⁴⁰.

S. aureus'un Laboratuvar Tanısı

a) Koloni Morfolojisi ve Mikroskopik Görünüm

Klinik örnekler koyun kanlı agara ekilir. Kontamine örneklerdeki organizmanın izolasyonu için örnekler, "Columbia kolistin nalidiksik-asit besiyeri (CNA)" veya "Feniletıl alkol agar (PEA)" gibi Gram negatif bakterilerin üremesini inhibe eden besiyerlerine ekilmelidir. Ayrıca *S. aureus*'un selektif izolasyonu isteniyorsa %7,5 sodyum klorid eklenmiş agarlı besiyeri de kullanılabilir. Mannitolü *S. aureus* fermente eder, diğer stafilokoklar fermente edemez. "Mannitol salts agar" nazal kültür gibi örneklerde *S. aureus*'un varlığını tayin eden iyi bir selektif besiyeridir¹².

S. aureus koyun kanlı agar besiyerinde, 37°C'de, 24 saatlik inkübasyon sonunda 1-3 mm çapında, düzgün parlak ve konveks yüzeyli, sarı-turuncu pigmentli görünüme sahip S tipi koloniler şeklinde ve genellikle β-hemoliz yapmış olarak görülürler. Bu hemolizin nedeni, sitotoksinler özellikle de α-hemolizin'dir. Gram boyama ile üzüm salkımına benzer kümeler şeklinde, güçlü Gram pozitif boyanmış koklar olarak görülürler¹⁰.

Uzun süre antibiyotik tedavisi alan hastalarda ya da kistik fibrozis gibi altta yatan persistan hastalığı olanlarda *S. aureus*, “small koloni varyant” olarak bilinen atipik koloniler şeklinde üreyebilir. Bu koloniler genellikle çok küçük ve pigmentsizdirler ve karbondioksit varlığında daha iyi ürerler¹⁰.

S. aureus'un izolasyonu için kromojenik substrat içeren besiyerleri de kullanılmaktadır. *S. aureus* kolonileri CHROMagar'da leylak renginde, IDagar'da ise yeşil renkte görülürler. Bu besiyerlerinde kolonilerdeki renk değişikliğinin nedeni organizmanın üremesi sırasında α -glukozidaz üretiminin bir sonucudur. KNS'ler ise bu besiyerlerinde mavi, beyaz veya bej renginde koloniler oluştururlar¹⁰.

b) Katalaz Testi

Hidrojen peroksiti (H_2O_2) su ve oksijene ayrıştırmaya yarayan katalaz enziminin gösterilmesi için yapılır. Stafilokoklar katalaz pozitifdir. Stafilokok ve mikrokoklar katalaz testi ile streptokok, enterokoklardan ayrılırlar. Bu test sitokrom oksidaz enzimlerinin varlığını tespit eder. Katalaz testi lam üzerinde %3 hidrojen peroksit ve 1-2 bakteri kolonisi karıştırılarak yapılır. Köpürme şeklinde gaz çıkışı varsa pozitif olarak değerlendirilir. Hızlı ve kuvvetli köpürme, H_2O_2 'nin su ve oksijene dönüşümünün göstergesidir. Kırmızı kan hücreleri zayıf pozitif katalaz reaksiyonuna sebep olmaktadır. Bu nedenle testin, kan içermeyen besiyerinde üreyen kolonilerden yapılması uygundur. Stafilokokların nadir suşları katalaz negatif olabilir ve bazı enterokoklar pseudokatalaz üreterek H_2O_2 ile zayıf tepkimeye girebilirler¹⁰.

c) Koagülaz Testi

S. aureus koagülaz pozitifdir ve koagülaz testi *S. aureus*'u diğer stafilokoklardan ayırt etmede en yaygın kullanılan ve genel olarak kabul gören bir tanı testidir. Bağlı koagülaz ve serbest koagülaz olmak üzere iki farklı koagülaz enzimi vardır

Koagülaz testi, tüp ve lam testi olmak üzere iki şekilde yapılabilir. Her iki test için EDTA'lı tavşan plazması önerilmekle birlikte insan plazması da kullanılabilir¹⁰.

1-Tüp koagülaz testi: Stafilokokların besiyerine salgıladıkları serbest koagülaz araştırılır. Bu madde plazmada bulunan “coagulase reacting factor” (CRF) ile ilişki kurar ve trombokinaza benzeyen bir etki ile fibrinojeni pıhtılaştırır. Tavşan veya insan plazması kullanılır. 1/5 dilüe edilmiş 1 ml plazma ile 1-3

koloni mikroorganizma tüpte karıştırılır ve 37°C'de 4-5 saat inkübasyondan sonra plazmanın koagülasyonu izlenir. Test sonucunun fazla bekletilmeden belirlenmesi gerekmektedir. Çünkü stafilokokların salgıladıkları diğer bir enzim olan fibrinolizinler, plazmin oluşumunu sağlayarak tüpte oluşmuş koagülasyonu eritmektedirler. Bu durum yanlış negatif sonuçlara neden olur. Sitrata metabolize eden bazı mikroorganizmaların (örneğin *P. aeruginosa*, *S. marcescens*, bazı enterokoklar) yalancı pozitif sonuç verebilmesi nedeniyle sitratlı plazmanın kullanımı uygun değildir^{10,17}.

2-Lam koagülaz testi: Bu test ile bağlı koagülaz (kümeleştirme faktörü-clumping factor) gösterilmektedir. Bağlı koagülaz kültür filtratlarına geçmez, hücreye bağlıdır. Etkinliğinin ortaya çıkması için CRF'ye gereksinim yoktur. Besiyerinden öze ile alınan stafilokok 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. Negatif sonuç çıktığında mutlaka serbest koagülaz testi yapılmalıdır. Bağlı koagülaz tespiti için ticari olarak üretilen hızlı sonuç veren lateks aglütinasyon testleri de mevcuttur. Ayrıca Protein A'ya, fibrinojene ve *S. aureus*'ün spesifik antijenlerine bağlı IgG'ler ile kaplı lateks partikülleri ile tasarlanmış testler de mevcuttur^{10,17}.

d) DNase Testi (Deoksiribonükleaz Testi)

DNase ve termonükleaz varlığı, metakromatik agar difüzyon prosedürü ve DNA toluidine blue agar kullanılarak tespit edilebilmektedir. *S. aureus* DNase ve termonükleaz pozitifdir. Bu test genellikle koagülaz negatif *S. aureus* izolatlarının tanısında yardımcıdır⁴¹.

e) Mannitol Fermantasyonu

S. aureus yüksek tuzlu ortamlarda üreyebilir. *S. aureus*, *S. epidermidis* ve birtakım diğer koagülaz negatif suşlar mannitolü fermente ederler. Bu özellikten epidemiyolojik çalışmalarda *S. aureus* nazal taşıyıcılarının taranmasında faydalanılır. Kullanılan besiyeri "Mannitol Salts Agar"dır. Bu besiyeri %1 mannitol, %7.5 NaCl, fenol kırmızısı ve pepton içerir. Yüksek tuz konsantrasyonu diğer organizmaların üremesini engeller (enterokoklar dışında). Besiyerine ekimi yapılan kolonilerin 18-24 saat sonra üremeleri tuzlu ortamlarda üreyebildiklerini, kolonilerin etrafında oluşan sarı renk ise mannitolü fermente ederek asit oluşturduklarını göstermektedir¹⁰.

f) Otomatize Yöntemler

Gram pozitif ve Gram negatif birçok bakterinin identifikasyon ve duyarlılık sonuçlarının belirlenmesinde kullanılan otomatize sistemler bulunmaktadır. Sistemde Gram pozitif ve negatif mikroorganizmaların identifikasyon ve duyarlılık kartları farklıdır. Vitek 2 Gram pozitif identifikasyon kartı (GP) (BioMerieux) ile çoğu önemli Gram pozitif bakterinin identifikasyonu amaçlanmıştır. GP kartı ile identifikasyon, biyokimyasal metodlara ve yeni geliştirilmiş substratlara dayanmaktadır. Sistemde karbon kaynağı kullanımı, enzimatik aktivite ve direnci ölçen 43 biyokimyasal test mevcuttur. İdentifikasyon sonuçları yaklaşık olarak 8 saat içinde verilmektedir. Ayrıca RapiDEC Staph (BioMerieux), API-ID 32 Staph (BioMerieux), Microscan Rapid POS Combo panel (Dade/MicroScan) gibi birçok firmanın ürettiği identifikasyon panelleri bulunmaktadır^{17,42}.

g) Moleküler Testler

Koagülaz ve diğer biyokimyasal testlerde şüpheli sonuçlar elde edilen suşlar için moleküler yöntemlerin kullanılması gerekebileceği gibi, metisilin/oksasilin duyarlılığında belirsiz sonuçlar elde edildiğinde de bu yöntemlere başvurulabilir⁴³.

S. aureus'un tanısı için kullanılan moleküler yöntemlerin çoğu PZR bazlıdır. Nükleaz (*nuc*), koagülaz (*coa*), protein A (*spa*), *femA* ve *femB*, *Sa442*, 16 S rRNA ve yüzey ilişkili fibrinojen bağlayan protein genleri gibi türe özgü bölgeleri amplifiye eden birçok primer geliştirilmiştir⁴⁴. Mevcut ticari gerçek zamanlı PZR'nin başarısı ispatlanmıştır. Bu ve diğer alternatif moleküler metotlar, son yıllarda tanı ve duyarlılık testlerini kombine ederek geliştirilmiş ve rutin laboratuvarların kullanımına sunulmuştur. Fakat bu yöntemlerin ek maliyet yükünden dolayı, diğer yöntemlerle şüpheli sonuçlar alındığı zaman doğrulama amaçlı yapılması önerilmektedir⁴³.

Antibiyotik Direnci

Stafilokoklara bağlı enfeksiyonlarda penisilinin kullanıma girmesi bir umut olmakla birlikte kısa bir süre sonra gelişen penisilin direnci bu umutları boşa çıkarmıştır. Daha sonra geliştirilen metisilinin de kullanıma girmesinden sadece bir yıl sonra bu antibiyotiğe dirençli ilk suş tanımlanmıştır. Özellikle hastane kaynaklı enfeksiyonların önde gelen sebeplerinden biri olan MRSA, hayatı tehdit eden ciddi enfeksiyonlara neden olmaktadır. Son zamanlarda toplumda da çeşitli enfeksiyonlardan MRSA suşları izole edilmeye başlanmıştır. Bu TK-

MRSA suşları HK-MRSA suşlarına göre antibiyotiklere daha duyarlı olmalarına rağmen, bazıları PVL gibi toksinler üreterek daha virülan olabilmektedir. TK-MRSA suşları nekrotizan pnömoni gibi ciddi enfeksiyonlarda oluşturmalarına rağmen sıklıkla deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarından izole edilmektedirler^{45,46}.

S. aureus klinik kullanımda olan antibiyotiklerin çoğuna direnç geliştirme yeteneğindedir. Tüm dünyada çeşitli antibiyotiklere karşı değişik direnç oranları rapor edilmiştir. Direnç gelişiminde pek çok mekanizma rol oynamaktadır. Bunlardan en önemlileri patojenite adaları ve hareketli gen kaset gruplarıdır⁴⁶ (staphylococcal cassette chromosome-SCC) .

Patojenite Adaları

Birçok patojenik faktör plazmidler, bakteriyofajlar, transpozonlar ve integronlar ile; konjugasyon, transdüksiyon ve transformasyon gibi mekanizmalar ile aktarılmaktadır. DNA dizi analizi çalışmaları sayesinde bu hareketli gen gruplarına ek olarak "Patojenite Adaları (PA)" adı verilen ve bakteri kromozomu üzerinde belirli bölgelerde bir araya gelmiş gen gruplarının varlığı gösterilmiştir. PA insan, hayvan ve bitki patojeni birçok bakteride gösterilmiş ve virülansa katkıları ispatlanmıştır. Bununla birlikte patojen olmayan bazı suşlarda da PA'nın varlığı gösterilmiş ve virülansa katkısı olmasa da bakteriye çoğalma, fiziksel koşullara adaptasyon ya da bağışıklık sisteminden kaçış gibi özellikler kazandırdığı düşünülen bu yapılara ekolojik adalar (EA) adı verilmiştir⁴⁶.

PA bir veya daha çok virülans faktörü taşımaktadırlar. Bunlardan bazıları; kapsül polisakkaritleri, endotoksin, bazı ekzotoksinler, sekresyon sistemleri ve demir kullanımı ile ilgili genlerdir. PA bunlardan başka antibiyotik direnç genlerini de taşıyabilirler²⁰.

PA bakteri kromozomunun dışında, bakteriyofajlar ve plazmidler gibi ekstrakromozomal DNA yapıları içerisinde de bulunabilirler. PA'nın moleküler ağırlığı 10-200 kb arasındadır. Genellikle bakteri kromozomundan farklı G+C oranına ve farklı kodon kullanım özelliğine sahiptirler. Bu durum PA'nın başka bir kaynaktan kazanıldığını düşündürmektedir⁴⁷.

Tüm genom yapıları tanımlanmış olan *S. aureus* suşlarında birkaç PA tanımlanmıştır. PA1 ve PA2, TŞST-1'i kodlayan genleri içermektedir. PA3 ve PA4 ise çok sayıda enterotoksini kodlayan genleri içermektedirler⁴⁷.

S. aureus, PA benzeri ancak toksin genlerinden başka gen dizileri taşıyan yapıları da barındırmaktadır. Bunlar, antibiyotik direnç genleri taşıyan SCCmec grubu, kapsül genlerini taşıyan diğer SCC gen grubu ve adherens protein kodlarını içeren *PAbap* grubudur²⁰.

SCCmec Gen Grubu

SCC; stafilokok türleri arasında genetik madde alışverişine aracılık eden hareketli bir elemandır. KNS türlerinde ve MSSA izolatlarında da bulunmaktadır. Yapı olarak PA'lara benzemekle birlikte, hiç virülans geni içermemektedir. *mecA* geni, SCCmec adı verilen ve SCC ailesinin metisilin direnci açısından özelleşmiş bir üyesinde bulunmaktadır. Bu genomik adacıklarda, *mecA* geninden başka, diğer antibiyotiklere dirençten sorumlu genler, insersiyon gen dizileri ve fonksiyonları henüz tanımlanmamış genler de yer alır. MSSA suşları SCCmec içermemektedirler. *mec* geni içermeyen SCC'ler de vardır ve stafilokok türlerinde gen aktarımı için oldukça uygundur. *mecA* içermeyen SCC'ler daha çok mikroorganizmanın stres durumlarında hayatta kalmasına yardımcı olan genleri taşımaktadırlar^{1,48}.

SCCmec ve SCC, bakteri kromozomuna yerleşme ve ayrılmadan sorumlu olan "*cassette chromosome recombinase*" (*ccr*) genleri ve yapılarının genetik bileşenleri ile sınıflandırılırlar. SCCmec kompleksinin hareketi, invertaz/rezolvaz ailesinden olan rekombinazlarca kodlanan *ccr*ler tarafından sağlanmaktadır. Her SCCmec, karakteristik bir *ccr* ve *mec* gen kompleksini içerir. SCCmec; *ccr* ve *mec* genleri dışında çok sayıda transpozon ve entegre plazmid kopyaları ile taşınan, bir veya daha fazla antibiyotik direnç geni de taşımaktadırlar⁴⁹. SCCmec elemanının diğer kısımlarında ise, SCCmec tipleri içinde farklılık gösteren ve junkyard (J) bölgesi olarak adlandırılan çeşitli diziler bulunur. SCCmec'in boyut değişikliklerinin bu nedenle olduğu düşünülmektedir⁴⁸.

Günümüze kadar *ccr* ve *mec* kombinasyonlarına göre beş SCCmec tipi tanımlanmıştır.

SCCmec Tipi: Sınıf B *mec* gen kompleksi ve tipi *ccr* gen kompleksinden oluşmaktadır. Transpozon veya plazmid taşımamaktadır. 34 kb ağırlığındadır. J bölgesinde, virülans faktörü fibronektinin adheransını etkileyen *p/s* geni içermektedir. SCCmec Tip I, *mecA*'dan başka antibiyotik direnç geni taşımamaktadır⁵⁰.

