



İZMİR KÂTİP ÇELEBİ
ÜNİVERSİTESİ

T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
ATATÜRK EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ BÖLÜMÜ

KLİNİK ÖRNEKLERDEN
İZOLE EDİLEN STAFİLOKOKLARDA
MAKROLİD, LİNKOZAMİD ve STREPTOGRAMİN B
DİRENCİNİN
FENOTİPİK ve GENOTİPİK
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ
Dr. FUNDA KOÇAL CAN

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. MUSTAFA DEMİRCİ

İZMİR
ŞUBAT-2015

T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
ATATÜRK EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ BÖLÜMÜ

KLİNİK ÖRNEKLERDEN
İZOLE EDİLEN STAFİLOKOKLARDA
MAKROLİD, LİNKOZAMİD ve STREPTOGRAMİN B
DİRENCİNİN
FENOTİPİK ve GENOTİPİK
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ
Dr. FUNDA KOÇAL CAN

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. MUSTAFA DEMİRCİ

Bu çalışma İKÇÜ-BAP tarafından 2014-1-TEZ-36 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

İZMİR
ŞUBAT-2015

**T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI
ATATÜRK EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ KLİNİĞİ**

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN
İZOLE EDİLEN STAFİLOKOKLARDA
MAKROLİD, LİNKOZAMİD ve STREPTOGRAMİN B
DİRENCİNİN
FENOTİPİK ve GENOTİPİK
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Dr. FUNDA KOÇAL CAN

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Uzmanlık Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma tarafımızca incelenerek her yönü ile “Tıpta Uzmanlık” tezi olarak uygun ve yeterli bulunmuştur.

Tez Danışmanı : Prof. Dr.Mustafa Demirci-İzmir Katip Çelebi
Üniversitesi Tıp Fakültesi

Üye : Prof. Dr.Selçuk Kaya-İzmir Katip Çelebi Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Üye : Prof. Dr.Ramazan İnci-Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi

Prof.Dr. Mehmet Ali MALAS
Tıp Fakültesi Dekanı

TEŞEKKÜR

Asistanlık sürem boyunca eğitimimi sağlayan, mesleki bilgi ve deneyimleriyle yetişmeme katkıda bulunan tez danışmanım Prof. Dr. Mustafa DEMİRCİ'ye ve eğitim sorumlumuz Prof. Dr. Selçuk KAYA'ya, Doç. Dr. Erkan YULA'a, idari sorumlumuz Doç. Dr. İlhan AFŞAR'a, eğitim görevlimiz Uzm. Dr. Nükhet KURULTAY'a, Doç. Dr. Aslı Gamze ŞENER'e, Doç. Dr. Süreyya Gül YURTSEVER'e, Uzm. Dr. Nurten GÜLVARDAR BARAN'a, Uzm. Dr. Serdar GÜNGÖR'e, Uzm. Dr. Hüseyin Hakan ER'e

Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji, Halk Sağlığı, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ve Biyokimya rotasyonlarım sırasında bilgi ve deneyimleriyle katkıda bulunan tüm hocalarıma,

Asistanlığım süresince birlikte çalıştığım tüm asistan arkadaşlarıma, teknisyen, sekreter ve personelimize,

Asistanlık ve tez sürecim dahil hayatımın her aşamasında desteğini ve sevgisini esirgemeyen sevgili eşim Ender CAN'a

Ve, herşeyden önce bugünlere gelmeme vesile olan sevgili anneme, babama ve abime sonsuz teşekkür ederim...

Tez çalışmamı, 2014-1-TEZ-36 no'lu proje ile destekleyen İKÇÜ Rektörlüğü Araştırma Fonu'na teşekkür ederim.

