

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN
STAPHYLOCOCCUS SUŞLARININ DİRENÇ
PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ**

Bio. Teyde ÇALIŞKAN

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç.Dr. Zafer ÇETİNKAYA
Tez No: 2011 – 016**

2011 – Afyonkarahisar

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN STAPHYLOCOCCUS
SUŞLARININ DİRENÇ PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ**

Bio. Teyde ÇALIŞKAN

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç.Dr. Zafer ÇETİNKAYA**

**Bu Tez Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu
Tarafından 10.TIP.13 Proje Numarası İle Desteklenmiştir.**

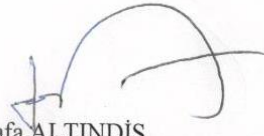
Tez No: 2011 - 016

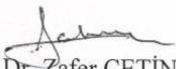
2011 – Afyonkarahisar

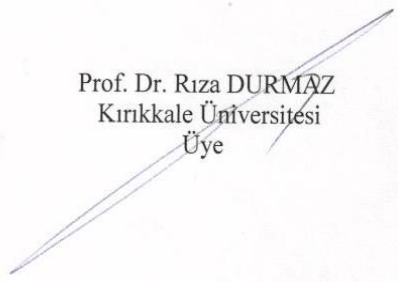
KABUL ve ONAY

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Mikrobiyoloji Programı
çerçevesinde yürütülmüş bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi
olarak kabul edilmiştir.


Tez Savunma Tarihi: 30/05/2011


Doç. Dr. Mustafa ALTINDIŞ
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Jüri Başkanı


Doç. Dr. Zafer ÇETİNKAYA
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Üye


Prof. Dr. Rıza DURMAZ
Kırıkkale Üniversitesi
Üye

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Teyde ÇALIŞKAN'ın Klinik Örneklerden İzole Edilen Staphylococcus Suşlarının Direnç Profillerinin Belirlenmesi başlıklı tezi 10.06.2011 günü saat 11.00 da Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.


Prof. Dr. İsmail BAYRAM
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında öğrenciliğim süresince yetişmemde büyük emekleri ve katkıları olan, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım değerli hocalarım, Doç. Dr. Zafer ÇETİNKAYA, Doç. Dr. Mustafa ALTINDIŞ, Doç. Dr. İhsan Hakkı ÇİFTÇİ, Doç. Dr. Orhan Cem Aktepe ve Yrd. Doç. Dr. Özlem MİMAN'a;

Tezimin hazırlanmasında benden yardımlarını esirgemeyen, yapıcı eleştiri ve önerilerinden faydalandığım tez danışmanım sayın Doç. Dr. Zafer ÇETİNKAYA'ya;

Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda bulunduğum süre içerisinde tez çalışmalarımındaki yardımlarından dolayı Doç. Dr. İhsan Hakkı ÇİFTÇİ, Uzm. Dr. Gülşah AŞIK, Yüksek Lisans öğrencileri Bio. Kübra ÇALIŞKAN ERYEĞEN, Bio. Davut ÇUFALI, Bio. Hatice DECDELİ ve Bio. Ebru KIRAÇ, Doktora öğrencisi Bio. Emine DURHAN, çok sevdiğim arkadaşım Bio. Sefa ÇAMDERE ve mikrobiyoloji biriminde çalışan tüm biyolog ve laborant arkadaşlara;

Hayatım boyunca desteklerini hep yanımda hissettiğim sevgili anneme, babama ve kardeşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca; tez çalışmamı 10.TIP.13 no'lu proje ile destekleyen Afyon Kocatepe Üniversitesi Rektörlüğü'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY	i
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR	vi
TABLolar DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii

1. GİRİŞ	1
1.1. Tarihçe	1
1.2. Sınıflandırma	2
1.3. Morfolojik Özellikleri	3
1.4. Yapısal Özellikler.....	4
1.5. Kültür Özellikleri	6
1.6. Kimyasal Özellikleri	7
1.7. Patogenez ve İmmünite	7
1.7.1. Enzimler	7
1.7.1.1. Katalaz.....	7
1.7.1.2. Koagülaz	7
1.7.1.3. Lipaz.....	8
1.7.1.4. Hyalüronidaz	8
1.7.1.5. Fibrinolizin (Stafilokinaz)	8
1.7.1.6. Nükleaz	8
1.7.1.7. Fosfatidilinozitol – Spesifik fosfolipaz C.....	9
1.7.1.8. Deoksiribonükleaz.....	9
1.7.1.9. Penisilinaz (β -laktamaz).....	9
1.7.1.10. Slime Faktör	10
1.7.2. Stafilokokal Toksinler	11
1.7.2.1. Sitolitik Toksinler	11
1.7.2.2. Enterotoksin	12
1.7.2.3. Eksfoliyatif toksin (Eksfoliyatin)	13
1.7.2.4. Toksik şok sendromu toksini-1 (TSST-1)	14
1.8. Epidemiyoloji.....	14
1.8.1. MRSA Enfeksiyonlarının Kontrolü.....	16
1.9. <i>S.aureus</i> ' un Neden Olduğu Enfeksiyonlar	18
1.9.1. Deri Enfeksiyonları	18
1.9.2. Bakteriyemi	19
1.9.3. Endokardit	20
1.9.4. Organ Enfeksiyonları	20
1.9.5. <i>S.aureus</i> ' un toksinleriyle yaptığı hastalıklar	21
1.9.6. Koagülaz negatif stafilokok enfeksiyonları.....	22
1.10. Stafilokok enfeksiyonlarında tedavi	23
1.10.1. Hücre Duvar Sentezini Etkileyen Antibiyotikler.....	24
1.10.1.1. β -laktam antibiyotikler	24
1.10.1.2. Glikopeptid antibiyotikler	28
1.10.2. Protein Sentezini İnhibe Eden Antibiyotikler.....	29
1.10.2.1. Aminoglikozidler	29
1.10.2.2. Makrolidler.....	29
1.10.2.3. Oksazolidonlar	30
1.10.2.4. Streptograminler	31
1.10.2.5. Linkozamidler	31

1.10.2.6. Tetrasiklinler	32
1.10.2.7. Kloramfenikol	33
1.10.3. Nükleik Asit Sentezini İnhibe Eden Antibiyotikler	33
1.10.3.1. Sülfonamidler ve Trimetoprim	33
1.10.3.2. Kinolonlar	34
1.10.3.3. Rifampin.....	35
1.10.4. Diğer ajanlar	35
1.11. Stafilokoklarda Metisilin Direnci	36
1.11.1. Stafilokoklarda Metisilin Direnç Mekanizmaları	37
1.11.1.1. Yeni Bir Penisilin Bağlayıcı Penisilin (PBP2a) Sentezi Nedeniyle Oluşan Direnç	37
1.11.1.2. Aşırı β -laktamaz Salgılanması İle Oluşan Direnç	43
1.11.1.3. Mevcut PBP'lerde β -laktam Antibiyotik Afinitesinde Azalma İle Oluşan Direnç.....	43
1.11.2. Metisilin Direncini Etkileyen İnternal Faktörler	43
1.11.3. Metisilin Direncini Etkileyen Eksternal Faktörler.....	44
1.11.4. Metisilin Direncinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler.....	44
1.11.4.1. Fenotipik Yöntemler	45
1.11.4.2. Moleküler Yöntemler	46
1.11.5. Epidemiyolojik Yönden Birbirine Benzeyen Kökenlerin Tanımlanması	48
1.11.5.1. Fenotipik Yöntemler	48
1.11.5.2. Genotipik yöntemler.....	49
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	51
2.1. Klinik Örneklerden Bakteri İdentifikasyonu	51
2.2. Metisilin Direncinin Belirlenmesi	53
2.2.1. Disk Difüzyon Yöntemi	53
2.2.2. Çoklu Antibiyotik Direncinin Belirlenmesi	54
2.2.3. Moleküler Yöntemler	55
2.2.3.1. Bakteriyel DNA'nın Hazırlanması	55
2.2.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	56
2.2.3.3. Agaroz Jel Hazırlanması	57
2.2.3.4. Agaroz Jel Elektroforezi.....	58
3. BULGULAR.....	59
4. TARTIŞMA	65
5. SONUÇ	72
ÖZET.....	73
SUMMARY	74
KAYNAKLAR.....	75

SİMGELER ve KISALTMALAR

°C	Santigrat derece
µl	Mikrolitre
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
BORSA	Borderline Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CRF	Coagulase Reacting Factor
CoNS	Koagülaz negatif stafilokok
DDT	Disk Difüzyon Test
DNaz	Deoksiribonükleaz
ETA	Eksfoliyatif toksinA
ETB	Eksfoliyatif toksinB
Ig	Immunglobulin
KNS	Koagülaz Negatif Stafilokok
MDR	Çoğul antibiyotik direnci (multiple drug resistance)
MHA	Muller Hinton Agar
MİK	Minunum İnhibitör Konsantrasyonu
MLSB	Makrolid-Linkozamid-StreptograminB
MRS	Metisilin Rezistan Stafilokok
MRKNS	Metisilin Rezistan Koagülaz Negatif Stafilokok
MRSA	Metisilin Rezistan <i>Staphylococcus aureus</i>
MODSA	Moderately Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
MSS	Methicilline Susceptibility <i>Staphylococcus</i>
MSSA	Methicilline Susceptibility <i>Staphylococcus aureus</i>
NAG	N-asetilglukozamin
NAM	N-asetilmuramik asit
PBP	Penisilin Bağlayan Protein
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
PVL	Panton-Valentin lökositidin
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
OS-MRSA	Oksasiline duyarlı MRSA
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SCCmec	Staphylococcal Cassette Chromosome
TBE	Tris, Borik asit, EDTA
TSST-1	Toxic Shock Syndrome Toxin-1
TK-MRSA	Toplum Kökenli-Metisiline Rezistan <i>Staphylococcus aureus</i>
VISA	Vancomycin Intermediate <i>Staphylococcus aureus</i>
VRSA	Vancomycin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>

TABLolar DİZİNİ

Tablo1.1.Stafilokokların DNA/DNA ilişkileri ve fenotipik özelliklerine göre sınıflandırılması	3
Tablo 3.2 <i>S.aureus</i> suşlarının çoklu antibiyotik duyarlılıkları	61
Tablo 3.3 KNS suşlarının antibiyotik direncinin <i>mecA</i> gen varlığı ile karşılaştırılması	63
Tablo 3.4 KNS suşlarının türlerine göre çoklu antibiyotik duyarlılıkları	64

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Stafilokok gram görüntüsü	3
Şekil 1.2 Peptidoglikan zincirler ve aralarındaki çapraz bağlar.	4
Şekil 1. 3.Penisilin G'nin Yapısı.....	25
Şekil 1. 4.Metisilinin Yapısı.....	25
Şekil 1. 5.Sephalosporinin Yapısı	27
Şekil 1. 6.Karbapenemin yapısı.....	27
Şekil 1. 7.Vankomisin'in Yapısı	28
Şekil 1. 8.Teikoplanin'in Yapısı	28
Şekil 1. 9.Gentamisin, Tobramisin ve Amikasin'in Yapıları	29
Şekil 1. 10.Eritromisin'in Yapısı	30
Şekil 1.11 Linezolid'in 70S başlangıç kompleksini önlemesi	30
Şekil 1. 12.StreptograminB Yapısı.....	31
Şekil 1. 13.Klindamisin'in Yapısı.....	32
Şekil 1. 14.Tetrasiklin'in Yapısı	32
Şekil 1. 15.Kloramfenikol'un Yapısı	33
Şekil 1. 16.SXT'nin Yapısı.....	34
Şekil 1. 17.Kinolon'ların Yapısı	35
Şekil 1. 18.mec DNA bölgesi.....	38
Şekil 1. 19.Mec gen kompleksinin dört sınıfı.....	39
Şekil 1. 20.Ccr gen kompleksinin yapısı	39
Şekil 1. 21.Stafilokoklarda tanımlanan SCCmec tipleri.....	41
Şekil 2. 1 Stafilokok koloni morfolojisi	52
Şekil 2. 2 Tüpte koagülaz testi	53
Şekil 2. 3 DNaz besiyeri / S.aureus / KNS	53
Şekil 3. 1 S.aureus suşlarının servislere göre dağılımı	59
Şekil 3. 2 S.aureus suşlarının klinik örneklerle göre dağılımı	60
Şekil 3. 3 S.aureus suşlarının yaş gruplarına göre dağılımı.....	60
Şekil 3. 4 S.aureus suşlarında nuc gen bölgesi	61
Şekil 3. 5 KNS suşlarının servislere göre dağılımı.....	62
Şekil 3. 6 KNS suşlarının klinik örneklerle göre dağılımı.....	62
Şekil 3. 7 KNS suşlarının yaş ortalamasına göre dağılımı	63
Şekil 3. 8 KNS suşlarının tür dağılımı	63
Şekil 3. 9 Dirençli stafilokoklarda mecA geninin gösterilmesi.....	64

1. GİRİŞ

Yirmi birinci yüzyılda tıp biliminin elde ettiği en önemli kazanımlardan biri; insanın ortalama yaşam süresinde belirgin artış olmasıdır. Global olarak bakıldığında, 1955 yılında ortalama yaşam süresi 48 iken 1997 yılında 66 yaşa kadar uzamıştır. Bu da yarım yüzyıldan az bir sürede %38 artışa denk düşmektedir.

Yaşam süresindeki bu artışın pek çok sebebi vardır, ancak majör sebeplerden biri enfeksiyon hastalıklarına bağlı morbidite ve mortalitenin azalmasıdır. Enfeksiyon hastalıklarının azalması multifaktöriyel olmasına rağmen, üç ana faktör dikkat çekmektedir. Birinci faktör; artmış sanitasyon ve hijyenik koşullar, ikinci faktör; etkili aşuların geliştirilmesi, üçüncü faktör ise; 1930 ve 1940'lı yıllardan başlayarak güvenli ve etkili antimikrobiyal ajanların keşfi ve üretimidir.

Dünya Sağlık Örgütü istatistiklerine göre, 1997 yılında dünyada her üç ölümden biri enfeksiyöz ya da paraziter sebeplerle oluşmuştur. Bu sonuç çarpıcı olmasına rağmen, aslında enfeksiyon hastalıklarına bağlı ölüm oranlarını gerçek değerlerinden az göstermektedir (Ostroff ve Leduc, 2000).

Stafilokoklar; antibiyotiklerin daha keşfedilmediği dönemlerde çok ağır seyreden, tedavisi zor, ölümcül enfeksiyonlara neden olmaktadır. Günümüzde de nozokomiyal patojenler içinde öneminin giderek artması, epidemilere yol açabilmesi ve çoklu antibiyotik direncine bağlı olarak tedavi seçeneklerinin kısıtlanması nedeniyle dünya tıp gündeminin başlarında yer almaktadır (Ostroff ve Leduc, 2000).

1.1. Tarihçe

Stafilokoklar; 100 yıldan fazla bir zamandır enfeksiyon etkenleri arasında en çok dikkati çeken bakteriler olarak tıp dünyasının gündeminde yer almaktadır. Stafilokoklar, ilk olarak 1878'de Robert Koch tarafından tanımlanmıştır. Sir

Alexander Ogston tarafından 1880’de üzüm salkımına benzetilmiş ve düzensiz kümeler oluşturmaları nedeniyle stafilocok olarak isimlendirilmiştir. Ardından, 1884’te Rosenbach hasta örneklerinden bu mikroorganizmaları ilk kez izole etmiştir (Waldvogel, 1995; Sheagren ve Schaberg; 1998; Bilgehan, 1996; Cengiz, 2004).

Penisilinin; 1928’de Alexander Fleming tarafından bulması ve 1940’da Florey ve Chain tarafından üretiminin başarılması ile stafilocokların oluşturduğu enfeksiyonların tedavisinde başarı kaydedilmiştir. Penisilinaz üretimi ilk olarak 1940’da Abraham Chain tarafından *Escherichia coli* bakterisinde bildirilmiştir. *Staphylococcus aureus* suşlarında ise penisilin direncini 1944’de Kirby tanımlamıştır (Shopsin ve Kreiswirth, 2001).

İlk semi sentetik penisilinaza dirençli antimikrobiyal olan metisilin 1959’da klinik kullanıma girmiştir. Metisiline dirençli ilk *S.aureus* (MRSA) izolatları iki yıl sonra İngiltere’den bildirilmiştir. Bu direnç 1960’lı yıllarda Avrupa’da ve 1970’li yıllarda ABD’nde önemli bir sorun haline gelmiştir. Özellikle 1980’li yıllarda MRSA suşları hastane kaynaklı salgın etkeni olarak bildirilirken; kinolonlar, klindamisin, makrolidler, kloramfenikol, tetrasiklinler, aminoglikozidler, trimetoprim sulfametoksazol ve rifampisin gibi antibiyotiklere karşı çoklu direnç ile sık karşılaşmıştır (Grüneberg, 1997; Şardan, 2000).

1.2. Sınıflandırma

Stafilokoklar, *Micrococcaceae* ailesi içinde yer almaktadır. *Staphylococcus* generisi içinde şu ana kadar 33 tür saptanmış olup 17 tanesi insan klinik örneklerinde soyutlanmıştır (Koneman ve ark., 1997). Stafilocok türleri DNA/DNA ilişkileri ve fenotipik özelliklerine göre en az dört grup altında toplanabilirler (Waldvogel, 2000; Bilgehan, 2000) (Tablo1.1).

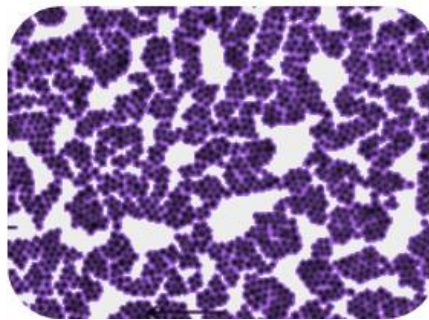
Tablo1.1. Stafilokokların DNA/DNA ilişkileri ve fenotipik özelliklerine göre sınıflandırılması (Waldvogel, 2000; Bilgehan, 2000)

<i>S. epidermidis</i> grubunda	<i>S. saprophyticus</i> grubunda	<i>S. simulans</i> grubunda	<i>S. sciure</i> grubunda	Herhangi bir gruba dahil olmayanlar
<i>S. epidermidis</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. simulans</i>	<i>S. sciure</i>	<i>S. aureus</i>
<i>S. capitis</i>	<i>S. cohnii</i>	<i>S. carnosus</i>	<i>S. lentus</i>	<i>S. auricularis</i>
<i>S. warneri</i>	<i>S. xylosus</i>			<i>S. intermedius</i>
<i>S. haemolyticus</i>				<i>S. hyicus</i>
<i>S. hominis</i>				<i>S. caseolyticus</i>
<i>S. saccharolyticus</i>				

Stafilokoklar arasında patojenitesi en yüksek tür *Staphylococcus aureus*’dur. *S. aureus* dışında çeşitli koagülaz üretmeyen stafilokoklar da (*S. epidermidis* ve *S. saprophyticus*) insanlarda çeşitli enfeksiyonlara sebep olmaktadır (Koneman ve ark., 1997; Janda ve ark., 1994). Fırsatçı enfeksiyonlardan nadir olarak *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. saccharolyticus*, *S. cohnii*, *S. simulans*, *S. capitis*, *S. sciuri*, *S. lugdunensis*, *S. caprae* sorumludur (Koneman ve ark., 1997; Kawamura ve ark., 1998).

1.3. Morfolojik Özellikleri

Stafilokoklar; gram pozitif kok görünümündedir. Ayrıca; 0,5-1,5µm çapında, yuvarlak, hareketsiz, sporsuz, katı besiyerine birbirine bakan iki dik yüzeyde bölünerek ürerler. Üç veya dört hücreden oluşan kısa zincirler yapabilirler ve düzensiz üzüm salkımı (*Staphylo*: Üzüm salkımı, *Coccus*: Tanesi) benzeri şekiller oluştururlar (Waldvogel, 2000; Cengiz, 1999) (Şekil1.1).



Şekil 1.1 Stafilokok gram görüntüsü

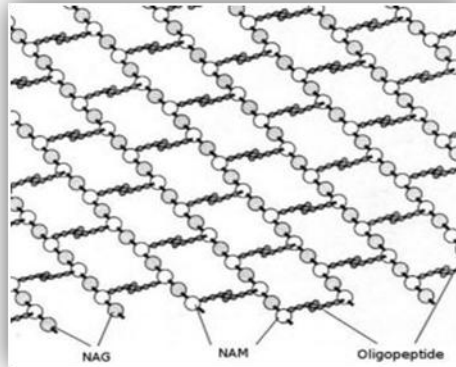
(<http://student.ccbcmd.edu/courses/bio141/labmanua/lab15/gpstaph.html> den uyarlanmıştır, 24/05/2011)

1.4. Yapısal Özellikler

Stafilokokların genomu yaklaşık 2800 baz çiftli sirküler bir kromozom ile profajlar, plazmidler ve transpozonlardan oluşur. Bakterinin virulansından ve direncinden sorumlu olan genler *S.aureus* kökenlerine, diğer stafilokok türlerine ve farklı cins gram pozitif bakterilere en sık aktarılma yolu transdüksiyondur (Tünger, 2004).

Stafilokokların hücre duvarının en dış tabakası polisakkarit bir kapsül ile örtülebilmektedir. Kapsül, bakteriyi fagositozdan korur. Genetik faktörler ve üreme ortamlarına bağlı olarak, çoğu stafilokoklar tarafından monosakkarit, protein ve küçük peptidlerin oluşturduğu, suda çözünebilir, gevşek bağlı ince bir tabaka (slime tabakası) üretilir (Muray ve ark., 2005).

Peptidoglikan tabaka; stafilokokların hücre duvar kuru ağırlığının yarısını oluşturur. Peptidoglikan tabaka; β -1,4 glikozid bağları ile birbirine bağlanan N-asetilglukozamin (NAG) ve N-asetilmuramik asit (NAMA) alt gruplarından meydana gelir. NAMA; D ve L aminoasitlerinden oluşmuş pentapeptid zincirleri bulundurur. NAMA'de bağlanan pentapeptid yapısı sırasıyla; L-alanin, D-glutamik asit, L-lizin, D-alanin, D-alanin şeklindedir. Pentapeptid yan zincirleri, pentaglisin köprüleri ile bir zincirde D-alanin ile diğer zincirdeki L-lizin arasında olacak şekilde birbirlerine çapraz bağlanır. *S.aureus*'da çapraz bağlantı oranı yüksektir ve bu özellik bakterinin lizozim enzimine karşı dirençli olmasını sağlar (Ünal, 2004; Lodise ve ark., 2005).



Şekil 1.2 Peptidoglikan zincirler ve aralarındaki çapraz bağlar.

(<http://content.answers.com/main/content/> den uyarlanmıştır, 31/01/2010).

Hücre duvarının sentezi çoklu enzimatik adımlardan oluşan bir süreçtir. Özetle, disakkarit peptidler şeklindeki prekürsörler plazma membranından transport edilir ve ilk duvar sentezine katılması sağlanır. Son basamakta, oluşan peptid zinciri henüz çapraz bağlanmamış peptid ve önceden hazırlanmış peptidoglikan arasında peptid bağı oluşturur. Bu bağlanma transpeptidaz enzimleri tarafından gerçekleştirilir. Bu transpeptidasyon olayı üç boyutlu bir ağ oluşumuna sebep olur ve hücre duvarına tam bir sağlamlık kazandırır (Cottagnoud, 2002).

Transpeptidaz ve karboksipeptidazlar gibi hücre duvarı sentezinin son basamağına katılan bütün enzimler plazma membranına sıkıca bağlanmış durumdadırlar. Bu enzimler ayrıca β -laktam antibiyotiklere kovalent olarak bağlandığı ve yine bu antibiyotikler tarafından inaktive edildikleri için penisilin bağlayan proteinler olarak da isimlendirilirler (Pereira ve ark., 2007). Kısaca PBP'ler hücre duvarında bulunan, transpeptidaz, karboksipeptidaz ve endopeptidaz gibi enzimlerdir. Bu enzimler bakterinin büyüme ve bölünmesi sırasında hücre duvarının bir araya gelmesi ve şekil almasından sorumludurlar. Bakteriler yapıları birbirine benzer dört ayrı özellikte PBP yaparlar (Cengiz, 2004). Penisilinler bağlandıkları PBP'lere göre bakterilerde farklı etki gösterir. *S.aureus*'larda hücre duvarı sentezinde normalde PBP 1, 2 ve 3 görev alır. Bunlara ek olarak MRSA'lar farklı bir PBP olan PBP2a'ya sahiptirler. PBP'lerin inaktivasyonu bakterinin ölümüne yol açarken PBP'nin β -laktam antibiyotiklere olan afinitesindeki azalma ise dirence neden olur (Martin ve ark., 2007; Livermore, 2000).

Hücre duvarını oluşturan bir diğer önemli yapı da; peptidoglikan tabakaya kovalan olarak bağlı olan teikoik asittir. Teikoik asit; gliserol fosfat polimeridir ve bir kısmı da sitoplazma membranındaki glikolipidlere bağlanır. Bu yapı lipoteikoik asit olarak adlandırılır. Ayrıca teikoik asit; stafilokokların konağa aderensini sağlar (Langevelde, 1998).

Virülansda önemli bir yapı olan proteinA da *S.aureus*'un yüzey proteinlerinden biridir. ProteinA, IgG'nin Fc kısmına bağlanarak antifagositik etki gösterir (Koneman ve ark., 1997).

Stafilokoklarda çok sayıda yüzey proteini tanımlanmaktadır. Çoğu *S.aureus* suşunun en dış yüzeyinde **clumping faktör** (bağlı koagülaz) bulunmaktadır. Clumping faktör, fibrinojeni fibrine dönüştürür ve stafilokokların kümeleşmesine sebep olur. Bu proteinin saptanması, *S.aureus*'un tanımlanmasında temel bir testtir (Muray ve ark., 2005).