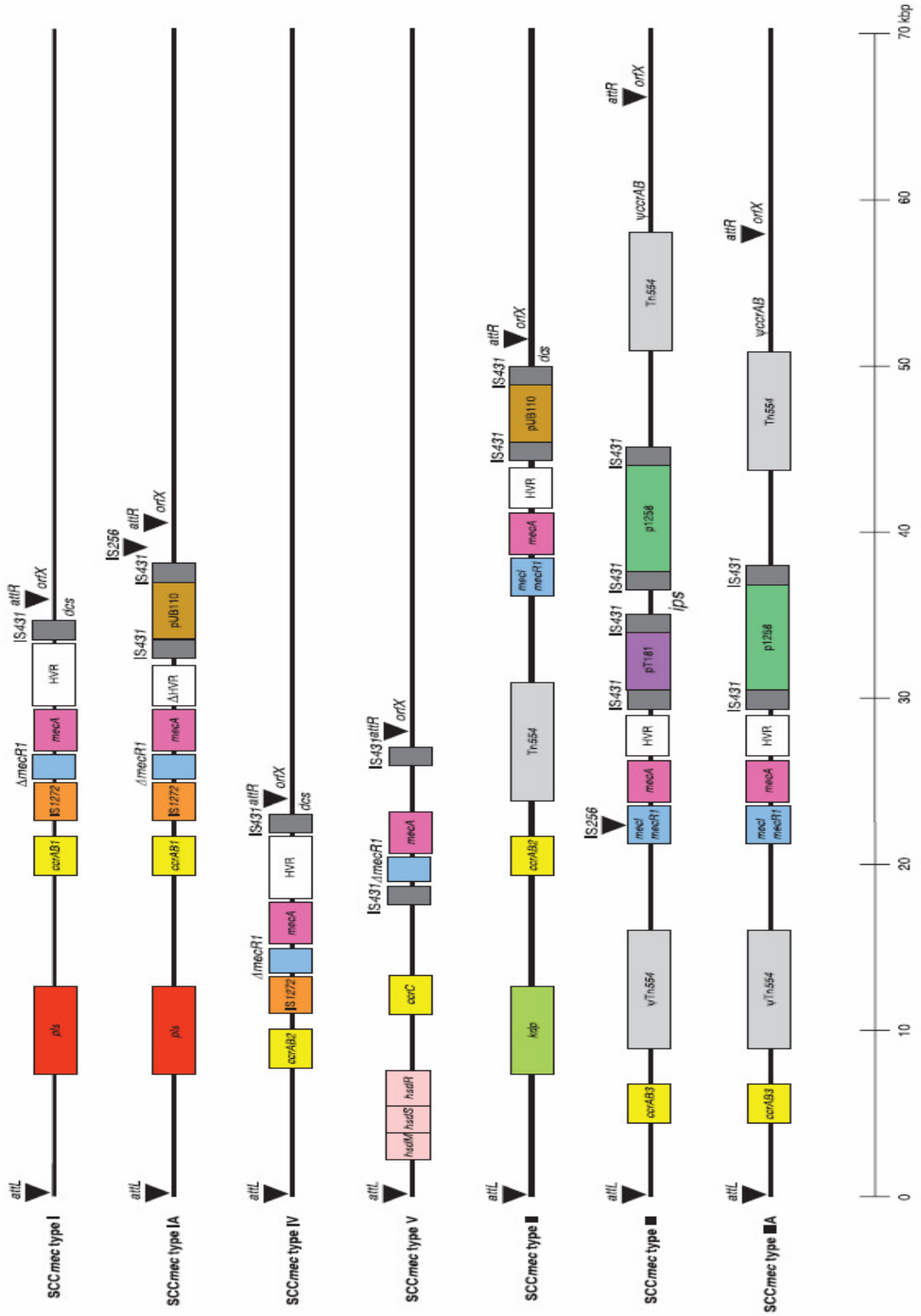
SCCmec TipII: Sınıf A *mec* gen kompleksi ve tipII ccr kompleksinden oluşmaktadır. 53 kb ağırlığındadır ve metisilin direnci oluşturan *mecA* ile *mecR1* genleri dışında J bölgesinde pUB110 plazmidi ve Tn554 transpozonu taşımaktadır. Tn554; makrolid, klindamisin ve streptogramin B'ye karşı dirençten, pUB110 ise aminoglikozidlere karşı dirençten sorumludur. Genellikle hastane kaynaklı enfeksiyonlardan izole edilir, geniş bir direnç spektrumu vardır^{48,51}.

SCCmec TipIII: Sınıf A *mec* gen kompleksi ve tip III ccr gen kompleksinden oluşmaktadır. 66 kb molekül ağırlığı ile beş tipin en büyüğü olup *mecA*, *mecR1* dışında pT181 ve PI258 plazmidi, Tn554 transpozonu ve pseudo Tn554 (Ψ Tn554) taşımaktadır. Diğer tiplerde bulunmayan Ψ ccr geni adı verilen geni de içerir. *SCCmec* tip III genellikle hastane kaynaklı enfeksiyonlardan izole edilmektedir ve oldukça geniş bir direnç spektrumuna sahiptir. Aminoglikozidler, tetrasiklin, makrolid grubu antibiyotikler ve ağır metallere dirençten sorumludur^{52,53}.

SCCmec TipIV: Sınıf B *mec* gen kompleksi ve tip II ccr gen kompleksinden oluşmaktadır. *SCCmec* tip IV diğerlerine göre daha küçük boyutlu, 20-24 kb ağırlığındadır. *SCCmec* tip I, IV ve V *mecA* dışında antibiyotik direnç geni taşımamaktadırlar. Ancak tip IVc varyantı Tn4001 transpozonu içermektedir. Bu transpozon üzerindeki *aacA-aphD* genleri, arbekasin haricindeki aminoglikozid direncinden sorumlu, çift fonksiyonlu AAC/APH proteinini kodlamaktadır. Az sayıda direnç geni içeren *SCCmec* tip IV, genellikle TK-MRSA'larda bulunmaktadır^{52,53}.

SCCmec TipV: Sınıf C *mec* gen kompleksi ile ccrC içermektedir. Ito ve ark. tarafından 2006 yılında tanımlanmıştır. Bu kasetin boyutu 27 kb olup tipIV'den biraz büyüktür. Daha çok TK-MRSA izolatlarında bulunmakta ve sadece metisilin direnci kodlayan genleri içermektedir. Son olarak *SCCmec* tip V'in bir varyantı (V_T) tanımlanmıştır. *SCCmec* tip V_T , IS431 transpozonunda prematür bir stop kodon (tnp') içermesi ile *SCCmec* tip V'ten ayrılmaktadır^{52,53}.

SCCmec tiplerinden, Tip I, II ve III genellikle hastane kökenli, Tip IV ve V ise toplum kökenli MRSA izolatlarında bulunmaktadır. *mecA* dışında direnç geni taşımadıklarından dolayı toplum kaynaklı suşlar genelde beta-laktam dışı antibiyotiklere duyarlıdırlar^{52,54,55}. Stafilokoklarda tanımlanan *mec* tipleri şekil 3'de gösterilmiştir.



Şekil 3. SCC mec tipleri⁴⁸.

Stafilokok enfeksiyonlarında kullanılan antibiyotikler ve direnç mekanizmaları

1- Penisilinaza dirençli penisilinler ve metisilin direnci

Metisilin, nafsilin ve izoksazolil penisilinler (kloksasilin, dikloksasilin, flukloksasilin ve oksasilin) bu grupta yer almaktadır. Bu antibiyotikler beta-laktamazların hidrolizine dirençlidirler. Etkinlikleri stafilokok enfeksiyonları ile sınırlıdır, bu nedenle "anti-stafilokokal penisilinler" de denilmektedir. Mikroorganizmalar ürettikleri β -laktamaz (penisilnaz) enzimi ile β -laktam halkası taşıyan antibiyotiklerin etkilerini inhibe ederler. Bu durum β -laktam halkasının amid bağının hidrolizi yoluyla gerçekleşmektedir. β -laktamazların β -laktam halkasındaki amid bağına ulaşmalarını engellemek için benzilpenisilin yapısındaki fenoksi grubunun yerine metoksi grubunun eklenmesi ile metisilin (2,6-dimetoksifenilpenisilin) sentez edilmiştir. Bir penisilin türevi olan metisilin, β -laktamaz enzimine dirençlidir ve β -laktamaz enzimine dirençli antibiyotikler içerisinde 1959 yılında ilk üretilen ve klinikte ilk kullanılan antibiyotiktir. Ancak ciddi interstisyel nefrit yapma yan etkisinden dolayı sadece laboratuvarlarda kullanılmaktadır. Metisilin kullanıma girmesinden sadece bir yıl sonra İngiltere'de ilk metisilin dirençli stafilokok rapor edilmiştir. In vitro olarak metisiline dirençli bulunan stafilokok suşları, diğer β -laktam antibiyotiklere de dirençli kabul edilir⁵⁶⁻⁵⁸.

MRSA'larda metisilin direnci üç mekanizma ile gerçekleşmektedir;

- 1) Aşırı miktarda β -laktamaz salgılanması.
- 2) Kromozomal metisilin direnci.
- 3) PBP'lerdeki yapısal değişiklikler.

1) Aşırı miktarda β -laktamaz salgılanması: Sınırdaki metisilin direncine neden olmaktadır. Metisilin β -laktamaz enzimine dayanıklıdır. Ancak metisiline direnç gelişimine aşırı miktarda β -laktamaz üretiminin de neden olabileceği gösterilmiştir. Bu suşlar Borderline resistant *S. aureus* (BORSA) olarak adlandırılırlar⁵⁹.

2) Kromozomal Metisilin Direnci: En sık görülen direnç mekanizmasıdır. İntrinsik metisilin direnci olarak bilinir. Metisilin direncinden sorumlu *mecA* genini taşıyan plazmid ve transpozonların bulunduğu gen kaseti, bakteri kromozomuna integre olmaktadır. *MecA* geninin etkisi ile MRSA suşlarında PBP2' ya da

PBP2a denilen yeni bir PBP sentezlenmektedir. PBP2a 78 kDa ağırlığındadır ve β -laktam antibiyotiklere karşı PBP'den daha düşük afinite göstermektedir. Buna bağlı olarak β -laktam antibiyotikler PBP2a'ya bağlanmamakta, böylece bakteri hücre duvarı için gerekli olan peptidoglikan sentezi devam etmektedir¹⁹.

Stafilokoklarda PBP2a sentezinin düzenlenmesinde *mecR1* ve *mecI* adı verilen iki düzenleyici gen önemli rol oynar. Bu genler *mecA* gen transkripsiyonunu düzenlemektedirler⁶⁰.

Sık veya uygunsuz antibiyotik kullanımı *S. aureus* suşlarında kromozomal mutasyonlara veya *mecA* gen sisteminde delesyonlara neden olarak PBP2a'nın devamlı üretilir hale gelmesine neden olabilir. Klinik MRSA izolatlarında *mecI* ve sıklıkla da *mecR1* bölgelerinde delesyonlar ya da *mecI* veya *mecA*'nın promotor bölgesinde mutasyonlar görülmektedir^{60,61}.

Kromozomal metisilin direnci üç şekilde ortaya çıkmaktadır; 1) Homojen direnç; kolonideki her bakterinin aynı ve yüksek derecede metisilin direnci göstermesi durumudur. Hepsinde de *mecA* geni vardır ve PBP2a sentezlenmektedir. 2) Heterojen direnç; daha sık görülen direnç tipidir. Kolonideki tüm bakteriler *mecA* taşırlar ancak 10^6 ile 10^8 bakteriden birinde yüksek metisilin direncine rastlanmaktadır. 3) Eagle-tip dirençte ise suşlar düşük metisilin konsantrasyonlarında metisiline duyarlı iken, yüksek konsantrasyonlarda dirençlidirler. Bu tip direncin, sağlam *mecA* regülatör genlerinin yüksek metisilin konsantrasyonlarında PBP2a sentezini indüklemeleri sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir²⁵.

3) PBP'lerdeki yapısal değişiklikler: Bu değişiklikler orta düzeyde metisilin direncine neden olmaktadır. Bu MRSA suşları β -laktamaz üretmezler ve *mecA* geni taşımazlar. Ancak metisiline dirençlidirler. PBP'lerin yapısındaki mutasyonel değişikliklerle ilgili bir mekanizma olduğu düşünülmektedir. Bunun sonucu olarak PBP'lerin β -laktam antibiyotiklere afiniteleri azalır. Bu tip dirençli suşlara Modified resistant *S. aureus* (MODSA) adı verilmektedir⁶².

Metisilin direncinin düzenlenmesi, esas olarak *mecA* ve varsa *blaZ* genlerinin düzenleyici-sinyal üretici sistemleri ile olmaktadır. Bununla birlikte metisilin direncini etkileyen başka faktörler de vardır. Bu faktörlerden bir tanesi bakteri hücre duvarının yapısı ile ilişkilidir. PBP2a'nın optimal etki gösterebilmesi için NAM ve NAG yapısındaki karbonhidrat yapılarının belirli uzunlukta olması gerekmektedir. Peptidoglikan yapısındaki pentapeptidlerde

oluşan değişiklikler de metisilin direncinde azalmaya neden olmaktadır^{63,64}. Metisilin direncinde “fem faktörleri” adı verilen bir protein grubunu kodlayan genlerin de rol oynadığı düşünülmektedir. Bu genler, “*factors essential for the expression of methicillin resistance*” (*fem*) ya da “auxiliary” (*aux*) olarak tanımlanmışlardır ve *mecA* gen bölgesinden farklı bir bölgede yer almaktadır. Fem faktörleri 20 kadar proteini ifade eder. PBP2a’yı etkilememektedirler. Bunların çoğu peptidoglikan tabakanın yapımında görev alır. Peptidoglikan zincirleri arasına glisin rezidüleri ekleyerek pentaglisin yapıyı oluştururlar. Fem faktörlerinin enzimatik aktiviteleri vardır. Doğrudan ya da direkt olarak metisilin direncine etki ederler^{65,66}.

Ayrıca besiyeri bileşenleri, ortam sıcaklığı, ortamdaki tuz konsantrasyonu, pH ve ozmolarite de metisilin direncini etkilemektedir. İnkübasyon süresinin uzun olması, yüksek tuz konsantrasyonları (%6,5) ve düşük ısı (30-35°C) metisilin direncini artırır. Bu şekilde dış faktörlerin etkili olduğu metisilin direnci, laboratuvarlarda genellikle heterojen direnç fenotipinde görülmektedir^{64,67}.

2- Beta-laktamaz inhibitörlü kombine penisilinler

Ampisilin, amoksisilin, tikarsilin, piperasilin gibi penisilin türevlerinin, klavulonik asit, sulbaktam ve tazobaktam ile kombinasyonu ile beta-laktamaz salgılayan bakterileri etkileyen ilaçlar geliştirilmiştir^{16,57}.

3- Sefalosporinler

Bakteri hücre duvarı sentezinde rol oynayan PBP'lere bağlanarak inhibisyon yoluyla etki gösterirler. PBP'lerde meydana gelen değişiklikler sonucu sefalosporinlere direnç gelişir. Yapı ve antimikrobiyal etkinliklerine göre dört kuşak altında toplanırlar. Birinci kuşak sefalosporinler, metisiline duyarlı stafilokoklara (MSSA) en etkili gruptur. Ancak hiç bir sefalosporin kuşağının MRSA üzerine etkinliği yoktur^{68,69}.

4- Aminoglikozidler

Bakteri ribozomunun 30S subunitine bağlanarak protein sentezini bozarlar. Gentamisin, netilmisin ve tobramisin stafilokoklara karşı en aktif aminoglikozidlerdir. Rifampin gibi; aminoglikozidlerin de tek başlarına kullanımları, yüksek direnç gelişme riski nedeniyle kısıtlıdır. β-laktam antibiyotikler ve vankomisin ile sinerjistik etki göstermeleri nedeniyle birlikte kullanılmaları önerilmekle birlikte; in vitro olarak sinerjistik etkileşim görülmesine

rağmen in vivo olarak bu etki bilinmemektedir¹. Tobramisin MRSA suşlarına etkisizdir. Çünkü *mecA*, yapısında tobramisin direncinden sorumlu *aadD* geni içermektedirler. Bazı MRSA suşlarıncı plazmid ve transpozonlarda bulunan genler aracılığıyla aminoglikozid modifiye edici enzim sentez edilir. Bu enzimatik inaktivasyon aminoglikozidlere karşı direnç oluşumunda en önemli mekanizmadır. Ayrıca gentamisine karşı plazmid kaynaklı direnç de yaygın olarak görülmektedir^{68,70}.