Dr. Funda KOÇAL CAN

İzmir 2015

İÇİNDEKİLER

Sayfa

KABUL VE ONAY.....	I
TEŞEKKÜR.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
KISALTMALAR.....	VI
TABLO DİZİNİ.....	VIII
ŞEKİL DİZİNİ.....	IX
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1.Stafilokoklar.....	4
2.1.1.Tarihçe.....	4
2.1.2.Sınıflandırma.....	5
2.1.3. Görünüm ve Boyanma Özellikleri.....	5
2.1.4. Üreme Özellikleri.....	6
2.1.5. Biyokimyasal Özellikleri.....	6
2.1.6. Virulans ve Patojenite.....	6
2.1.7. Epidemiyoloji.....	12
2.1.8. Enfeksiyonları.....	13
2.1.9. Laboratuvar tanısı.....	18
2.2. Makrolidler.....	23
2.2.1. Yapısı.....	23
2.2.2. Etki mekanizması.....	24
2.2.3. Antimikrobiyal Aktivitesi.....	24
2.2.4. Farmakokinetik Özellikleri.....	25

2.2.5. Klinik Kullanımı.....	25
2.3. Linkozamidler.....	26
2.3.1. Yapısı.....	26
2.3.2. Etki mekanizması.....	27
2.3.3. Antimikrobiyal Aktivitesi	27
2.3.4. Farmakokinetik Özellikleri	28
2.3.5. Klinik Kullanımı.....	28
2.4. Ketolidler.....	29
2.4.1. Yapısı.....	29
2.4.2. Etki mekanizması.....	29
2.4.3. Antimikrobiyal Aktivitesi	30
2.4.4. Farmakokinetik Özellikleri	30
2.4.5. Klinik Kullanımı.....	31
2.5 Streptograminler.....	31
2.5.1. Yapısı.....	31
2.5.2. Etki mekanizması.....	32
2.5.3. Antimikrobiyal Aktivitesi	32
2.5.4. Farmakokinetik Özellikleri	33
2.5.5. Klinik Kullanımı.....	33
2.6. Makrolid, Linkozamid, ve Streptogramin Antibiyotiklerine Karşı Direnç Mekanizmaları.....	34
2.6.1. Hedef Bölge Değişikliği.....	34
2.6.2. Aktif Efluks Pompa Sistemi.....	35
2.6.3. Enzimatik inaktivasyon.....	36
2.6.4. MLS _B Direncinin Saptanması.....	37
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	39
3.1. Bakteri İzolatlarının Eldesi.....	39

3.2. Antibiyotik Duyarlılık Testleri.....	39
3.3. <i>S. aureus</i> ve Koagulaz Negatif Stafilocokların Tanımlanması.....	39
3.4. Çift Disk Difüzyon Testi (D Test).....	40
3.5. <i>ermA</i> , <i>ermC</i> , <i>msrA</i> , <i>msrB</i> genlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyon Yöntemiyle Araştırılması.....	41
3.5.1. DNA Ekstraksiyonu	41
3.5.2. Direnç genlerinin saptanması	42
3.5.3. <i>ermA</i> , <i>ermC</i> , <i>msrA</i> , <i>msrB</i> Genleri için PCR Karışımları ve Uygun Döngü Koşulları.....	43
3.5.4. PCR Ürünlerinin Saptanması	47
3.6. PCR İçin Kullanılan Sarf Malzemelerin ve Solüsyonların Hazırlanması.....	48
3.7. İstatiksel Analiz.....	49
4. BULGULAR.....	50
5. TARTIŞMA	65
6. SONUÇLAR.....	75
7. ÖZET.....	77
8. SUMMARY.	79
9. KAYNAKLAR.....	81

KISALTMALAR

AGBHS: A grubu beta-hemolitik streptokok

bç: Baz çifti

BHI: Brain-heart infusion broth

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

cMLS_B: Yapısal Makrolid, Linkozamid ve Streptogramin B Direnci

CF: Clumping Factor (Bağlı koagülaz)