Sitoplazmik membran; protein, lipit ve az miktardaki karbonhidratların bileşiminden oluşur. Hücrede osmotik bariyer olarak çalışır. Hücresel biyosentez ve solunum enzimlerinin sentezlenmesinde görevlidir (Muray ve ark., 2005).

1.5. Kültür Özellikleri

Aerob olup basit besiyeri dahil birçok besiyerlerinde üreyebilir (Kloss ve Bannerman, 1995). Üreme için optimal ısı 37°C ve optimal pH 7.4'tür. Stafilokok izolatları %10 ve daha az oranda NaCl içeren ortamlarda üreyebilirler. Bazı *S.aureus* suşları hücre zarında yer alan karotenoid yapıdaki pigmentten dolayı altın sarısı rengi koloni yapabilirler (Kawamura ve ark., 1998).

Stafilokoklar; kanlı agar, nutrient agar, triptik soy agar ve beyin kalp infüzyon agar gibi birçok basit besiyerinde ürer. Kanlı agar besiyerlerinde koloniler 18-24 saatte krem-sarı, portakal rengi pigmentasyon gösterirler. Oluşan koloniler S tipi, yuvarlak, hafif kabarık görünümündedir. Belirgin kapsül oluşturan suşlar parlak ve ıslak görünüme sahip olabilir. Kanlı agarda β hemoliz yaparlar. *S.aureus* hem aerob hem de anaerob ortamda ürer (Bannerman, 2003; Peacock, 2005; Moreillon ve ark., 2005).

Gliserol monoasetat gibi yağ asitleri ile zenginleştirilmiş besiyerinde, 37°C'de üretildiklerinde pigment oluştururlar. Buyyonda ve anaerob koşullarda pigment yapmazlar. *S.aureus* altın sarısı, *S.epidermidis* tebeşir beyazı (porselen beyazı) renginde koloniler oluşturur. *S.simulans*, *S.intermedius* ve *S.hycus subsp.hycus* pigment oluşturmaz.

1.6. Kimyasal Özellikleri

Stafilokoklar glukozu fermantatif olarak parçalar ve son ürün olarak laktik asit oluştururlar. Ayrıca laktoz, sukroz, mannoz, trehaloz ve maltozu da fermente edebilirler. Mannitolu ise sadece *S.aureus* fermente eder ve koagülaz pozitifdir (Moreillon ve ark., 2005; Cengiz, 1999).

Furazolidon ve lizostafine duyarlı olmalarına karşın, basitrasin ve lizozime direnç gösterirler. Dezenfektan ve antiseptiklere duyarlıdır. Kuarterner amonyum klorür bileşikleri ile etkin bir şekilde dezenfekte edilebilir ayrıca alkol ve iyot gibi antiseptiklere de oldukça duyarlıdır (Bannerman, 2003; Alen ve ark., 2006). *S.saprophyticus*, *S.cohnii*, *S.xylosus* novobiosine dirençli suşlardır. *S.aureus* mannitol ve trehalozdan asit oluşturarak *S.epidermidis*'ten; novobiosine duyarlı olması ile *S.saprophyticus* 'tan ayrılabilir (Cengiz, 1999).

1.7. Patogenez ve İmmunite

1.7.1. Enzimler

1.7.1.1. Katalaz

Tüm stafilokoklar katalaz enzimine sahiptir. Süperoksit dismutaz ve indirgenmiş flavoproteinlerin oksitlenmesi sırasında bakteri hücresi içerisinde açığa çıkan toksik hidrojen peroksiti su ve oksijene katalize eder (Muray ve ark., 2005; Gülay, 1999).

1.7.1.2. Koagülaz

Stafilokoklar bağlı ve serbest olmak üzere 2 tip koagülaza sahiptir. Stafilokok hücre duvarında bulunan bağlı koagülaz (clumping factor) doğrudan fibrinojeni fibrine dönüştürebilir ve stafilokoklarda kümelenmeye sebep olur. Serbest koagülaz ise; bir

plazma globulin faktörü (coagulase reacting factor) ile reaksiyona girerek bir trombin benzeri faktör (staphylothrombin) oluşturur. Koagülaz, stafilokok absesinin çevresinde fibrin oluşumuna sebep olur ve böylece enfeksiyon lokalize edilerek organizma fagositozdan korunur (Muray ve ark., 2005; Koneman ve ark., 1997).

1.7.1.3. Lipaz

S.aureus suşlarının tümü ve KNS'ların yaklaşık %30'undan fazlasında üretilir. Lipaz, yağları hidrolize ederek vücudun lipid içeren bölgelerinde stafilokokların yaşamasını sağlamakta ve yüzeyel dokuları invaze ederek fronkül ve karbonkül gibi enfeksiyonlarının gelişimine neden olmaktadır (Alen ve ark., 2006; Cengiz, 1999).

1.7.1.4. Hyalüronidaz

S.aureus'ların %90'dan fazlası tarafından üretilen bu enzim, bağ dokunun asellüler matriksinde bulunan asidik mukopolisakkaritler olan hyalüronik asidi hidrolize eder. *S.aureus*'un dokulara yayılımını kolaylaştırır (Muray ve ark., 2005).

1.7.1.5. Fibrinolizin (Stafilokinaz)

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

1.7.1.6. Nükleaz

Stafilokokların neredeyse tümü bu enzimi üretiliyor olmasına rağmen, termostabil nükleaz enzimi, *S.aureus* için önemli bir marker'dır. Bu enzimin enfeksiyon patogenezindeki fonksiyonu bilinmemektedir (Muray ve ark., 2005).

1.7.1.7. Fosfatidilinozitol – Spesifik fosfolipaz C

Özellikle erişkin tip solunum zorluğu sendromu ve dissemine intravasküler koagülasyon bulunan hastalardan izole edilen suşlarda saptanmıştır. Bu suşlar antimikrobiyal ajanlara özellikle de penisiline daha dirençlidir (Alen ve ark., 2006).

1.7.1.8. Deoksiribonükleaz

DNaz enzimleri endo ve ekzonükleaz aktivitesine sahip, nükleik asitleri 3'-fosfomononükleotidlere parçalayan fosfodiesterazlardır. *S.aureus* suşlarının %90'dan fazlasında bulunur (Alen ve ark., 2006).

1.7.1.9. Penisilinaz (β -laktamaz)

Penisilin tedavide kullanılmaya başladığı 1941'de stafilokok izolatlarının %90'dan fazlasının bu antibiyotiğe duyarlı olduğu görülmüştür. Ancak, bu organizmaların primer olarak penisilinaz (β -laktamaz) üretebilmeleri, penisiline çok hızlı bir şekilde direnç gelişmesine sebep oldu.

β -laktamaz enzimi; penisilinler, sefalosporinler ve benzeri β -laktam antibiyotikleri hidrolize ederek, bu antibiyotiklere direnç gelişimine neden olur. β -laktam halkasındaki karbonil grubu ile bir ester köprüsü oluşturan bu enzimler, siklik amid bağını bozar ve bir açıl-enzim türevi oluştururlar. Bu reaksiyonları sonucunda β -laktam antibiyotiklerle reaksiyona giren üç grup protein vardır:

1. Karboksi peptidazlar (Düşük molekül ağırlıklı PBP'ler).
2. Transpeptidazlar (Yüksek molekül ağırlıklı PBP'ler)
3. β -laktamazlar

Bütün PBP'lerin yanı sıra, β -laktamazların çoğunluğu da aktif bölgelerinde bir serin aminoasidine sahiptirler. Bu nedenle "serin peptidazlar" olarak adlandırılan bir enzim üst ailesinde yer alırlar. Bu enzimlerin β -laktam ajanlara bağlanması sırasında önce bir açıl-enzim türevi oluşmaktadır. Bunu izleyen basamakta, bir deaçilasyon işlemi gerçekleşir ve enzim açıl molekülünden ayrılarak rejenere olur. PBP'ler ve β -laktamazlar arasındaki farkı bu deaçilasyon basamağının hızı belirler. β -laktamazlar açıl türevinden kısa sürede ayrılır, ancak PBP'lerde bu basamak gerçekleşmez. Sonuçta reaksiyon β -laktamazların aksine enzim inaktivasyonu ile sonlanır.

Geniş bir enzim grubu olan β -laktamazlar moleküler yapılarına ve işlevsel özelliklerine göre sınıflandırılırlar. Bu güne kadar dört farklı moleküler sınıf (A, B, C, D) tanımlanmıştır. A, C ve D moleküler sınıflarında yer alan β -laktamazlar yukarıda açıklanan serin-ester aracılıklı mekanizma ile işlev görürler. Sınıf B β -laktamazlar ise kofaktör olarak çinko gerektiren metalloenzimlerdir. A sınıfı, tercihen substratı penisilinler olan β -laktamazlardan oluşur. Bu grup enzimler içerisinde *S.aureus*'un β -laktamazları (Grup 2a) da yer alır (Gülay, 1999).

Gram pozitif bakteriler arasında β -laktamaz üreten en önemli patojen stafilokoklardır. Stafilokokal β -laktamazlar genellikle küçük plazmidlerle veya transpozonlarla taşınmakla beraber, büyük plazmidlerin kodladığı β -laktamazlar ve diğer direnç mekanizmaları da bulunmaktadır. Bu β -laktamaz enzimini kodlayan genler sadece *S.aureus*'lar arasında değil, *S.aureus* ve *S.epidermidis* arasında da konjugasyonla transfer edilebilir (Kuyucu, 2007; Zscheck, 1993).

1.7.1.10. Slime Faktör

Slime maddesi amorf kapsül yapısında, glikokaliks materyali olup %40 karbonhidrat, %27 protein içermektedir. Slime pozitif suşların daha virulan ve antibiyotiklere daha dirençli oldukları bildirilmektedir. Slime faktör hücrel immun yanıtı baskılar, opsonizasyonu, nötrofil kemotaksisini ve nötrofil fagositozunu inhibe eder (Alen ve ark., 2006; Cengiz, 1999).

1.7.2. Stafilokokal Toksinler

1.7.2.1. Sitolitik Toksinler

Stafilokoklar, konak hücre morfolojisini ve/veya fonksiyonunu etkileyen çok sayıda ekstrasellüler toksin üretebilir. Bu toksinler sayesinde stafilokoklar yoğun inflamatuvar yanıt olan bölgelerde üremelerini sürdürebilirler (Cengiz, 1999).

1.7.2.1.1. Hemolizinler

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

Alfa Toksin: En güçlü membran hasar proteini olup 33 kDa ağırlığındadır. Kanlı agarda görülen β hemolizden bu toksin sorumludur. Bakteriyel kromozomlarda ve plazmidlerde kodlanır. İnsan makrofaj ve trombosit hücre membranları üzerinde litik etkiye sahiptir fakat monositlere etkisizdir. Dermonekrotik ve sitolitik etkileri vardır (Peacock, 2005; Alen ve ark., 2006; Moreillon ve ark., 2005).

Beta Toksin: Stafilokokal sfingomyelinaz C olarak adlandırılıp 35 kDa ağırlığındadır. En iyi koyun eritrositlerine, daha az olarak da insan ve tavşan eritrositlerine litik etki gösterir. Toksinin en önemli özelliği sıcak-soğuk lizis yapabilme yeteneğidir. Fibroblast ve lökosit hücrelerine de toksik etki gösterir. Antijeniktir, antitoksini ile nötralize olur (Peacock, 2005; Alen ve ark., 2006; Moreillon ve ark., 2005).

Gama Toksin: İnsan eritrositleri üzerine orta derecede etkilidir. Özellikle stafilokokal kemik enfeksiyonlarında kanda bu toksine karşı antikor düzeyinin yüksek bulunması, toksinin bu hastalıklarda etkili olduğunu düşündürmektedir (Peacock, 2005; Alen ve ark., 2006; Moreillon ve ark., 2005).

Delta Toksin: Hücre membran bütünlüğünü bozar ve adenilat siklazı aktive ederek cAMP salınımına neden olur. Bu enzimatik aktivite, Stafilokoksik Toksik Şok Sendromu (STSS) ve stafilokokal besin zehirlenmesinde rol oynar. 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 bulunabilmektedir (Peacock, 2005; Alen ve ark., 2006; Moreillon ve ark., 2005).

1.7.2.1.2. Lökosidin (Panton-Valentine Toksin)

Bir ekzotoksindir. Birbirlerini sinerjik olarak etkileyen F (fast) ve S (slow) adında iki protein komponentinden oluşur. Bunların moleküler ağırlıkları 32 ve 35 kDa'dur. Toksin, hücre zarında potasyum ve diğerkatyonlara karşı geçirgenliği arttırıcı gözeneklerin açılmasını sağlayarak etkili olur. Lökositler ve makrofajlar üzerine litik etkisi vardır. Lökositler tarafından fagosite edilseler de lökosidin üreten stafilokoklar hücre içerisinde üremeye devam ederler. Bu toksini bulduran türlerin enfeksiyonlarında hızlı ilerleme, kanama ve nekrotizan pnömoni tablosu görülmektedir (Peacock, 2005; Alen ve ark., 2006; Moreillon ve ark., 2005).

1.7.2.2. Enterotoksin

Serolojik olarak farklı 8 stafilokok enterotoksini (A-E, G-I) ve enterotoksin C'nin 3 alt tipi tanımlanmıştır. Isıya, mide ve jejunum enzimlerine dirençli, 100°C'ye 30 dakika dayanabilen, polipeptid yapısında maddelerdir. Enterotoksin; makrofaj ve yardımcı T hücrelerinden, sırasıyla IL-1 ve IL-2 salınımını uyarıp, sindirim kanalında bir süper antijen olarak davranır (Tünger, 2004).

Gıda ürünleri enterotoksin üreten stafilokoklar ile kontamine olduktan sonra gıdanın yeniden ısıtılması ve gastrik asite maruz kalması koruyucu olmamaktadır. Bu toksinler tüm *S.aureus* suşlarının %30-50'si tarafından üretilebilmektedir. Enterotoksin A hastalıkla ilişkili en yaygın toksindir. Enterotoksin C ve D kontamine

süt ürünlerinde bulunur. Enterotoksin B ise stafilokokal pseudomembranöz enterokolite sebep olur. Bu toksinler, jejunum epitelindeki fırçamsı kenar kaybı ve mast hücrelerinden inflamatuvar mediyatörlerin salınımının uyarılmasıyla stafilokokal gıda zehirlenmesinin karakteristik özelliği olan kusmanın oluşmasından sorumlu olabilir (Alen ve ark., 2006; Moreillon ve ark., 2005; Muray, 2005).

1.7.2.3. Eksfoliyatif toksin (Eksfoliyatin)

Epidermolitik bir toksindir. Stafilokokal enfeksiyonların veziküler ve eksfoliyatif deri lezyonlarından sorumludur. Antijenik ve biyokimyasal özelliklerine göre iki tipe ayrılır. Eksfoliyatif toksin A (ETA) genleri ısıya dirençli ve kromozomal kökenliken, eksfoliyatif toksin B (ETB) ısıya duyarlı ve plazmid kökenlidir (Koneman ve ark., 1997; Ladhani ve ark., 1999). Toksinlere karşı oluşan antikorlar koruyucu ve nötralizan etkiye sahiptir. Stafilokokal Haşlanmış Deri Sendromu (SSSS)'ndan sorumludur (Alen ve ark., 2006; Moreillon ve ark., 2005).

Eksfoliyatif toksin direkt olarak keratinize epidermisin stratum granulosumu üzerine etki eder. Mukoza hiçbir zaman tutulmaz ki bu özellik stafilokokal haşlanmış deri sendromunu daha ciddi bir tablo olan toksik epidermal nekrolizden ayırır (Ladhani, 1999).

Haşlanmış deri sendromu çoğunlukla küçük çocuklarda ve nadiren de büyük çocuklar ve erişkinlerde görülür. Bunun muhtemel sebeplerinden birisi ETA ve ETB'nin, duyarlı yenidoğanların epidermisinde bulunup büyük çocuk ve erişkin epidermisinde bulunmayan GM4 benzeri glikopeptitlere bağlanmalarıdır (Muray ve ark., 2005).

1.7.2.4. Toksik şok sendromu toksini-1 (TSST-1)

Daha önceden pirojenik ekzotoksin C ve enterotoksin F olarak adlandırılan TSST-1, ısı ve proteolize dirençli, 22 kD'luk kromozom aracılı bir ekzotoksindir. TSST-1 ilk kez 1978 yılında tanımlanmış olan ateş, diyare, eritrodermi, mental konfüzyon ve refrakter hipotansiyon ile karakterize olan toksik şok sendromundan (TSS) sorumlu tutulan süperantijendir (Tünger, 2004; Dinges ve ark., 2000).

TSST-1; sistemik olarak salınır. T lenfosit proliferasyonu ve monositlerden IL-1 salınımını uyarır. *S.aureus* suşlarının %5-25'i TSST-1 geni taşır. Son yıllarda KNS'lara bağlı toksik şok sendromu da bildirilmiştir (Dinges ve ark, 2000).

1.8. Epidemiyoloji

Stafilokoklar dış çevre koşullarına dayanıklı bakterilerdir. Kurumuş klinik materyallerden aylar sonra bile izole edilebilir. Günümüzde nozokomiyal patojenler arasında öneminin giderek artması, epidemilere yol açabilmesi ve çoklu antibiyotik direncine bağlı olarak tedavi seçeneklerinin kısıtlı olması nedeniyle dünya tıp gündeminin başlarında yer almaktadır (Ostroff ve Leduc, 2000; Cengiz, 2004).

Cilt ve mukozal yüzeylerde kolonize olurlar. İnsanda anterior burun mukozası, nazofarinks, perineal bölge ve cildin normal flora üyesidir. Çalışmalar anterior burun deliklerinin en sık kolonize olan bölge olduğunu göstermiştir. Burun mukozasına teikoik asit komponentleri aracılığıyla bağlanır. Bu bağlantıda nazofaringeal mukozadaki musin de önemli yere sahiptir (Moreillon ve ark., 2005).

Stafilokoklar deri ve nazofarinkste bulunmalarından dolayı yayılımı kolaydır ve birçok hastane kaynaklı enfeksiyondan sorumludur. Yüksek ısı, dezenfektanlar ve antiseptik solüsyonlara duyarlıdır (Muray ve ark., 2005).

Nazal taşıyıcılığı etkileyen faktörlerden bazıları; *S.aureus*'un hücre duvarında bulunan lipoteikoik asit ve bazı yüzey proteinleri, viral enfeksiyonlar sırasında burun epiteline aderansın artması, bazı HLA tipleri (DR3 gibi), yaş, ırk, genetik yapı, immunolojik durum, kadınlarda hormonal durum ve hastanede yatış gibi durumlardır (Kluytmans ve ark., 1997; Nouwen ve ark., 2001).

Hastaneye yatırılan hastalara tanı ve tedavi amacıyla uygulanan endoskopi, kataterizasyon, biyopsi, mekanik ventilasyon, trakeostomi gibi girişimler konak savunma mekanizmasının bozulmasına ve konağın özgül florasının yerine, hastane ortamında yaygın olan mikroorganizmalarla kolonizasyonuna yol açmaktadır. Bu mikroorganizmaların başında MRSA gelmektedir (Moreillon ve ark., 2005; Haddadin ve ark., 2002; Dündar ve ark., 2008). MRSA suşlarının kaynağı kolonize hastalar ile birlikte sağlık personelleridir. MRSA suşları özellikle sağlık personellerinin elleri ile diğer hastalara yayılmaktadır. (Peacock, 2005; Dündar ve ark., 2008; Kluytmans ve ark., 1997).

Sağlık çalışanları, insülin kullanan diyabetikler, kronik hemodiyaliz hastaları, intravenöz ilaç alışkanlığı olanlar, ayaktan periton diyalizi uygulanan hastalar, kronik dermatolojik hastalığı olanlar ve HIV pozitif hastalarda taşıyıcılık oranı daha fazladır. Bununla birlikte hastanede uzun süreli yatış öyküsü, yoğun antibiyotik kullanma, yanık ünitesinde tedavi görme, yoğun bakım servislerinde kalma, intravasküler katater varlığı, cerrahi girişim geçirme öyküsü, MRSA ile kolonize veya enfekte hasta ile temas ve aynı ailede sağlık alanında çalışan kişi varlığı MRSA enfeksiyonu için başlıca risk faktörlerini oluşturmaktadır (Moreillon ve ark., 2005; Dündar ve ark., 2008; Kluytmans ve ark., 1997).

Son yıllarda toplum kökenli MRSA (TK-MRSA) enfeksiyonları da giderek önem kazanmaya başlamıştır. TK-MRSA enfeksiyonları sağlıklı kişilerde, özellikle çocuk ve genç erişkinlerde görülür. Çoğunluğu Panton-Valentine toksini taşıyan bu suşlar daha çok deri, yumuşak doku enfeksiyonları ve pnömoniye yol açarlar (Maltezou ve ark., 2006).

MRSA enfeksiyonlarının sıklığı ülkeden ülkeye, hastaneden hastaneye ve hatta hastane içinde değişik servisler arasında bile büyük farklılık göstermektedir. Bu bakteri ile görülen enfeksiyonların sıklığı İskandinav ülkelerinde %1'den, Yunanistan, İtalya, İspanya ve Fransa'da olduğu gibi %80'lere kadar değişmektedir (Martins ve ark., 2007).

ABD yoğun bakım ünitelerinden izole edilen *S.aureus* suşlarının %52'sinde, yoğun bakım dışı ünitelerden izole edilenlerin ise %42'sinde metisiline direnç saptanmıştır. KNS açısından bakıldığında ABD'de bakteriyemilerden izole edilen suşların %65'inin metisiline dirençli olduğu görülmüştür (Martins ve ark., 2007).

Türkiye'de 1996-1999 yılları arasında yapılan 9 ayrı çalışmada bildirilen metisilin direncinin ortalama %47,5, 2000-2003 yıllarında ise 8 ayrı çalışma sonuçlarının ortalaması %46,6 bulunmuştur. Ancak son yıllarda hastanede yatan hastalardan izole edilen *S.aureus* suşlarına ilişkin verileri içeren yayınlar, metisilin direncinin %52'ye yükseldiğini göstermiştir (Derbentli, 2004).

1.8.1. MRSA Enfeksiyonlarının Kontrolü

MRSA kontrol programları kolonizasyonun önlenmesi ve etkenin hastalar arası taşınmasının engellenmesine odaklanmaktadır. Böyle bir program el yıkama, izolasyon önlemlerinin uygulanması, iletişim, taşıyıcıların tedavisi, eğitim, sürveyans, kontrollü antibiyotik kullanımı gibi temel öğeler üzerinde yapılandırılmaktadır (Gürler ve ark., 1997).

El Yıkama: Sağlık personeli eldiven giysin veya giymesin, hasta ile temastan önce ve sonra mutlaka ellerini yıkamalıdır. El yıkama uyumunda 1,5-2 katlık artış, hastane kaynaklı enfeksiyonların insidansında %25-50 azalmaya neden olmaktadır (Gürler ve ark., 1995; Öztürk ve ark., 1995).

İzolasyon: Sadece nazal veya yüzeysel MRSA kolonizasyonu olan hastalar için standart önlemler yeterlidir. Bunun dışındaki hastalarda temas izolasyonu uygulanmalıdır. “Hospital Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC)” tarafından bu izolasyon önlemlerinin ayrıntıları tanımlanmıştır (Kocagöz ve ark., 1997).

İzole edilecek hastaların hastane koşulları nedeniyle; özellikle yoğun bakım birimlerinde, her zaman ayrı odaya alınması mümkün olmamaktadır. Bu durumda aynı odada kalan hastaların cilt bütünlüğünün bozulmuş olmaması, invaziv girişim kataterlerinin bulunmaması, hastalarda nötropeni, steroid tedavisi, kemoterapi gibi immun sistemi baskılayıcı durumun olmamasına özen gösterilmelidir (Ünal, 1997).

Temas izolasyonunun sonlandırılması kontrol kültürlerinin sonucuna bağlıdır. Hasta, tedavisi tamamlandıktan 3 gün sonra ve 24 saat arayla alınan enfeksiyon alanı ve burun kültürlerinde MRSA üremediği kesin olarak tespit edilince temas izolasyonundan çıkarılmalıdır (Dündar ve Dündar, 2003; Gürler ve ark., 1997).

Taşıyıcıların Tedavisi: MRSA ile kolonize kişilere antibiyotik tedavisi uygulanmasıyla kaynağın küçültülmesi mümkündür. Sağlık çalışanları için, salgın ile ilişkisi olduğunun gösterildiği durumlarda veya tedavi gerektiren bir MRSA enfeksiyonu varlığında antibiyotik tedavisi uygulanmalı ve iş kısıtlaması açısından değerlendirilmelidir. Üç farklı tedavi rejimi denenmiştir:

1. Sistemik antibiyotikler
2. Lokal antibiyotikler veya dezenfektanlar
3. Bakteriyel interferans

Sistemik antibiyotik tedavisi artan direnç oranları nedeniyle başarısız olabilmektedir. Lokal dezenfeksiyon daha başarılı olmaktadır. Günümüzde standart yöntem %2 nazal mupirosin pomadın 8 saatte bir, 5-7 gün boyunca kullanımındır. Nazal stafilokok taşıyıcısı olan sağlıklı gönüllülerde (339 kişi) yapılan çift-kör bir

çalışmada nazal mupirosin pomadı günde 3 kez 5 gün kullananlarda tedavi sonrası %91 eliminasyon gelişirken, bu oran plasebo grubunda %6 olarak bulunmuştur. Aynı çalışmada eradikasyon sağlanan 130 kişiden 96'sının 4 hafta sonra halen kültür negatif olduğu, plasebo grubunda ise 8 kişiden sadece 1'inin kültür negatif kaldığı saptanmıştır ($p<0.001$) (Değerli ve ark., 2000).

Eğitim: Hastane içinde MRSA enfeksiyonlarının kontrol altına alınabilmesi için hasta, hasta yakınları ve personelin konunun önemi ve uygulamalar hususunda eğitilmeleri gereklidir.