5- Tetrasiklinler

Ribozomun 30S subunitine bağlanıp aminoasit-tRNA'yı bloke ederek protein sentezini inhibe ederler. Stafilokoklarda tet (K), tet (L), tet (M) olmak üzere üç direnç geni bulunmaktadır. tet(M) geni minosiklin ve doksisisikline kromozomal direnci kodladığı için klinik açıdan önemlidir^{68,71}.

6- Karbapenemler

Beta-laktam antibiyotikler içinde en geniş spektruma sahip antibiyotiklerdir. Karbapenemlerin Gram pozitif aerob bakterilere etkileri iyidir. MSSA suşlarına etkin, MRSA suşlarına etkisizdirler^{58,72}.

7- Trimetoprim-Sülfametoksazol

Trimetoprim, dihidrofolat redüktaz (DHFR) enzimini inhibe ederek bakterilerde tetrahidrofolat sentezini engeller. Sülfonamidler ise paraaminobenzoik asit analogları olup bu metabolik yolda dihidropteroat sentaz (DHPS) enzimini inhibe ederek tetrahidrofolat sentezini engeller. En sık gözlenen sülfonamid direnci, bakterinin sülfonamidlerin düşük afinite gösterdiği DHPS sentezlemesi olup bu olay plazmid kontrolündedir^{68,73}.

8- Kinolonlar

Nalidiksik asit türevi olan florokinolonlar, DNA girazı ve topoizomeraz IV'ü hedefler. Siprofloksasin ve ofloksasinin klinik kullanıma girdiği ilk yıllarda *S. aureus*'a karşı çok iyi etkinlik gözlenmiş ancak kısa sürede direnç gelişmiştir.

Kinolonlara direnç gelişimi kromozomal mutasyonlar nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Dirençte iki farklı mekanizma rol oynamaktadır. Bu mekanizmalardan biri NorA çoklu ilaç effluks pompasının yapımının indüksiyonudur ve düşük düzeyde kinolon direncine neden olur. Diğer mekanizma ise kinolonların hedefleri olan topoizomeraz IV (*grlA* ve *grlB*) veya DNA giraz (*gyrA* ve *gyrB*) genlerindeki mutasyonlardır. Topoizomeraz IV veya DNA giraz genleri üzerindeki mutasyonlar, enzimlerin yapısında aminoasit

değişimlerine ve kinolonların hedef afinitelerinde düşüşe neden olur. Bu mutasyonlar en sık topoizomerez IV'ün *grlA* alt ünitesi ve DNA giraz'ın *gyrA* alt ünitesinde görülmektedir^{68,74}.

9- Makrolidler, Linkozamidler ve Streptograminler

Bu antibiyotik gruplarının ortak özellikleri, bakteriyel ribozomlara bağlanarak protein sentezini inhibe etmeleridir. Direnç gelişimi üç klasik mekanizma ile gerçekleşir. Bunlar; ilacın hedefinde değişiklik olması, ilacın kendisinin bakteri tarafından inaktivasyonu ve ilacın hücre içerisine alımındaki değişikliklerdir^{18,19}.

Makrolidler grubunda linkomisin ve klindamisin bulunur. Bakteri ribozomunun 50S subunitine bağlanarak protein sentezini bozarlar. En sık görülen direnç mekanizması ribozomal hedefin değişmesidir^{57,74}.

Linkozamidler bakteri ribozomunun 50S subunitine bağlanarak protein sentezini bozarlar. Ribozomal hedefin değişmesi en sık görülen direnç mekanizmasıdır. Klaritromisinin MSSA suşlarına etkinliği eritromisinden daha fazladır. MRSA suşları ise genellikle bu gruba dirençlidir^{57,74}.

Streptograminler moleküler yapılarına göre başlıca A ve B olmak üzere iki gruba ayrılır. Birlikte kullanıldığında sinerjistik etki gösteren bu ilaçlardan; dalfopristin A ve kinopristin B bu grupta yer almaktadır. Bakteriyel ribozomun 50S subunitine bağlanarak protein sentezini sinerjistik olarak inhibe ederler. Hem MSSA hem de MRSA suşlarına etkilidirler^{57,75}.

Ribozomal değişiklikler ve ilacın dışarı pompalanması (effluks sistemi), *S. aureus* suşlarında en sık görülen direnç mekanizmalarıdır. Ribozomal değişiklikler *erm* geni ile ilişkilidir. Bu değişiklik, ilacın ribozomlardaki hedefine afinitesini oldukça düşürmektedir. *erm* geni, plazmidler ve transpozonlar ile aktarılmaktadır. Stafilokoklardaki *erm* geni indüklenebilir özelliktedir. Yani *erm* geni ürünleri ancak ortamda indükleyici ilaçlar varsa sentez edilmektedir^{76,77}.

Effluks sisteminde, *S. aureus* ve koagülaz negatif stafilokoklarda, ATP bağımlı effluks pompasını düzenleyen gen grubunun bir üyesi olan *msrA* adı verilen bir gen rol oynamaktadır. Bu tür dirençte bütün makrolidlere ve streptogramin B'ye direnç (MS tipi direnç) görülür^{18,19}.

10- Kloramfenikol

Bakteri ribozomunun 50S subunitine bağlanarak protein sentezini bozarlar. Direnç mekanizması plazmid kontrolünde sentezlenen ve hücre içi bir enzim olan kloramfenikol asetil transferaz enzim aktivitesidir^{57,68}.

11- Rifampisin

DNA'ya bağımlı RNA polimeraz enzimine bağlanarak bu enzimi inhibe eden ve protein sentezini bozan bakterisidal bir ilaçtır. Diğer antibiyotiklerin daha az ulaşabildikleri doku ve apselere iyi dağılım gösterir. RNA polimeraz enzimini kodlayan rpoB gen bölgesinde oluşan kromozomal mutasyonlar rifampisin direncine yol açar. Bu şekildeki direnç gelişimi tek başına rifampisin kullanımında yüksek seviyede görülmektedir ve bu yüzden MRSA enfeksiyonlarında tek başına kullanımı tartışmalıdır. Diğer antistafilokokal ilaçlarla birlikte MSSA ve MRSA enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılır^{78,79}.

12- Fusidik asit

Bakterinin protein sentezini ribozomlara bağlanmadan inhibe eden steroid benzeri bir antibiyotiktir. Etki mekanizmasının özgüllüğü nedeniyle diğer antibiyotiklerle arasında çapraz direnç görülmemektedir⁵⁷.

13- Oksazolidinonlar

Hem oral hem parenteral kullanılabilme özelliğine sahip olan Linezolid ve Eperozolid bu grubun iki üyesidirler. Ribozomlarda 50S alt birimine bağlanarak 70S başlangıç kompleksinin oluşmasını önlerler. Etki mekanizmalarının farklı olması nedeniyle diğer antibiyotiklerle çapraz direnç göstermezler^{57,80}.

14- Mupirosin

Mupirosin *Pseudomonas fluorescens*'in doğal bir ürünü olan psödomonik asittir. İzolösil-tRNA sentetaz enzimini inhibe ederek stafilokoklar üzerine bakterisidal etki gösterir. Klinikte sadece topikal kullanıma uygun formları mevcuttur. Deri enfeksiyonlarında etken olan stafilokoklara karşı yüksek in-vitro etkinlik gösterir. Mupirosinin lokal olarak burun deliğine uygulanmasının, MRSA'lar dahil *S. aureus* nazal taşıyıcılığının eradikasyonunda etkili olduğu bildirilmektedir. Uzamış ve yüksek doz kullanımlarında mupirosin direnci gelişebilmektedir⁷⁹.

Düşük seviye direnç (MİK >100 µg/ml) bakteri kromozomunda, hedef enzim yapısında değişikliklere neden olan nokta mutasyonları ile ortaya çıkmaktadır ve antibiyotik konsantrasyonunun artırılmasıyla aşılabilmektedir.

Yüksek seviye direnç (MİK >1000 µg/ml), gentamisin direncini kodlayan konjugatif bir plazmid üzerindeki yeni bir izolösil-tRNA sentetaz geni ile ortaya çıkmaktadır. Bu yeni gen, mupirosinin hedefinde yapısal bir değişiklik oluşturarak etkisini inhibe etmektedir. Bu tip direnç ise yüksek doz mupirosin uygulaması ile aşılamaz. Yüksek seviye dirence sahip MRSA suşları nozokomiyal salgınlara neden olabilmektedirler^{79,81}.

15- Glikopeptidler

Vankomisin, teikoplanin, ristosetin, avoparsin bu grupta yer almaktadırlar. Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarı sentezini inhibe ederler. Bu inhibisyonu, hücre duvarı peptidoglikan öncüllerindeki peptidil D-alanin-D-alanin uç kısmına bağlanarak transglikozilaz ve transpeptidaz enzimlerinin hedeflerini bozarak gerçekleştirirler^{57,75}.

Moleküler ağırlığı yaklaşık 1450 Da ağırlığında, suda çözünebilir, trisiklik bir glikopeptid olan vankomisin, diğer glikopeptid antibiyotikler içerisinde klinikte en çok tercih edilendir ve MRSA enfeksiyonlarının tedavisinde ilk seçenektir¹⁹.

Vankomisine az duyarlı *S. aureus* ilk olarak 1997 yılında Japonya'dan bildirilmiştir⁸². Bu suşun vankomisin MİK değeri 8 µg/ml olup, orta düzeyde (intermediate) dirençli *S. aureus* (VISA) olarak tanımlanmıştır. Daha sonra bunu ABD, Fransa, İngiltere ve Almanya'dan bildirilen VISA suşları izlemiştir. Hepsinin de ortak noktası MRSA ve farklı klonal özelliklere sahip olmalarıdır. İlk vankomisin dirençli *S. aureus* suşu 2002 yılında ABD'den bildirilmiştir. MİK değeri ≥ 32 µg/ml olarak ölçülmüştür ve VRSA olarak tanımlanmaktadır⁸³.

VISA ve VRSA direnç tiplerinin ortaya çıkış mekanizmaları farklıdır. VISA suşlarında azalmış duyarlılığın nedeni hücre duvarındaki peptidoglikan yapısındaki değişikliklerdir. Bu suşlarda hücre duvarı daha düzensiz ve kalındır. Bu durum D-alanin-D-alanin rezidülerinin sayısının artmasına neden olmaktadır. Dolayısıyla vankomisin bağlanabileceği daha fazla D-alanin-D-alanin molekülü vardır ve bu durum orta düzeyde vankomisin direnciyle sonuçlanmaktadır. Peptidoglikan yapısındaki değişikliklerin mekanizması henüz bilinmemektedir^{19,20}.

VRSA suşlarında ise direnç mekanizması *vanA* geni varlığına bağlıdır. *vanA* geni varlığında D-alanin-D-alanin yapısı D-alanin-D-laktat olarak değiştirilmektedir. Glikopeptidler bu yeni yapıya daha düşük afinite gösterirler. Bu durum vankomisine direnç ile sonuçlanmaktadır¹⁹.

Metisilin Direncinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

MRSA'lar, nozokomiyal enfeksiyonların en önemli etkenlerindendirler. MRSA'larda çoklu ilaç direnci sık olarak görülmektedir. Bu nedenle metisilin direncinin en kısa sürede doğru olarak saptanması bu enfeksiyonların kontrol altına alınmasında ve tedavisinde doğru antibiyotiğin seçilmesinde büyük önem taşımaktadır.

Metisilin direncinin saptanmasında *mecA* geninin moleküler yöntemlerle saptanması altın standart olarak kabul edilmektedir. Ancak bu yöntemlerin klinik laboratuvarlarda uygulanması zor ve pahalıdır. Bu nedenle klinik laboratuvarlarda stafilokok izolatlarında metisilin direncinin saptanmasında öncelikle fenotipik yöntemler kullanılmaktadır.

Fenotipik Yöntemler

Disk difüzyon yöntemi: En sık kullanılan yöntemdir. İnokulum yoğunluğu McFarland 0.5 standardına eşdeğer olacak şekilde hazırlanır. MHA besiyerine eküvyon ile ekim yapıldıktan sonra diskler yerleştirilir ve 35°C'de 16-18 saat inkübe edilir. Bunun sonucunda, disk çevresinde bakterilerin üremediği dairesel bir inhibisyon alanı oluşur. Bu alanın çapı mm cinsinden ölçülerek 'duyarlı', 'orta duyarlı', 'dirençli' olacak şekilde duyarlılık belirlenir. Diskler arasındaki mesafe en az 2 cm olmalıdır⁸⁴⁻⁸⁶.

CLSI, oksasilin disk difüzyonu için 33-35°C'de 24 saat inkübasyonu önermektedir. Oksasiline dirençli suşlar, diğer tüm Beta-laktamlara in vitro olarak duyarlı görünebilmelerine karşın klinik olarak etkili değildirler. *S. aureus*'ta *mecA* kontrolündeki oksasilin direncini saptamada sefoksitin disk testi, oksasilin disk testi ile benzer sonuçlar vermektedir. Ayrıca sefoksitin disk difüzyon testinin performansı, referans test olarak kabul edilen mikrodilüsyon yöntemi kadar iyi ve okunması daha kolaydır. Eğer *S. aureus*'ta sonuç "orta düzeyde duyarlı" çıkarsa, *mecA* analizi veya PBP2a testi, sefoksitin disk testi, bir oksasilin MIK testi veya oksasilin-tuz agar tarama testi yapılmalıdır. Orta düzeyde duyarlı yerine bu testlerden birinin sonucu bildirilmelidir⁸⁶.

Dilüsyon yöntemleri: Test yöntemlerinin duyarlılıklarını değerlendirmede, dilüsyon metoduyla belirlenen minimal inhibitör konsantrasyon (MIK) değeri, referans metot olarak kabul edilmiştir^{43,84}.

Agar dilüsyon: British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC), %2 NaCl eklenmiş Mueller-Hinton Agar (MHA) veya Columbia agar'ın tercih

edilebileceğini bildirirken, CLSI sadece %2 NaCl'li MHA önermektedir. Her iki yöntem de 24 saat inkübasyon gerektirir. İnkübasyon ısı olarak BSAC 30°C'yi, CLSI ise 33-35°C'yi önermektedir. Oksasilin için 2 mg/L MİK değeri duyarlı, >2 mg/L MİK değeri dirençli suşları gösterir.

Sıvı mikrodilüsyon: CLSI %2 NaCl eklenmiş MH sıvı besiyeri, 5×10^5 inokulum miktarı ve 33-35°C'de 24 saat inkübasyonu önermektedir⁴³.

Breakpoint Yöntemi: Dilüsyon MİK yöntemleriyle temelde aynı olan bu yöntem, hem agar hem de sıvı dilüsyon metotlarını kapsar. Fakat bu test sadece 2mg/L oksasilin şeklinde breakpoint konsantrasyonunu verir⁴³.

Tuz agar tarama: Disk difüzyon yönteminde görülen şüpheli direncin doğrulanması için tavsiye edilen testtir. Bu yöntemde, 6 µg/ml oksasilin ve %4 NaCl içeren MHA besiyerine, McFarland 0.5 standardında bakteri süspansiyonundan eküvyon ile ekim yapılır. Plaklar 24 saat 35°C'de inkübe edilir. Bir tek koloni üremesi dahi suşun metisiline dirençli olduğunu gösterir. Testin duyarlılık ve özgüllüğü oldukça yüksektir. Bu test KNS için önerilmemektedir⁸⁶.

E-test yöntemi: Bakteri süspansiyonu yine McFarland 0.5 standardında hazırlanır ve MHA'ya eküvyon ile ekim yapılır. E-test stribi yerleştirilip, 35°C'de 24 saat inkübe edilir. İnkübasyon süresi sonunda, elips şeklindeki inhibisyon alanının stribi kestiği konsantrasyon MİK olarak belirlenir⁸⁶.

PBP2a Lateks Aglütinasyon Testi: Ticari olarak temin edilir. PBP2a'ya karşı monoklonal antikorlarla kaplanmış lateks partiküllerinin aglütinasyonu esasına dayanır. *S. aureus* için özgüllüğü ve duyarlılığı yüksek ve aynı zamanda 10 dakika gibi kısa bir sürede sonuç verebilen bir testtir. Ancak NaCl içeren besiyerlerinden alınan koloniler için güvenilir değildir⁴³.