CRF: Coagulase-Reacting factor

ereA: eritromisin esterifikasyon A

ereB: eritromisin esterifikasyon B

ermA: Eritromisin metilaz A

ermC: Eritromisin metilaz C

dATP: Deoksi adenin tri fosfat

dCTP: Deoksi sitozin tri fosfat

dGTP: Deoksi guanin tri fosfat

DNA: Deoksi Ribonükleik Asit

dNTP: Deoksi Nükleotit Tri Fosfat

GGDP: Genejet Genomic DNA Purifikasyon

IVIG: İntravenöz immunglobulin

iMLS_B Direnci: İndüklenebilir Makrolid, Linkozamid ve Streptogramin B Direnci

KNS: Koagülaz negatif Stafilokok

linA: Linkozamid nükleotidil transferaz

mef: Makrolid efluks geni

MHA: Mueller Hinton Agar

MHC-2: Major histocompatibility kompleks-2

MIK: Minimal inhibitör konsantrasyon

MRKNS: Metisiline dirençli Koagülaz negatif Stafilokok

MRSA: Metisiline dirençli *Stapylococcus aureus*

MSCRAMM: Mikrobiyal yüzey komponentini tanıyan adezif matriks molekülü

MSKNS: Metisiline duyarlı Koagülaz negatif Stafilokok

MSSA: Metisiline duyarlı *Stapylococcus aureus*

MS_B Direnci: Makrolid, Streptogramin B Direnci

msrA: Metiyonin sülfoksid redüktaz A

msrB: Metiyonin sülfoksid redüktaz B

NNIS: National Nosocomial Infections Surveillance System

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PVL: Panton-Valentine Lökosidin

Q/D: Kinopristin/Dalfopristin

RNA: Ribonükleik Asit

TMP-SXT: Trimetoprim-sulfametaksazol

TŞST-1: Toksik Şok Sendromu Toksini-1

vat: Virginamisin faktör asetiltransferaz

vgb: Virginamisin faktör b

VRE: Vankomisine Dirençli Enterokok

TABLO DİZİNİ

- Tablo 1.** Mikrokok ve stafilokokların ayırımında kullanılan fenotipik testler
- Tablo 2.** En sık enfeksiyon etkeni stafilokok türlerinin ayırımı
- Tablo 3.** PCR’da kullanılan özgül primerler
- Tablo 4.** Stafilokok izolatlarının izole edildiği klinik materyallerin dağılımı
- Tablo 5.** İzolatların yaş gruplarına göre dağılımları
- Tablo 6.** Stafilokok izolatlarının izole edildiği materyallerin kliniklere göre dağılımı
- Tablo 7.** Stafilokok izolatlarının test edilen antibiyotiklere duyarlılık oranları.
- Tablo 8.** İzole edilen KNS türlerinin dağılımı
- Tablo 9.** *S. aureus* izolatlarında D-test yöntemi kullanılarak belirlenen direnç fenotipleri
- Tablo 10.** KNS türlerinde D-test yöntemi kullanılarak belirlenen direnç fenotipleri
- Tablo 11.** MS_B fenotipi gösteren izolatlarda PCR ile tespit edilen gen bölgeleri
- Tablo 12.** iMLS_B fenotipi gösteren izolatlarda PCR ile tespit edilen gen bölgeleri
- Tablo 13.** cMLS_B fenotipi gösteren izolatlarda PCR ile tespit edilen gen bölgeleri

ŞEKİL DİZİNİ

- Şekil 1.** Eritromisin kimyasal yapısı
- Şekil 2.** Klindamisin kimyasal yapısı
- Şekil 3.** Linkomisin kimyasal yapısı
- Şekil 4.** Telitromisin kimyasal yapısı
- Şekil 5.** Kinopristin kimyasal yapısı
- Şekil 6.** Dalfopristin kimyasal yapısı
- Şekil 7.** D- test ile tespit edilen MLS_B direnç fenotipleri
- Şekil 8.** *ermA* geninde direnç ile ilişkili 421 bç'lik gen bölgesinin agaroz jel elektroforez görüntüsü
- Şekil 9.** *ermC* geninde direnç ile ilişkili 572 bç'lik gen bölgesinin agaroz jel elektroforez görüntüsü
- Şekil 10.** *msrA* geninde direnç ile ilişkili 940 bç'lik gen bölgesinin agaroz jel elektroforez görüntüsü
- Şekil 11.** *msrB* geninde direnç ile ilişkili 595bç'lik gen bölgesinin agaroz jel elektroforez görüntüsü

1.GİRİŞ

Stafilokoklar, insan normal florasında bulunmakla birlikte ciddi enfeksiyonlara neden olan en önemli bakterilerdendir. Son zamanlarda gittikçe artan oranda hastane ve toplum kaynaklı enfeksiyon etkeni olmaya başlamışlardır. Deri, yumuşak doku, yara enfeksiyonu ve besin zehirlenmesi gibi tablolardan osteomyelit, septik artrit, pnömoni, menenjit, endokardit ve sepsis gibi yaşamı tehdit eden ve yüksek mortaliteye yol açan çok çeşitli enfeksiyonlara sebep olurlar [1, 2].