Sürveyans: MRSA için kültür ve duyarlılık verileri sürekli olarak izlenmelidir. İzole edilen suşların kökenine ait bilgilerin toplanması yararlı olacaktır. Bu veriler MRSA'nın hastane içi yayılımının izlenmesini ve bir salgının erken fark edilmesini sağlar (Ünal, 1997).

1.9. *S.aureus*' un Neden Olduğu Enfeksiyonlar

S. aureus basit deri enfeksiyonlarından, hayatı tehdit eden ciddi enfeksiyonlara kadar çeşitli hastalıklara sebep olabilir (Muray ve ark., 2005).

1.9.1. Deri Enfeksiyonları

S.aureus temel olarak piyojenik eksuda veya abse gelişimini indükler. Tutulan anatomik yapıya göre değişik klinik formlar oluşabilir:

İmpetigo: Epidermis tutulumu olur. Sıklıkla çocuklarda gözlenen, travmaya açık bölgelerde oluşan yüzeysel deri enfeksiyonudur. (Moreillon ve ark., 2005). Kırmızı bir makul şeklinde başlayan lezyon üzerinde ortaya çıkan veziküller hızla ruptüre olur ve sarı kurutlu hal alır.

Folikülit: Süperfişyal dermisin tutulumudur. Kıl follikülü ve apokrin bölgeyi içine alan piyodermidir. Sistemik semptom bulunmaz ve lokal antiseptik tedavi yeterlidir (Moreillon ve ark., 2005).

Fronkül ve Karbonkül: Dermis tutulumudur. Fronkül, kıl dokusundan zengin olan yüz, boyun, koltuk altı ve kalça bölgesinde oluşur. Karbonkül, kıl follükülünden köken alan enfeksiyonun derin subkutan dokulara yayılımı sonucu oluşan birkaç kıl kökü içeren derin yerleşimli enfeksiyonlardır. Genelde boyun bölgesindedir (Moreillon ve ark., 2005).

1.9.2. Bakteriyemi

Son yıllarda *S.aureus*'a bağlı kan dolaşımı enfeksiyonu insidansı giderek artış göstermektedir. Genelde 2 gruba ayrılmaktadır: Hastanede kazanılmış bakteriyemi; hastaneye yatıştan 2 gün sonra kazanılan bakteriyemi ve Toplumdan kazanılmış bakteriyemi; hastaneye yatışın ilk 2 gün öncesinde veya başvuru esnasında saptanan bakteriyemi. Bu 2 kategori giderek birbiriyle örtüşmeye başlamıştır. Bu yüzden “toplumdan kazanılmış bakteriyemi” yerine “toplum başlangıçlı bakteriyemi” olarak adlandırmak daha doğru olacaktır (Dündar ve Dündar, 2003).

Nozokomiyal Bakteriyemi: Genelde intravasküler veya üriner katater varlığı gibi invaziv medikal girişimler ile ilişkilidir. Komplikasyon olarak metastatik periferik enfeksiyonlar gelişebilir. Nozokomiyal *S.aureus* bakteriyemisi hastanede gelişen bütün febrilseptik epizodun ayırıcı tanısında düşünülmelidir (Moreillon ve ark., 2005). Vasküler katater etrafında tünel enfeksiyonu olması halinde katater acil olarak çıkarılmalıdır. Tünel enfeksiyonu olmaksızın katater ile ilişkili enfeksiyon 10-14 günlük medikal tedaviden fayda görebilir. Artrit, osteomyelit gibi derin enfeksiyonlarda 4-6 haftalık tedavi gerekirken, yüzeysel cilt ve yumuşak doku enfeksiyonlarında 14 günlük tedavi yeterli olmaktadır (Moreillon ve ark., 2005).

Toplum Başlangıçlı Bakteriyemi: Antibiyotik çağından önce farklı vakalardaki *S.aureus* bakteriyemisinin klinik tezahürü belirgin olarak aynıydı. Hastaların %70'inde altta yatan bir hastalık yoktu, genç hastalardı ve dissemine enfeksiyon genellikle metastatik abselere yol açmaktaydı ve vakaların %82'si ölümlle sonuçlanmaktaydı (Skinner ve ark., 1941). Brezilya'da yapılan başka bir çalışmada; *S.aureus* bakteriyemisinin mortalite oranı %39 olarak bulunmuş ve hastane kaynaklı bakteriyemi vakaların %86'sını oluşturduğu belirtilmiştir. Bakteriyemilerin çoğunun intravenöz katater (%26) ve solunum yolu enfeksiyonu (%13) ile ilişkili olduğu saptanmıştır (Conterno ve ark., 1998). Önemli süpüratif komplikasyonları vardır; osteomyelit, septik artrit, menenjit, infektif endokardit ve diğer tüm viseral organlarda stafilokokal enfeksiyonlar ortaya çıkabilir (Tünger, 2004).

1.9.3. Endokardit

Doğal kapakta gelişen infektif endokardit *S.aureus* bakteriyemisinin en ciddi komplikasyonlarından biridir. Valv replasmanı yapılsa da uygun antibiyoterapiye rağmen letal seyredebilir. Tipik olarak akut multipl periferik septik emboli, kapak destruksiyonu, miyokardit ve mikst kardiyojenik ve septik şokla gider (Abbott ve Agodoa, 2002).

1.9.4. Organ Enfeksiyonları

Pnömoni ve Ampiyem: *S.aureus* toplum kökenli pnömonilerin %10'undan sorumlu iken hastane kökenli pnömonilerde %20-30 oranında izole edilmiştir (Osiyemi ve Dickinson, 2000). Daha çok; alt solunum yolunun viral enfeksiyonlarından sonra, bakımevlerinde kalan yaşlı hastalarda, diyabet ve alkolizm gibi predispozan faktörlere sahip hastalarda görülür. Akut erişkin solunum yetmezliği sendromu ya da septik şokla birlikte olduğunda mortal seyreder (Moreillon ve ark., 2005).

Osteomyelit: Klinik olarak akut ve kronik formda karşımıza çıkabilir. Akut form genelde çocuk ve yaşlılarda hematogen yayılımla oluşur (Moreillon ve ark., 2005). Çocuklarda uzun kemiklerin metafizleri tutulma eğiliminde iken yaşlılarda vertebral osteomyelit sıklıdır. Derin doku ve kemik kültürlerinden etken tanımlanır. Kronik form düşük derecede inflamasyon, nekroz, sekestra, fistül, rekurrensle karakterize olup aylar, yıllar sürer.

Septik artrit: Çocuklarda ve erişkinlerin nongonokokal artritlerinde sık rastlanır (Moreillon ve ark., 2005; Dündar ve Öztürk, 2002). Lokal travma sonucu, hematogen veya iyatrojenik olarak gelişebilir. Erişkinlerde romatoid artrite sekonder gelişebilir.

Septik bursit: En sık diz ve dirsek eklemleri tutulur. Septik artritte görülen eklem hareket kısıtlılığı burada yoktur. Antistafilokokal antibiyotikler 2-3 hafta süreyle verilmelidir. Tekrarlama durumunda cerrahi eksizyon düşünülebilir (Moreillon ve ark., 2005).

1.9.5. *S.aureus'* un toksinleriyle yaptığı hastalıklar

Stafilokokal haşlanmış deri sendromu: Eksfoliyatin A ve B salgılayan suşlar tarafından oluşturulur. Ciddi sepsis, sıvı elektrolit kaybı sonucunda hipovolemi, sepsis sendromu ve %1-10 oranında ölüm görülür. Tam düzelme genelde 10 günde olur (Tünger, 2004). İnfantlarda tanımlanan Ritter hastalığında, eksfoliyatif toksinle ilişkili deri lezyonlarının yanı sıra nazofarinks, umblikus ve üriner sistemin tutulumu söz konusudur. Ayırıcı tanıda toksik epidermal nekrolizis, diğer bülloz hastalıklar ve toksik şok sendromu düşünülmelidir. Eskar bırakmaksızın iyileşir.

Toksik şok sendromu: Yüksek ateş, hipotansiyon, bol sulu ishal, eritroderma, mental konfüzyon ve renal yetmezliğin başlıca bulguları oluşturduğu ciddi bir tablodur. 1980 yılında menstruasyon dönemindeki kadınlarda tampon kullanımı ile ilişkili TSS tanımlanmıştır (Dinges ve ark., 2000; Shands ve ark., 1980).

Menstruasyon ile ilişkili olmayan TSS'lu hastalarda stafilokoklar vücudun diğer bölgelerinden izole edilebilmektedir. Nonmenstruel TSS' da TSST-1'e ek olarak serum enterotoksin B ve C de salgılanabilmektedir. Normal popülasyonda TSST-1'e karşı koruyucu antikor titreleri %90'dan fazla oranda bulunurken TSS'lu hastaların %90,5'ten fazlasında akut dönem serumlarında koruyucu antikor bulunmadığı ve konvelesan dönemde de %50'sinde koruyucu antikor oluşmadığı görülmüştür (Moreillon ve ark., 2005; Dinges ve ark., 2000). Tedavide şok ve sistemlere yönelik komplikasyonlara öncelik verilmelidir. Tampon varsa uzaklaştırılmalı, uygun antibiyotik tedavisine hızla başlanmalıdır (Moreillon ve ark., 2005).

Besin zehirlenmeleri: Genelde salgınlar şeklinde görülür. Enterotoksin B ve diğer enterotoksinlere bağlı olarak gelişir. Toksin ısıya dirençli olup kaynatma veya pişirme ile inaktive olmaz. Sütü tatlılar, konserve, etli yiyecekler, patates salataları ve dondurma en sık rastlanan sorumlu besinlerdir. Hastalık 2-6 saatlik inkübasyon süresinden sonra bulantı, kusmayla başlayıp ishale devam eder. Prognoz iyi olup tüm semptomlar 8 saatte düzelir. Tedavide sıvı-elektrolit kaybının yerine konması esastır (Bilgehan, 2000).

1.9.6. Koagülaz negatif stafilokok enfeksiyonları

Başta *S.epidermidis* olmak üzere KNS'lar son yıllarda hastane enfeksiyonlarının önemli etkenleridir. Bu durumun nedeni normal flora bakterileri olmaları ve invaziv girişimler sonucu kolayca alınabilmeleridir. İnsanlarda en fazla patojen olanlar *S.epidermidis* ve *S.saprophyticus*'tur. Bunu *S.haemolyticus*, *S.lugdunensis*, *S.hominis* ve *S.schleiferi* izlemektedir. KNS'ların etken olduğu enfeksiyonların çoğu katater veya protez ile ilişkilidir. *S.epidermidis* enfeksiyonlarının büyük çoğunluğu hastane kökenli iken, *S.saprophyticus* enfeksiyonları genellikle toplum kökenlidir (Dündar ve Dündar, 2008; Archer ve Climo, 2005).

KNS'lar özellikle damar kataterlerinin sık kullanıldığı servislerde nozokomiyal bakteriyeminin en sık nedenidir. Protez kapak endokarditinde etken genellikle

S.epidermidis'tir. KNS'ların neden olduğu katater enfeksiyonlarında α , β , d-lizin üretimi ve slime (glikokaliks) yapımı önemli patojenite faktörlerindedir. Şant enfeksiyonlarının 2/3'sinden KNS'lar sorumludur ve etken sıklıkla *S.epidermidis*'tir. Peritonitte de en sık etken *S.epidermidis* olup bunu *S.haemolyticus* izler.

KNS'lar göğüs ve kalp cerrahisi sonrası gelişen sternal osteomyelitler, protez eklem etrafındaki kemik enfeksiyonları ve enfekte hemodiyaliz şantlarından kaynaklanan hematojen osteomyelitlerin önemli etkenlerindedir. Bu grupta yer alan *S.epidermidis* göz cerrahisi sonrasında gelişen enfeksiyonların en önemli nedenlerindedir. *S.saprophyticus* ise özellikle doğurgan çağıdaki sağlıklı kadınlarda komplike olmayan akut üriner sistem enfeksiyonu etkenleri arasında *E.coli*'den sonra ikinci sırayı alır (Dündar ve Dündar, 2008; Archer ve Climo, 2005; Kloos ve Bannerman, 1994).

1.10. Stafilokok enfeksiyonlarında tedavi

Stafilokoklar; çoğu antibiyotiğe hızlı direnç geliştirdiklerinden, uygun tedavinin seçimi için antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması gerekmektedir. Direnç gelişimi özellikle *S.aureus* suşlarında daha sık görülmektedir. *S.aureus*'un neden olduğu bakteriyemi, pnömoni, endokardit ve osteomyelit gibi ağır seyirli enfeksiyonlarda yüksek dozlarda ve uzun süreli antibiyotik uygulanması buna neden olabilmektedir (Rice ve ark., 2003; Gülay, 2008).

Günümüzde stafilokok suşlarının çoğunun β -laktamaz üretmeleri nedeniyle penisilin G tedavide kullanılamaz duruma gelmiştir. Aynı zamanda metisiline dirençli stafilokok (MRS) suşlarının çoğu, başta diğer β -laktam antibiyotikler olmak üzere, aminoglikozidlere ve tetrasikline de dirençlidir (Rice ve ark., 2003; Gülay, 2008; Gür, 2008).

1.10.1. Hücre Duvar Sentezini Etkileyen Antibiyotikler

1.10.1.1. β -laktam antibiyotikler

β -laktam antibiyotikler, tiazolidin halkasına bir β -laktam halkası eklenmesi ile oluşan 6-aminopenisilanik asit nükleusu içeren antibakteriyel ajanlardır. Bu antibiyotikler, hücre duvar sentezinin transpeptidasyon evresinde görev alan enzimlere bağlanarak peptidoglikan sentezini inhibe ederler. Bu nedenle, bu enzimlere penisilin bağlayan proteinler (PBP) de denilmektedir. β -laktam antibiyotikler; penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar, karbapenemler ve β -laktamaz inhibitörleri olarak sınıflandırılmaktadırlar (Çolak, 1999).

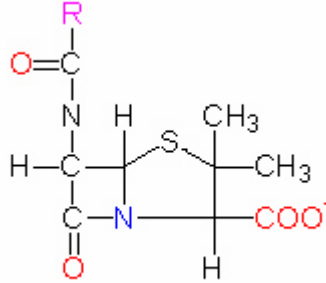
1.10.1.1.1. Penisilinler

Penisilinlerin hedefi, penisilin bağlayan protein (PBP) olarak adlandırılan ve hücre duvarı sentezinde rol oynayan enzimlerdir. Antibiyotiğin bu enzimlere bağlanması, peptidoglikan sentezini engeller ve genellikle bakterinin lizisine yol açan otolizinlerin harekete geçmesine neden olur. β -laktamlar bakteri bölünmesini engelleyen etkili ilaçlardır. Eğer otolitik mekanizmada değişiklik olursa, β -laktamlar bakterisidal etki yerine bakteriyostatik etki gösterirler.

Stafilokoklarda penisiline direnç β -laktamazlara bağlıdır ve β -laktam halkası parçalanarak etkisiz hale gelir. β -laktamaz üretimi için gerekli olan genler plazmid kontrolündedir ve bakteriyofajlar aracılığı ile duyarlı hücrelere taşınabilir.

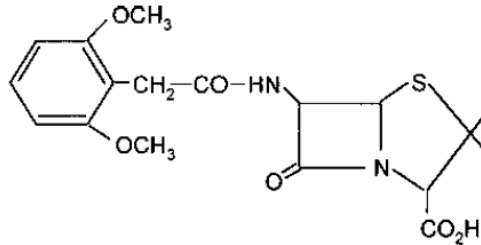
Günümüzde nozokomiyal stafilokok izolatlarının %95'inden fazlası β -laktamaz üretmektedir. Bununla birlikte β -laktamaz yapmayan suşlarda penisilin MİK değerlerinin genellikle yüksek olması bu antibiyotiklerin stafilokok

enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmasını sınırlamaktadır (Yıldız ve Aygen, 2002).



Şekil 1. 3. Penisilin G'nin Yapısı (Ulusoy, 2003)

Metisilin, bu antibiyotiğe hassas olan mikroorganizmalara karşı tedavi amaçlı kullanılabilir. MRSA suşları genellikle sadece metisiline değil tüm β -laktam antibiyotiklerine karşı dirençlidir.



Şekil 1. 4. Metisilin'in Yapısı (Stapleton ve Taylor, 2002)

Tüm β -laktam antibiyotiklere karşı gelişen direncin temel nedeni kromozomal *mecA* geninin kodladığı PBP2a olarak adlandırılan yeni bir PBP'dir. PBP'lerdeki bu değişiklik tüm β -laktamlara çapraz dirençten sorumludur. Molekül ağırlığı 78 kDa olan bu PBP'nin β -laktam antibiyotiklerine afinitesi diğer PBP'lerden daha düşüktür. Bu nedenle metisiline dirençli bakteri β -laktam antibiyotiklerle karşılaştığı zaman diğer tüm PBP'ler, antibiyotik tarafından bloke edilir. PBP2a düşük afinite nedeniyle β -laktam antibiyotiğini bağlamaz ve tüm fonksiyonları üzerine alarak bakterinin hücre duvarı sentezini devam ettirir. Bakteride PBP2a yapımı o ortamda β -laktam antibiyotik bulunmasıyla ilgili değildir, ancak ortamda antibiyotik yoksa fonksiyon

göstermez. PBP2a miktarıyla metisiline direnç düzeyi arasında bir ilişki yoktur. Bu enzim metisiline dirençli koagülaz pozitif ya da koagülaz negatif tüm stafilokoklarda gösterilmiştir.

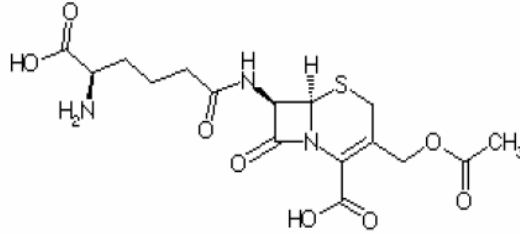
PBP2a'nın sentezini sağlayan genetik bilgi bakteri kromozomunda 30-40 kb genişliğinde bir DNA elementi (*mec*) üzerinde bulunan *mecA* geninde taşınmaktadır. *mecA* geni büyük olasılıkla bir transpozon üzerindedir ve transdüksiyon ile genetik bilgi dirençli suşlardan duyarlı suşlara aktarılmaktadır. Bakteride metisiline direncin ortaya çıkabilmesi için *mecA* geninin eksprese olması gerekir, ancak bu ekspresyon her bakteride aynı şekilde olmamaktadır. Bu yüzden *mecA* geni taşıdığı halde metisiline değişik düzeylerde dirençli ve hatta duyarlı stafilokoklar olabilmektedir. Stafilokoklar arasında *mecA* geninin fenotipik ekspresyonu farklılık gösterir. Bazı suşlarda popülasyondaki bakterilerin çok az bir kısmında direnç gözlenir. Bu durum heterojen direnç olarak adlandırılır. Bazı suşlarda ise bakteri popülasyonunun tamamında direnç gözlenir ve homojen direnç olarak adlandırılır. Stafilokoklarda metisiline direnç determinantlarının varlığı bakteride fenotipik metisilin direncinin ortaya çıkması için tek başına yeterli değildir. Metisilin direncinin açığa çıkarılabilmesi için çok sayıda başka genetik olayların varlığı gereklidir. Büyük olasılıkla *mecA* geninin ekspresyonunu kontrol eden başka bazı genler de direnç oluşumunda etkili olmaktadır (Yıldız ve Aygen, 2002).

1.10.1.1.2. Sefalosporinler

Sephalosporin C, bir mantar türü olan *Cephalosporium*'un temel fermantasyon ürünüdür. Bu antibiyotik etki mekanizması ve yapı bakımından penisiline benzer. Bu antibiyotikteki β -laktam halkası, penisilindeki karakteristik 5 karbonlu dihidrotiazin halkası yerine 6 karbonlu dihidrotiazin halkası ile birleşmiştir.

Sephalosporinler, bakterilere karşı etkilerine ve β -laktamaz stabilitesinin arttırılmasına göre birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü nesil antibiyotikler olmak üzere sınıflandırılabilir.

Sephalosporinler, oldukça yaygın kullanım alanına sahip antibiyotiklerdir. Penisiline hassas çoğu mikroorganizmaya karşı etkilidirler. Ayrıca, penisilin alerjisi olan bireylerde kullanılabilen uygun antibiyotiklerden biridir (Joklik ve ark., 1992).

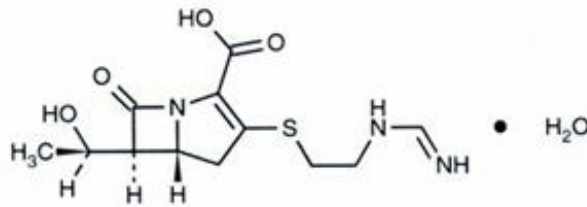


Şekil 1. 5.Sephalosporinin Yapısı
www.genome.ad.jp/kegg/catalog/Compound/C00916.gif den uyarlanmıştır (20/05/2011)

1.10.1.1.3. Karbapenemler

Karbapenem ve Tienam, penisilin ve sephalosporinden sterokimyasal olarak farklıdır. Bu antibiyotikler trans konfigürasyonunda ve sülfür atomlu halka, metilen grubuyla yer değiştirmiştir.

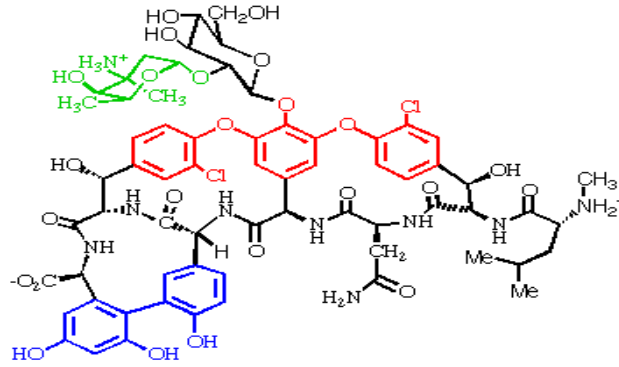
Karbapenemler, mevcut tüm β -laktam türevi antibiyotiklere göre daha geniş spektruma sahiptir. Bu antibiyotiklerin mevcut formları imipenem, ertapenem ve meropenemdir. MRSA'lar bu antibiyotiklere de dirençlidir.



Şekil 1. 6.Karbapenemin yapısı
www.vet.purdue.edu/structures/imipen600.jpg den uyarlanmıştır (15/05/2011)

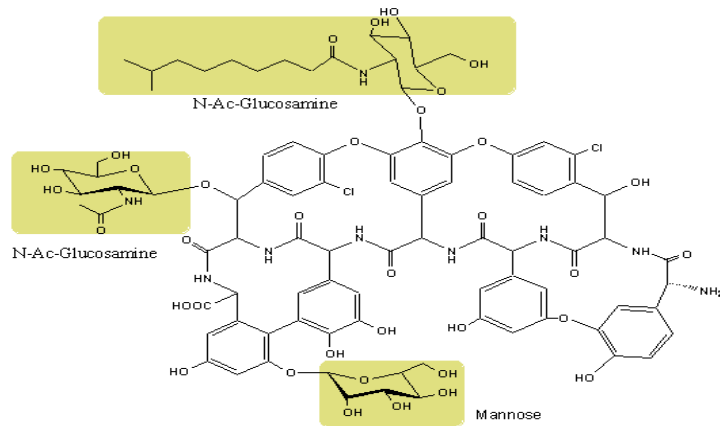
1.10.1.2. Glikopeptid antibiyotikler

β -laktam antibiyotiklere dirençli stafilkoklar ve enterokoklardaki artış nedeniyle bu grup antibiyotikler klinikte yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Çetinkaya ve Ünal, 1997). Vankomisin ve teikoplanin özellikle metisiline dirençli stafilkoksik enfeksiyonlarda tek seçenek haline gelmiştir (Maranan ve ark., 1997). Bu iki antibiyotik, bakterilerin hücre duvarını oluşturan peptidlerin terminal D-Ala-D-Ala dizisine bağlanarak transglikozilasyon reaksiyonunu ve peptidoglikan oluşumunu inhibe etmektedir (Çetinkaya ve Ünal, 1997; Lundstrom ve Sobel, 1995).



Şekil 1. 7.Vankomisin'in Yapısı

<http://www.jaggeddesign.com/distancia-vancomycin-effective-against/> den uyarlanmıştır (11/01/2011)



Şekil 1. 8.Teikoplanin'in Yapısı

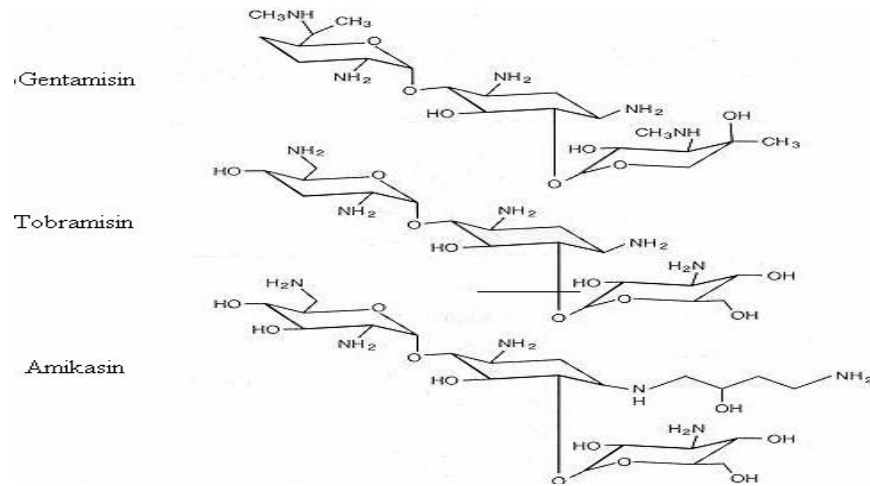
http://linux1.nii.res.in/~pankaj/gt/gt_DB/html_files/antibiotic/Teicoplanin.html den uyarlanmıştır (11/01/2011)

1.10.2. Protein Sentezini İnhibe Eden Antibiyotikler

Bu grupta bulunan ilaçlar bakteriyel ribozomun 30S veya 50S alt ünitelerine bağlanarak etkili olmaktadır.