Otomatize sistemler: Bu sistemlerden en sık kullanılanı Vitek 2 sistemidir. Bu sistemde Vitek 2 sistem antibiyotik duyarlılık test (AST) kartı, Gram pozitif mikroorganizmaların otomatize kantitatif veya kalitatif duyarlılık testi için kullanılır. Antibiyotik duyarlılık sonuçları sistem tarafından 16-24 saat içinde verilmektedir. VITEK 2 otomatize sistemde *S. aureus* ve KNS'ler için oksasilin MİK değeri CLSI önerileri doğrultusunda rapor edilmektedir (60,121). Otomatize sistemler ile yanlış negatif sonuçlara rastlanmadığı, düşük oranda da olsa yanlış pozitif sonuçların elde edilebileceği bildirilmektedir⁴³.

Moleküler yöntemler

Metisilin direncinin heterojen ekspresyonundan dolayı MRSA suşları, fenotipik metotlarla her zaman doğru olarak tanımlanamamaktadır. Bu nedenle stafilokoklarda, metisilin direncini açığa çıkarmak için PZR ile *mecA* geninin tespiti altın standarttır. PZR yöntemi, fenotipik olarak oksasiline direnci göstermeyen ancak *mecA* geni bulunduran suşları da tespit eder^{43,87}.

PZR, üç değişik sıcaklıkta çalışan basamakların bir döngü halinde tekrarlanması ile gerçekleştirilir. İlk basamak denatürasyondur. Bu basamakta 94°C'ye dek 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 nükleotidleri 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^{86,88,89}.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma yapılmadan önce, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesinden etik kurul onayı alınmıştır (15/05/2009 tarih ve 5/104 no'lu etik kurul kararı).

Örneklerin Toplanması ve İzolasyonu

Bu çalışmada Eylül 2008-Eylül 2010 tarihleri arasında, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında, çeşitli klinik örneklerden; koloni morfolojisi, Gram boyama, katalaz, lam koagülaz, DNase ve oksasilin disk difüzyon testlerinin sonucunda MRSA olduğu saptanan 190 adet *S. aureus* suşu incelemeye alındı.

Hastane yatışının üzerinden en az 2 gün geçmiş olan örnekler hastane kaynaklı olarak kabul edildi. Son 1 ay içinde hastane yatışı olmayan ve polikliniklerden gelen örnekler toplum kaynaklı olarak kabul edildi. Gelen örneklerden 170 adedi hastane kaynaklı, 20 adedi toplum kaynaklıydı.

Klinik Örneklerden İzolasyon ve identifikasyon

Bronko-alveolar lavaj, trakeal aspirat örnekleri, beyin omurilik sıvısı (BOS), asit mayi, plevral mayi örnekleri, yara, apse, idrar örnekleri ve diğer klinik örnekler %5 kanlı agar besiyerine ekildi ve 35-37°C'de, 18-24 saat inkübe edildi. Kan kültür örnekleri Bactec kan kültürü şişelerine alınarak, Bactec 9240 (Becton-Dickinson, USA) otomatize kan kültürü cihazına konuldu ve cihaz pozitif uyarı verene kadar beş gün inkübe edildi. Pozitif kan kültürleri Gram boyama yapılarak stafilokok morfolojisinde olanlara ileri testler yapıldı.

Bakteri üremesi saptanan kolonilerden Gram boyası yapılarak Gram pozitif kok olanlara katalaz, lam koagülaz ve DNase testi uygulandı.

a- Katalaz testi: Eritrositlerde var olan katalaz aktivitesi nedeniyle, çikolata besiyerinden lam üzerine alınmış koloniye %3'lük hidrojen peroksitten (H_2O_2) birkaç damla damlatıldı ve hava kabarcığının oluşması pozitif test olarak kabul edildi. Kontrol suşu olarak *S. aureus* ATCC 25923 kullanıldı.

b- Lam koagülaz testi: Gram pozitif kok olarak boyanan ve katalaz testi pozitif olan tüm izolatlarla uygulandı. Çalışmada, lam koagülaz testi yapılırken insan plazması kullanıldı. Besiyerinden öze ile alınan birkaç koloni, 1ml insan plazması içinde ezildi ve emülsiyon haline getirildi. Koagülasyon oluşup oluşmadığı kontrol edildi. Bu süre içinde pıhtı oluşturmeyen suşlar koagülaz negatif kabul edildi. Lam koagülaz testinde pozitif kontrol olarak *S. aureus* ATCC 25923 suşu kullanıldı.

c-DNAse testi: Mikroorganizma DNAse test agara (Merck, Almanya) ekildi. 35°C'de 18-24 saat inkübe edildi.. Daha sonra koloniler üzerine 1 N HCl döküldü. Berrak zon meydana getirenler DNAse testi pozitif yorumlandı. Pozitif kontrol olarak *S. aureus* ATCC 25923 suşu kullanıldı.

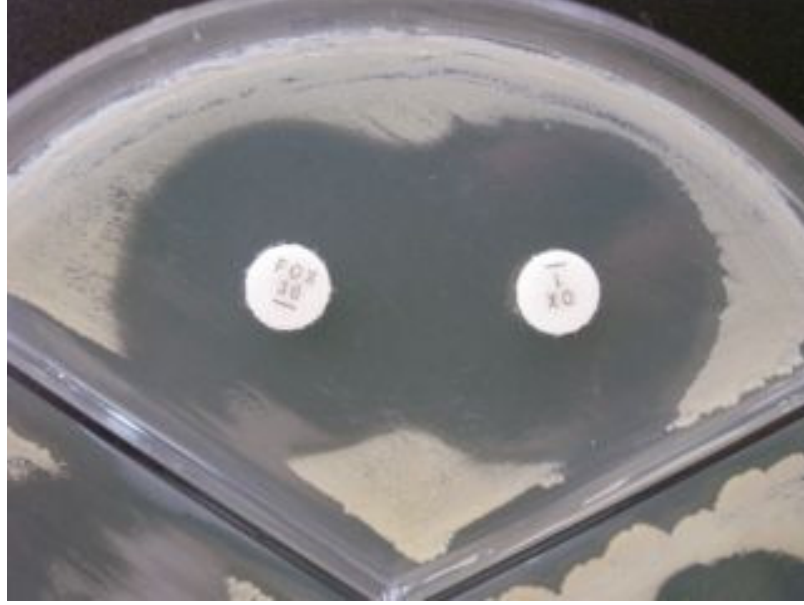
Metisilin direnci tespiti

Metisilin direncinin tespitinde; oksasilin-sefoksitin disk difüzyon, oksasilin agar tarama, oksasilin-sefoksitin E test yöntemleri ve PZR yöntemiyle *mecA* geni araştırıldı.

Disk difüzyon yöntemi: Kirby-Bauer disk difüzyon tekniği ile CLSI döküman M2-A9 önerileri dikkate alınarak yapıldı. Ticari firmadan satın alınan 1 µg oksasilin diski (Oxoid, İngiltere) ve 30 µg sefoksitin diski (Oxoid, İngiltere) kullanıldı. İnkübasyon periyodu sonunda *S. aureus* için önerilen üreme zon çapları mm cinsinden değerlendirildi. Kontrol suşu olarak metisiline duyarlı *S. aureus* ATCC 25923 ve metisiline dirençli *S. aureus* ATCC 43300 kullanıldı.



Resim 1. Oksasilin ve sefoksitin disk difüzyon testi (dirençli)



Resim 2. Oksasilin ve sefoksitin disk difüzyon testi (duyarlı)

Ayrıca çalışmamızda stafilokok enfeksiyonlarında tercih edilen birçok antibiyotik içinde disk difüzyon yöntemi kullanıldı. Bu antibiyotikler; 10 µg penisilin, 5 µg rifampin, 2 µg klindamisin, 30 µg tetrasiklin, 10 µg gentamisin, 5 µg siprofloksasin, 10 µg fusidik asit, 30 µg vankomisin ve 25 µg trimetoprim-sulfametoksazol olup değerlendirmede CLSI tarafından önerilen duyarlılık sınırları kullanıldı⁸⁶. Fusidik asit duyarlılığı Fransa Mikrobiyoloji Cemiyeti Antibiyogram Komitesi'nin 1996'da belirlediği kriterlere göre yapıldı⁹⁰.

E-Test yöntemi: CLSI'nın M7-A7 belgesi önerileri dikkate alınarak yapıldı. Bakteri süspansiyonu McFarland 0.5 standardında hazırlandı ve MHA'a eküvyon ile ekim yapıldı. E-test stribi yerleştirilip, 35°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda, elips şeklindeki inhibisyon alanının stribi kestiği konsantrasyon MİK olarak belirlendi⁸⁶.

Oksasilin E-test, Sefoksitin E-test stripleri kullanıldı. Testte kontrol suşu olarak *S. aureus* ATCC 29213 kullanıldı.



Resim 3. Oksasilin ve sefoksitin E Test (dirençli)



Resim 4. Oksasilin ve sefoksitin E Test (duyarlı)

Tablo 4. *S. aureus* ve KNS'lerde CLSI tarafından önerilen oksasilin-sefoksitin disk difüzyon ve E-test duyarlılık sınırları

	Antibiyotik	Zon çapı (mm)			MİK (µg/ml)	
		R	I	S	R	S
<i>S. aureus</i>	Oksasilin	≤10	11-12	≥13	≥4	≤2
	Sefoksitin	≤19	-	≥20	≥8	≤4

Tuz Agar Tarama Yöntemi: Oksasilin agar tarama CLSI döküman M7-A7 standartlarına göre yapıldı. Mueller Hinton toz agara (Oxoid, İngiltere) %4 NaCl eklendi, 121 °C'de 15 dakika otoklavlandıktan sonra 50 °C ye soğutuldu ve steril şartlarda 6 µg/ml olacak şekilde oksasilin toz (Sigma, Almanya) eklenerek 4 mm kalınlığında petrilere besiyeri döküldü. İnokulum disk difüzyon için tarif edildiği gibi hazırlandı. Besiyerleri 35 °C'de 24 saat inkübe edildi. Tek bir koloni üremesi halinde bile oksasiline dirençli kabul edildi. Kontrol suş olarak *S. aureus* ATCC 25923 kullanıldı⁸⁶.

Moleküler yöntem

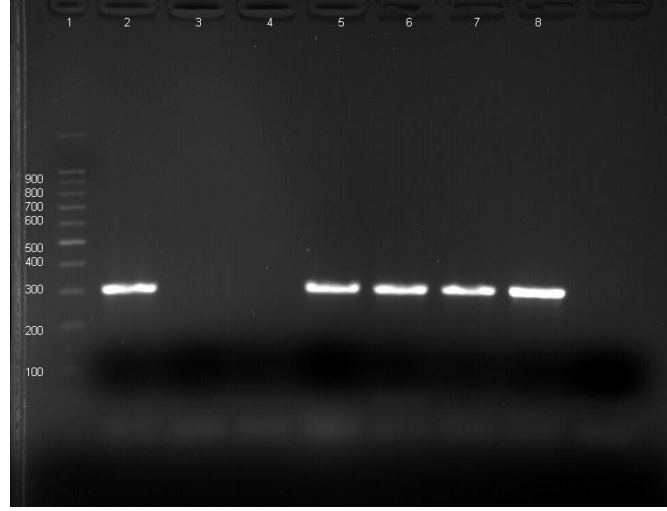
DNA'nın elde edilmesi: Kültürden alınan bakterilere kaynatma yöntemi uygulanarak DNA'nın ekstraksiyonu yapıldı.

1. 1000 µl Tris-EDTA pH 8.0 (TE) içine öze dolusu koloniler toplandı.
2. 30 dakika 80 C °de ısıtma bloğuna konuldu.
3. 10 dakika 12000 rpm'de santrifüj yapılarak üstteki sıvı döküldü.
4. Kalan pelletin üzerine 200 µl kloroform koyularak vortekslendi.
5. Üzerine 200 µl TE koyularak 12000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip üst sıvı alınarak yeni ependorfa aktarıldı.

MecA Polimeraz Zincir Reaksiyonu:

MecA primerleri 100 pmol konsantrasyonda olacak şekilde dilüe edildi.. *MecA1* (5'GTA GAA ATG ACT GAA CGT CCG ATA A3') ve *MecA2* (5'CCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTA A3') oligonükleotid primerleri kullanılarak, 310 bç'lik *mecA* geni bölgesi PCR yöntemi ile amplifiye edildi⁹¹.

MecA için pozitif kontrol olarak, *S. aureus* ATCC 43300 standart suşu kullanıldı.



Resim 5. *mecA* PZR görünümü

(1- DNA ladder, 2- Pozitif kontrol, 3- Negatif kontrol, 4- *mecA*-, 5, 6, 7, 8- *mecA* +)

Tablo 5. *MecA* PZR testi için gereken PZR karışımı

PZR KARIŞMI (1 örnek için)	KONSANTRASYON	MİKTAR
Enzim Tampon solüsyonu	10 X	5 µl
dNTP	10µmol	1 µl
MgCl ₂	25mM	5 µl
<i>mecA</i> F	100µmol	0.5 µl
<i>mecA</i> R	100µmol	0.5 µl
Hot start Taq	5Ü/µl	0.25 µl
DNA		5 µl
dH ₂ O		32.75 µl
Toplam		50 µl

PZR için tüpler ısı döngü cihazına yerleştirilerek 94°C'de 4 dk denatürasyondan sonra 94°C'de 45 sn, 55°C'de 45sn, 72°C'de 1 dk olacak şekilde 30 döngü gerçekleştirildi ve ardından 72°C'de 2 dk ek uzama basamağı uygulandı (tablo 6).

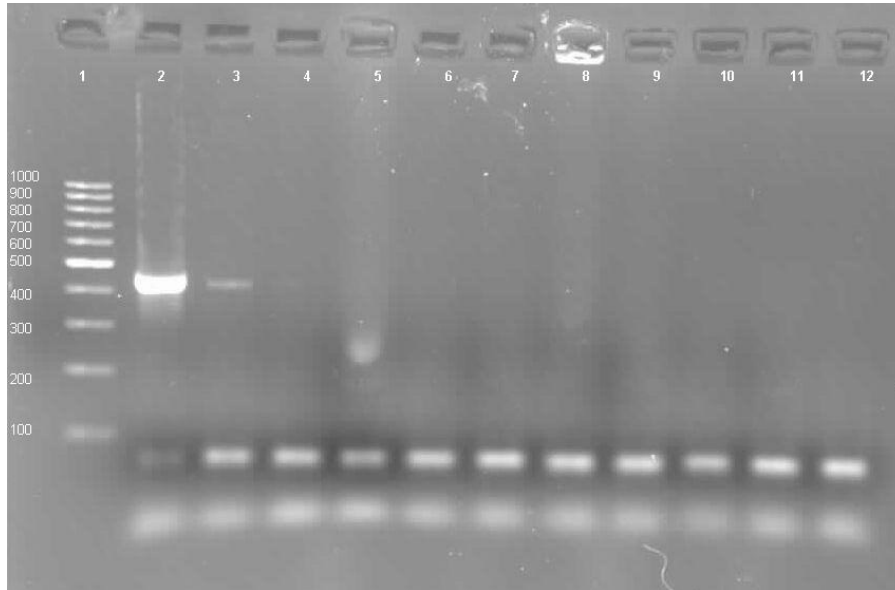
Tablo 6. *MecA* Isı döngü reaksiyon aşamaları

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	94	4 dak	1
Denatürasyon	94	45 sn	30
Primer Bağlanması	50	45 sn	
Zincir Uzaması	72	1 dak	
Son Uzatma	72	2 dak	1

Panton-Valentine Lökosidin Polimeraz Zincir Reaksiyonu:

PVL gen bölgesi primerleri 100 pmol konsantrasyonda olacak şekilde dilüe edildi. PCR amplifikasyonunda kullanılan luk-PV1 (5'GTA AAA TGT CTG GAC ATG ATC CA3') ve luk-PV2 (5'CAA (C/G)TG TAT TGG ATA GCA AAA GC3') oligonükleotid primerleri ile amplifiye edilen 433 bç'lik bölge PCR yöntemi ile amplifiye edildi .Hedef DNA bölgesinin çoğaltılması için aşağıdaki PZR karışımı hazırlandı⁵ (tablo 7).

PVL için pozitif kontrol olarak *S. aureus* GRE14 suşu kullanıldı⁹².



Resim 6. PVL PZR görünümü

(1- DNA Ladder, 2- Pozitif kontrol, 3- PVL+, 4-11- PVL-, 12- negatif kontrol)

Tablo 7. PVL testi için gereken PZR karışımı

PZR KARIŞMI (1 örnek için)	KONSANTRASYON	MİKTAR
Enzim Tampon solüsyonu	10 X	5 µl
dNTP	10pmol	1 µl
MgCl ₂	25mM	5 µl
Luk-PV F	100pmol	0.5 µl
Luk-PV R	100pmol	0.5 µl
Hot start Taq	5Ü/µl	0.25 µl
DNA		5 µl
dH ₂ O		32.75 µl
Toplam		50 µl

PZR için tüpler ısı döngü cihazına yerleştirilerek 95°C'de 12 dk denatürasyondan sonra 94°C'de 30 sn, 55°C'de 30 sn, 72°C'de 60 sn olacak şekilde 30 döngü gerçekleştirildi ve ardından 72°C'de 7 dk ek uzama basamağı uygulandı (tablo 8).

Tablo 8. PVL için ısı döngü reaksiyon aşamaları

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	95	12 dak	1
Denatürasyon	94	30 sn	30
Primer Bağlanması	55	30 sn	
Zincir Uzaması	72	1 dak	
Son Uzatma	72	7 dak	1

Polimeraz Zincir Reaksiyonu Ürünlerinin Görüntülenmesi:

mecA ve *PVL* PZR sonuçlarının değerlendirilmesi için, PZR programı tamamlandıktan sonra amplifiye olan bölgeler %1,5'lik agaroz jelde analiz edildi. %1,5'lik agaroz jel içerisine 0,5 mg/ml etidiyum bromür eklendi. Daha sonra, PZR reaksiyonu ürünlerine 6X yükleme tamponundan 1/5 oranında (1 hacim

yükleme tamponu, 5 hacim PZR reaksiyonu ürünü) eklendi. Örnekler agaroz jele yüklendikten sonra 100 mA, 110 Voltta 35 dakika elektroforeze tabi tutuldu. Elektroforez sonucu, UV translüminatörlü (Salubris-technica) bilgisayarlı jel dokümantasyon sistemi ile fotoğrafı çekilerek yorumlandı. Primerlerin çoğalttığı bölge *mecA* için 310 bp'lik, PVL için 433 bp'lik olup, beklenen bant uzunluğu, moleküler marker (Fermentes DNA 100 base pair ladder) yardımıyla yorumlandı.

Kullanılan Cihaz ve Gereçler

Cihazlar

1. Otomatik pipetler

Tek kanallı 20 µl, 200 µl ve 1000 µl'lik Eppendorf (Eppendorf Reference, Germany).

Steril pipet ucu olarak 2 µl, 10 µl, 200 µl ve 1000 µl'lik filtrelili plastik pipet (Eppendorf Reference, Germany)

2. Isı döngü cihazı

PZR işlemlerinin yapılmasında programlanabilen üst kapak ısıtmalı otomatik thermal cycler (Eppendorf, Mastercycler Gradient 22331, Almanya)

3. Elektroforez Tankı ve Güç Kaynağı

Agaroz jel elektroforez (Biometra)

4. Jel Görüntüleme ve Analiz Sistemi

UV translüminatörlü (Salubris-technica, USA) bilgisayarlı jel dokümantasyon sistemi elde edilen jeldeki bantların görüntülenmesinde kullanıldı.

5. Hassas Terazi

Kimyasal maddelerin tartımında hassas terazi (Scaltec, Almanya) kullanıldı.

6. Vorteks (Mekanik Karıştırıcı)

PZR işlemleri sırasında örneklerin ve PZR komponentlerinin karıştırılması için Vorteks (Nüve, Türkiye) cihazı kullanıldı.

7. Soğutmalı Santrifüj

Örneklerin santrifüj edilmesi ve PZR işlemleri sırasında santrifüj işleminin gerekli olduğu durumlarda çözelti ve karışımların

çöktürülmesi amacıyla soğutmalı santrifüj cihazı (Hettich, Almanya) kullanıldı.

8. İnkübatör

Ekimi yapılan besiyerlerinin inkübasyonu için inkübatör (Memmert, Almanya) kullanıldı.

9. Otoklav

Besiyerlerinin ve solüsyonların sterilizasyonu için otoklav (Nüve, Türkiye) kullanıldı.

10. Steril laminar akımlı güvenlik kabini

Ekimlerin, besiyerlerinin steril bir biçimde hazırlanması, aynı şekilde DNA ekstraksiyonu, PZR ve kesim reaksiyonunun steril bir ortamda gerçekleştirilebilmesi için steril laminar akımlı güvenlik kabini (Heraeus, Almanya) kullanıldı.

11. Benmari

Ben-mari (Memmert, Almanya), DNA ekstraksiyonunda ve hazırlanan solüsyonların ısı ile çözülmesinde kullanıldı.

12. Mikrodalga Fırın

Elektroforezde kullanılan agarozun tampon solüsyonu içerisinde eritilmesinde mikrodalga fırın (Beko, MD 1500, Türkiye) kullanıldı.

13. Derin Dondurucu

DNA ekstraksiyonu, PZR ve kesim sonucu elde edilen örneklerin saklanması için derin dondurucu (-20°C, Uğur, 2005, Türkiye) kullanıldı.

14. Bactec 9240 otomatize kan kültürü cihazı (Becton-Dickinson, USA)

Kullanılan antibiyotikler

Disk difüzyon testinde kullanılanlar

Oksasilin (OX)-1µg (Oxoid, İngiltere)

Sefoksitin (FOX)-30 µg (Oxoid, İngiltere)

Vankomisin (VA)-30 µg (Oxoid, İngiltere)

Gentamisin (CN)-10 µg (Bioanalyse, Türkiye)

Tetrasiklin (TE)-30 µg (Bioanalyse, Türkiye)

Rifampin (RA)-5 µg (Bioanalyse, Türkiye)

Siprofloksasin (CIP)-5 µg (Bioanalyse, Türkiye)

Klindamisin (DA)-2 µg (Bioanalyse, Türkiye)

TMP-SXT (SXT)-1.25/23,75 µg (Bioanalyse, Türkiye)

Linezolid (LZD)-30 µg (Oxoid, İngiltere)

Fusidik asit (FD)-10 µg

Agar tarama testinde kullanılanlar

Oksasilin selektif supplement 5 mg (Sigma, Almanya)

Kitler

Oksasilin E-test (Biomerieux, İsveç)

Sefoksitin E-test (Biomerieux, İsveç)

Besiyerleri

Kanlı Agar (Oxoid, İngiltere, LOT 646736)

Mueller-Hinton Agar (Biomerieux, Fransa, LOT 823405401)

DNase Test Agar (Merck, Almanya)

PZR Tekniğinde Kullanılan Gereçler

dNTP (Fermantes, Almanya)

Primerler (Ella Biotech GmbH, Almanya)

Buffer B (Fermantes, Almanya)

Taq DNA Polimeraz (250 U/ml) (Fermantes, Almanya)

Elektroforetik Analiz Solüsyonları

a) 10 X TBE (Tris-Borik Asit-EDTA) Stok solüsyonu

- 108 g Tris-base(Sigma T-1503, USA) (0,9 M)
- 55 g Borik asid (Merck 2993665, USA) (0,9 M)
- 8,3 g EDTA (Sigma E-6788, USA) pH 8,0 (20mM)
- Distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.
- Manyetik karıştırıcıda çözülerek pH 8,0'e ayarlandı.
- Otoklavda sterilizasyon yapılarak oda ısısında saklandı.

b) 1X TBE (Çalışma solüsyonu)

- 100 ml 10 X TBE üzerine, 900 ml distile su eklendi.
- Elektroforez tankına konularak kullanıldı.

c) Etidiyum Bromid Solüsyonu (10mg/ml)

- 0,1 g Etidiyum bromid (Sigma E-9884, USA) 10 ml distile su içinde çözüldü.
- Işığa hassas olduğu için alüminyum folyo ile sarılarak + 4 ° C' de saklandı.

d) Yükleme tamponu (6X)

- 1 X TBE
- %40 Sukroz (Sigma S-7903, USA)
- %0,025 Brom fenol mavisi (Sigma B-0126, USA).

e) Bromtimol mavisi:

- 0,4 gr bromtimol (Merck 64271, Darmstad, Germany) mavisi
100 ml distile su içerisinde çözüldü.

BULGULAR

Çeşitli klinik örneklerden izole edilen ve oksasilin disk difüzyon testi sonucu dirençli saptanan 190 *S. aureus* suşunda; sefoksitin disk difüzyon, oksasilin agar tarama, oksasilin E test, sefoksitin E test çalışıldı ve PZR ile *mecA* gen varlığı araştırıldı.

Suşların tümünde *mecA* geni saptandığından tüm örnekler MRSA olarak kabul edildi. 190 adet MRSA örneğinin 170'i hastane kaynaklı, 20'si toplum kaynaklıydı. 73 suş dahili bölümlerden, 117 suş cerrahi bölümlerden gönderilen örneklerden elde edildi.

Örneklerin alınış yerlerine göre dağılımı ise tablo 9'da gösterilmiştir.

Tablo 9. Klinik örneklerin dağılımı

Örnek	Sayı	%
Trakeal aspirat	55	29
Yara	50	26,3
Doku	21	11,1
Periferik kan	20	10,6
Kateter	18	9,5
İdrar	5	2,6
Abse	5	2,6
Dren	5	2,6
Balgam	3	1,6
Plevra	1	0,5
Boğaz	1	0,5
BOS	1	0,5
Bronko-alveolar lavaj	1	0,5
Diğer	4	2,1
Toplam	190	100

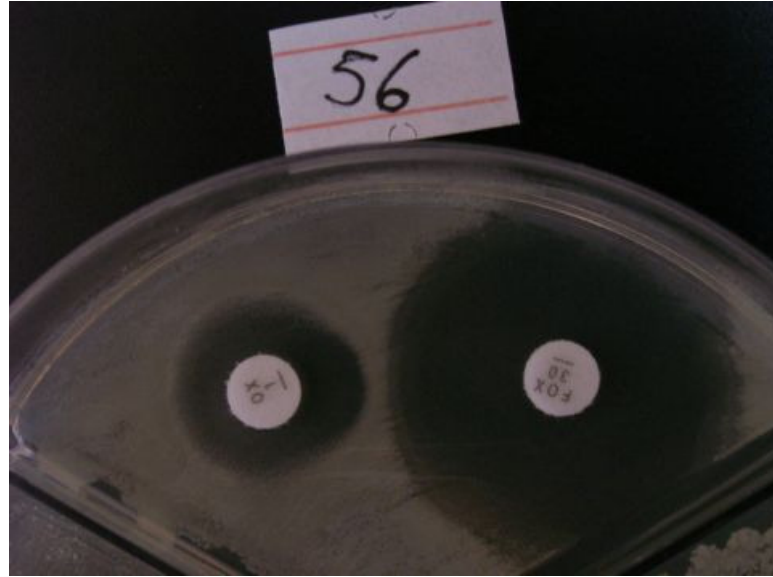
MecA geni pozitif olan 190 suştan; oksasilin disk difüzyon testi, 190 suşu dirençli olarak belirlerken diğer tüm testler 188 suşu dirençli olarak saptadı.

Tablo 10'da direnç paternleri gösterilmiştir.

Tablo 10. Uygulanan testlere göre MR ve MS suşların dağılımı

	MR	MS
Oksasilin Disk Difüzyon	190	0
Oksasilin Agar Tarama	188	2
Sefoksitin Disk Difüzyon	188	2
Oksasilin E test	188	2
Sefoksitin E test	188	2
<i>mecA</i>	190	0

Toplam 2 adet suş; oksasilin disk difüzyon testi ile metisiline dirençli olarak tespit edilirken, diğer fenotipik yöntemlerle duyarlı saptandı. Bu suşların PZR ile *mecA* geni içerdiği tespit edildi (resim 7 ve 8).



Resim 7. 56 numaralı suş



Resim 8. 58 numaralı suş

Oksasilin disk difüzyon testi ile diğer testler arasında güçlü bir uyum gözlenirken, sefoksitin disk difüzyon, oksasilin agar tarama, oksasilin E test ve sefoksitin E testlerinin birbiri ile tam uyumlu oldukları saptanmıştır (kappa: 1,00).

Oksasilin agar tarama, sefoksitin disk difüzyon, oksasilin E test ve sefoksitin E testleri ile *mecA* gen pozitifliği karşılaştırıldığında tablo 4.2'deki sonuçlara göre duyarlılık oranı %98,9 olarak hesaplandı.

Oksasilin disk difüzyon testi ile *mecA* pozitifliği karşılaştırıldığında ise duyarlılık oranı %100 olarak hesaplandı.

Toplam 6 hastaya ait izolatta PVL geni tespit edildi (%3,16). 6 örneğin 5'inin hastane kaynaklı, 1'inin toplum kaynaklı olduğu saptandı (tablo 11). Hastane ve toplum kaynaklı örnekler arasında, PVL pozitifliği yönünden istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunamadı.

Tablo 11. Hastane ve toplum kaynaklı örneklerdeki PVL dağılımı

	PVL	Sayı	%
Hastane kaynaklı	PVL pozitif	5	2,94
	PVL negatif	165	97,06
Toplum kaynaklı	PVL pozitif	1	5
	PVL negatif	19	95

TK-MRSA örneklerinde bulunan PVL (+) suş, dermatoloji polikliniğinden gönderilen scalp bölgesindeki apseden izole edilmişti. HK-MRSA örneklerindeki PVL (+) suşlardan 2'si Enfeksiyon Hastalıkları ve Beyin Cerrahisi Kliniği'nden gönderilen trakeal aspirat kültürü, 2'si Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ve Enfeksiyon Hastalıkları Kliniği'nden gönderilen periferik kan kültürü, 1'i Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği'nden gönderilen kateter kültüründe izole edilmişti. Tüm suşların çeşitli antibiyotiklere duyarlılık sonuçları tablo 12'de gösterilmiştir.

Tablo 12. Suşların çeşitli antibiyotiklere duyarlılık sonuçları.

	AK	DA	SXT	GN	FD	CIP	RA	TE	VA	TEC	LZD
Dirençli sayı (%)	171 (90)	57 (30)	2 (1)	178 (94)	12 (6)	180 (95)	178 (94)	180 (95)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Duyarlı sayı (%)	19 (10)	133 (70)	188 (99)	12 (6)	178 (94)	10 (5)	12 (6)	10 (5)	190 (100)	190 (100)	190 (100)

(AK: Amikasin, DA: Klindamisin, SXT: Trimetoprim/sülfametoksazol, GN: Gentamisin, FD: fusidik asit, CIP: Siprofloksasin, RA: Rifampisin, TE: Tetrasiklin VA: Vankomisin, LZD: Linezolid TEC: Teikoplanin)

190 suşun hastane ya da toplum kaynaklı olmasına göre düzenlenmiş antibiyotik duyarlılık sonuçları tablo 13'te gösterilmiştir.

Tablo 13. Suşların antibiyotik duyarlık sonuçlarının hastane ve toplum kaynaklı olarak dağılımı

		AK	DA	SXT	GN	FD	CIP	RA	TE	VA	TEC	LZD
Hastane kaynaklı	Dirençli Sayı	156	53	1	160	10	161	160	164	0	0	0
	%	92	31	0,6	94	6	95	94	96	0	0	0
	Duyarlı Sayı	14	117	169	10	160	9	10	6	170	170	170
	%	8	69	99,4	6	90	5	6	4	100	100	100
Toplum kaynaklı	Dirençli Sayı	15	4	1	16	2	16	15	14	0	0	0
	%	75	20	5	80	10	80	75	70	0	0	0
	Duyarlı Sayı	5	16	19	4	18	4	5	6	20	20	20
	%	25	80	95	20	90	20	25	30	100	100	100

(AK: Amikasin, DA: Klindamisin, SXT: Trimetoprim/sülfametoksazol, GN: Gentamisin, FD: fusidik asit, CIP: Siprofloksasin, RA: Rifampisin, TE: Tetrasiklin VA: Vankomisin, LZD: Linezolid TEC: Teikoplanin)

PVL geni pozitif bulunan 6 suşun çeşitli antibiyotiklere duyarlık sonuçları tablo 14'te gösterilmiştir.

PVL geni negatif bulunan 184 suşun çeşitli antibiyotiklere duyarlık sonuçları tablo 15'te gösterilmiştir.

Tablo 14. PVL pozitif suşların antibiyotiklere duyarlıklarının dağılımı.