1.10.2.1. Aminoglikozidler

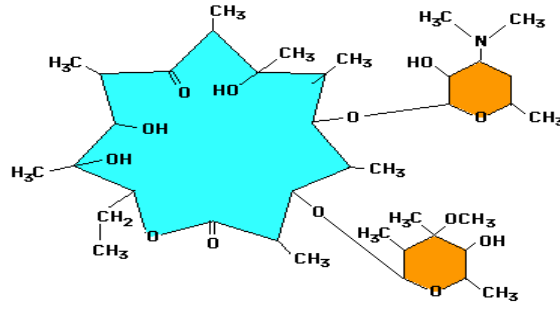
Gentamisin, amikasin, netilmisin ve tobramisin stafilokoklara karşı kullanılan en etkili aminoglikozidlerdendir. Tek başına tedavi edici ajan kullanıldığında direnç geliştiği için tek başına kullanımı uygun değildir. Aminoglikozidlerin vankomisinle birlikte kullanımı in vivo sinerjistik etki sağlarken bu etkinin in vitro boyutu bilinmemektedir (Chambers, 1997).



Şekil 1. 9. Gentamisin, Tobramisin ve Amikasin'in Yapıları (Neu ve Gootz, 2003)

1.10.2.2. Makrolidler

Makrolidler, 50S ribozomal alt üniteye bağlanarak bağlanarak peptid zincirinin uzamasını inhibe ederler. Bakteriyostatik etkili antibiyotiklerdir. Bu grup içinde Eritromisin, Klaritromisin, Azitromisin ve Spiromisin gibi antibiyotikler yer alır (Yorgancıgil ve ark., 1999).

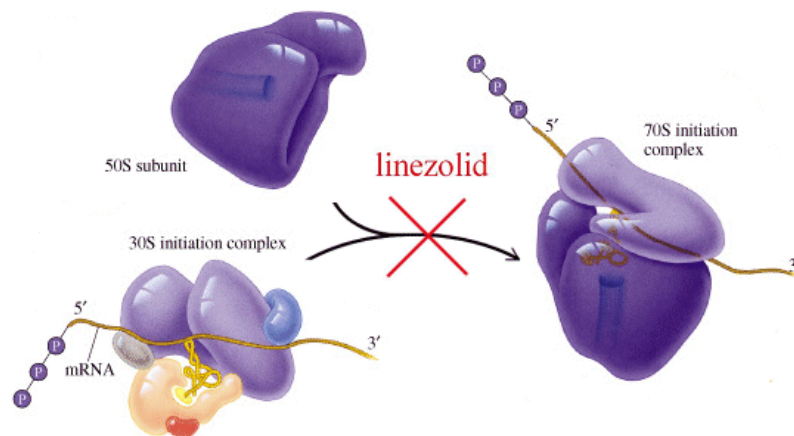


Şekil 1. 10.Eritromisin'in Yapısı

<http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/library/micro229/terry/229sp0.html> den uyarlanmıştır (10/01/2011)

1.10.2.3. Oksazolidonlar

Oksazolidonlar, N-formylmethionyltRNA-mRNA-30S üçlü kompleksini etkileyerek protein sentezini bozup, bakteriyostatik etki gösterirler (Swaney ve ark., 1998). Bu antibiyotikler özellikle dirençli *S.aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecium* gibi gram olumlu bakterilere karşı etkilidir (Shinabarger ve ark., 1997). 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. Hem oral hem parenteral kullanılabilme özelliğine sahiptir (Usluer, 2008; Rice ve ark., 2003).

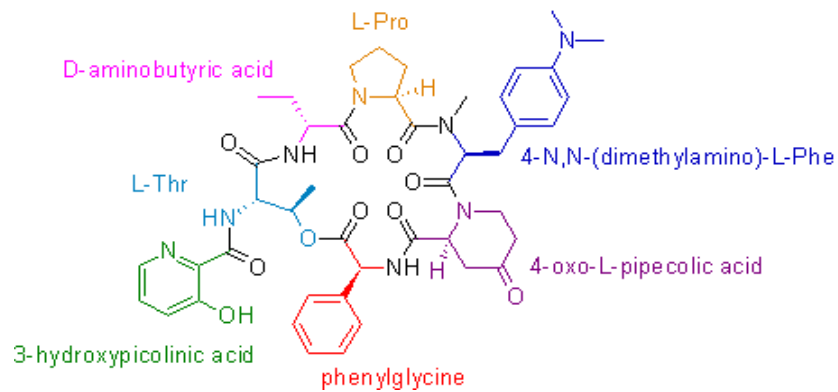


Şekil 1.11 Linezolid'in 70S başlangıç kompleksini önlemesi

<http://www.chm.bris.ac.uk/motm/linezolid/linezolid.htm> den uyarlanmıştır (20/05/2011)

1.10.2.4. Streptograminler

Streptograminler, 50S ribozomal alt üniteye bağlanarak protein sentezini engellerler. Yapısal olarak A ve B olmak üzere iki grup molekülden oluşurlar. Streptogramin A olan dalfopristin ve streptogramin B olan kinopristinin 70/30 oranında kombinasyonudur ve bu iki grup sinerjik etkili olup tedavide kombinasyon halinde kullanılmaktadır. Sinerjik aktiviteden grup A ve B streptograminlerin sırasıyla protein sentezinin erken ve geç safhalarını inhibe etmelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Bozdoğan ve Leclercq, 1999). Tek başlarına bakteriyostatikken kombine verildiklerinde bakterisidal etki kazanırlar ve antibakteriyel aktivitede 10 katlık artış olur. Metilaz (streptogramin B direncinden sorumlu) üreten suşlarda bakterisidal etki kaybolur bu durumlarda MRSA tedavisinde kullanımı sınırlar. Hedefte modifikasyon; 23S rRNA'da mutasyon veya peptidil transferaz metilasyonunu kodlayan rRNAerm geninde posttranskripsiyonel modifikasyon sonucu grup B streptogramin direnç fenotipi ortaya çıkar. Aktif efluks; Makrolid ve grup B streptogramin direncinden sorumlu mekanizmadır (Chambers, 1997).



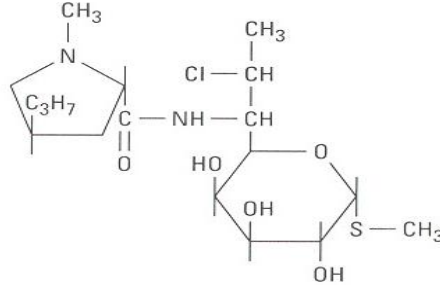
Şekil 1. 12.StreptograminB Yapısı

http://en.wikipedia.org/wiki/Streptogramin_B den uyarlanmıştır (17/05/2011)

1.10.2.5. Linkozamidler

Bu antibiyotikler de bakteri hücresinde 50S ribozomal alt üniteye bağlanıp peptid zincirin uzamasını engellemektedir. Ribozomal hedefin değişmesi en sık görülen

direnç mekanizmasıdır (Tünger, 2008; Peacock, 2005). Bu grup ajanlardan klindamisin, özellikle metisiline duyarlı stafilokok enfeksiyonlarında etkili olmaktadır (Yao ve Moellering, 1995).

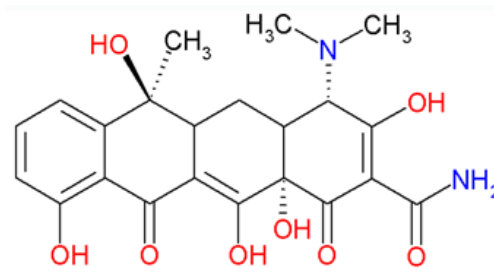


Şekil 1. 13.Klindamisin'in Yapısı

<http://yunus.hacettepe.edu.tr/~pkelicen/MakrolidLinkozamid.ppt> den uyarlanmıştır (18/05/2011)

1.10.2.6. Tetrasiklinler

Tetrasiklinler; 30S ribozomal alt üniteye bağlanıp aminoaçıl-tRNA'yı bloke ederek protein sentezini inhibe ederler. Bakteriyostatik etki gösteren geniş spektrumlu antibakteriyel ajanlardır (Yao ve Moellering, 1995). 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 (Gür, 2008; Çokça, 2008).

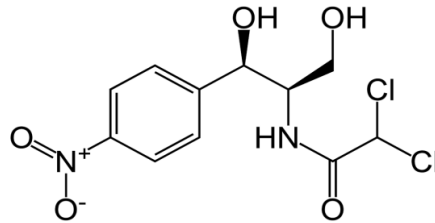


Şekil 1. 14.Tetrasiklin'in Yapısı

<http://tr.wikipedia.org/wiki/Tetrasiklin> den uyarlanmıştır (18/05/2011)

1.10.2.7. Kloramfenikol

Bu ajan, 50S ribozomal alt üniteye bağlanarak protein sentezini inhibe etmektedir. Direnç mekanizması plazmid kontrolünde sentezlenen ve hücre içi bir enzim olan kloramfenikol asetil transferaz enzim aktivitesidir (Mutlu, 2008; Gür, 2008). Gram olumlu bakterilerin çoğuna etkili olmasına rağmen, kemik iliği üzerine baskılayıcı etkisinden dolayı klinik kullanımı kısıtlıdır (Çolak, 1999).

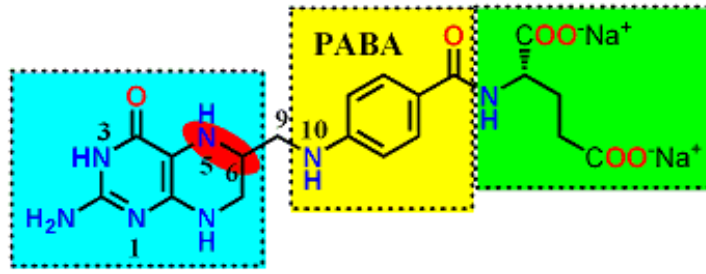


Şekil 1. 15.Kloramfenikol'un Yapısı
<http://tr.wikipedia.org/wiki/Kloramfenikol> den uyarlanmıştır (15/05/2011)

1.10.3. Nükleik Asit Sentezini İnhibe Eden Antibiyotikler

1.10.3.1. Sülfonamidler ve Trimetoprim

Sülfonamidler, paraaminobenzoik asit (PABA) ile yarışarak dihidropteroat sentaz enzimini ve dihidrofolat sentezini; trimetoprim ise dihidrofolat redüktazı inhibe ederek dihidrofolattan tetrahidrofolat sentezini engellemektedir (Lundstrom ve Sobel, 1995; Yao ve Moellering, 1995). İn vitro testlerde trimetoprim-sulfametoksazol (SXT) kombinasyonu MRSA suşlarının çoğuna etkili bulunmaktadır (Yorgancıgil ve ark., 1999). En sık gözlenen sülfonamid direnci, bakterinin sülfonamidlere düşük afinite gösteren DHPS sentezlemesi olup bu olay plazmid kontrolündedir (Aksu ve Candevir, 2008; Peacock, 2005).



Şekil 1. 16.SXT'nin Yapısı

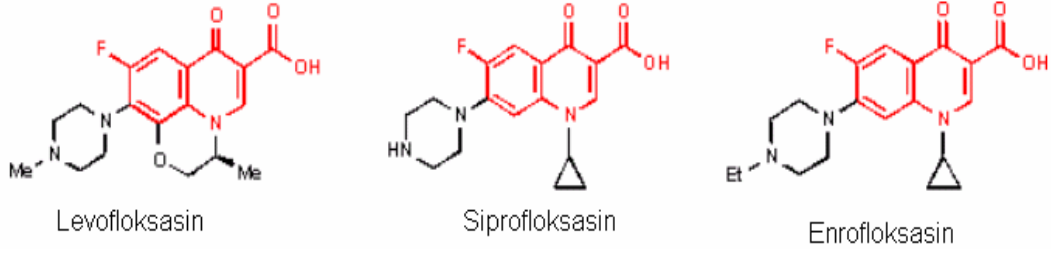
<http://web.usal.es/~pelaez/AQF/DHFR.htm> den uyarlanmıştır (13/04/2011)

1.10.3.2. Kinolonlar

Kinolon grubu antibiyotikler, DNA giraz enzimini inhibe ederek bakterisidal etki göstermektedir. Nalidiksik asit, bu grubun ilk üyesi olup daha sonra kinolon nükleusuna flor atomu eklenerek florokinolonlar geliştirilmiş ve böylelikle etki spektrumları genişletilmiştir (Yao ve Moellering, 1995).

Kinolon direnci ilaç efluks pompası *norA*'nın fazla ekspresyonu ya da hedef topoizomeraz IV ve DNA girazdaki yapısal mutasyonlara bağlı olarak gelişmektedir (Tünger, 2004). Kinolon direncini önlemek için rifampinle kombinasyon yapılabilir, bu kombinasyon stafilokok kolonizasyonu ve ağır stafilokok enfeksiyonlarında yararlıdır (Chambers, 1997).

SENTRY çalışması hastane kökenli MRSA'larda kinolon direncinin %90'lara vardığını göstermiştir ki bu da tedavide kullanımlarını oldukça kısıtlamaktadır (Diekema ve ark., 2001).



Şekil 1. 17. Kinolon'ların Yapısı

1.10.3.3. Rifampin

Rifampin, DNA'ya bağımlı RNA polimeraz enzimi ile stabil bir kompleks oluşturarak RNA sentezini engelleyip bakterisidal etki göstermektedir. Gram olumlu ve Gram olumsuz bakteri enfeksiyonlarda kullanılabilir (Yao ve Moellering, 1995). Ancak tek başına kullanıldığında hızla direnç geliştiği için başka antibiyotiklerle kombinasyonu gerekmektedir. Bu yüzden duyarlı izolatlarda kombinasyon tedavisi ile kullanılmalıdır (Chambers, 1995).

Rifampin *Streptomyces mediterranei*'den elde edilen rifamisin'in semisentetik bir türevidir. Vankomisin ve diğer antistafilokokal ajanlarla kombine olarak metisiline duyarlı ve dirençli stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılır. Kronik stafilokok osteomyelitinde vankomisin veya nafsiline kombine olarak kullanıldığında tedavi başarısının artırdığı bildirilmektedir (Erol, 2003).

1.10.4. Diğer ajanlar

Mupirosin *Pseudomonas fluorescens*'in fermantasyonu ile elde edilen doğal bir antibiyotiktir. Topikal uygulama için formları mevcuttur. Mupirosin, izölösil-tRNA sentetazı inhibe ederek stafilokokları inhibe eder ve öldürür. Primer ve sekonder deri enfeksiyonlarında etken olan stafilokoklara mükemmel in vitro etkinlik gösterir. Metisiline dirençli stafilokokların büyük bir kısmı mupirosine duyarlıdır. Uzamış kullanımı dirence yol açar (Roth ve ark., 2001; Felek, 2003).

Fusidik asit, fosfamisin, novobiocin ve coumermycin minosiklin, tedavide kullanılabilen diğer antibiyotiklerdir.

1.11. Stafilokoklarda Metisilin Direnci

MRSA, genellikle gram pozitif organizmalara karşı etkili olan birçok antibiyotiğe karşı dirençlidir. Yani multiresistanttır. Bu durum nozokomiyal enfeksiyonlarda büyük bir sorun ortaya çıkarmaktadır (Roth ve ark., 2001).

Multiple antibiyotik direncine sahip *S.aureus* suşları büyük sağlık problemlerine neden olmaktadır (Rubin ve ark., 1999). Bu nedenle, bu bakterilerdeki antibiyotik direncinin hassas ve spesifik metotlarla doğru tespiti klinikte oldukça önemli bir rol oynamaktadır. Ancak yeterli ayırımı sağlayamayan fenotipik tiplendirme metotları, büyük oranda büyüme ortamına bağlıdır. Bu nedenle, multiple antibiyotik direncine sahip *S.aureus*'ların yayılımını durdurmak amacıyla direnç türünün tespiti, ancak moleküler tekniklerle mümkündür. Bu teknikler stafilokokların ve direnç tiplerinin hassas, hızlı ve doğru tespitinin yapılmasını sağlarlar. Bu yüzden PZR'ın mikrobiyoloji laboratuvarlarında MRSA suşlarının spesifik ve hassas tespiti için kullanımı çok tercih edilmektedir (Roth ve ark., 2001).

Stafilokoklarda metisilin direnci değişik mekanizmalarla oluşabilir. Bunlar içinde en sık rastlanılanı, stafilokokların yeni bir penisilin bağlayan protein (PBP) kazanmaları ile oluşan dirençtir. Bu mekanizma nedeniyle dirençli olan stafilokoklarda, metisiline duyarlı olanlardan farklı olarak, yeni bir PBP vardır. PBP2'nin hemen altında yer aldığı için PBP2a adı verilen 78 kDa molekül ağırlığındaki bu enzimin, β -laktam antibiyotiklere afinitesi diğer PBP'lerden daha düşüktür. Bu nedenle metisiline dirençli stafilokoklar β laktam antibiyotiklerle karşılaştığı zaman diğer tüm PBP'ler antibiyotikler tarafından bloke edildiği halde bu enzimin afinitesi düşük olduğu için, β laktam antibiyotiği bağlamaz ve tüm fonksiyonları üzerine alarak, bakteri duvar sentezini devam ettirir. Ortamda β laktam antibiyotik olsa da olmasa da PBP2a sentezlenir. Ancak ortamda antibiyotik yoksa

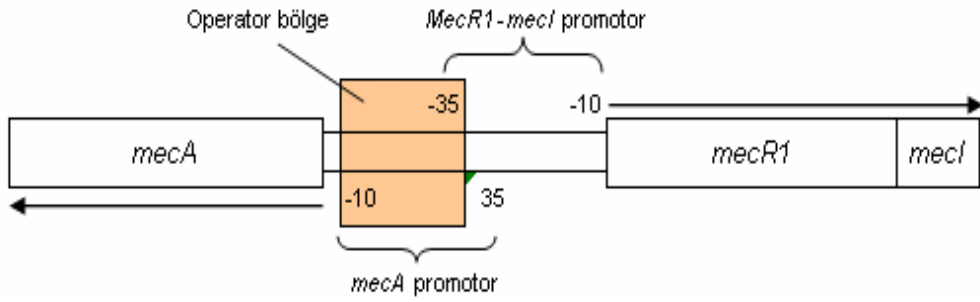
fonksiyon göstermez. PBP miktarı ile bakterinin metisilin direnç düzeyi arasında bir ilişki yoktur. PBP2a, dünyanın değişik bölgelerinde izole edilen, metisilin dirençli koagülaz pozitif ya da negatif tüm stafilokoklarda gösterilmiştir. Metisiline duyarlı olanlarda ise yoktur (Resende ve Ark., 1997; Rartinan ve Tomasz, 1984).

1.11.1. Stafilokoklarda Metisilin Direnç Mekanizmaları

1.11.1.1. Yeni Bir Penisilin Bağlayıcı Penisilin (PBP2a) Sentezi Nedeniyle Oluşan Direnç

En sık karşılaşılan dirençtir. MRS suşlarında metisiline hassas stafilokok (MSS) suşlarından farklı olarak ek bir PBP vardır ve PBP2a olarak adlandırılmaktadır. PBP2a'nın β -laktam antibiyotiklere afinitesi diğer PBP'lerden daha düşüktür. PBP2a, 2 kb'lik DNA segmentine lokalize bir gen olan *mecA* geni tarafından kodlanmaktadır. *mecA* geni regülasyonunu sağlayan *mecI* (represör gen) ve *mecR1* (sinyal dönüştürücü gen) genleriyle beraber stafilokokal kaset kromozomu (staphylococcal cassette chromosome-SCC) ismi verilen genetik yapının üzerinde taşınır. *mecR1* ve *mecI*'nin plazmid aracılı stafilokokal β -laktamaz geni olan *blaZ*'nin ekspresyonunda rolü olan *blaR1* ve *blaI* ile protein sekans homolojisi yüksektir. Bu da *mecA*'nın regülatör genlerini, *blaZ* sisteminden aldığını düşündürmektedir (Hiramatsu ve ark., 2002; Ito ve ark., 2003; Kuroda ve ark., 2001).

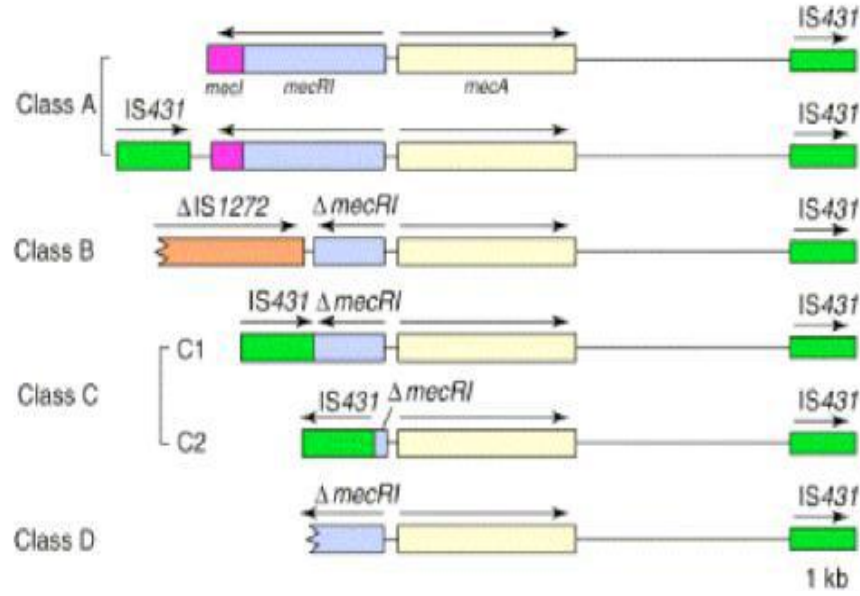
Hassas stafilokok suşlarında *mec* DNA bulunmazken, metisiline dirençli stafilokok suşlarında bulunur. *mec* DNA bölgesi, *mecA*, yapısal gen olan penisilin binding proteini (PBP2a), *mecI* ve *mecR1* ve *mecA*'nın transkripsiyonunu kontrol eden (regulatory) düzenleyici elementleri içerir (Chambers, 1997).



Şekil 1. 18. *mec* DNA bölgesi

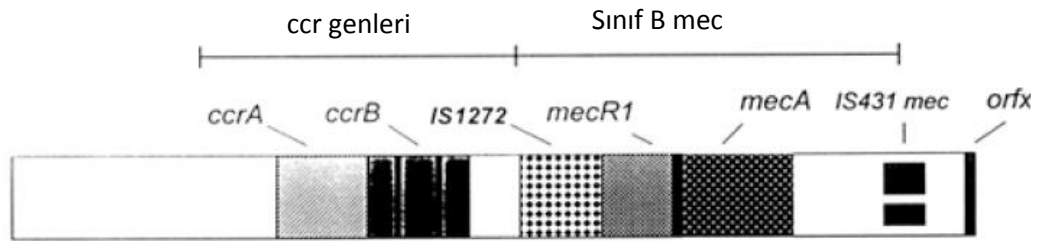
SCC; stafilokok türleri arasında genetik madde alışverişine aracılık eden hareketli bir elemandır. KNS türlerinde ve metisiline hassas *S.aureus* (MSSA) izolatlarında da bulunmaktadır. *mecA* geni SCC_{mec} adı verilen ve SCC ailesinin metisilin direnci açısından özelleşmiş bir üyesinde bulunmaktadır (Hiramatsu ve ark., 2002; Ito ve ark., 2003; Hanssen ve Ericson, 2006).

SCC_{mec}, 21-67 kb büyüklüğünde bir DNA dizisi olup, kromozomda replikasyon başlangıcının (*oriC*) yakınındaki *orfX*'in 3' ucunda *attB*sc bölgesinde yer almaktadır. SCC_{mec}'in replikasyon merkezine yakın bir bölgede yerleşmesi, antibiyotik direnç genlerini çabuk almasını sağlayarak bakteriye önemli bir avantaj kazandırmaktadır. SCC_{mec}, *mec* gen kompleksi (*mecA* ve regüle edici genler) ve *ccr* kompleksinden oluşmuştur. *mec* gen kompleksi metisilin direncinden sorumludur. İçerdikleri yapılara göre *mec* gen kompleksi dört sınıfta incelenir (Hiramatsu ve ark., 2001; Martins ve Cunha, 2007; Hanssen ve Ericson, 2006; Ito ve ark., 2003).



Şekil 1. 19. Mec gen kompleksinin dört sınıfı

SCCmec kasetinde ikinci ana genetik yapı olan *ccr* gen kompleksi kasetin bakteriyel genoma entegrasyonu ve eksizyonundan sorumludur. Bunlar invertaz/rezolvaz ailesinden *ccrA*, *ccrB* ve yeni tanımlanan *ccrC* olmak üzere üç farklı rekombinaz kodlayan genlerdir. SCCmec'in mobilitesini sağlarlar (Hanssen ve Ericson, 2006; Martins ve Cunha, 2007; Zhang ve ark., 2005).



Şekil 1. 20. Ccr gen kompleksinin yapısı

SCCmec elemanının diğer kısımlarında ise, SCC mec tipleri içinde farklılık gösteren ve J (junkyard) bölgesi olarak adlandırılan çeşitli diziler bulunur. J dizileri arasında "insertion sequence" denilen IS elemanları, farklı antibiyotiklere dirençten sorumlu transpozonlar yer almaktadır (Ito ve ark., 2003; Hanssen ve Ericson, 2006; Martins ve Cunha, 2007).

Günümüze kadar SCCmec'in 5 farklı tipi tanımlanmıştır. TipI, TipII ve TipIII Ito ve arkadaşları tarafından, TipIV Ma ve arkadaşları tarafından ve TipV yine Ito ve arkadaşları tarafından tarif edilmiştir (Ito ve ark., 2001; Ma ve ark., 2002; Ito ve ark., 2004) (Şekil 1.22).

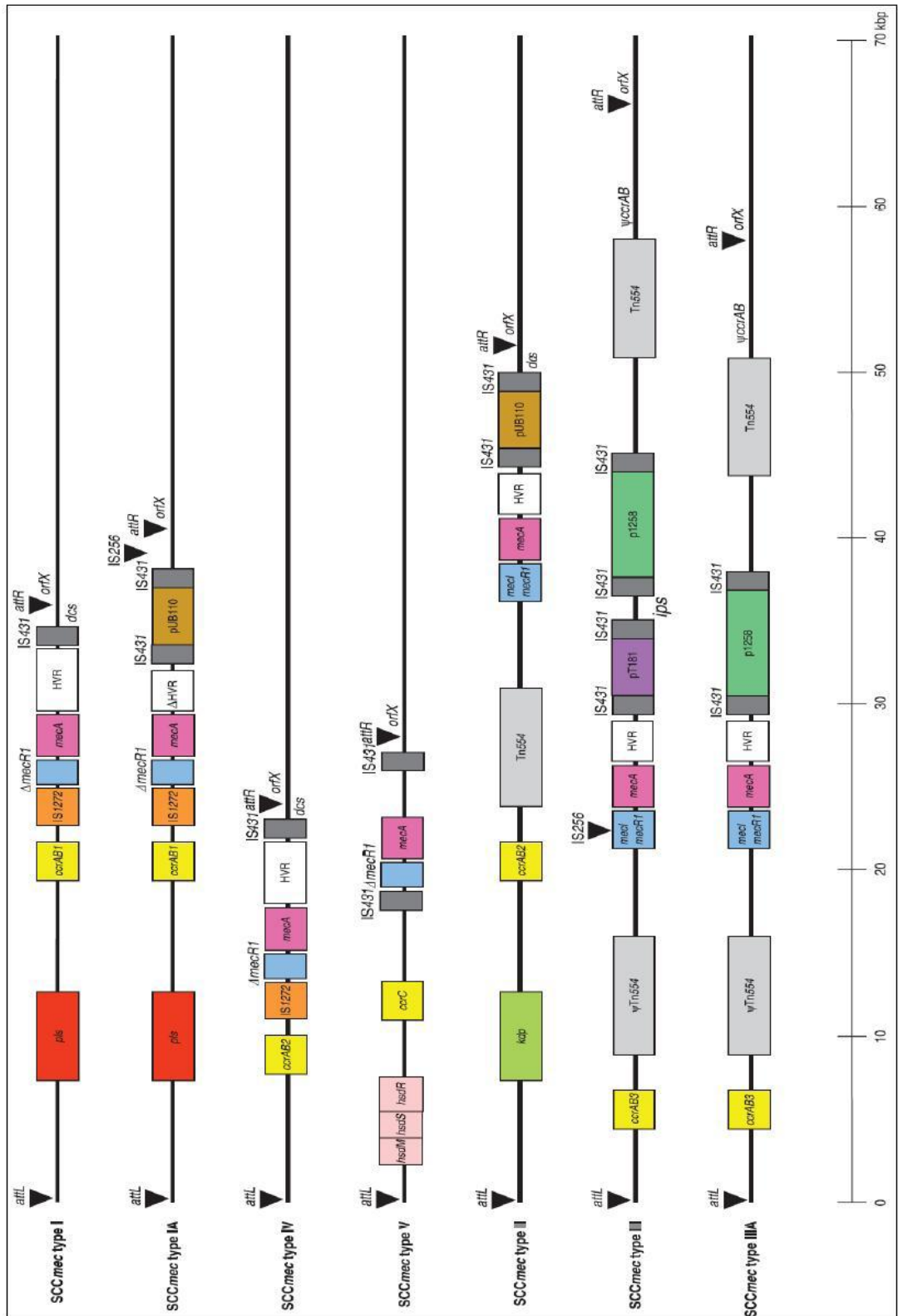
SCCmec TipI; sınıf B mec gen kompleksi ve tipI ccr gen kompleksinden oluşmaktadır. Metisilin ve ağır metaller dışındaki ilaçlara karşı direnç geni taşımamaktadır (Martins ve Cunha, 2007; Zhang ve ark., 2005; Ito ve ark., 2001).

SCCmec TipII; sınıf A mec gen kompleksi ve tipII ccr kompleksinden oluşmaktadır. mecA ve mecR1 genleri dışında, J bölgesinde pUB110 plazmidi ve Tn554 transpozonu taşımaktadır. Tn554; makrolid, klindamisin ve streptograminB'ye karşı dirençten, pUB110 ise aminoglikozidlere karşı dirençten sorumludur (Martins ve Cunha, 2007; Zhang ve ark., 2005; Ito ve ark., 2001).

SCCmec TipIII; sınıf A mec gen kompleksi ve tip III ccr gen kompleksinden oluşmaktadır. mecA, mecR1 dışında pT181 plazmidi, Tn554 transpozonu ve pseudo Tn554 (YTn554) taşımaktadır. YTn554 kadmiyuma karşı dirençten, pT181 tetrasiklin ve civaya karşı dirençten sorumludur. Diğer tiplerde bulunmayan Yccr geni adı verilen geni de içerir (Martins ve Cunha, 2007; Zhang ve ark., 2005; Ito ve ark., 2001).

SCCmec TipIV; sınıf B mec gen kompleksi ve tip 2 ccr gen kompleksinden oluşmaktadır. Bu yapı küçük olup mecA dışında direnç geni taşımaz (Martins ve Cunha, 2007; Zhang ve ark., 2005; Ma ve ark., 2002).

SCCmec TipV; sınıf C mec gen kompleksi ile ccrC içermektedir. Ito ve ark. tarafından bir Avustralya suşundan tanımlanmıştır. Sadece metisilin direnci kodlayan genlere sahiptir (Martins ve Cunha, 2007; Zhang ve ark., 2005; Ito ve ark., 2004).



Şekil 1. 21. Stafilkoklarda tanımlanan SCCmec tipleri (Turaç Biçer, 2009)

İngiltere’de 1961’de izole edilen ilk MRSA (NCTC 10442) suşunun TipI, Japonya’da 1982’de izole edilen MRSA (N315) suşunun TipII, Yeni Zelanda’da 1985’de izole edilen MRSA (85/2082) suşunun TipIII SCCmec içerdiği saptanmıştır (Martins ve Cunha, 2007; Ito ve ark., 2001; Ito ve ark., 1999). SCCmec tiplerinden, TipI, II ve III genellikle hastane kökenli, TipIV ve V ise toplum kökenli MRSA izolatlarında bulunmaktadır (Martins ve Cunha, 2007; François ve ark., 2004).

Stafilokoklarda metisilin direnci fenotipik olarak iki farklı biçimde karşımıza çıkabilmektedir:

Homojen direnç: Bakteri kolonisini oluşturan tüm bakteriler mecA genini taşırlar ve hepsinde mecA geni fonksiyoneldir (Gür, 2008; Ünal, 2004).

Heterojen direnç: Klinik uygulamada daha sık görülen, ancak tespiti güç olan direnç türüdür. mecA geni taşımalarına rağmen, 104 yada 108 bakteriden birinde direncin olması durumudur. Bunun nedeninin; mecA dışındaki düzenleyici genetik elemanların mutasyonu olabileceği düşünülmektedir (Gür, 2008; Ünal, 2004).

Ayrıca mecA varlığına rağmen metisilin minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) düzeylerinin düşük olduğu izolatlar bulunmaktadır. Pre-MRSA olarak adlandırılan bu izolatlarda mecI-mecRI düzenleyici genleri işlevseldir. Heterojen dirençli izolatların saptanmasında mecR1 için daha iyi ve hızlı bir indükleyici olan sefoksitin kullanılması, otolizinlerin etkisini azaltmak için besiyerine %2-4 oranında NaCl eklenmesi, mecA gen ekspresyonunun artırılması için düşük ısıda uzun süre inkübasyon gibi yöntemleri kullanılmaktadır (Peacock, 2005; Gür, 2008; Ayaz, 2008; Ünal, 2004).

1.11.1.2. Aşırı β -laktamaz Salgılanması İle Oluşan Direnç

β -laktamazların aşırı salgılanması metisilini kısmen parçalayarak metisilin direncine neden olur. Bu tür direnç, β laktam antibiyotiklerin β laktamaz inhibitörü ile kombine edilmesi ile yenilebilir (Rice ve ark., 2003; Ayaz, 2008; Ünal, 2004).

1.11.1.3. Mevcut PBP'lerde β -laktam Antibiyotik Afinitesinde Azalma İle Oluşan Direnç

Son yıllarda mecA geni taşımadıkları halde metisiline dirençli stafilocoklar tespit edilmiştir. Çok az sayıda görülen bu suşlar incelendiğinde, bu bakterilerin mevcut PBP'lerinin β laktam antibiyotiklere düşük afinite gösterdikleri saptanmıştır. Ayrıca mecA negatif olmasına rağmen oksasilin MİK değerleri 8-16 mg/L civarında olan suşlar bulunabilmektedir. Bunların bir kısmı β -laktamazın aşırı üretiminden [Borderline resistant *S.aureus* (BORSA)], bir kısmı da var olan PBP'lerdeki (özellikle PBP2 ve PBP4) nokta mutasyonlarından [Moderately resistant *S. aureus* (MODSA)] veya PBP4'ün (düşük molekül ağırlıklı PBP) aşırı yapımından kaynaklanabilir (Peacock, 2005; Rice ve ark., 2003; Ünal, 2004).

1.11.2. Metisilin Direncini Etkileyen İnternal Faktörler

1- Belirli Uzunluktaki Glikan Zincirleri: PBP2a, PBP2'nin transglikozilaz aktivitesine bağımlıdır. β laktamlar yüksek molekül ağırlıklı PBP'lerin transpeptidaz domain'ini inhibe ederken, transglikozilaz domain'ine bir etki göstermezler (Ünal, 2004; Bachi ve Rohrer, 2002).

2- Normal Peptid Konfigürasyonu İçin Gerekli Kök Peptidler: Ortama glisin konulduğunda, peptidoglikan zincirinin sonunda normal koşullarda olması

gereken iki alanin rezidüsünün yerini, iki glisin rezidüsünün almasının metisilin direncinde azalmaya ve homojen fenotipin heterojen fenotipe dönüşmesine neden olduğu bilinmektedir. Bu sonuçlar PBP2a'nın doğru uzunlukta ve normal seride peptid elde edilmesi için kök peptidlerine ihtiyaç olduğuna işaret etmektedir (Ünal, 2004; Bachi ve Rohrer, 2002).

3- Intakt Olmak İçin Gerekli Pentaglisin Çapraz Köprüleri: Glikan zincirlerini birbirine bağlayan pentaglisin çapraz köprülerinin yapımından femA, femB ve femX sorumludur. FemX birinci glisini, femA ikinci ve üçüncü glisinleri ve femB de dördüncü ve beşinci glisinleri köprüye sokar. femA ve femB genlerinin herhangi birinin inaktivasyonu bakteri için letal olduğundan, femA ve femB proteinleri ilaç çalışmalarının yeni hedefleridir (Ünal, 2004; Bachi ve Rohrer, 2002).

1.11.3. Metisilin Direncini Etkileyen Eksternal Faktörler

Tuz konsantrasyonu, pH, ozmolarite ve ortam ısısı metisilin direncini etkileyen eksternal faktörlerdendir. İnkübasyon süresinin 18 saat yerine 24 saate uzatılmasının metisilin dirençli suşların saptanmasını arttırdığı da bilinmektedir (Ünal, 2004; Bachi ve Rohrer, 2002).

1.11.4. Metisilin Direncinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

MRS'larda tüm β -laktam yapısındaki antibiyotiklere ve aynı zamanda diğer grup antibiyotiklere olmak üzere çoklu ilaç direnci görülmektedir. Bu nedenden dolayı metisilin direncinin en kısa sürede doğru olarak saptanmasının bu enfeksiyonların kontrol altına alınmasında ve tedavisinde doğru antibiyotiğin seçilmesinde büyük önem taşımaktadır. Günümüzde metisilin direncinin saptanmasında mecA geninin moleküler yöntemlerle saptanması altın standart olarak kabul edilmektedir. Ancak, bu yöntemlerin klinik laboratuarda uygulanması zor ve pahalıdır. Bu nedenle klinik

laboratuarlarda stafilokok izolatlarında metisilin direncinin saptanmasında çeşitli yöntemler kullanılmaktadır.

1.11.4.1. Fenotipik Yöntemler

Disk difüzyon yöntemi: En sık kullanılan yöntemdir. İnokulum yoğunluğu McFarland 0,5 standartına eşdeğer olacak şekilde hazırlanır. Mueller Hinton agar (MHA) besiyerine eküvyon ile ekim yapıldıktan sonra diskler yerleştirilir ve 35°C’de 16-18 saat (oksasilin için 24 saat) inkübe edilir. Bunun sonucunda, disk çevresinde bakterilerin üremediği dairesel bir inhibisyon alanı oluşur. Bu alanın çapı mm cinsinden ölçülerek duyarlı, orta duyarlı ve dirençli olacak şekilde duyarlılık belirlenir. Diskler arasındaki mesafe en az 2 cm olmalıdır (Turnidge ve ark., 2003; Jorgensen ve Turnidge, 2003; CLSI, 2009; CLSI, 2008).

E-test yöntemi: Bakteri süspansiyonu yine McFarland 0,5 standartında 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 belirlenir (Turnidge ve ark., 2003; CLSI, 2008).

Tuz agar tarama: Bu yöntemde, 6 mg/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 (Turnidge ve ark., 2003; CLSI, 2008).

Aglütinasyon testleri: Son yıllarda *mecA* ürünü PBP2a’nın varlığını saptayarak metisilin direncinin belirlendiği latex aglütinasyon kitleri geliştirilmiştir (Leeuwen ve ark., 1999). PZR ile *mecA* varlığının tespiti ile karşılaştırıldığında bu testlerin duyarlılığı %97-98,5, özgülüğü ise %100 olduğu bulunmuştur (Louie ve ark., 2000).

Vitek2 otomatize sistem: Vitek2 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 (VITEK2, <http://www.biomerieux.com>; CLSI, 2008).

1.11.4.2. Moleküler Yöntemler

Metisiline dirençli izolatları saptamada moleküler yöntemler en duyarlı yöntemlerdir. Bunlar içinde DNA hibridizasyon ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yer almaktadır. Her iki yöntemin *mecA*'yı saptama duyarlılığı ve özgüllüğü %100 olup uygulama kolaylığı açısından PZR tercih edilen ve günümüzde altın standart olarak kabul edilen yöntemdir (Turnidge ve ark., 2003; Jorgensen ve Turnidge, 2003; Nolte ve Caliendo, 2003, Köksal, 2001; Jaffe ve ark., 2000).

1. DNA hibridizasyonu: Özgül bölgelere bağlanan enzim veya radyoaktif işaretli probler kendilerine özgü değişik yöntemlerle denatüre edilebilen DNA veya RNA ile hibridize olarak stabil bir çift iplik oluştururlar. Böylelikle hibridize olan nükleik asitler çeşitli yöntemlerle saptanabilir hale getirilir (Podzorski ve Persing, 1995; Wolcott, 1992). *mecA*'yı saptamaya yönelik yapılan çalışmalar ile hibridizasyon sonuçları karşılaştırıldığında bu yöntemin %100 duyarlı ve özgül bir yöntem olduğu saptanmıştır (Richard ve ark., Kolbert ve ark., 1998). Ancak, uygulama zorluğu ve PZR'a göre daha yüksek miktarlarda DNA gerektirmesinden dolayı çok tercih edilen bir yöntem değildir (Ünal ve ark., 1992).

2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR): Nükleik asitlerin invitro çoğaltılmasını sağlayan bir yöntemdir. Yöntem belirli bir nükleotid dizgesini içeren DNA bölgesinin çoğaltılması esasına dayanır. Bu teknik çok az miktarda DNA ile çalışmaya olanak sağlamaktadır. Çoğaltılan DNA bölgesi (20-30 bazlık nükleotid bölgesi) özgül olduğu için tanı amaçlı kullanılan hızlı bir testtir. Çoğaltılmak istenen DNA bölgesinin iki ucuna özgü bu bölgenin baz dizelerini tamamlayıcı bir çift sentetik oligonükleotid primer kullanılır. İstenilen DNA parçası bu iki primerle

sınırlandırılarak çoğaltılır. Bu işlemde ısıya dayanıklı Taq DNA polimeraz enzimi kullanılır (Bannerman, 2003).

Bu yöntemde üç değişik sıcaklıkta basamaklar bir döngü halinde tekrarlanır. İlk basamak denatürasyon olup, bu basamakta 94°C'a kadar ısıtılan DNA'daki hidrojen bağlarının birbirinden ayrılmasıyla DNA iki zincir halini almaktadır. İkinci aşama annealing (birleşme)'dir. Bu aşamada sıcaklığın düşürülmesiyle primerler çoğaltılacak bölgenin uçlarında yer alan kendilerine özgül dizileri tanıyarak hidrojen bağları kurup bağlanırlar. Üçüncü basamak ise primerlerin uzama aşamasıdır. Karışım DNA polimerazın çalıştığı sıcaklığa getirildiğinde primerlere bağlanmış enzim molekülleri sentezlenmekte olan DNA'nın 3' ucuna, kalıp DNA'ya uygun nükleotidleri ekleyerek DNA sentezini yaparlar. Bu üç basamak her tekrarlanışında iki primer arasında kalan özgül DNA parçasının her iki zincirinin birer kopyası çıkarılmış olur. Reaksiyon için ortamda, çoğaltılacak DNA bölgesinin, bu bölgenin iki ucundaki DNA dizisini özgül olarak tanıyıp bağlanacak olan DNA primerlerinin, primerlere bağlanıp bunlara 3' ucundan nükleotidleri ekleyerek sentez yaptıracak DNA polimerazın ve sentezde kullanılacak deoksinükleotid trifosfatların (dATP, dCTP, dGTP dTTP), DNA polimerazın çalışması için gerekli tampon görevi yapacak tuzların ve Mg⁺⁺'un bulunması gerekmektedir (Bannerman, 2003).

Çoğaltılan DNA değişik yöntemlerle saptanabilmektedir. Yaygın olarak kullanılan yöntem agaroz jel elektroforezidir. PZR ile elde edilen ürünler bu yöntemle ayrıştırıldıktan sonra DNA zincirleri etidyum bromidle boyanarak ultraviyole altında görünür hale getirilir. Elde edilen bantlar moleküler büyüklük belirleyicileri ile karşılaştırılarak doğruluğu hakkında karar verilir (Podzorski ve Persing, 1995).

Yakın gelecekte bu tekniğin kan ve diğer steril vücut boşluklarındaki *mecA* taşıyan stafilokokları saptamada hızlı ve güvenilir bir yöntem olarak uygulamaya gireceği düşünülmektedir. Sonuçta, doğru antibiyoterapiye daha hızlı başlanabileceği umulmaktadır.

1.11.5. Epidemiyolojik Yönden Birbirine Benzeyen Kökenlerin Tanımlanması

1.11.5.1. Fenotipik Yöntemler

Bakteriyel epidemiyolojide, klasik fenotipik yöntemler halen ön sırada gelmektedir (Emori ve Gaynes, 1993). Bu amaçla, çeşitli fenotipik yöntemler uygulanmaktadır.

Rezistotip belirlenmesi: Bu yöntemde antimikrobiyal ajanlar kullanılarak duyarlılık testi yapılmaktadır. Standart ve tekrarlanabilirliğinin yeterli olması nedeniyle izolatların karşılaştırılmasında da uygulanabilmektedir (Struelens, 1996).

Serotip belirlenmesi: Bu yöntemde poliklonal veya monoklonal antikor setleri kullanılarak yüzey antijenleri saptanır. Tek bir tür veya cinsten izolatların karşılaştırılmasında kullanılır (Arbeit, 1995).

Biyotip saptanması: Mikroorganizmalar arasında değişkenlik gösterdiği bilinen bazı biyokimyasal özelliklerin saptanması yöntemidir. Tiplendirme yeteneği çok iyi düzeyde olmasına karşın, ayırım gücü değişken ve türe bağlıdır (Emori ve Gaynes, 1993; Arbeit, 1995).

Multilokus enzim elektroforezi (MLEE): Bir çok gendeki allellik farklılıkları gösteren, bakteri için gerekli enzimlerin elektroforetik varyantlarını saptama temeline dayanan bir yöntemdir (Arbeit, 1995).

Faj ve bakteriyosin tiplendirmesi: Standart bir bakteriyofaj seti veya bakteriyosinler kullanılarak özgül lizis paternleri eldesine dayanan bu yöntemler sadece bazı türler için başarıyla kullanılabilir. Ancak tiplendirme yeteneğinin düşük olması, kalite kontrolü için sürekli olarak standart faj veya bakteriyosin setleri bulundurulması gerekliliği nedeniyle kullanımı sınırlıdır (Emori ve Gaynes, 1993).

1.11.5.2. Genotipik yöntemler

Moleküler epidemiyolojik yöntemler olarak da adlandırılan genotipik yöntemler, fenotipik yöntemlerin tiplendirme ve ayırım gücü sınırlı kaldığından salgın incelemesinde kullanılmaya başlanmıştır.

Plazmid profil analizi: Bu yöntem, plazmidlerin saflaştırılması ve agaroz jel elektroforezi ile ayrılarak sayı ve büyüklük açısından incelenmesi esasına dayanır. Plazmid profil analizi tek hastane veya serviste gelişen bir hastane salgınında aynı türden bakterilerin kıyaslanması amacıyla kullanılabilir (Arbeit, 1995).

RFLP yöntemi: Bakteri genomunun kıyaslanması için kullanılan bir yöntemdir. Kromozomal DNA'nın sık kesen restriksiyon enzimleriyle muamelesi sonucu, bakteri genomunda bulunan kesim bölgelerinin sayısı ve yerine göre suştan suşa değişen bir patern elde edilir (Arbeit, 1995).

Ribotiplendirme: Tüm DNA'yı temsil edebilecek korunmuş bölgelerin analizi yapılır ve mikroorganizmalar birbiriyle kıyaslanır. Bu amaçla genom, restriksiyon enzimleriyle kesilerek gen bölgelerine özgül işaretli probalar kullanılır (Arbeit, 1995).

Pulsed field gel electrophoresis (PFGE): Bu yöntemde mikroorganizma genomu seyrek kesen endonükleazlarla muamele edilir. Sonuçta DNA büyük parçalara ayrılır ve tüm mikroorganizma genomu incelenebilir. PFGE paternlerinin yorumlanması için standartlar geliştirilmiştir. Tenover ve arkadaşları iki izolatın DNA makrorestriksiyon paternleri aynı ise izolatların aynı suş, paternler arasında 1-6 bant farklılık söz konusu ise aynı suşun alt tipleri olarak kabul edilmelerini önermektedir. Bu yöntem günümüzde epidemiyolojik olarak birbiri ile ilişkili izolatların saptanmasında "altın standart" olarak kabul edilmektedir (Tenover ve ark., 1995). MRSA izolatlarını ayırt edebilme gücü bakımından diğer genotipik yöntemlere göre üstün olup, laboratuvar standardizasyonunda sorunlarla karşılaşmaktadır (Olive ve Bean, 1999).

Arbitrarily primed PZR (AP-PZR): Bu yöntem, düşük bağlanma ısılarında kromozomal DNA'ya rastgele bağlanabilen 9-10 bazlık kısa dizgiler kullanılarak bakteri genomunun amplifiye edilmesi temeline dayanır (Arbeit, 1995; Olive ve Bean, 1999).

Rep-PZR: AP-PZR analizine benzeyen bir yöntem olup burada bakteri genomunda bulunan tekrarlayan dizgilere özgü primerler kullanılmaktadır (Arbeit, 1995; Olive ve Bean, 1999).

Günümüzde fenotipik yöntemler epidemiyolojik bağlantılı kökenleri saptamak için sık kullanılmakla birlikte, bu yöntemlerin çoğul antibiyotik direncinden dolayı klonal olarak bağlantılı bakterilerin saptanmasında yararı sınırlıdır. Bu yüzden epidemiyolojik çalışmalarda DNA kaynaklı tipleme yöntemlerinin, en güvenilir yöntemler olduğu bildirilmektedir.

Bu yöntemler içinde, yukarıdaki kısımda belirtildiği gibi, PFGE altın standart olmasına rağmen sayılan dezavantajlarından dolayı rutin laboratuvarlarda kullanılmamaktadır. Bu yüzden AP-PZR, PFGE'e kıyasla daha hızlı, ucuz ve uygulanmasının kolay olması bakımından epidemiyolojik olarak bağlantılı kökenleri saptamada rutinde sık olarak kullanılmaktadır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

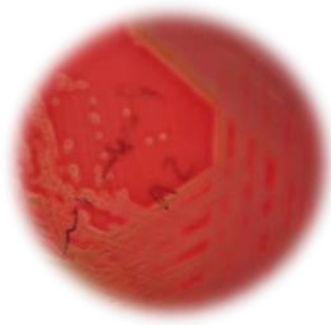
Kasım 2009 – Nisan 2010 tarihleri arasında Afyon Kocatepe Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen, çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş olan toplam 316 stafilokok suşu çalışmaya alındı.

2.1. Klinik Örneklerden Bakteri İdentifikasyonu

Kliniklerden gelen kan kültürü şişeleri, rutin olarak Bactec otomatize kan kültürü cihazına (Becton Dickinson, MD, USA) konuldu ve cihaz pozitif uyarı verene kadar en fazla yedi gün inkübe edildi. Pozitif kan kültürleri Gram boyama ile değerlendirildi. Bronko-alveolar lavaj, trakeal aspirat örnekleri, beyin omurilik sıvısı (BOS), asit mayi, plevral mayi örnekleri, yara, apse, idrar örnekleri ve diğer klinik örnekler %5 koyun kanlı agar ve çikolata besiyerine ekildi ve 35-37°C’de, 16-24 saat inkübe edildi.