	AK	DA	SXT	GN	FD	CIP	RA	TE	VA	TEC	LZD
Dirençli Sayı	6	2	1	6	1	6	6	6	0	0	0
%	100	33	17	100	17	100	100	100	0	0	0
Duyarlı Sayı	0	4	5	0	5	0	0	0	6	6	6
%	0	67	83	0	83	0	0	0	100	100	100

(AK: Amikasin, DA: Klindamisin, SXT: Trimetoprim/sülfametoksazol, GN: Gentamisin, FD: fusidik asit, CİP: Siprofloksasin, RA: Rifampisin, TE: Tetrasiklin VA: Vankomisin, LZD: Linezolid TEC: Teikoplanin)

Tablo 15. PVL negatif suşların antibiyotiklere duyarlıklarının dağılımı.

	AK	DA	SXT	GN	FD	CIP	RA	TE	VA	TEC	LZD
Dirençli Sayı	165	55	1	172	11	174	172	174	0	0	0
%	90	30	0,5	93	6	95	93	95	0	0	0
Duyarlı Sayı	19	129	183	12	173	10	12	10	184	184	184
%	10	70	99,5	7	94	5	7	5	100	100	100

(AK: Amikasin, DA: Klindamisin, SXT: Trimetoprim/sülfametoksazol, GN: Gentamisin, FD: fusidik asit, CİP: Siprofloksasin, RA: Rifampisin, TE: Tetrasiklin VA: Vankomisin, LZD: Linezolid TEC: Teikoplanin)

PVL (+) suşlarda PVL (-) suşlara göre; amikasin, klindamisin, gentamisin, fusidik asit, siprofloksasin, rifampisin, tetrasiklin ve özellikle trimetoprim-sülfametoksazol'de daha yüksek direnç oranları saptanmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi (tablo 16). Vankomisin, linezolid ve teikoplanin'e ise tüm suşlar duyarlı olarak bulundu.

Tablo 16. PVL pozitif ve negatif suşların antibiyotik direnç paternleri

Antibiyotikler	PVL (+)		PVL (-)		p
	n	%	n	%	
AK	6	100	165	90	0,89
DA	2	33,3	55	30	0,86
SXT	1	16,7	1	0,5	0,08
GN	6	100	172	93	0,95
FD	1	16,7	11	6	0,84
CİP	6	100	174	95	0,99
RA	6	100	172	93	0,95
TE	6	100	174	95	0,99
VA	0	0	0	0	-
TEC	0	0	0	0	-
LZD	0	0	0	0	-

(AK: Amikasin, DA: Klindamisin, SXT: Trimetoprim/sülfametoksazol, GN: Gentamisin, FD: fusidik asit, CİP: Siprofloksasin, RA: Rifampisin, TE: Tetrasiklin VA: Vankomisin, LZD: Linezolid TEC: Teikoplanin)

İstatistiksel Analiz

Çalışmada excel programında toplanan veriler SPSS (Statistical Packet for The Social Sciences) 11.5 paket programına aktarılmıştır.

Çalışmada kullanılan veriler kategorik veriler olduğu için verilerin tanımlayıcı istatistiklerinde frekanslar ve oranları verilmiştir. Tanı testleri arasındaki uyumun ortaya koyulması için kappa test istatistiğine bakılmıştır.

Testlerin diagnostik performanslarında *MecA* test sonuçları altın standart olarak alınarak test istatistikleri hesaplanmıştır. Ayrıca gelen materyallerin kaynağı ile test sonuçları arasındaki kategorik verilerin analizinde ki kare testi kullanılmıştır.

$P < 0,05$ istatistik açıdan anlamlı kabul edilmiştir. Hesaplamalarda SPSS 11.5 ve MedCalc®v11.0.1 paket programı kullanılmıştır.

TARTIŞMA

Stafilokoklarda özellikle yüksek düzey heterojen direncin varlığı nedeniyle dirençli suşlar sıklıkla gözden kaçabilir. Fenotipik yöntemlerle metisilin direncinin saptanması, uygulanan test koşullarından etkilenmektedir. İnokulum miktarı, inkübasyon ısı ve süresi, NaCl konsantrasyonu ve ortamın pH'sı gibi birçok faktör direncin belirlenmesinde rol oynar. Bu nedenle örneklerde *mecA* gen bölgesinin gösterilmesi, direncin tespitinde en iyi yöntem olarak kabul edilmektedir. Bu gen bölgesi PZR ya da DNA prob yöntemleri ile saptanabilmektedir. En önemli avantajları hızlı ve doğru sonuç alınması olan bu yöntemlerin, dezavantajları test başına maliyetlerinin yüksek olması ve eğitimli personel gerektirmesidir¹⁶.

Stafilokoklarda metisilin direnci, hızla yayılan ve özellikle hastanede yatan hastalarda yüksek seviyelere ulaşmış olması nedeniyle de tedavide sorunlar oluşturan önemli bir problemdir. MRSA suşlarının beta-laktam antibiyotikler yanında diğer birçok antibiyotiğe de dirençli olabilmeleri metisilin direncinin kısa sürede, doğru olarak tespit edilmesinin önemini daha da artırmaktadır. Metisilin direncinin tespitinde genellikle maliyeti ucuz, uygulaması kolay, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek olan oksasilin disk difüzyon testi kullanılmaktadır. Ancak disk difüzyon yönteminde aşırı penisilinaz üreten suşlar, metisilin veya oksasilin disklerinin çevresinde küçük bir inhibisyon zonu yaparken, gerçek metisilin veya oksasilin dirençli suşlar hiçbir zon yapmaz. Bazı aşırı penisilinaz üreten suşların hiç zon yapmaması ve MRSA olarak tanımlanması da mümkündür. Sefoksitin disk difüzyon testinin aşırı penisilinaz üretiminden oksasilin disk difüzyon testi kadar etkilenmediği bildirilmektedir⁴³.

CLSI, *S. aureus* izolatlarında metisilin direncinin saptanması sırasında kuşkulu sonuç alındığında, doğrulama testi olarak oksasilin agar tarama testini önermektedir. Altın standart olan *mecA* geninin saptandığı PZR yöntemiyle en iyi uyumu bu test göstermektedir. Swenson ve arkadaşları, *S. aureus* türlerinde mikrodilüsyon, disk difüzyon ve oksasilin agar tarama testi arasından, oksasilin agar tarama yönteminin duyarlılığını en yüksek olarak saptamışlardır⁹³. Oğuz ve arkadaşları, toplam 117 *S. aureus* suşunda, agar dilüsyon, agar tarama ve disk difüzyon yöntemi ile metisilin direnci araştırmışlardır⁹⁴. Agar dilüsyona göre agar tarama ve disk difüzyon yöntemlerinin duyarlılık ve özgüllükleri sırası ile %100, %95 ve %100, %92.6 bulmuşlardır. Bu çalışmaların yanında MR'nin tespitinde

kullanılan testlerin duyarlılık ve özgüllüğünü çok farklı oranlarda saptayan çalışmalar da mevcuttur. Cavassini ve arkadaşları, 200 *S. aureus* izolatında yaptıkları çalışmada, disk difüzyon ve agar tarama testlerinin sonuçlarını *mecA* sonuçlarıyla karşılaştırmışlar, disk difüzyon testinin duyarlılığını %61.3, özgüllüğünü %96.7, agar tarama testinin duyarlılığını %82.5; özgüllüğünü ise %98.3 olarak tespit etmişler⁹⁵. Araştırmacılar MRSA suşlarında duyarlılık ve özgüllüğü yüksek bir test olarak bilinmesine karşılık, oksasilin agar tarama testinin duyarlılığını düşük bulmuşlardır. Zhu ve arkadaşları, oksasilin disk difüzyon yönteminin duyarlılığını (%97,5), sefoksitin disk difüzyon yönteminin duyarlılığından (%96,6) daha yüksek bulmuşlardır⁹⁶. Telli ve arkadaşlarının çalışmalarında elde ettikleri duyarlılık sonuçları; oksasilin disk difüzyon testi %98.8, sefoksitin disk difüzyon testi %98.3, oksasilin agar tarama testi %98.8, MRSA lateks aglütinasyon testi %97.7 iken, oksasilin ve sefoksitin disk difüzyon testlerinin tanısal değerlerini daha yüksek saptamışlardır⁹⁷. Oksasilin disk difüzyon testinin birçok heterojen suшта %61-98,8 arasında duyarlılık gösterdiğini belirten çalışmalar vardır⁹⁶⁻¹⁰⁰.

Çalışmamızda oksasilin disk difüzyon testi ile 190 suşu dirençli olarak saptarken diğer tüm testlerle 188 suş dirençli olarak değerlendirildi. İstatistiksel fark olmasa da oksasilin disk difüzyon testi, MRSA örneklerini tespit etmekte daha iyi sonuçlar elde etti. Çalışmamızdaki tüm suşlar *mecA* geni içerdiği için sadece duyarlılık karşılaştırması yapıldı. Bu karşılaştırma sonucu oksasilin disk difüzyon testi ile %100 olarak saptanan duyarlılık, diğer testlerle %98,9 olarak belirlendi. Elde ettiğimiz sonuçlar, Telli ve arkadaşları ile Zhu ve arkadaşlarının çalışmaları ile benzerlik gösterdi^{96,97}. Testlerin birbiri ile uyumu, oksasilin disk difüzyon testi ile diğer testler arasında yüksek olarak saptandı. Bu test dışındaki testler her bir suшта aynı sonuçlar elde edildiği için tam uyumlu olarak belirlendi. Çalışmada MRSA dışında *S. aureus* suşu yer almadığı için, oksasilin disk difüzyon testinin yanlış pozitiflik açısından değerlendirilmesi ya da testler arasında özgüllük karşılaştırması yapılamadı.

Çalışmamızda uygulanan testlerle yanlış negatif sonuçların olması, bize duyarlılık testlerinin dış faktörlerden etkilendiğini, metisilin direncini belirlemede genotipik yöntemlerin daha duyarlı ve güvenilir olduğunu göstermiştir. Metisilin direncinin doğru olarak belirlenememesi, etkili olmayan bir tedavinin uygulanmasına yol açarken, kliniğe yanlış pozitif sonuç verilmesi de gereksiz

yere pahalı ve ciddi yan etkileri bulunan bir glikopeptid antibiyotiğin kullanılmasına neden olabilmektedir. Ancak genotipik yöntemlerin maliyet ve ekipman sorunları nedeniyle rutin laboratuvar tanısında kullanılması zor görülmektedir.

Stafilokoklarda bir virülans faktörü olan PVL, özellikle deri, yumuşak doku enfeksiyonları ve akut nekrotizan pnömoniler ile ilişkilidir^{5,37}. Literatürde, yapılan çalışmaların büyük çoğunluğunda, toplum kökenli izolatlarda PVL pozitifliği daha yüksek oranlarda bulunmuştur. Ek olarak PVL pozitif TK-MRSA izolatlarının daha sık deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarına yol açtıkları çok sayıda araştırmacı tarafından bildirilmiştir¹⁰¹⁻¹⁰⁴. Çalışmamızda 190 suştan 6'sında (%3,16) PVL geni saptandı. PVL pozitif suşların 5 tanesi hastane kaynaklı, 1 tanesi toplum kaynaklı örneklerdeydi.

TK-MRSA örneklerinde bulunan PVL (+) suş, dermatoloji polikliniğinden gönderilen skalp bölgesindeki apsedan izole edildi. Yapılan çalışmalarda PVL içeren TK-MRSA'ların sıklıkla cilt enfeksiyonlarına sebep olduğu bildirilmektedir^{5,37}.

S.aureus izolatlarında PVL gen bölgesinin araştırıldığı çalışmalarda farklı oranlarda pozitiflik (%0,44-%72) saptanmıştır^{104,105}. Amerika Birleşik Devletleri'nde, 11 şehirde hastanelere cilt ve yumuşak doku enfeksiyonu ile başvuran hastalarda yapılan bir çalışmada; saptanan 249 MRSA izolatının % 50'sinde PVL pozitifliği bildirilmiştir¹⁰⁶. Avrupa'da ise MRSA suşlarında %1-3 oranında PVL pozitifliği bildirilmektedir¹⁰⁷.

Ülkemizde bu konuda yapılan çalışmalarda; Öksüz ve arkadaşları 22 MRSA izolatından 9'unda (%41) PVL pozitifliği saptamışlardır¹⁰⁸. Kılıç ve arkadaşları 385 MRSA izolatından 5'inde (%1,3) PVL geni saptadıklarını bildirmişlerdir¹⁰⁹. Karahan ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, 261 MRSA suşundan 8'inde (%3,1) PVL pozitifliği saptamışlar¹⁰³. Bu örneklerden; 193 adet HK-MRSA izolatında 1 (%0,5), 68 adet TK-MRSA izolatında 7'sinde (%10) PVL geni saptamışlardır. Bu PVL (+) MRSA izolatlarının 5 tanesi yara, 2 tanesi idrar, 1 tanesi apsedan izole edilmiştir. Araştırmacılar PVL pozitif izolatların idrar yolu enfeksiyonu ile ilişkisine de dikkat çekmektedirler. Hacettepe Üniversitesi Hastanesinde yapılan bir çalışmada; Akoğlu ve arkadaşları, klinik birimlerden izole edilen çeşitli örnekler ait 110 HK-MRSA izolatından 14'ünde (%12,7) PVL geni varlığı saptamıştır¹¹⁰.

Chini ve arkadaşları yaptıkları çalışmada; 218 adet TK-MRSA izolatından 157'sinde (%72), 280 HK-MRSA izolatından ise 65'inde (%23) PVL geni saptamışlar ve PVL pozitif MRSA izolatlarının hastanelere yayıldığına dikkat çekmişlerdir¹⁰².

PVL geninin toplum kaynaklı MRSA'lara ait olduğu kabul edilirken günümüzde yapılan çalışmalarda hastane kaynaklı izolatlarda da tespit edilmektedir. Salgado ve arkadaşları, MRSA kolonizasyonunun yıllar sürebileceğine, hastanede ya da toplumdan kazanılan MRSA'nın klinik enfeksiyon gelişene kadar fark edilmeyeceğine, bu nedenle TK-MRSA ifadesinin aslında bakterinin toplumdan kazanılmasından ziyade toplumda kolonizasyon ve enfeksiyonun saptanması anlamına gelebileceğine dikkat çekmektedirler⁹². Aires de Sousa ve arkadaşları tarafından Yunanistan'da, klinik örneklerden izole edilen HK-MRSA suşları ile yapılan bir çalışmada hastaneden hiç dışarı çıkmamış prematüre bir bebekten izole edilen MRSA izolatının PVL pozitif olduğu bildirilmiştir¹¹¹. Bu MRSA izolatının SCC*mec* tipi, antibiyogram özellikleri ve PVL pozitif olması toplum kaynaklı olduğunu düşündürse de, hiç hastane dışına çıkmamış bir bebekten izole edilmesi hastane kaynaklı olduğu görüşünü desteklemektedir.

HK-MRSA izolatlarında PVL sıklığı, dünyada en düşük Fransa ve en yüksek Cezayir'de olmak üzere %0,4 ile %67,5 arasında değişmektedir ve toplum kaynaklı MRSA örneklerinde daha yüksek oranlarda rapor edilmektedir^{112,113-116}.

Çalışmamızda; HK-MRSA'larda % 2,94, TK-MRSA'larda % 5 oranında PVL pozitifliği tespit edilmiştir. Hastanemizde PVL pozitif suşların bulunduğu görülmektedir. Yapılan çalışmalarda PVL geninin sadece toplum kaynaklı örneklerle ait bir virülans faktörü olduğu fikrinin değişmekte olduğunu ve hastane kaynaklı örneklerde de bu genin tespit edildiği bildirilmektedir^{92,102,110,111}.

MRSA izolatlarında gerek ülkemizden, gerekse yurtdışından oldukça farklı PVL pozitiflik oranlarının rapor edilmesi, kullanılan farklı primerler ve moleküler yöntemdeki farklılıklardan kaynaklanabilmektedir. Bu sebeple çalışma sırasında farklı primer seçimi ve termal döngü koşullarından kaynaklanan yalancı pozitif ve yalancı negatif sonuçların alınabileceği bildirilmektedir. Bunu azaltmak için farklı primerlerle sonuçların doğrulanması önerilmektedir¹¹⁷.

PVL pozitifliği, *S. aureus* suşlarının virülansını önemli ölçüde artırmakta ve neden olduğu hastalıkların klinik seyrini ağırlaştırarak komplikasyon gelişme riskini yükseltmektedir¹¹⁸. PVL pozitif suşların hastane ortamında yayılması, hatta salgınlar oluşturması, bu suşların antibiyotik direnç özelliklerini de üzerinde toplaması ile daha dirençli ve daha virülan *S. aureus* suşlarının ortaya çıkma riskini artırmaktadır¹¹⁹⁻¹²¹.