Bakteriler çalışma zamanına kadar %10 gliserol içeren beyin kalp infüzyon besiyerinde -70°C’de dondurularak saklandı. Çalışma yapılacağı zaman örnekler oda sıcaklığına çıkarılır. Eküvyon yardımıyla örnekten bir miktar alınıp Brain heart zenginleştirme besiyerinde süspanse edildi ve etüvde 16-24 saat süreyle inkübe edildi. Daha sonra %5 koyun kanlı agar besiyerine pasaj yapıldı ve 37°C’de 16-24 saat inkübe edildi.

Bakteri identifikasyonu koloni morfolojisi, gram boyama, katalaz reaksiyonu, koagülaz, clumping faktör ve DNaz testi sonuçları değerlendirilerek stafilokok suşları, *S.aureus* ve KNS olarak tanımlandı.



Şekil 2. 1 Stafilokok koloni morfolojisi

Katalaz reaksiyonu: 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.

Clumping faktör saptanması (lam koagülaz testi): Temiz bir lamda stafilokok kolonilerini homojen olarak süspanse edildi. Bu süspansiyonun üzerine bir damla plazma damlatılarak 10 saniye içerisinde kümeleşme reaksiyonu izlenen izolatlar clumping faktör olumlu olarak değerlendirildi. Test sonucu olumsuz olanlar tüp koagülaz testine alındı.

Tüp koagülaz testi: Plazma serum fizyolojik ile 1/5 oranında sulandırıldı ve 1 ml olacak şekilde steril bir tüpe aktarıldı. Stafilokok kolonileri bu plazmada süspanse edildi. Tüpler $35^{\circ}C$ 'lik etüve kaldırılarak saat başı kontrol edilmek üzere toplam 4 saat inkübe edildi. Bu süre içinde veya sonunda plazmanın pıhtılaştığı suşlar koagülaz olumlu olarak değerlendirildi. Süre sonunda koagülasyonun olmadığı tüpler oda ısısına çıkarılarak 24 saat sonunda pıhtılaşma izlendi.



Şekil 2. 2 Tüpte koagülaz testi

DNaz testi: Kanlı besiyerinden eküvyon yardımıyla birkaç stafilocok kolonisi alınıp DNaz besiyerine ekim yapıldı. Ekim yapılan besiyerleri etüvde 37°C’de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresinden sonra besiyerine bir miktar HCL dökülerek kolonilerin etrafında şeffaf zon çapı olup olmadığı gözlemlendi.



Şekil 2. 3 DNaz besiyeri / S.aureus / KNS

2.2. Metisilin Direncinin Belirlenmesi

Metisiline dirençli suşların saptanması için aşağıdaki testler uygulandı. Antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesinde CLSI kriterlerine uyuldu.

2.2.1. Disk Difüzyon Yöntemi

Stafilokok suşlarında metisilin direncinin belirlenmesi için yapılan testlerde, oksasilin kullanıldığında, direncin belirlenebilme olasılığı daha yüksektir. Bu

nedenle metisilin yerine oksasilin tercih edilmektedir (Gür, 2000). Bizim çalışmamızda da metisilin direncinin belirlenmesi için oksasilin ve sefoksitin kullanılmıştır.

Yirmidört saatlik saf bakteri kültüründen sıvı besiyerinde 0,5 McFarland bulanıklığına eşit olacak şekilde direkt koloni süspansiyonu hazırlanıp, bu süspansiyon 4 mm kalınlığındaki Mueller-Hinton agar besiyeri yüzeyine eküvyon yardımıyla yayıldı. Besiyeri yüzeyi kuruduktan sonra CLSI önerileri doğrultusunda oksasilin ve sefoksitin diskleri yerleştirildi. 37°C'de, normal atmosfer koşullarında 24 saat inkübasyondan sonra zon çapları değerlendirildi. *S.aureus* için oksasilin zon çapı ≤ 10 mm olanlar dirençli, 11-12mm olanlar orta duyarlı, ≥ 13 mm olanlar ise duyarlı, KNS suşları için zon çapı ≥ 18 mm olanlar duyarlı, ≤ 17 mm olanlar dirençli olarak kabul edildi. *S.aureus* için sefoksitin zon çapı; ≥ 20 mm olanlar duyarlı, ≤ 19 mm olanlar ise dirençli, KNS suşları için zon çapı; ≥ 25 mm olanlar duyarlı, ≤ 24 mm olanlar dirençli olarak kabul edildi.

2.2.2. Çoklu Antibiyotik Direncinin Belirlenmesi

Çoğul antibiyotik direncinin belirlenmesi için, Mueller Hinton Agar besiyerinde, hazır antibiyotik diskleri (Oxoid) kullanılarak, CLSI kriterlerine uygun disk difüzyon testi yapıldı. Kullanılan antibiyotikler, disk içerikleri ve değerlendirme için zon çapları Tablo 2.1'de verilmiştir. Test işlemi tamamlandıktan sonra tablo'da verilen zon çaplarına göre değerlendirme yapıp test edilen antibiyotiklerin direnç durumları belirlendi.

Tablo 2. 1.CLSI kriterlerine göre disk içerikleri ve zon çapları

Zon Çapları (mm)				
Antibiyotik	Disk içeriği(μg)	Duyarlı (≥)	Orta Duyarlı	Dirençli (≤)
Penisilin G	10	29	-	28
Vankomisin	30	-	-	6
Teikoplanin	30	14	11-13	10
Linezolid	30	21	-	20
Trimetoprim sulfametoksazol	1.25/23.75	16	11-15	10
Ampisilin sulbaktam	10/10	15	12-14	11
Eritromisin	15	23	14-22	13
Sefepim	30	18	15-17	14
Seftriakson	30	21	14-20	13
Sefotaksim	30	23	15-22	14
Ü: Ünite				

2.2.3. Moleküler Yöntemler

2.2.3.1. Bakteriyel DNA'nın Hazırlanması

Her suş için, steril mikro PZR tüplerine 100μL lizis tamponu dağıtıldı. Steril kürdanlar yardımıyla, her petriden 2-3 koloni alınıp lizis tamponu içerisine süspansiyon edildi ve iyice vortekslendi (GVLab, Germany). Sıcak blok üzerinde 100°C'lik saf suda 15 dakika kaynatıldı. Oda sıcaklığında soğuması için bekletildi ve tüpler santrifüjde 14000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi (Hettich Mikro 22). Santrifüj sonrası süpernatant kısımdan 20μL alınıp mikro PZR tüplerine aktarıldı. Tüpler hastaların protokol numaralarına göre sıralandı ve -20°C'de PZR işleminde kullanılmak üzere saklandı.

2.2.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

PZR, kromozomal DNA'dan istenilen gen bölgesini çoğaltmak için kullanılan bir tekniktir. Çoğaltılması istenen gen bölgesi için uygun oligonükleotid primerler kullanılır. Bu primerler aracılığı ile istenen gen bölgesinin varlığı araştırılır. PZR yöntemi toplam 150 stafilokok suşu için uygulandı ve real time PZR (gerçek zamanlı PZR) ile yaklaşık 533bp'lik *mecA* ve 255bp'lik *nuc* gen bölgelerinin varlığı araştırıldı.

Amplifikasyon mix'inin hazırlanması

CYBR	25µl	} 50µl
Distile su	20µl	
PrimerF	1,5µl	
PrimerR	1,5 µl	
DNA örneği	2 µl	

Çalışmada kullanılan primerler

<i>mecA1</i>	GGGATCATAGCGTCATTATTC	533bp
<i>mecA2</i>	AACGATTGTGACACGATAGCC	
<i>nuc1</i>	TCAGCAAATGCATCACAAACAG	255bp
<i>nuc2</i>	CGTAAATGCACTTGCTTCAGG	

Amplifikasyon mix'i reaksiyonun başlamaması için soğuk blok üzerinde ve çalışmanın kontamine olmaması için biyogüvenlik kabininde hazırlandı. Soğuk bloğa örnek sayısı kadar mikro pzs tüpü sıralandı. CYBR ve primerler -20°C'den çıkarıldı ve eridikten sonra örnek sayısına orantılı olarak 1,5 ml'lik tüpe aktarıldı. Ardından CYBR ve primerler tekrar -20°C'ye kaldırıldı. Sonra tüpe örnek sayısı ile orantılı olarak distile su eklendi ve karışımdan 48µl mikro pzs tüplerine dağıtıldı. Kontaminasyonu önlemek amacıyla karışım dağıtılırken mikro tüplerin kapakları pipetleme sonrası hemen kapatıldı. Daha sonra DNA ekleme işlemi kirli tezgah

üzerinde yapıldı. Hazırlanan karışıma 2µl DNA eklendi ve mikro tüpler Fluorion (Iontek, China) Thermal Cyclers'a yerleştirildi.

PZR reaksiyonu için gereken koşullar;

PreDenatürasyon	94°C'de 4 dakika	
Denatürasyon	94°C'de 30 saniye	} 35 Siklus
Annealing	54°C'de 30 saniye	
Uzama	72°C'de 1 dakika	
Son uzama	72°C'de 4 dakika	

PZR tüpleri cihaza yerleştirildikten sonra reaksiyonun gerçekleşmesi için gereken program ayarlandı ve çalışma başlatıldı. PZR işlemi sonucunda oluşması beklenen 533bp ve 255bp büyüklüğündeki gen ürünlerinin varlığı agaroz jel elektroforezinde incelendi. PZR sonucu mecA ve nuc negatif çıkan suşlar için PZR işlemi en az iki kez tekrarlanmıştır.

2.2.3.3. Agaroz Jel Hazırlanması

PZR sonucunda oluşan ürünler agaroz jel elektroforezde incelendi. Bunun için; %2'lik agaroz jel kullanıldı.

- * 1gr agaroz tartılıp 50mL 1XTBE içerisinde çözüldü.
- * Mikrodalga fırında homojen oluncaya kadar kaynatıldı.
- * Jel dökme tablasının kenarları kapatıldı.
- * Fırından çıkan agaroz tablaya döküldü ve katılaşmaya bırakıldı.
- * Tarak düzgün bir şekilde tablaya yerleştirildi.
- * Jel katılaşınca tarak dikkatlice çıkarıldı.
- * Tabla, içerisine 250mL 1XTBE tamponu konmuş elektroforez tankının içerisine yerleştirildi.

2.2.3.4. Agaroz Jel Elektroforezi

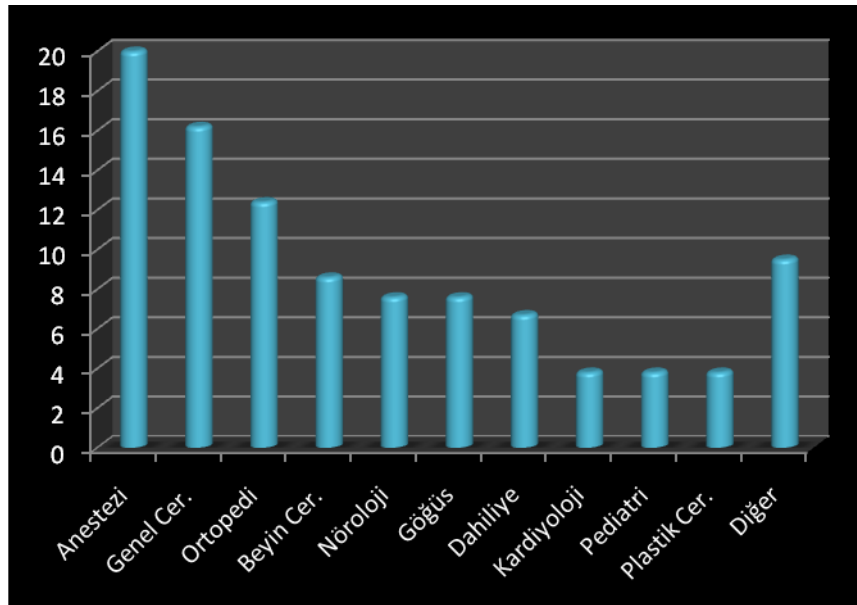
- * Steril PZR tüplerine 2µl jel yükleme solüsyonu dağıtıldı.
- * Yükleme solüsyonu üzerine 10µl PZR ürünü eklendi.
- * Jelin ilk kuyucuğuna 12µl marker (mecA için; 100bp, nuc için; 50bp ladder) yüklendi.
- * Diğer kuyucuklara sırasıyla PZR ürünleri yüklendi.
- * Elektroforez tankı güç kaynağına bağlandı (Termo EC 250-90 Electrophoretic Gel System,)
- * 100 Volt şiddetindeki akım 45 dakika boyunca uygulandı.
- * Jel elektroforez tankından alınıp içerisine etidyum bromid eklenmiş 1XTBE solüsyonunda yaklaşık 1 saat bekletildi.

Jel, görüntüleme sistemine (Biolab UVI Tech) yerleştirildi ve bant oluşumları incelendi. Elektroforez sonucu oluşan ürünler, marker ile karşılaştırıldı. Yaklaşık 533bp'lık bantların mecA, 255bp'lık bantların da nuc geni olduğu saptandı.

3. BULGULAR

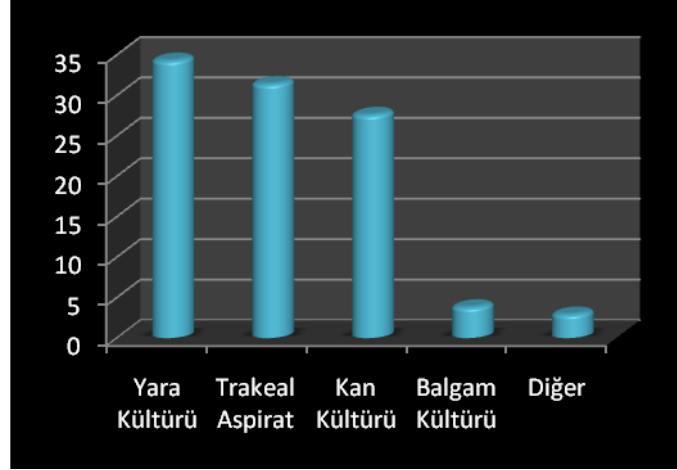
Kasım 2009 – Nisan 2010 tarihleri arasında Afyon Kocatepe Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nde yatan veya poliklinik hastalarından Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen, çeşitli klinik örneklerden izole edilen ve çoklu ilaç direnci gösteren toplam 316 stafilocok suşunun 271'i *S.aureus*, 45'i KNS idi.

S.aureus suşları; Anestezi (%20), Genel Cerrahi (%16,2), Ortopedi (%12,4), Beyin Cerrahi (%8,6), Göğüs (%7,6), Dahiliye (%6,7), Nöroloji (%7,6), Pediatri (%3,8), Kardiyoloji (%3,8), Plastik Cerrahi (%3,8) ve diğer (%9,5) servislerden gelen klinik örneklerden izole edildi (Şekil 3.1).



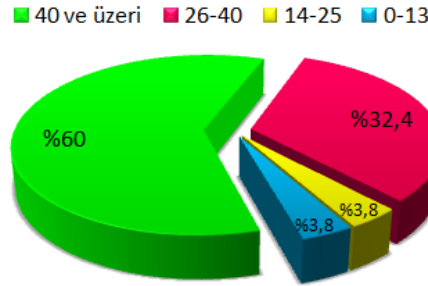
Şekil 3. 1 *S.aureus* suşlarının servislere göre dağılımı

S.aureus suşlarının %34,3'ü yara kültüründen, %31,4'ü trakeal aspirat kültüründen, %27,6'sı kan kültüründen, %3,8'i balgam kültüründen ve %2,9'u diğer klinik örneklerden elde edilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3. 2 S.aureus suşlarının klinik örneklere göre dağılımı

S.aureus izole edilen hastaların 63'ü erkek (%60), 42'si kadın (%40) idi. Hastaların yaş grupları; 0-13 yaş çocuk (%3,8), 14-25 yaş genç (%3,8), 26-40 yaş genç erişkin (%32,4) ve 41 ve üzeri yaş erişkin (%60) olarak belirlendi (Şekil 3.3).



Şekil 3. 3 S.aureus suşlarının yaş gruplarına göre dağılımı

Çoklu ilaç direnci gösteren *S.aureus* suşlarının, oksasilin disk difüzyon testinde 141'1 (%52) ve sefoksitinde ise 144'ü (%53,1) dirençli bulundu. Bu sonuçlar altın standart kabul edilen *mecA* geninin varlığı ile karşılaştırıldı (Tablo 3.1).

Tablo 3. 1.S.aureus suşlarının antibiyotik direncinin *mecA* gen varlığı ile karşılaştırılması

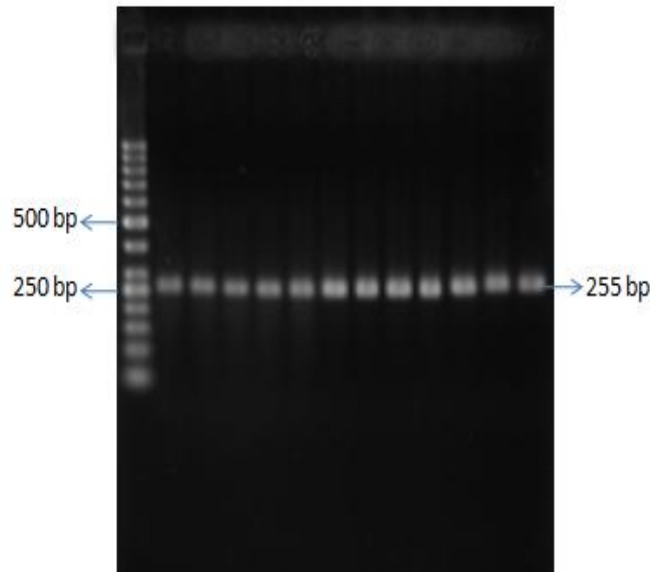
Antibiyotik		<i>mecA</i>	
		Pozitif	Negatif
Oksasilin	Dirençli	141	-
	Duyarlı	2	128
Sefoksitin	Dirençli	144	1
	Duyarlı	-	126

İzole edilen *S.aureus* suşlarının çoklu antibiyotik duyarlılıkları CLSI'nın belirlediği kriterlere göre değerlendirildi (Tablo 3.2). Çalışmaya dahil edilen 271 *S.aureus* suşundan %97,7'si Penisilin'e dirençli bulundu. Bunun yanında %70,8'i Ampisilin sulbaktama, %68,6'sı Seftriakson, Sefepim ve Eritromisine, %55,7'ı Trimetoprim sulfametoksazola ve %0,3'ü Linezolide dirençli bulundu. *S.aureus* suşlarında glikopeptid antibiyotikler olan Vankomisin ve Teikoplanine direnç saptanmadı.

Tablo 3.2 *S.aureus* suşlarının çoklu antibiyotik duyarlılıkları

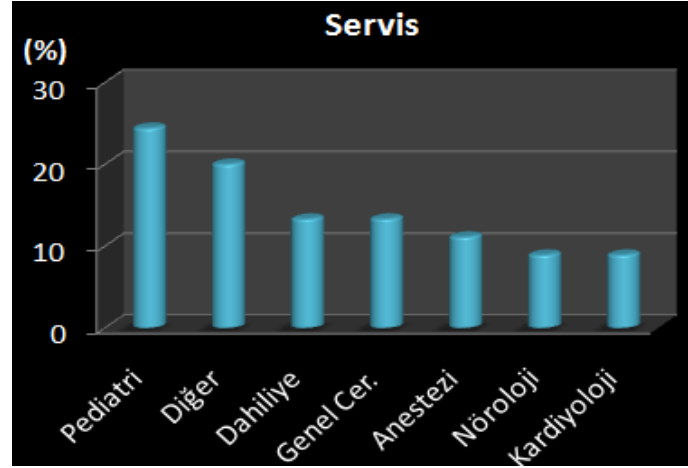
Antibiyotik	S	R
Vankomisin	271	-
Teikoplanin	271	-
Linezolid	270	1
Trimetoprim sulfametoksazol	120	151
Seftriakson	85	186
Ampisilin sulbaktam	79	192
Sefepim	85	186
Eritromisin	85	186
Penisilin	6	265

PZR işlemi sonucunda 271 *S.aureus* suşunun herbirinde 255bp'lık nuc gen ürünlerinin varlığı agaroz jel elektroforezinde gösterildi (Şekil 3.4).



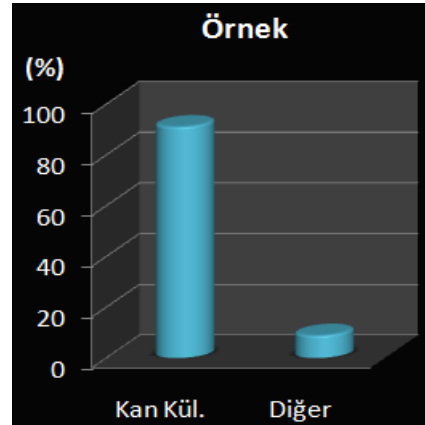
Şekil 3. 4 *S.aureus* suşlarında nuc gen bölgesi

KNS suşları; Pediatri (%24,4), Dahiliye (%13,3), Genel Cerrahi (%13,3), Anestezi (%11,1), Nöroloji (%8,9), Kardiyoloji (%8,9) ve diğer (%20,0) servislerden gelen klinik örneklerden izole edildi (Şekil 3.5).



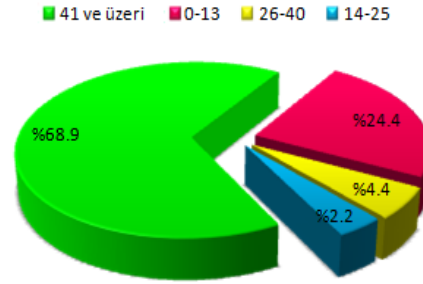
Şekil 3. 5 KNS suşlarının servislere göre dağılımı

Toplam 45 KNS suşunun 41'i kan kültürü örneklerinden (%91,1) ve 4'ü diğer klinik örneklerden (%8,9) izole edildi (Şekil 3.6).



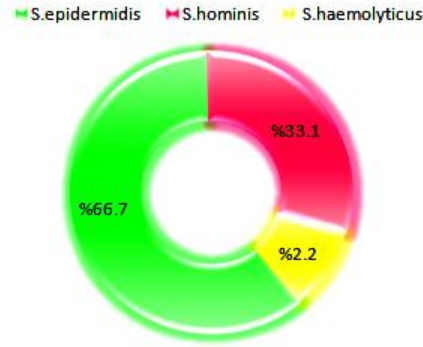
Şekil 3. 6 KNS suşlarının klinik örneklere göre dağılımı

KNS suşu izole edilen hastaların 17'si kadın ve 28'i erkekti. Bu hastaların yaş grupları 0-13 yaş çocuk, 14-25 yaş genç, 26-40 yaş genç erişkin, 41 ve üzeri yaş erişkin olarak belirlendi (Şekil 3.7).



Şekil 3. 7 KNS suşlarının yaş ortalamasına göre dağılımı

İzole edilen 45 KNS suşunun 30'u *S.epidermidis* (%66,7), 14'ü *S.hominis* (%31,1) ve 1 tanesi *S.haemolyticus* (%2,2) olarak tanımlandı (Şekil 3.8).



Şekil 3. 8 KNS suşlarının tür dağılımı

İzole edilen metisilin direnci şüpheli 45 KNS suşunun, oksasilin disk difüzyon testinde 41'i (%91,1) ve sefoksitin disk difüzyon da ise 42'si (%93,3) dirençli bulundu. Bu direnç durumları mecA geninin varlığı ile karşılaştırıldı (Tablo 3.3).

Tablo 3.3 KNS suşlarının antibiyotik direncinin mecA gen varlığı ile karşılaştırılması

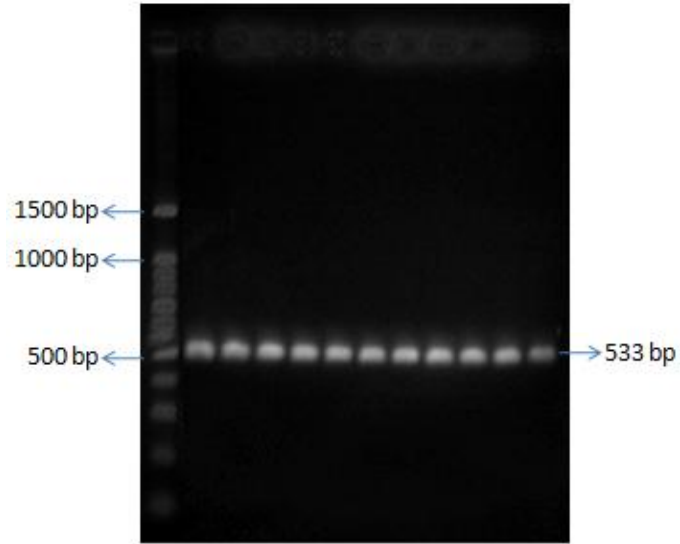
Antibiyotik		mecA	
		Pozitif	Negatif
Oksasilin	Dirençli	41	-
	Duyarlı	2	2
Sefoksitin	Dirençli	42	-
	Duyarlı	1	2

MRKNS şüpheli olarak tanımlanan 3 tür KNS suşunun çoklu antibiyotik duyarlılıkları CLSI'nın belirlediği kriterlere uygun olacak şekilde değerlendirildi (Tablo 3.4). Tüm KNS suşlarında penisiline %100 direnç gözlemlendi. Vankomisin, Teikoplanin ve Linezolide direnç saptanmadı.

Tablo 3.4 KNS suşlarının türlerine göre çoklu antibiyotik duyarlılıkları

Antibiyotik	<i>S. epidermidis</i>			<i>S. hominis</i>			<i>S. haemolyticus</i>		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Vankomisin	30	-	-	14	-	-	1	-	-
Teikoplanin	30	-	-	14	-	-	1	-	-
Linezolid	30	-	-	14	-	-	1	-	-
Penisilin	-	-	30	-	-	14	-	-	1
Ampisilin Sulbaktam	2	-	28	6	-	8	-	-	1
Gentamisin	21	-	9	8	-	6	-	-	1
Eritromisin	13	-	17	8	-	6	-	-	1
Klindamisin	12	-	18	3	-	11	-	-	1
Dalfopristin	29	-	1	14	-	-	1	-	-
Fusidik Asit	22	-	8	10	1	3	1	-	-
Trimetoprim Sulfametoksazol	17	-	13	9	-	5	-	-	1

PZR işlemi sonucunda metisilin dirençli stafilokok suşlarında oluşması beklenen 533bp'lık *mecA* gen ürünlerinin varlığı agaroz jel elektroforezinde gösterildi (Şekil 3.9).