Günümüzde çoklu direnç gösteren MRSA suşlarının artması nedeniyle stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde zorluklar yaşanmaktadır. Son 14 yıl içinde birçok ülkede VISA ve VRSA suşları bildirilmiştir¹²²⁻¹²⁶.

Bizim çalışmamızda; çalışılan tüm suşlar vankomisin, linezolid ve teikoplanine duyarlıydılar. Diğer antibiyotiklerden trimetoprim/sülfametoksazol ve fusidik asit dışındakilerde HK-MRSA'larda daha yüksek direnç oranları saptandı. Trimetoprim/sülfametoksazol ve fusidik asit ile TK-MRSA'larda gözlenen daha yüksek direnç oranı, bu antibiyotiklerin poliklinik hastalarında daha yoğun kullanımı ile ilişkili olabilir. Fusidik aside dirençli 2 TK-MRSA suşu, dermatoloji polikliniğinden gelen skalp apsesi ve plastik cerrahi polikliniğinden gelen yara enfeksiyonundan izole edildi. Dermatoloji polikliniğinden gönderilen skalp apsesine ait MRSA suşu PVL (+) olan tek TK izolatu olarak çoklu dirence sahipti ve vankomisin, linezolid ve teikoplanin dışındaki tüm antibiyotiklere dirençli saptandı. Trimetoprim/sülfametoksazole dirençli diğer TK-MRSA suşu idrar kültüründen izole edilmişti. Siprofloksasinde saptadığımız yüksek direnç oranları, MRSA'larda siprofloksasin direncinin son yıllarda giderek arttığına ilişkin çalışmalarla paralellik göstermektedir¹²⁷⁻¹²⁹.

Tristan ve arkadaşları tarafından, Fransız ulusal stafilokok merkezinin 1999-2005 yılları arasında dünya genelinde 17 ülkeden topladığı 469 PVL (+) TK-MRSA izolatu ile yaptığı çalışmada; bu suşların, birçok antimikrobiyal ajana genelde duyarlı olduklarını bildirmişlerdir. Bu çalışmada, tetrasikline yüksek, fusidik aside orta düzeyde direnç oranları saptanırken, tüm suşlar trimetoprim-sülfametoksazol, glikopeptidler ve linezolide duyarlı olarak saptanmıştır¹³⁰. Ellington ve arkadaşları tarafından İngiltere'de yapılan bir çalışmada; 2005-2008 yılları arasında toplanan 76 PVL (+) TK-MRSA izolatının (53'ü cilt ve yumuşak doku enfeksiyonu kaynaklı) HK-MRSA'lara göre genelde daha düşük direnç oranları gösterdikleri ancak eski çalışmalara göre direncin artmakta olduğu belirlenmiştir¹³¹. Bu çalışmada aynı aileden 2 bireyde saptanan suşların, faj

yapısı ve antibiyotik direnç paternlerinin aynı olduğu saptanmıştır. Bu durum ailesel geçiş olarak yorumlanmıştır. Yine bu çalışmada siprofloksasine yüksek oranda direnç (%67) saptanmış ve bu suşlarda çoklu antibiyotik direnci de belirlenmiştir.

Çalışmamızda, PVL (+) suşlarda, PVL (-) suşlara göre; amikasin, klindamisin, gentamisin, fusidik asit, siprofloksasin, rifampisin, tetrasiklin ve özellikle trimetoprim-sülfametoksazol'de daha yüksek oranda direnç olduğu görölmektedir. Ancak istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi (tablo 16).

Sonuç olarak hastanemizde, hastane ve toplum kaynaklı MRSA suşlarında PVL geni bulunmaktadır. Bu nedenle hastane ve toplumda bu suşların yayılımını önlemek için gerekli enfeksiyon kontrol önlemleri alınmalıdır.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda, 2008-2010 Eylül ayları arasında laboratuvarımıza gönderilen; koloni morfolojisi, gram boyama, katalaz, lam koagülaz, DNase ve oksasilin disk difüzyon testleri sonucu MRSA olarak değerlendirilen *S. aureus* suşları incelendi. Oksasilin disk difüzyon testi ile dirençli saptanan 190 suşun tümünde *mecA* geni tespit edilirken, sefoksitin disk difüzyon testi, oksasilin agar tarama, oksasilin E test, ve sefoksitin E test ile 190 suştan 188'i metisiline dirençli saptandı. Çalışmamızda, testler arasında belirgin fark olmamakla birlikte oksasilin disk difüzyon testinin MRSA tespitinde daha duyarlı olduğu saptandı.

Çalışmamızda MRSA suşlarının 6'sında (%3,16) PVL geni saptandı. Hastane kaynaklı 5 (%2,94) ve toplum kaynaklı 1 hasta (%5) örneğinde PVL geni tespit edildi. Önceki çalışmalarda PVL sıklıkla toplum kaynaklı stafilokok suşlarında tespit edilirken, günümüzde yapılan çalışmalarda hastane kaynaklı izolatlarda da tespit edildiği görülmektedir. Çalışmamızda saptadığımız HK-MRSA'larda gözlenen PVL pozitifliğinin TK-MRSA'lara yakın oranda olması sonucu, bu virülans faktörünün hastanelere yayılabileceğine dikkat çekmektedir.

Hastane içinde bu suşların yayılımını önlemek için gerekli izolasyon önlemlerinin uygulanması, yayılımı önleme ya da geciktirmede etkili olabilir.

PVL geni taşıyan MRSA'lar çoklu antibiyotik direncine sahip olduğu için tedavide güçlükler yaşanabilir.

Yapılacak ileri çalışmalarda, PVL geninin doğru tespiti için standardize yöntemlerin ve primerlerin geliştirilmesi gerekmektedir.

Sonuç olarak;

PVL pozitif MRSA suşları daha virulan ve çoklu ilaç direnci olduğu için araştırılmalı ve bu suşların toplum ve hastanede yayılımını engellemek için uygun enfeksiyon kontrol önlemleri alınmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Chambers HF. Methicillin Resistance in Staphylococci: Molecular and Biochemical Basis and Clinical Implications. Clin Microbio Rev 1997;10:781-91.
2. Lindsay JA, Holden MT. *Staphylococcus aureus*: superbug, super genome? Review. Trends Microbiol 2004;12(8):378-85.
3. Katayama Y, Takeuchi F, Ito T, Ui-Mizutani Y, Kobayashi I, Hiramatsu K. Identification in methicillin-susceptible *Staphylococcus hominis* of an active primordial mobile genetic element for the staphylococcal cassette chromosome mec of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 2003; 185: 2711–22.
4. Dündar V. Metisiline dirençli stafilokok infeksiyonları. Klim Derg 2000; 13: 26-27
5. Lina G, Piemont Y, Godail-Gamot F, et. al. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. Clin Infect Dis 1999; 29(5): 1128-32.
6. Supersac G, Prevost G, Piemont Y. Sequencing of leucocidin R from *Staphylococcus aureus* P83 suggests that staphylococcal leucocidins and gamma-hemolysin are members of a single, two-component family of toxins. Infect Immun 1993; 61(2): 580-7.
7. Clinical and Laboratory Standarts İnstitute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighteenth Informational Supplement 18.M100-S18. 2008; 28(1): 46-54
8. Hasbek M, Hakgüdener Y, Kaya S, Bakıcı ZM. Stafilokoklarda metisilin direncinin farklı yöntemlerle belirlenmesi ve çoğul antibiyotik direnci. C.Ü Tıp Fakültesi Dergisi 2002; 24(4): 179-184.
9. Bannerman TL. *Staphylococcus*, *Micrococcus* and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (Eds) Manual of Clinical Microbiology 9th Ed. Washington: DC, 2009: 390-411.

10. Winn W, Allen S, Janda W, et. al. Gram-Positive Cocci. In: Washington C. Winn Jr. (Eds). Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology 6. baskı. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2006: 624-43.
11. Cengiz AT. Stafilocoklar. Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Güneş Kitabevi, Ankara 2003: 339-48.
12. Bilgehan H. Staphylococcus. Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları. İzmir 2000: 240-66
13. Shopsisin B, Kreiswirth BN. Molecular epidemiology of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Emerg Infect Dis 2001; 7:323-26.
14. Grüneberg RN. Anti-Gram positive agents: What we have and what we would like. Drugs 1997; 6: 29-38.
15. Şardan YÇ. Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* infeksiyonlarının epidemiyolojisi ve kontrolü. Hastane İnfek Derg 2000; 4:205-207.
16. Peacock SJ. *Staphylococcus*. In: Borriello SP, Murray PR, Funke G (Eds). Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections 10th Ed. Hodder Arnold, London, United Kingdom. 2005: 771-832.
17. Alen S, Koneman E, Janda W, Schreckenberger P, Winn W, Woods G, Procop G. Eds. The gram-positive cocci: Part 1: Staphylococci and related organism. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology 6th Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006: 644-61.
18. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. The Staphylococci. İçinde: Brooks GF, Butel J. S, Morse SA (Eds). Medical Microbiology. 12. baskı New York: Javets, Melnick & Adelberg's; 2004: 223-30.
19. Ulusoy S, Usluer G, Ünal S. *Staphylococcus aureus*: Mikrobiyoloji, Patogenez ve Epidemiyoloji. İçinde: Gram Pozitif Bakteri İnfeksiyonları. Ankara: Bilimsel Tıp: 2004:9-71.
20. Mandell GL, Bennet JE, Dolin R. *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock). In: Mandell G. L, Bennet J. E, Dolin R. (Eds). Principles and Practise of Infectious Diseases volum 2 6. baskı. Philadelphia: Elsevier; 2005: 2321-51.
21. Parras FM, Guerrero DC, Bouza E, et. al. Comparative study of mupirocin and oral co-trimoxazole plus topical fusidic acid in eradication of nasal

- carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 175–9.
22. Armstrong-Esther CA, Smith JE. Carriage patterns of *Staphylococcus aureus* in a healthy non-hospital population of adults and children. *Ann Hum Biol* 1976; 3: 221–7.
 23. Kluytmans J, Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10(3): 505-20.
 24. Pattee PA and Neveln DS. Transformation analysis of three linkage groups in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 1975;124: 201-11.
 25. Salmenlinna S. Molekular Epidemiology of Meticillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Finland. Academic dissertation. Faculty of Medicine, University of Helsinki, Haartman Institute. Helsinki, 2002;14-44
 26. Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, et. al. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 2001; 357: 1225-40.
 27. Joklik WK, Willet HP, Amos DB, Wilfet C. *Zinsser Microbiology*. 20. Edition, Appleton and Lange 1992; 401-6.
 28. Moreillon P, Que Y, Glauser MP. *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock) In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (Eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th Ed. Philadelphia: Churchill Livingstone 2005; 2321-51.
 29. Marques MB, Weller PF, Parsonnet J, Ransil BJ, Nicholson-Weller A. Phosphatidylinositol-specific phospholipase C, a possible virulence factor of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1989; 27(11): 2451-4.
 30. Prevost GP, Couppie P, Prevost S, et. al. Epidemiological data on *Staphylococcus aureus* strains producing synergohymenotropic toxins. *J Med Microbiol* 1995; 42: 237–45.
 31. Boyle-Vavra S, Daum RS. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Panton-Valentine leukocidin. *Lab Invest* 2007; 87(1): 3-9.
 32. Kaneko J, Kamio Y. Bacterial two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: structures, pore-forming mechanism, and organization of the genes. *Biosci Biotechnol Biochem* 2004; 68(5): 981-1003.

33. Prevost G, Cribier B, Couppie P, et. al. Panton-Valentine leukocidin and gamma hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. *Infect Immun* 1995; 63: 4121–9.
34. Noda M, Kato I. Purification and crystallization of staphylococcal leukocidin. *Methods Enzymol* 1998; 165: 22–32.
35. Konig B, Prevost G, Konig W. Composition of staphylococcal bi-component toxins determines pathophysiological reactions. *J Med Microbiol* 1997; 46: 479–85.
36. Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, et. al. Community acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton–Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 978–84.
37. Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, et. al. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet* 2002; 359: 753–9
38. Adem PV, Montgomery CP, Husain AN, et. al. *Staphylococcus aureus* sepsis and the Waterhouse–Friderichsen syndrome in children. *New Engl J Med* 2005;353:1245–1251.
39. Lindsay JA, Ruzin A, Ross HF, Kurepina N, Novick RP. The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 1998;29(2):527-43.
40. Dündar V, Dündar DÖ. Stafilokok Enfeksiyonları. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (Eds). *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2008; 2065-77.
41. Bilgehan H. *Klinik Mikrobiyolojik Tanı*. 3. baskı. İzmir: Fakülteler Yayınevi Barış Yayınları. 2002; 692-694
42. VITEK 2 Product Information bioMérieux. Durham, North Carolina 27704-0969/ USA. <http://www.biomerieux.com>. Erişim tarihi: 12.10.2010
43. Brown DFJ, Edwards DI, Hawkey PM, et. al. Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 1000-18.
44. Ünal S. Stafilokoklarda metisilin ve enterokoklarda vankomisin direncinin belirlenmesi. *ANKEM Derg* 2007; 21 (Ek 2): 166-170.

45. Boyle-Vavra S, Ereshefsky B, Wang CC, et. al. Successful multiresistant community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineage from Taipei, Taiwan, that carries either the novel staphylococcal chromosome cassette *mecA* (SCCmecA) type VT or SCCmecA type IV. J Clin Microbiol 2005; 43: 4719–4730.
46. Köksal F. Bakteriyel Patojenite Adaları/Genomik Adalar. İçinde: IV. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kursu. Durmaz R (Eds). İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi, Malatya 3-7 Eylül 2007: 144-52.
47. Novick RP. Mobile genetic elements and bacterial toxins: the superantigen-encoding pathogenicity islands of *Staphylococcus aureus*. Plasmid. 2003; 49(2): 93-105.
48. Hanssen AM, Ericson Sollid JU. SCCmec in staphylococci: genes on the move. FEMS Immunol Med Microbiol 2006; 46:(1):8-20.
49. Novick RP, Schlievert P, Ruzin A. Pathogenicity and resistance islands of staphylococci. Microbes Infect 2001; 3(7): 585-94.
50. Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Trends in Microbiol 2001; 9: 486-93.
51. Ito T, Okuma K, Ma XX, Yuzawa H, Hiramatsu K. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. Drug Resistance Updates 2003; 6: 41-52.
52. Zhang K, McClure JA, Elsayed S et. al. 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 2005; 43: 5026-33.
53. Banu S. *Staphylococcus aureus*'ta metisilin ve vankomisin direnci. Hacettepe Tıp Dergisi 2007;38:127-134.
54. Ito T, Katayama Y, Hiramatsu K. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mecA* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 1449–58.
55. Ito T, Katayama Y, Asada K, et. al. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome in methicillin resistant *Staphylococcus*. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 1323-36.

56. Proctor RA, Langevelde PV, Kristjansson M, Maslow JN, Arbeit RD. Persistent and relapsing infections associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis 1995; 20: 95-102.
57. Rice LB, Sahm D, Bonomo RA. Mechanism of resistance to antimicrobial agents. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (Eds). Manual of Clinical Microbiology 9th Ed. Washington DC, 2009: 1075-1146
58. Ayaz C. Beta laktamların genel özellikleri ve penisilinler. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (Eds). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2008: 266-78.
59. McDougal L, Thornsberry C. The role of β -lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase resistant penicillins and cephalosporins. J Clin. Microbiol 1986; 23: 832-9.
60. 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 Chemother 1996; 40: 2680-5.
61. Song MD, Wachi M, Doi M, Ishino F, Matsubashi M. Evolution of an inducible penicillin-target protein in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by gene fusion. FEBS Lett 1987; 221: 167-71.
62. Tomasz A, Drugeon HB, De Lencastre HM, Jabes D, McDougal L, Bille J. New mechanism for methicillin resistance in *S. aureus*: clinical isolates that lack the PBP 2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity, Antimicrob Agents Chemother 1989; 33: 1867-9.
63. Merlino J, Watson J, Rose B, et. al. Detection and expression of methicillin/oxacillin resistance in multidrug-resistant and non-multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* in Central Sydney, Australia. J Antimicrob Chemother 2002; 49(5): 793-801.
64. Paul D, Stapleton T, Peter WT. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. Sci Prog 2002; 85(Pt 1): 57-72.
65. Rohrer S, Ehlert K, Tschierske M, Labischinski H, Berger- Bächli B. The essential *Staphylococcus aureus* gene *fmbB* is involved in the first step of

- peptidoglycan pentaglycine interpeptide formation. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1999; 96: 9351-5
66. Berger-Bächi B, Rohrer S. Factors influencing methicillin resistance in staphylococci. Arch Microbiol 2002; 178(3): 165-71.
67. Liu IX, Durham DG, Richards RME. Baicalin synergy with β -lactam antibiotics against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and other β -lactam-resistant strains of *S. aureus*. J Pharm Pharmacol 2000; 52: 361-6.
68. Gür D, Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (Eds). Bakterilerde antibiyotiklere karşı direnç. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2008: 243-57.
69. Sakarya S. Sefalosporinler. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (Eds). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2008: 278-88.
70. Topçu AW. Aminoglikozidler. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (Eds). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2008: 294-303.
71. Çokça F. Tetrasiklinler. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (Eds). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2008: 308-13.
72. Şenol E. Karbapenemler ve Monobaktamlar. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (Eds). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Nobel Tıp Kitabevleri İstanbul; 2008: 288-94.
73. Aksu HSZ, Candevir A. Sulfonamidler, Trimetoprim ve Trimetoprim-Sulfametoksazol. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (Eds). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2008: 368-72.
74. Tünger Ö. Makrolidler, ketolitler, linkozamitler. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (Eds). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2008: 313-26.
75. Arman D. Glikopeptidler, streptograminler ve lipopeptidler. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (Eds). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2008: 326-37.
76. Naimi TS, LeDell KH, Como-Sabetti K, et. al. Comparison of community- and health care associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. JAMA 2003; 290: 2976-84.