Şekil 3. 9 Dirençli stafilokoklarda *mecA* geninin gösterilmesi

4. TARTIŞMA

Tıp dünyasında meydana gelen gelişmeler sonucu, bir yandan insanoğlunun yaşam kalitesi artıp, yaşam süresi uzarken, diğer yandan tanı ve tedavi amacıyla uygulanan girişimler, yoğun antibiyotik kullanımı gibi faktörlerin faturası karşımıza “hastane enfeksiyonları” ve “antibiyotiklere dirençli bakteriler” olarak çıkmaktadır.

İnsanoğlunun penisilinin keşfiyle başlattığı savaşta, stafilokoklar da enzimleriyle saflarını korumaya devam etmektedirler. Öyle ki 1944 yılında penisilinaz yapımıyla başlayan bu karşı koyuşun bugün gelinen noktasında stafilokoklar çoklu antibiyotik direnci gösteren, tedavileri zor olan “sorunlu” mikroorganizmalar konumundadırlar (Ehlert, 1999).

Stafilokoklar spor oluşturmeyen bakteriler arasında en dirençli olanlardandır ve fizyolojik olmayan çeşitli çevresel koşullarda yaşamlarını sürdürebilirler. Kurumuş klinik materyallerden aylarca sonra bile izole edilebilirler, rölatif olarak ısıya dirençlidirler ve yüksek tuz oranına sahip besiyerlerinde üreyebilirler. Dolayısıyla potent antimikrobiyal ajanların varlığına, gelişmiş halk sağlığı koşullarına ve hastane enfeksiyon kontrol önlemlerine rağmen, *S.aureus*'un majör bir insan patojeni olmaya devam etmesi şaşırtıcı değildir.

Stafilokoklarda metisilin direnci, hızla yayılan ve özellikle hastanede yatan hastalarda yüksek seviyelere ulaşmış olması nedeniyle de tedavide sorunlar oluşturan önemli bir problemdir. MRS suşlarının beta-laktam antibiyotikler yanında diğer birçok antibiyotiğe de dirençli olabilmeleri metisilin direncinin kısa sürede, doğru olarak tespit edilmesinin önemini daha da artırmaktadır. Bu direncin tespitinde genellikle maliyeti ucuz, uygulanması kolay, duyarlılığı ve özgülüğü yüksek olan oksasilin ve sefoksitin disk difüzyon testi kullanılmaktadır (Hussain ve ark., 2000; Gradelski ve ark., 2001). Sefoksitin, özellikle heterojen dirençli suşların saptanmasında *mecR1* için daha iyi ve hızlı bir indükleyici olduğu düşünülmekte ve

metisilin direncini belirlemede alternatif olarak kullanılabilceği bildirilmektedir (Brown ve ark., 2005; Swenson ve Tenover, 2005; Frigatto ve ark., 2005).

MRSA enfeksiyonlarının görölme sıklığı, aynı ülkenin, hastanelerin farklı bölge ve bölümlerinde bile değişiklik göstermekle birlikte dünya genelinde artmaya devam etmektedir (Kleyens ve ark., 2007).

Avrupa'da özellikle İskandinav ülkelerinde MRSA oranları %1'ler gibi oldukça düşük oranlarda rapor edilirken, İtalya, Portekiz gibi Avrupa'nın güney kıyı ülkeleri ile Afrika'nın kuzey bölgesinde, suşların elde edildiği hasta gruplarına göre değişmek üzere %50'lerin üzerinde MRSA varlığı bildirilmektedir (Robicsek ve ark., 2008; Faria ve ark., 2005; Aires de Sousa ve ark., 2005). Blandino ve arkadaşları yaptıkları çalışmada metisilin direncini %45, Kim ve ark. ise %64 oranında saptamıştır (Blandino ve ark., 2004; Kim ve ark., 2004). Stratchounski ve ark.'nın Rusya'da yaptığı çalışmada metisilin direnci oranı %89,5 olarak saptanmıştır (Stratchounski ve ark., 2005). Borg ve ark.'nın yaptığı Akdeniz ülkelerini kapsayan ve ülkemizin de arasında bulunduğu çalışmada Türkiye'deki metisilin direnci oranının %39 olarak bildirilmiştir (Borg ve ark., 2007).

Ülkemizde son yıllarda yapılan çalışmalarda da MRSA oranları oldukça farklı sonuçlar içermektedir. Bozca ve ark.'nın 2005-2006 yılları arasında çeşitli hasta örneklerinden elde edilen 720 *S.aureus* izolatının %34'ünü MRSA olarak saptamışlardır (Bozca ve ark., 2007). Sipahi ve ark.'nın 2001-2005 yılları arasında, hastane kaynaklı *S.aureus* enfeksiyonu olarak tanımlanan 825 suşun yıllara göre direnç oranlarının incelendiği bir çalışmada, metisilin direncinin en yüksek düzeye %76,7 ile 2003 yılında ulaştığı ve 2005 yılında bu direncin %55,3'e olduğu rapor edilmiştir (Sipahi ve ark., 2007). Balaban'ın 2008 yılında yaptığı çalışmada direnç oranı %49,2 olarak bildirilmiştir (Balaban, 2008). Yiğit ve ark.'nın yaptıkları çalışmada %10,2 oranında metisilin direnci saptanmıştır (Yiğit ve ark., 2008). Duman ve ark.'nın yaptığı çalışmada metisilin direnci %36,4, Dündar ve Sönmez Taner'in çalışmalarında ise %23 olarak belirlenmiştir (Duman ve ark., 2009; Dündar ve Sönmez Taner, 2009). Turaç Biçer'in yaptığı çalışmada toplam 90 *S.aureus*

suşunun %50'si metisiline dirençli bulunmuştur (Turaç Biçer, 2009). Haznedaroğlu ve ark.'nın yaptığı üç yıllık çalışmada 2008 yılında metisilin direnci %42 olarak saptanmıştır (Haznedaroğlu ve ark., 2010). Bizim çalışmamızda ise toplam 271 *S.aureus* suşunun %53,1'i metisiline dirençli olarak bulunmuştur. MRSA oranının yüksek olmasının sebebi olarak; metisilin ve çoklu ilaç direnci gösteren izolatların çalışmamıza dahil edilmesi söylenebilir.

Stafilokoklardan penisilinazı aşırı üreten suşlarda oksasilin disk difüzyon testlerinde küçük bir inhibisyon zonu oluşabileceği ya da hiç zon oluşturmayacağı bildirilmekte; sefoksitin ile yapılan testlerde sorun gözlenmemektedir (Brown ve ark., 2005). Swenson ve ark.'nın yaptığı çalışmada *mecA* aracılı metisilin direncini tahmin etmede sefoksitin duyarlılığını %99 ve özgülüğünü %100 olarak bulmuşlardır (Swenson ve ark., 2007).

Iraz'ın yaptığı çalışmada, OS-MRSA olarak değerlendirilen dört suş dışında kalan toplam 210 *S.aureus* izolatında *mecA* varlığı referans alınarak oksasilin ve sefoksitin disk difüzyon testinin sonuçları Tablo 4.1'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre, *mecA* referans alındığında oksasilin disk difüzyon testinin duyarlılığı %95,1 iken sefoksitin duyarlılığı ise %96,3 saptanmıştır. Oksasilin disk difüzyon testinin özgülüğü %95,3, sefoksitin özgülüğü ise %98,4 olarak saptanmıştır (Iraz, 2008).

Bizim çalışmamızda; oksasilin disk difüzyon testinin duyarlılığı %98,6 ve özgülüğü %100 olarak saptandı. Sefoksitin disk difüzyon testinin duyarlılığı %100 ve özgülüğü ise %99,2 olarak saptandı. *mecA* aracılı metisilin direncinin tespitinde sefoksitin disk difüzyon testinin, oksasilin disk difüzyon testinden daha etkin olduğunu belirtmişlerdir.

Tablo 4. 1 *mecA* gen varlığına göre oksasilin ve sefoksitin disk difüzyon testinin karşılaştırılması (Iraz, 2008)

Antibiyotik		<i>mecA</i>	
		Pozitif	Negatif
Oksasilin	Dirençli	78	6
	Duyarlı	4	122
Sefoksitin	Dirençli	79	2
	Duyarlı	3	126

Çalışmamızda; metisilin dirençli olarak düşünülen suşlardan 2 tanesi *mecA* pozitif olduğu halde oksasilin disk difüzyon testinde MSSA olarak bulundu. Buna benzer bir durumu ilk olarak Hososaka ve arkadaşları 11 farklı hastaneden topladığı 480 *S.aureus* suşunda, oksasiline duyarlı ve *mecA* geni pozitif altı suşu tespit ederek göstermişlerdir (Hososaka ve ark., 2007). Ayrıca, 1 suş *mecA* negatif olduğu halde sefoksitin disk difüzyon testinde metisilin dirençli olarak bulunmuştur. *mecA* negatif suşlarda, fenotipik olarak dirençli bulunan suşların aşırı beta-laktamaz yapımı, metisilini inaktive eden enzimlerin varlığı, PBP2a dışında PBP'lerin bulunması gibi farklı mekanizmalar ile açıklanabileceği ifade edilmektedir (Brown ve ark., 2005; Roisin ve ark., 2008).

Stafilokoklarda linezolid direnci çok nadir olup, direnç mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Direnç, sıklıkla 23S ribozomun V. bölgesinde meydana gelen özgül nokta mutasyonları sonucunda ortaya çıkmaktadır. Bu mutasyonlar genellikle 23S rRNA'da bulunan 2576 pozisyonundaki aminoasitte görülür ve böylece linezolidin hedef bölgeye bağlanmasında azalma meydana gelir. (Küçükbayrak ve Özdemir, 2006).

Linezolide dirençli ilk MRSA izolatı, 85 yaşında periton diyalizine giren ve dört hafta süreyle linezolid kullanmış olan bir olgudan izole edilmiştir. MRSA'ya bağlı peritonit tablosu gelişen bu hastada linezolid MİK değeri $>32 \mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur (Tsiodras ve ark., 2001). Bizim çalışmamızda ise MRSA olarak tanımlanan ve çoklu direnç gösteren 1 suş linezolide dirençli saptandı.

Dirençli suşlarda etkisiz, duyarlı suşlarda gereksiz antibiyotik kullanmamak için bunların antibiyogram sonuçlarını bilmemiz gerekmektedir. Çalışmamızda, MRS ve MSS suşlarında birçok antibiyotik için disk difüzyon testi yapıldı ve duyarlılıkları belirlendi. Sonuçlar ülkemizde ve birçok ülkede yapılan çalışmalarla benzerlik gösterdi (Oğuz ve ark., 2009; Cuevas ve ark., 2008; Hua ve ark., 2006)

Özellikle MRSA'lar on yılı aşkın bir süredir pandemilere sebep olarak, ciddi stafilokok enfeksiyonlarındaki artışın en önemli kaynağını oluşturmaktadır (Gould,

2007). Coğul antimikrobiyal dirençli stafilokok enfeksiyonlarının morbidite ve mortalitesinin yüksek olması, yüksek tedavi maliyetini de beraberinde getirmesi, bu enfeksiyonların prevalansının hemen her ülkede izlenmesine sebep olmuştur. Sanayileşmiş ülkeler başta olmak üzere birçok ülke konuya ilişkin çok merkezli çalışma programları düzenlemiş ve MRSA yayılımını önlemek için kendi ulusal rehberlerini oluşturmuşlardır (Humphreys, 2007).

Türkiye’de ve yurtdışında yapılan çeşitli çalışmalarda KNS izolatları arasında metisilin direnci %46-76 arasında bildirilmektedir (Doğruman ve ark., 2005).

YBÜ’de yatan hastaların tüm kan kültürlerinden üreyen etkenlere bakıldığında KNS’ların ilk sıralarda olduğu dikkati çekmektedir (Mitt ve ark., 2009). Bolat ve ark.’nın yaptıkları çalışmada yenidoğan bebeklerden alınan kan kültürlerinde %66,6 oranında KNS suşu saptanmıştır (Bolat ve ark., 2011). Pehlivanoglu ve ark.’nın yaptığı çalışmada hastane kaynaklı etkenler arasında en sık KNS izole edilmiş ancak oksasilin direnci daha yüksek (%52) bulunmuştur (Pehlivanoglu ve ark., 2011).

Çalışmamıza dahil edilen ve çoklu ilaç direnci gösteren 45 KNS suşunun; fenotipik yöntemlerden oksasilin (duyarlılık %95,3 ve özgüllük %100) ve sefoksitin disk difüzyon testinin (duyarlılık %97,6 ve özgüllük %100) sonuçları yakın bulundu.

Geleneksel olarak, *S.aureus* tarafından oluşturulan enfeksiyonlarda mikroorganizmanın identifikasyonu ve antibiyotik duyarlılık testleri için ortalama iki gün gerekmektedir. Benzer şekilde, moleküler yöntemle *mecA*’nın saptanması da aynı süre ve ek teknolojik donanım gerektirmektedir. MRSA enfeksiyonlarında etkenin hızlı ve doğru tanımlanması mortalite, hastanede yatış süresi ve tedavi maliyetinde önemli bir azalmayı da beraberinde getirmektedir (Stamper ve ark., 2007; Palka-Santini ve ark., 2007; Thomas ve ark., 2007; Cosgrove, 2006).

Çalışmamızda hem *S. aureus* hem de KNS suşlarında fenotipik yöntemlerin genotipik yöntemle uyumu araştırıldı. Rutin klinik mikrobiyoloji laboratuvarında daha

ucuza mal olan ve kolay uygulanabilen oksasilin ve sefoksitin DDT sonuçlarının güvenilirliğinin yüksek olduğu belirlendi. Otomatize sistem de referans test ile uyumlu bulunup, daha kısa sürede sonuç verdi. Fenotipik yöntemlerle değerlendirilemeyen suşlarda *mecA* gen varlığını göstermek için PZR yöntemi yapılması uygun görüldü. MRS suşlarının beta-laktam antibiyotikler yanında diğer birçok antibiyotiğe de dirençli olması, metisilin direncinin klinik laboratuvarlarda kısa sürede ve doğru olarak tespit edilmesinin önemini artırmaktadır.

Boubaker ve ark.'nın çalışmasında, 115 MRSA ve 350 MSSA suşunda metisilin direncinin saptanmasında oksasilin ve sefoksitin disk difüzyon testini kullanılmış; *mecA* sonuçları ile bir arada irdelenmiştir. Bu çalışmada; disk difüzyon ile oksasilin duyarlılığı % 90,4, özgüllüğü % 99,1, disk difüzyon ile sefoksitin duyarlılığı % 96,5, özgüllüğü % 100 olarak saptanmıştır (Boubaker ve ark., 2004).

Ruiz-Perz de Pipaon ve arkadaşları, pozitif 131 kan kültürü şişesinde Gram pozitif kokları LightCycler real-time PZR yöntemi ile incelemişlerdir. LightCycler sisteminde metisilin direncini belirleyen *mecA* geninin yanı sıra *S.aureus*'lar için özgül olan *nucA* geni de incelenmiştir. *S. aureus* ve KNS'larda real-time PZR-*mecA* gen varlığının duyarlılık ve özgülüğünü % 100 ve % 97,5 bulmuşlardır. Real-time PZR yöntemini MRS ve MSS suşlarının hızlı bir şekilde doğrudan tanımlanması için yüksek derecede duyarlı ve özgül olarak bildirmişler (Ruiz-Perez de Pipaon ve ark., 2005).

Bizim çalışmamızda; DNA ekstraksiyonu yapılan stafilokok suşlarında metisilin direncini göstermek amacıyla *mecA* gen varlığını ve *S.aureus* suşlarının KNS suşlarından ayırımı sağlayan *nuc* gen varlığını tespit etmek için ThermalCycler sistemi kullanıldı. PZR işleminin sonuçları disk difüzyon testi sonuçları ile uyumlu bulunup, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek olarak saptandı.

Avrupa'da antibiyotik duyarlılık testleri standartlarını oluşturmuş, ulusal düzeyde altı ayrı kuruluş bulunmaktadır. Bunlar; İngiltere'de BSCA (British Society of Antimicrobial Chemotherapy), Fransa'da CASFM (Comité de l'Antibiogramme

de la Société Française de Microbiologie), Danimarka'da CRG (Commissie Richtlijnen Gevoeligheidsbepalingen), Almanya'da DIN (Deutsches Institut für Normung), Norveç'te NWGA (Norwegian Working Group on Antibiotics) ve İsveç'te SRGA (The Swedish Reference Group for Antibiotics)'dır. Bunlar dışındaki Avrupa ülkeleri ve Türkiye, daha çok ABD kaynaklı CLSI tarafından kabul edilen standartları kullanmaktadır.

Görüldüğü üzere, Avrupa ülkelerinin bile kendi aralarında antibiyotik duyarlılık testleri için görüş ayrılıkları bulunmaktadır, öte yandan heterojenite gösteren stafilokoklarda metisilin direncinin fenotipik yöntemlerle gösterilmesi için komitelerin farklı önerilerde bulunması hem laboratuvarları hem de klinisyenleri zor durumda bırakmaktadır.

Sonuç olarak, stafilokoklarda metisilin direncinin fenotipik yöntemlerle gösterilmesi, özellikle heterojen metisilin direnci varlığı ve bu direncin de çevresel faktörlerden etkilenmesi nedeniyle, halen çözüme ulaştırılmamış bir problemdir. Dolayısıyla, bu konu açıklık kazanıncaya kadar moleküler inceleme yapılamayan laboratuvarlarda, metisilin direncini tespit etmek için stafilokok suşlarının *mecA* genini indükleyen farklı antibiyotik diskleri ile aynı anda test edilmesi ve uyumsuz sonuçlar alınması halinde, direncin moleküler yöntemlerle referans laboratuvarlarda araştırılması uygun olacaktır.

5. SONUÇ

Çalışmamızda *S.aureus* ve KNS suşlarında *mecA* gen varlığı altın standart olarak kabul edildiğinde; oksasilin disk difüzyon ve sefoksitin disk difüzyon testlerinin duyarlılık ve özgüllükleri birbirlerine yakın bulundu. Bu yöntemler referans test ile istatistiksel olarak yüksek uyum gösterdi.

Sefoksitin disk difüzyon testi sonuçlarının metisilin direncini göstermedeki üstünlüğü bizim çalışmamızda da izlendi. Hem oksasilin hem sefoksitin diskinin antibiyogram plaklarına beraber konulup farklarının değerlendirilmesinin uygun bir yöntem olabileceği düşünüldü. Yanlış pozitifliğin sefoksitin diskinde daha az olabileceği de göz ardı edilmemelidir.

Stafilokoklarda heterojen dirençli suşlar nedeniyle metisilin direncinin fenotipik yöntemlerle gösterilmesi sık olmasa da yanlışlıklara neden olmaktadır. Fenotipik yöntemlerin çevre şartlarından çok etkilendiği göz önünde tutulmalı ve önerilen standartlar dışında uygulamalardan kaçınılmalıdır.

Ancak, hem *S.aureus* hem de KNS'larda metisilin direncinin belirlenmesinde altın standart olarak kabul edilen PZR ile *mecA* geninin saptanması ve bu yöntemin giderek rutin laboratuarlarda kullanıma girmesidir. Özellikle tedaviye klinik yanıtın olmadığı olgularda ya da direnç sonuçlarının çıkması için 24-48 saat bekleyemeyecek hastalar gibi seçilmiş olgularda moleküler yöntemlerin kullanılması daha hızlı ve doğru bir tercih olabilir.

ÖZET

Klinik Örneklerden İzole Edilen *Staphylococcus* Suşlarının Direnç Profillerinin Belirlenmesi

Klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* ve koagülaz negatif stafilocoklarda metisilin direnci, oksasilin ve sefoksitin disk difüzyon testi ve dirençten sorumlu *mecA* genin polimeraz zincir reaksiyonu ile gösterilmesi planlandı.

Kasım 2009 – Nisan 2010 tarihleri arasında Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarına gelen klinik örneklerden izole edilen ve metisilin direnci şüpheli toplam 150 stafilocok suşuna bu testler uygulandı. Altın standart olarak kabul edilen *mecA* geni ise polimeraz zincir reaksiyonu ile araştırıldı.

Oksasilin disk difüzyon testine göre *Staphylococcus aureus* izolatlarının %52'si, KNS izolatlarının %91,1'i dirençli, sefoksitin disk difüzyon testine göre *Staphylococcus aureus* izolatlarının %53,1'i, KNS izolatlarının %93,3'ü dirençli bulundu. İzole edilen 45 KNS suşunun %66,7'si *S.epidermidis*, %31,1'i *S.hominis* ve %2,2'si *S.haemolyticus* olarak tanımlandı. MRSA suşları arasında bir suş linezolide dirençli bulunmuştur.

Stafilocoklarda heterojen dirençli suşlar nedeniyle metisilin direncinin fenotipik yöntemlerle gösterilmesi sıklıkla yanlışlıklara neden olmaktadır. Bu sorunun özellikle koagülaz negatif stafilocok suşlarında, *Staphylococcus aureus*'a göre daha da belirgin olduğu gözlenmektedir. Çalışmamızda *Staphylococcus aureus*'lar da fenotipik yöntemlerden, oksasilin (duyarlılık %98,6 ve özgüllük %100) ve sefoksitin disk difüzyon testinin (duyarlılık %100 ve özgüllük %99,2) sonuçları birbirine yakın bulundu. KNS suşlarında fenotipik yöntemlerden oksasilin (duyarlılık %95,3 ve özgüllük %100) ve sefoksitin disk difüzyon testinin (duyarlılık %97,6 ve özgüllük %100) sonuçları yakın bulundu. Ancak, hem *Staphylococcus aureus*, hem de koagülaz negatif stafilocok suşların da metisilin direncinin gösterilmesinde en uygun yöntem polimeraz zincir reaksiyonu ile *mecA* geninin belirlenmesidir.

Anahtar sözcükler: KNS, *mecA*, metisilin direnci, *S.aureus*.

SUMMARY

Determining Resistance Profiles of *Staphylococci* Strains That Isolated From Clinical Samples

Methicillin resistance of clinical isolates *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci was planned to be detected by oxacillin and cefoxitine disk diffusion tests and *mecA* gene which is responsible for the resistance by polymerase chain reaction.

150 staphylococcus strains isolated which clinic samples that comes from medical microbiology laboratory in Afyon Kocatepe University between november 2009 – 2010 april and the suspected methiciline resistance strains are tested. *mecA* gene which is accepted as gold standard was tested by polymerase chain reaction.

In the oxacillin disk diffusion test, 52% of the *Staphylococcus aureus* and 91,1% of the CoNS isolates, in the cefoxitine disk diffusion test 53,1% of the *Staphylococcus aureus* and 93,3% of the CoNS isolates were found to be resistant. We isolated 45 CoNS strains and were identified 66,7% *S.epidermidis*, 31,1% *S.hominis* and 2,2% *S.haemolyticus*. It was found that one of MRSA strains were resistant to linezolid.

Detection of methicillin resistance in staphylococci by phenotypical methods often leads to false results. This problem is more evident in the CoNS than the *Staphylococcus aureus* isolates. In our study, *Staphylococcus aureus* isolates the results of the phenotypical methods, oxaciilin (sensitivity 98,6% and spesificity 100%) and cefoxitine disk diffusion tests (sensitivity 100% and spesificity 99,2%) were found to be consistent. CoNS isolates the results of the phenotypical methods, oxaciilin (sensitivity 95,3% and spesificity 100%) and cefoxitine disk diffusion tests (sensitivity 97,6% and spesificity 100%) were found to be consistent. However, the most appropriate method for detecting the methicillin resistance for both *Staphylococcus aureus* and CoNS isolates is detection of *mecA* gene by polymerase chain reaction.

Key Words: CoNS, *mecA*, methicillin resistance, *S.aureus*.

KAYNAKLAR

- ABBOTT KC, AGODOA LY. (2002). Hospitalizations for bacterial endocarditis after initiation of chronic dialysis in the United States. *Nephron*, 91:203-209.
- AKSU HSZ, CANDEVİR A. (2008). Sulfonamidler, Trimetoprim ve Trimetoprim-Sulfametoksazol. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 368-372.
- ALEN S, KONEMAN E, JANDA W, SCHRECKENBERGER P, WINN W, WOODS G, PROCOP G. (2006). *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5th, Philadelphia: Lippincott Williams, 539-576.
- AR CHE R GL, CL IMO MW. (2005). *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative staphylococci. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2352-2360.
- ARBEIT RD. (1995). Laboratory procedures for epidemiologic analysis of microorganisms. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenoer FC, Tenover RH. *Manual of Clinical Microbiology*. 6th. Washington. ASM press. 190-208.
- ARSLAN H, TUNÇBİLEK S, NAZLIER S. (1997). Nosokomial enfeksiyon etkeni olarak izole edilen stafilokoklarda glikopeptid antibiyotiklerin etkinliği, 8. Turk Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi, Program ve Özet Kitabı, 784.
- AYAZ C. (2008). Beta laktamların genel özellikleri ve penisilinler. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 266-278.
- BACHI BB, ROHRER S. (2002). Factors influencing methicillin resistance in staphylococci. *Arch Microbiol*, 178:165-171.
- BALABAN N. (2008). Klinik Materyallerden İzole Edilen Stafilokoklarda Makrolid, Linkozamid ve Streptogramin B Direnci Sıklığının Disk Yaklaştırma Testi ve Moleküler Yöntemler Kullanılarak Araştırılması. Doktora Tezi.
- BANNERMAN TL. (2003). Staphylococcus, micrococcus and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover RH, Manual of Clinical Microbiology, 384-404.
- BİLGEHAN H. (1996). Gram olumlu koklar. Klinik Mikrobiyoloji: Özel Bakterioloji ve Bakteri Enfeksiyonları, İzmir. Şafak Matbaası, :217-245.
- BİLGEHAN H. (2000). Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakterioloji ve Bakteri Enfeksiyonları. Fakülteler Kitabevi, İzmir, 239-268.
- BİLGEHAN H. (2005). Klinik Mikrobiyoloji, 10. basım, Barış yayınları, 5: 239-271.