77. Lewis JS, Jorgensen JH. Inducible clindamycin resistance in staphylococci: should clinicians and microbiologists be concerned? *Clin Infect Dis* 2005; 40: 280–5.
78. Erol S. Rifamisinler. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (Eds). *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2008: 372-6
79. Schmitz FJ, Fluit AC, Hafner D, et. al. Development of resistance to ciprofloxacin, rifampin and mupirocin in methicillin-susceptible and resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 3229–31.
80. Usluer G. Oksazolidinonlar. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (Eds). *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi* İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2008: 337-341
81. Felek S. Mupirosin. In: Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S (Eds). *Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler* Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 2003: 427-30.
82. Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother* 1997; 40: 135-6
83. Smith TL, Pearson ML, Wilcox KR, et. al. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med* 1999; 340: 493-501.
84. 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. *Diag Microbiol Infect Dis* 2005; 51: 57-62.
85. Jorgense JH, Turnidge JD. Susceptibility testing methods: Dilution and disk diffusion methods. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (Eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 9th Ed. Washington DC: ASM Pres, 2009: 1146-73.
86. Clinical and Laboratory Standarts Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement*. CLSI Document M100-S20 Pennsylvania, 2010; 30:60-68.
87. Velasco D, Tomas MM, Cartelle M, et. al. Evaluation of different methots for detecting meticilline resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55: 379-82

88. Cauwelier B, Gordts B, Descheemaeker P, et. al. Evaluation of disk diffusion method with cefoxitin (30 microg) for detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2004; 23: 867-8.
89. Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE. The molecular evolution of methicillin- resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect 2007; 13: 222-35.
90. Comite de L'antibiogramme de la Societe Française Microbiologie. Communiqué 1996. Pathol Biol 1996; 44: 1-8.
91. Johnsson D, Mölling P, Strålin K, Söderquist B. Detection of Panton-Valentine leukocidin gene in *Staphylococcus aureus* by LightCycler PCR: Clinical and epidemiological aspects. Clin Microbiol Infect 2004; 10: 884-9.
92. Salgado CD, Farr BM, Calfee DP. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a meta-analysis of prevalence and risk factors. Clin Infect Dis 2003; 36(2): 131-9.
93. Swenson JM, Williams PP, Killgore G et. al. Performance of eight methods, including two new rapid methods, for detection of oxacillin resistance in a challenge set of *Staphylococcus aureus* organism. J Clin Microbiol 2001; 39:3785-8.
94. Oğuz VA, Dodanlı S, Yıldırım İ ve ark. Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) pevalansının farklı yöntemlerle araştırılması. Flora Derg 2001; 6(3): 178-83.
95. Cavassini M, Wenger A, Jaton K, et. al. Evaluation of MRSA-screen, a simple anti-PBP2a slide latex agglutination kit, for rapid detection of methicillin resistance *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 1999; 37: 1591-4.
96. Zhu L-X, Zhang Z-W, Wang C, Yang H-W, Zhang Q, Cheng J. Evaluation of the CLSI cefoxitin 30-µg disk diffusion method for detecting methicillin resistance in staphylococci. Clin Microbiol Infect 2006; 12: 1021-45
97. Telli M, Sümerkan B, Eşel D. *Staphylococcus aureus*'ta metisilin direncinin belirlenmesinde sefoksitin disk, oksasilin disk, oksasilin agar tarama ve PBP2a lateks testlerinin karşılaştırılması. İnfek Derg 2006; 20 (2): 93-6.
98. Felten A, Grandy B, Lagrange PH, et. al. 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. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2766-71.
- 99.** Swenson JA, Spargon J, Tenover FC, et. al. Optimal inoculation methods and quality control for the NCCLS oxacillin agar screen test for detection of oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2001; 37:81-4.
- 100.** Swenson JM. New tests for the detection of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol News* 2002; 24: 159-63.
- 101.** Kilic A, Mert G, Senses Z, Bedir O, Aydogan H, Basustaoglu AC, Appelbaum PC. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal isolates from Turkey. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2008; 94: 15-19.
- 102.** Chini V, Petinaki E, Foka A, Paratiras S, Dimitracopoulos G, Spiliopoulou I. Spread of *Staphylococcus aureus* clinical isolates carrying Panton-Valentine leukocidin genes during a 3-year period in Greece. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12(1): 29-34.
- 103.** Karahan ZC, Tekeli A, Adaleti R, Koyuncu E, Dolapci I, Akan OA. Investigation of Panton-Valentine leukocidin genes and SCCmec types in clinical *Staphylococcus aureus* isolates from Turkey. *Microb Drug Resist* 2008; 14(3): 203-10.
- 104.** Witte W, Braulke C, Cuny C, et. al. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with Panton-Valentine leukocidin genes in central Europe. *J Clin Microbiol Infect Dis* 2005; 24: 1-5.
- 105.** Ramdani-Bougoussa N, Bes M, Meugnier H, et. al. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains resistant to multiple antibiotics and carrying the Panton-Valentine leukocidin genes in an Algeria hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 1083-5.
- 106.** Moran GJ, Krishnadasan A, Gorwitz RJ, et. al. Methicillin-resistant *S. aureus* infections among patients in the emergency department. *N Engl J Med* 2006; 355: 666–74.
- 107.** Del Giudice P, Blanc V, Durupt F, et. al. Emergence of two populations of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with distinct epidemiological, clinical and biological features, isolated from patients with community-acquired skin infections. *Br J Dermatol* 2006; 154: 118-24.

- 108.**Öksüz L, Gürler N, Güner S, Kayacan BÇ. Klinik Örneklerden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarında Panton-Valentine Lökosidin (PVL) Varlığının Araştırılması: Ön Çalışma. 23. Ankem Antibiyotik ve Kemoterapi Kongresi. Çeşme-İzmir, 28 Mayıs-01 Haziran 2008.
- 109.**Kilic A, Uskudar GA, Senses Z, Bedir O, Aydoğan H, Basustaoglu C. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC *mec*) characterization and Panton-Valentine leukocidin gene occurrence for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Turkey, from 2003 to 2006. *Ant Leeuwen* 2008; 94: 607-14.
- 110.**Akoğlu H, Zarakolu P, Altun B, Ünal S. Hacettepe üniversitesi erişkin hastanesinde 2004-2005 yıllarında izole edilen hastane kaynaklı metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarının epidemiyolojik ve moleküler özellikleri. *Mikrobiyol Bul* 2010; 44: 343-55.
- 111.**Aires de Sousa M, Bartzavali C, Spiliopoulou I, Sanches IS, Crisóstomo MI, Lencastre H. Two international methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones endemic in a university hospital in Patras, Greece. *J Clin Microbiol* 2003; 41(5): 2027-32.
- 112.**Robert J, Etienne J, Bertrand X. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* producing Panton-Valentine leukocidin in a retrospective case series from 12 French hospital laboratories, 2000-2003. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 585-7.
- 113.**Wannet WJ, Spalburg E, Heck ME, et. al. Emergence of virulent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains carrying Panton-Valentine leukocidin genes in The Netherlands. *J Clin Microbiol* 2005; 43(7): 3341-5.
- 114.**Shukla SK, Stemper ME, Ramaswamy SV, Conradt JM, Reich R, Graviss EA, Reed KD. Molecular characteristics of nosocomial and Native American community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones from rural Wisconsin. *J Clin Microbiol* 2004; 42(8): 3752-7.
- 115.**Diep BA, Sensabaugh GF, Somboona NS, Carleton HA, Perdreau-Remington F. Widespread skin and soft-tissue infections due to two methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains harboring the genes for Panton-Valentine leukocidin. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2080-4.
- 116.**Holmes A, Ganner M, McGuane S, Pitt TL, Cookson BD, Kearns AM. *Staphylococcus aureus* isolates carrying Panton-Valentine leukocidin genes

- in England and Wales: frequency, characterization, and association with clinical disease. *J Clin Microbiol* 2005; 43(5): 2384-90.
- 117.**Karahan ZC, Dolapçı İ, Tekeli A. *Staphylococcus aureus* izolatlarında Panton-Valentine Lökosidin genlerinin polimeraz zincir reaksiyonu ile amplifikasyon sonuçları üzerine reaksiyon koşullarının etkisi. *Mikrobiyol Bul* 2009; 43: 519-28.
- 118.**Holderbaum D, Spech T, Ehrhart LA, Keys T, Hall GS. Collagen binding in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 2258 - 61.
- 119.**Linde H, Wagenlehner F, Strommenger B, et. al. Healthcare associated outbreaks and community-acquired infections due to MRSA carrying the Panton-Valentine leucocidin gene in southeastern Germany. *Eur J Microbiol Infect Dis* 2005; 24: 419-22.
- 120.**Saiman L, O'Keefe M, Graham PL, et. al. Hospital transmission of communityacquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among postpartum women. *Clin Infect Dis* 2003; 37: 1313-9.
- 121.**Aires-de-Sousa M, Conceicao T, de Lancelstre H. Unusually high prevalence of nosocomial Panton-Valentine leukocidin positive *Staphylococcus aureus* isolates in Cape Verde Islands. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3790-3.
- 122.**Ploy M, Grelaud C, Martin C, et. al. First clinical isolate of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a French hospital. *Lancet* 1998; 351: 121-2.
- 123.**Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, et. al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* 1997; 350: 1670-3.
- 124.**Centers for Disease Control and Prevention. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin-United States 1997. *MMWR* 1997; 46: 765-6.
- 125.**McManus J. Vancomycin resistant *staphylococcus* reported in Hong Kong. *BMJ* 1999; 318: 62-6.
- 126.**Mi-Na K, Pai CH, Woo JH, et. al. Vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* in Korea. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3879-81.

- 127.**Zhanel GG, DeCorby M, Laing N, et. al. Antimicrobial-Resistant Pathogens in Intensive Care Units in Canada: Results of the Canadian National Intensive Care Unit (CAN-ICU) Study, 2005-2006. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(4):1430-7.
- 128.**Gould SWJ, Cuschieri P, Rollason J, Hilton AC, Easmon S, Fielder MD. The need for continued monitoring of antibiotic resistance patterns in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from London and Malta. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2010; 21: 9-20.
- 129.**Thong KL, Junnie J, LieW FY, Yusof MY, Hanifah YA. Antibigrams and Molecular Subtypes of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Local Teaching Hospital, Malaysia. *J Microbiol Biotechnol* 2009; 19(10): 1265-70.
- 130.**Tristan A, Bes M, Meugnier H, et. al. Global distribution of Pantone-Valentine leukocidin positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, 2006; *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 13, No. 4, April 2007 *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 594-600.
- 131.**Ellington MJ, Ganner M, Warner M, Cookson BD, Kearns AM. Polyclonal multiply antibiotic-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with Pantone-Valentine leucocidin in England. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 46-50.

KISALTMALAR

BORSA	: Borderline Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
CCR	: Casette Chromosome Recombinase
CIP	: Siprofloksasin
CLSI	: Clinical and Laboratory Standarts Institute
CRF	: Coagulase Releasing Factor
DA	: Klindamisin
DDT	: Disk Difüzyon Testi
EA	: Ekolojik Adalar
ET	: Eksfoliyatif Toksin
FD	: Fusidik Asit
FOX	: Sefoksitin
GN	: Gentamisin
HK	: Hastane Kaynaklı
KNS	: Koagülaz Negatif Stafilokok
LZD	: Linezolid
MHA	: Mueller-Hinton Agar
MIK	: Minimal İnhibitör Konsantrasyon
MODSA	: Modified Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
MRSA	: Metisilin Resistan <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	: Metisilin Sensitif <i>Staphylococcus aureus</i>
NAG	: N-asetil glukozamin
NAM	: N-asetil muramik asit
ORF	: Open Reading Frame
OX	: Oksasilin
PA	: Patojenite Adaları
PBP	: Penisilin Bağlayan Protein
PFGE	: Pulsed Field Jel Elektroforez
PMNL	: Polimorfonükleer Lökositleri
PVL	: Panton-Valentine Lökosidin

PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RA	: Rifampin
SCC	: Staphylococcal Cassette Chromosome
SHDS	: Stafilokokal Haşlanmış Deri Sendromu
STŞS	: Stafilokoksik Toksik Şok Sendromu
SXT	: Trimetoprim Sülfametoksazol
TE	: Tetrasiklin
TK	: Toplum Kaynaklı
TŞST-1	: Toksik Şok Sendromu Toksini-1
VA	: Vankomisin
VISA	: Vancomycin Intermediate <i>Staphylococcus aureus</i>
VRSA	: Vancomycin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>

ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ

Şekiller	Sayfa No
Şekil 1 (PVL üretebilen TK-MRSA'nın ortaya çıkışı)	24
Şekil 2 (PVL'nin doku nekrozundaki rolü)	26
Şekil 3 (SCC mec tipleri)	39

Resimler	Sayfa No
Resim 1 (Oksasilin ve sefoksitin disk difüzyon testi -dirençli)	51
Resim 2 (Oksasilin ve sefoksitin disk difüzyon testi -duyarlı)	52
Resim 3 (Oksasilin ve sefoksitin E Test -dirençli)	53
Resim 4 (Oksasilin ve sefoksitin E Test -duyarlı)	53
Resim 5 (<i>mecA</i> PZR görünümü)	55
Resim 6 (PVL PZR görünümü)	56
Resim 7 (56 numaralı suş)	63
Resim 8 (58 numaralı suş)	64

TABLULAR

Tablolar	Sayfa No
Tablo 1 (Stafilokok tür ve alt türleri)	11
Tablo 2 (<i>S.aureus</i> 'un patogenezinde rol oynayan ekstrasellüler faktörler)	15
Tablo 3 (<i>S. aureus</i> 'un bazı yüzey proteinleri)	20
Tablo 4 (<i>S.aureus</i> ve KNS'lerde CLSI tarafından önerilen oksasilin-sefoksitin disk difüzyon ve E-test duyarlılık sınırları)	53
Tablo 5 (<i>MecA</i> PZR testi için gereken PZR karışımı)	55
Tablo 6 (<i>MecA</i> ısı döngü reaksiyon aşamaları)	56
Tablo 7 (PVL testi için gereken PZR karışımı)	57
Tablo 8 (PVL için ısı döngü reaksiyon aşamaları)	57
Tablo 9 (Klinik örneklerin dağılımı)	62
Tablo 10 (Uygulanan testlere göre MR ve MS suşların dağılımı)	63
Tablo 11 (Hastane ve toplum kaynaklı örneklerdeki PVL dağılımı)	64
Tablo 12 (Suşların çeşitli antibiyotiklere duyarlılık sonuçları)	65
Tablo 13 (Suşların antibiyotik duyarlılık sonuçlarının hastane ve toplum kaynaklı olarak dağılımı)	66
Tablo 14 (PVL pozitif suşların antibiyotiklere duyarlılıklarının dağılımı)	67
Tablo 15 (PVL negatif suşların antibiyotiklere duyarlılıklarının dağılımı)	67
Tablo 16 (PVL pozitif ve negatif suşların antibiyotik direnç paternleri)	68