- BLANDINO G, MARCHESE A, ARDITO F. (2004). Antimicrobial susceptibility profiles of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* isolated in Italy from patients with hospital-acquired infections. *Int J Antimicrob Agents*. 24:515-8.
- BORG MA, DE KRAKER M, SCICLUNA E. (2007). Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in invasive isolates from southern and eastern Mediterranean countries, *J Antimicrob Chemother*. 60(6):1310-5.
- BOUBAKER BB, ABES RB, ABDALLAH HB. (2004). Evolution of a cefoxitin disk diffusion test for the routine detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect*. 10: 762-5.
- BOZCA B, COŞKUNER SA, BİÇER KÇ, GENÇ VE, ÖZGENÇ O. (2007). Stafilkoklarda metisilin direnç oranlarının saptanması. *Ankem Derg* 21(Ek1):S26
- BOZDOĞAN B, LECLERCQ R. (1999). Effects of genes encoding resistance to streptogramins A and B on the activity of quinupristin-dalfopristin against *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*, 43:2720-2725.
- BROWN DFJ, EDWARDS DI, HAWKEY PM. (2005). Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Antimicrob Chemother* 56:1000-18.
- BROWN DFJ, EDWARDS DI, HAWKEY PM. (2005). Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Antimicrob Chemother*. 56:1000-18.
- CENGİZ AT, MUTLU G, İMİR T, CENGİZ AT, USTAÇELEBİ Ş, TÜMBAY E, METE Ö.(1999). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara. Güneş Kitabevi,339-347.
- CENGİZ AT. (2004). Tıp ve diş hekimliğinde genel ve özel mikrobiyoloji; Ankara: Güneş Kitabevi, 343-50.
- CHAMBERS HF. (1997). Methicillin resistance in *Staphylococci*: Molecular and Biochemical Basis and Clinical Implications. *Clinical Microbiology Reviews*, 10:781-791.
- CHAMBERS HF. (1997). Methicillin-resistance in staphylococci: Molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev*. 10:781-791.
- CLSI. (2008). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Nineteenth Informational Supplement. CLSI Document M100-S18 Pennsylvania, 28:110-114.
- CLSI. (2009). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Nineteenth Informational Supplement. CLSI Document M100-S19 Pennsylvania, 29:52-59.
- CONTERNO LO, WEY SB, CASTELO A. (1998). Risk factors for mortality in *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 19:32-37.
- COTTAGNOUD P. (2002). Cellular and molecular aspects of drugs of the future: meropenem. *Cell Mol Life Sci.*, 59(11):1928-33.

- CUEVAS O, CERCENADO E, VINDEL A. (2004). Evolution of the antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. in Spain. Five nationwide prevalence studies, 1986 to 2002. *Antimicrob Agents Chemother*, 48:4240-4245.
- ÇETİNKAYA Y, ÜNAL S. (1997). Glikopeptid antibiyotikler: Vankomisin ve teikoplanin 1(ek):3-14.
- ÇOLAK D. (1999). Antimikrobiyal ilaçlar ve etki mekanizmaları. In: Mutlu G, İmir T, Cengiz AT. Ustaçelebi Ş, Tümbay E, Mete O. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Güneş Kitabevi, :339-347.
- DEĞERLİ K, ÖZBAKKALOĞLU B, SÜRÜCÜOĞLU S. (2000). Klinik örneklerden soyutlanan *Staphylococcus aureus* suşlarının çeşitli antimikrobiklere duyarlılıkları. *İnfeksiyon Dergisi*, 14:87-90.
- DERBENTLİ Ş. (2004). Cerrahi infeksiyonlarda dirençli Gram pozitif bakteri sorunu. *ANKEM Derg*, 18:215-221.
- DIEKEMA DJ, PFALLER MA, SCHMITZ FJ. (2001). Survey of infections due to *Staphylococcus* species: Frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pasific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis*, 32(supp2):114-132.
- DINGES MM, ORWIN PM, SCHLIEVERT PM. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev*. 13:16-34
- DUMAN Y, SERİNDAG A, TEKEREKOĞLU SM. (2009). Klinik Örneklerden İzole Edilen *Staphylococcus aureus*'ların Antimikrobiyallere Direnç Durumu. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 16 (3) 145-148
- DÜNDAR D, SÖNMEZ TAMER G. (2009). Klinik Örneklerden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarının Antimikrobiyal Duyarlılıkları: Üç Yıllık Değerlendirme. *ANKEM Derg*. 23(1):8-12
- DÜNDAR V, DÜNDAR DÖ. (2002). Stafilokok infeksiyonları Willke Topcu A(editor) İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Cilt 2 Etkenlere göre infeksiyonlar. 2002 Nobel Tıp Kitapevleri. 1507-1516.
- DÜNDAR V, DÜNDAR DÖ. (2008). Stafilokok Enfeksiyonları. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Ed. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 2065-2077.
- ÇOKÇA F.(2008).Tetrasiklinler. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 308-313.
- DÜNDAR V, DÜNDAR DÖ. Stafilokok İnfeksiyonları. IN: TOPÇU AW, SÖYLETİR G, DOĞANAY M. (2003). İnfeksiyon hastalıkları ve Mikrobiyoloji Kitabı. Nobel Tıp Kitapevleri, 1507-1516.
- EHLERT K.(1999). Methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus* melocular basis, novel targets and antibiotic therapy, *Curr Pharm Des*, 5:45. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 313-326.
- EMORI TG, GAYNES RP. (1993). An overview of nosocomial infections including the role of microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev*. 6:428-442.

- EROL S, LEBLEBİCİOĞLU H, USLUER G, ULUSOY S. (2003). Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler, Ankara, Bilimsel Tıp Yayınevi;417-420.
- FRANCOIS P, RENZI G, PITTET D. (2004). A novel multiplex real-time PCR assay for rapid typing of major staphylococcal cassette chromosome mec elements. *J Clin Microbiol*, 42:3309-12.
- FRIGATTO EAM, MACHADO AMO, PIGNATARI ACC, GALES AC. (2005). Is the cefoxitin disk test reliable enough to detect oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci? *J Clin Microbiol*. 43:2028-9.
- GÖNÜLLÜ N, KARA KÖSE A, ÇATAL F. (2009). Klinik Örneklerden İzole Edilen Stafilokok Suşlarının Makrolid ve Linkozamid Direnç Fenotipleri. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 39 (1-2): 12-5.
- GRADELSKI E, VALERA L, ALEKSUNES L. (2001). Correlation between genotype and phenotypic categorization of staphylococci based on methicillin susceptibility and resistance. *J Clin Microbiol*. 39:2961-2963.
- GRUNEBERG RN. (1997). Anti-Gram positive agents: What we have and what we would like. *Drugs*, 6:29-38. DİNGES MM, ORWİN PM, SCHLIEVERT PM. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev*, 13:16-34.
- GÜLAY Z. (1999). Antimikrobiyal ilaçlara direnç. In: Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. 1. baskı. Ankara: Güneş Kitabevi ,49:91-108.
- GÜLAY Z. (2008). Antibakteriyel ilaçların etki mekanizmaları. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 227-243.
- GÜR D. (2000). Aerop Üreyen Bakteriler için Dilüsyon Yöntemi ile Antimikrobik Duyarlılık Testleri-Dördüncü Baskı; Onaylanmış Standart. Bilimsel Tıp Yayınevi, 17(2).
- GÜR D. (2008). Bakterilerde antibiyotiklere karşı direnç. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri,
- GÜRLER N, KAYGUSUZ A, KARAYAY S, TÖRECİ K. (1997). Methicillin-resistant *Staphylococci* isolates from pus since 1992 and aminoglycoside and quinolone resistance in these strain. *ANKEM Derg*, 11:9.
- GÜRLER N, ÖNGEN B, ATTILA A, ÖKSÜZ L, TÖRECİ K. (1995). Gram pozitif koklarda seçimsiz duyarlılık deneylerinde saptanan direnç oranları. *ANKEM Derg*, 9:109.243-257.
- HADDADIN AS, FAPPIANO SA, LIPSET PA. (2002). Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in the intensive care unit. *Postgrad Med J*, 78:385-392.
- HANSEN AM, ERICSON SOLLID JU. (2006). SCCmec in staphylococci: genes on the move. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 46:(1):8-20.
- HAZNEDAROĞLU T, ÖNCÜL O, HOŞBUL T, ÇAVUŞLU Ş, BAYLAN O, ÖZYURT M. (2010). Yatan Hastalardan Soyutlanan *Staphylococcus aureus* Suşlarında Metisilin Direnci: Üç Yıllık Trend. *TAF Prev Med Bull*. 9(6):585-590

- HIRAMATSU K, ARITAKA N, HANAKI H, KAWASAKI S, HOSODA Y, HORI S, FUKUCHI Y, KOBAYASHI I. (1997). Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogenously resistant to vancomycin. *Lancet*, 350:1670–1673.
- HIRAMATSU K, CUI L, KURODA M, ITO T. (2001). The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol*, 9:486-93.
- HIRAMATSU K, KATAYAMA Y, YUZAWA H. (2002). Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol*, 292:67-74.
- HOSOSAKA Y, HANAKI H, ENDO H. (2007). Characterization of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*: a new type of MRSA. *J Infect Chemother* 13:79-86.
- HUSSAIN Z, STOAKES L, GARROW S. (2000). Rapid detection of *mecA*-positive and *mecA* negative coagulase negative staphylococci by an anti-penicillin binding protein 2a slide latex agglutination test. *J Clin Microbiol*. 38:2051-2054.
- IRAZ M. (2008). *Staphylococcus Aureus*'larda Metisilin Direncinin Tespitinde Oksasilin-Sefoksitin Disk Difüzyon, Oksasilin Agar Tarama, Lateks Aglutinasyon, *Meca* Gen Tespiti Ve Bir Otomatize Sistemin Karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi.
- ITO T, KATAYAMA Y, ASADA K. (2001). Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome in methicillin resistant *Staphylococcus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 45:1323-1336.
- ITO T, KATAYAMA Y, HIRAMATSU K. (1999). Cloning and nucleotid sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob Agents Chemother*. 43:1449-1458.
- ITO T, MA XX, TAKEUCHI F. (2004). Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. *Antimicrob Agents Chemother*, 48:2637-2651.
- ITO T, OKUMA K, MA XX. (2003). Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resist Update*, 6:41-52.
- JAFFE RI, LANE JD, ALBURG SV, NIEMEYER DM.(2000). Rapid extraction from and direct identification in clinical samples of methicillin-resistant staphylococci using the PCR. *J Clin Microbiol*, 38:3407-3412.
- JANDA WM, RISTOW K, NOVAK D. (1994). Evaluation of RapiDEC Staph for identification of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus*. *J Clin Microbiol* ,32:2056-2059.
- JORGENSEN J.H, TURNIDGE J.D. (2003). Susceptibility testing methods: Dilution and disk diffusion methods. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. *Manual of Clinical Microbiology*. 8th. Washington DC: ASM Pres, 1108-27.
- KAWAMURA Y, HOU XG, SULTANA F, HIROSE K, MIYAKE M, SHU S. (1998). Distribution of *Staphylococcus* species among human clinical specimens and emended description of *Staphylococcus caprae*. *J Clin Microbiol*. 36: 2038-2042.

- KIM HB, JANG HC, NAM HJ. (2004). In vitro activities of 28 antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus* isolates from Tertiary-Care Hospitals in Korea: a nationwide survey. *Antimicrob Agents Chemother.* 48:1124-7.
- KLOOS WE, BANNERMAN TL. (1994). Update on clinical significance of Coagulase-Negative Staphylococci. *Clin Microbiol Rev*, 7: 117-140.
- KLOOS WE, BANNERMAN TL. (1995). Staphylococcus and Micrococcus. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. *Manual of Clinical Microbiology*. 6th. Washington, DC: ASM Pre., 282-98
- KOCAGÖZ S, GÜR D, UZUN Ö, AKOVA M, ÜNAL S, AKALIN HE ve TÜBİTAK PROJESİ KATILIM MERKEZLERİ. (1997). Türkiye'de stafilokoklardaki metisilin direnci. 8. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi, 776.
- KOLBERT CP, ARRUDA J, VARDA-DELMORE P, ZHENG X, LEWIS M, KOLBERG J, PERSING DH. (1998). Branched-DNA assay for detection of the *mecA* gene in oxacillin-resistant and oxacillin-sensitive staphylococci. *J Clin Microbiol.* 36:2640-2644.
- KONEMAN EW, ALLEN SD, WILLIAM MJ, SCHRECKENBERGER PC, WINN WC. (1997). *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5th. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.
- KONEMAN EW, ALLEN SD, JANDA WM, SCHRECKENBERGER PC, WINN WC. (1997). The Gram-positive cocci. *The Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5th. Philadelphia: JB Lippincott Co., 539-576.
- KÖKSAL F. (2001). Nükleik asit çoğaltma yöntemleri. Durmaz R. *Uygulamalı moleküler mikrobiyoloji*, 15-34.
- KURODA M, OHTA T, UCHIYAMA I. (2001). Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, 357:1225-1240
- KUYUCU N.(2007). Antibiyotik direnci. *Çocuk Enf Derg* ,1:33-8.
- LADHANI S, JOANNOU CL, LOCHRIE DP, EVANS RW, POSTON S M. (1999). Clinical microbiol and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing Staphylococcal scalded-skin syndrome. *Clin Microbiol Rev.*12:224-242.
- LADHANI S, JOANNOU CL, LOCHRIE DP. (1999). Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome. *Clin Microbiol Rev*, 12:224-242.
- LANGEVELDE P, DISSEL JT, RAVENSBERGEN E, APPELMELK BJ, SCHRIJVER IA, GROENEVELD HP. (1998). Antibiotic-induced release of lipoteichoic acid and peptidoglycan from *Staphylococcus aureus*; quantitative measurements and biological reactivities. *Antimicrob Agents and Chemother* ,42:3073-3078.
- LEEUWEN WB, PELT C, LUIJENDIJK AD, VERBRUNGH HA, GOESSENS HF. (1999). Rapid detection of methicillin resistance staphylococcus aureus isolates by the MRSA-screen latex agglutination test. *J Clin Microbiol.* 37:3029-3030.

- LEW DP, WALDVOGEL FA.(1997). Osteomyelitis. *N Eng J Med.* ,336:999-1007.
- LIVERMORE DM.(2000). Antibiotic resistance in staphylococci. *Int J Antimicrob Agents.* 1:S3-10.
- LODISE TP, MCKINNON PS. (2005). Clinical and economic impact of methicillin resistance in patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Diagn Microbiol Infect Dis,* 52:113-22.
- LOUIE L, MATSUMARA SO, CHOI E, LOUIE M, SIMOR AE. (2000). Evaluation of three rapid methods for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol,* 38:2170-2173.
- LUNDSTROM TS, SOBEL JD. (1995). Vancomycin, Trimetoprim-Sulfamethoxazole and rifampin. *Infect Dis Clin Nort Am.* 9:747-767.
- MA XX, ITO T, TIENSASITORN C. (2002). Novel type of staphylococcal cassette chromosome mec identified in community-acquired methicillin –resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother,* 46:1147-1152.
- MALTEZOU H, GIAMARELLOU H. (2006). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Int J Antimicrob Agents,* 27:87-96.
- MARANAN MC, MORERIA B, BOYLE-VAVRA S, DAUM RS. (1997). Antimicrobial resistance in staphylococci. *Infect Dis Clin North Am,*11:813-849.
- MARTINS A, CUNHA MRS. (2007). Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci: epidemiological and molecular aspects. *Microbiol Immunol,* 51(9):787-795.
- MOREILLON P, QUE Y, GLAUSER MP.(2005). *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock) In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. *Principles and Practice of Infectious Diseases,* 2321-2351.
- MURAY PR, ROSENTHAL KS, KOBAYASHI GS, PFALLER MA. (1998). Staphylococcus and Related Organisms in Medical Microbiology. Third ed. Mosby, St. Low pp, 175-188.
- MURAY PR, ROSENTHAL KS, PFALLER PA. (2005). MEDICAL MICROBIOLOGY; 4th. Philadelphia: Elsevier, 203-12:221-36.
- MUTLU B. (2008). Kloramfenikol. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi.* İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 303-308.
- NEU HC, GOOTZ TD. (2003). General Concepts. Antimicrobial Chemotherapy, 11:1-26.
- NOLTE FS, CALIENDO AM. (2003). Molecular detection and identification of microorganisms. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (Eds). *Manual of Clinical Microbiology,* 234-256.
- NOUWEN JL, VAN BELKUM A, VERBRUGH HA. (2001). Determinants of *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *Neth J Med,* 59:126-133.

- OLIVE DM, BEAN P. (1999). Principles and application of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol.* 37:1661-1669.
- OSIYEMI O, DICKINSON G. (2002). Gram-positive pneumonia. *Curr Infect Dis Rep.* 2:207-214.
- ÖZTÜRK R, MİDİLLİ K, ERGİN S, AYGÜN G. (1995). Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kliniklerinde yatan hastaların klinik materyallerinden izole edilen stafilocokların antimikrobik maddelere duyarlılığı. *ANKEM Derg.* 9:105.
- PEACOCK SJ. (2005). *Staphylococcus*. In Borriello SP, Murray PR, Funke G. *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, 771-832.
- PEREIRA SF, HENRIQUES AO, PINHO MG, DE LENCASTRE H, TOMASZ A. Role of PBP1 in cell division of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 189(9):3525-31.
- PODZORSKI RP, PERSING DR. (1995). Molecular detection and identification of microorganisms. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Yolken RH. *Manual of Clinical Microbiology*. 6th. Washington: ASM Press. 130-157.
- PROCTOR RA, PETERS G. (1998). Small colony variants in staphylococcal infections: diagnostic and therapeutic implications. *Clin Infect Dis*, 27:419-423.
- RARTINAN BJ, TOMASZ A. (1984). Low affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bad.* 158: 513-516.
- RESENDE CA, FIGUEIREDO MS. (1997). Discrimination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from borderline-resistant and susceptible isolates by different methods. *J Med Microbiol.* 46: 145-149
- RICE LB, SAHM D, BONOMO RA. (2003). Mechanism of resistance to antimicrobial agents. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Yolken RH. *Manual of Clinical Microbiology* 8th Ed. Washington DC, 1074-1101.
- RICHARD P, MEYRAN M, CARPENTIER E, THABAUT A, DRUGEON HR. (1994). Comparison of phenotypic methods and DNA hybridization for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 32: 613-617.
- ROISIN S, NONHOFF C, DENIS O. (2008). Evaluation of new Vitek 2 card and disk diffusion method for determining susceptibility of *Staphylococcus aureus* to oxacillin. *J Clin Microbiol.* 46:2525-2528.
- SHANDS KN, SCHMID GP, DAN BB, BLUM D, GUIDOTTIRJ, HARGRETT NT, ANDERSON RL, HILL DL, BROOME CV, BAND JD, FRASER DW. (1980). Toxic-shock syndrome in menstruating women: its association with tampon use and *Staphylococcus aureus* and the clinical features in 52 cases. *N Engl J Med.*, 303:1436-1442.
- SHEAGREN JN, SCHABERG DR. (1998). Staphylococci. In: Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR. *Infectious Diseases*, 1693-1703.

- SHINABARGER DL, MAROTTI KR, MURRAY RW, LIN AH, MELCHIOR EP, SWANEY SM DUNYAK DS, DEMYAN WF, BUYSSE JM. (1997). Mechanism of action of oxazolidinones; effect of linezolid translation reactions. *Antimicrob Agents Chemother* ,4 1:2132-2136.
- SHOPSIN B, KREISWIRTH BN. (2001). Molecular epidemiology of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis*, 7:323-326.
- SİPAHİ OR, PULLUKÇU H, AYDEMİR Ş. (2007). Mikrobiyolojik kanıtlı hastane kökenli *Staphylococcus aureus* bakteriyemilerinde direnç paternleri: 2001-2005 yıllarının değerlendirilmesi. *Ankem Derg.* 21(1):1-4.
- SKINNER D, KEEFER CS. (1941). Significance of bacteremia caused by *Staphylococcus aureus*. A study of one hundred and twenty two cases and a review of the literature concerned with experimental infection in animals. *Arch Intern Med*, 68:851.
- SMITH TL, PEARSON ML, WILCOX KR, CRUZ C, LANCASTER MV, ROBINSON-DUNN B, TENOVER FC, ZERVOS MJ, BAND JD, WHITE E, JARVIS JVR. (1999). Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. Glycopeptide Intermediate *Staphylococcus aureus* Working Group, *N Engl J Med* , 340:493.
- STAPLETON PD, TAYLOR PW. (2002). Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: Mechanisms and Modulations. *Science Progress*, 85 : 57-72.
- STRATCHOUNSKI LS, DEKHNICH AV, KRETCHIKOV VA. (2005). Antimicrobial resistance of nosocomial strains of *Staphylococcus aureus* in Russia: results of a prospective study. *J Chemother.* 17:54-60.
- STRUELENS MJ and members of ESGEM of ESCMID. (1996). Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing system. *Clin Microbiol Infect.* 2:2-11.
- SWANEY SM, AOKI H, GANOZA C, SHINABARGER DL. The oxazolidinone linezolid inhibits initiation of protein synthesis in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:325 1-3255.
- SWENSON JM, LONSWAY D, MCALLISTER S. (2007). Detection of *mecA*-mediated resistance using reference and commercial testing methods in a collection of *Staphylococcus aureus* expressing borderline oxacillin MICs. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 58:33-9
- SWENSON JM, TENOVER FC. (2005). Results of disk diffusion testing with cefoxitin correlate with presence of *mecA* in *Staphylococcus spp.* *J Clin Microbiol.* 43:3818-23.
- ŞARDAN YÇ. (2000). Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* infeksiyonlarının epidemiyolojisi ve kontrolü. *Hastane İnfek Derg.* 4: 205-207.
- TENOVER FC, ARBEIT DR, GOERING RV. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed field gel electrophoresis. Criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 33:2233-2239.
- TURAÇ BİÇER A. (2009). Hastane İzolatı *Staphylococcus aureus* ve Koagülaz Negatif *Staphylococcus* Suşlarında Metisilin Direncinin Farklı Yöntemlerle Araştırılması. Uzmanlık Tezi.

- TURNIDGE JD, FERRARO MJ, JORGENSEN JH. (2003). Susceptibility testing methods: General considerations. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Yolken RH. *Manual of Clinical Microbiology*. 8th Ed. Washington DC: ASM Press, 1102-1107.
- TÜNGER Ö. (2008). Makrolidler, ketolidler, linkozamitler. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, Tunger A. (2004). *Staphylococcus aureus: mikrobiyoloji, patogenezi ve epidemiyoloji. Önemli ve sorunlu gram-pozitif bakteri infeksiyonları*, 9-22.
- ULUSOY S. (2003). Metisiline Dirençli *Staphylococcus Aureus* Suşlarında *MecA* Geninin PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Metodu İle Saptanması. Yüksek Lisans Tezi.
- USLUER G. (2008). Oksazolidinonlar. IN: TOPÇU AW, SÖYLETİR G, DOĞANAY M. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 337-341.
- ÜNAL S, HOSKINS J, FLOKOWITSCH J, WU E, PRESTON D, SHEATRUD P. (1992). Detection of methicillin-resistant *Staphylococci* by using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 30: 1685-1691.
- ÜNAL S. Stafilokoklarda Metisilin Direnci. IN: GÜR D, SÖYLETİR G, BAL Ç. (1997). Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Standardizasyonu Toplantısı. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını, 33:72-76.
- ÜNAL S. *Staphylococcus aureus*: Direnç Mekanizmaları. IN: ULUSOY S, USLUER G, ÜNAL S. *Grampozitif bakteri infeksiyonları*. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 23-38.
- VITEK2 Product Information bioMérieux. Durham, North Carolina 27704-0969/ USA. <http://www.biomerieux.com>
- WALDVOGEL FA. (1995). *Staphylococcus aureus*. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R. Principles and Practice of Infectious Diseases, 1754-1776.
- WOLCOTT MJ. (1992). Advances in nucleic acid-based detection methods. *Clin Microbiol Rev*. 5:370-386.
- YAO JDC, MOELLERING RC. (1995). Antibacterial agents. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Yolken RM. Manual Of Clinical Microbiology. 6th ed. Washington. ASM press. 1281-1307.
- YAO JDC. (1995). Moellering RC. Antibacterial agents. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RM. Manual Of Clinical Microbiology. 6th ed. Washington. ASM press, 1281-1307.
- YILDIZ O., AYGEN B. (2002). Stafilokokların Antibiyotik Duyarlılığı ve Direnç Sorunu. İnfeksiyon Hastalıkları Serisi, 5, :128-136.
- YİĞİT N, AKTAŞ EA, AL DOĞRUMAN F. (2008). Klinik Örneklerden İzole Edilen Stafilokokların Metisilin, Fusidik Asit ve Mupirosin Direnci. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*. 65(1): 17-23.

YORGANCIGİL B, DEMİRCİ S, DEMİR İ, ARDA M. (1999). Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* kökenlerinin değişik antibiyotiklere dirençleri. *İnfeks Derg* ,13:501-503.

ZHANG K, MCCLURE JA, ELSAYED S. (2005). Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome mec types I to V in methicillinresistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, 43:5026-5033.

ZSCHECK KK, MURRAY BE. (1999). Genes involved in the regulation of beta-lactamase production in enterococci and staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother.* ,37(9):1966-70.