Stafilokokların insanlarda çeşitli fırsatçı enfeksiyonlara yol açtığı uzun zamandan beri bilinmektedir [3]. Bu cins içindeki en patojen tür olan *S. aureus* özellikle hastane kökenli enfeksiyonlarda önemli morbidite ve mortaliteye yol açmaktadır. 1980'li yıllardan itibaren metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) suşlarının pek çok hastanede yaygın olarak görülmeye başlamasıyla klinik ve epidemiyolojik bir sorun haline gelmiştir [4].

Koagülaz negatif stafilokok (KNS) türleri insanların normal deri ve mukoza florasının önemli bir üyesidir [4, 5]. Son yirmi yıldır başta *S. epidermidis* olmak üzere KNS'lerin önemli nozokomiyal enfeksiyonlara yol açabildiği bilinmektedir [4]. *S. epidermidis*'in doğal ve prostatik kapak endokarditi, bakteriyemi, cerrahi yara enfeksiyonu etkeni olduğu ve üriner sistem katater, intravasküler katater enfeksiyonlarına ve şant enfeksiyonlarına yol açtığı bilinmektedir [6].

Makrolid (eritromisin v.b.), linkozamid (klindamisin v.b.) ve streptogramin (kuinopristin-dalfopristin v.b.) grubu antibiyotikler (MLS_B), stafilokoklar da dahil olmak üzere Gram-pozitif bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır [7, 8]. Makrolidler ve klindamisin özellikle deri ve yumuşak doku enfeksiyonları ile penisiline alerjik hastalarda bir alternatif olarak sık kullanılan antibiyotiklerdir [9, 10]. Klindamisin, deri, yumuşak doku ve intraabdominal organ enfeksiyonlarında sık kullanılan bir antibiyotiktir [11]. MLS_B grubu antibiyotikler, kimyasal yapıları farklı ancak protein sentezinin inhibisyonu suretiyle benzer etki mekanizmasına sahiptir. Bu grup antibiyotiklere direnç, hedef bölge değişikliği, enzimatik inaktivasyon ve aktif olarak ilacın dışa atılması sonucu gelişebilmektedir. Hedef bölge değişikliği, *erm* (eritromisin ribozom metilaz) geninin kodladığı enzimlerin etkisiyle, MLS_B grubu antibiyotiklerin hedef bölgesi olan 23S rRNA'daki

adenin rezidülerine metil grubunun eklenmesi sonucu veya 23S rRNA V. kangalının merkez kısmında ya da L4 ve L22 gibi ribozomal proteinlerdeki mutasyonlar sonucunda olmaktadır. Birçok *erm* geni kromozomal yerleşimli olup transpozonlar aracılığıyla taşınırken, bir kısmı da plazmid kaynaklı olarak taşınmaktadır. *erm* geninin ekspresyonu yapısal-konstitütif (cMLS_B) veya indüklenebilir (iMLS_B) karakterdedir. Yapısal ekspresyon indükleyicilerin varlığı veya yokluğundan bağımsız olarak sıklıkla *erm* genlerinin regülatör bölgelerindeki nokta mutasyonları, delesyon veya duplikasyon gibi değişiklikler sonucunda görülür [12, 13]. Makrolid direnci, dışa atım mekanizmasına bağlı olarak da gelişebilmektedir. Bu şekilde gelişen dirence makrolid-streptogramin B (MS_B) direnci adı verilir ve bu tür direnç stafilokoklarda *msrA* geni tarafından kodlanır [8]. MLS_B grubu antibiyotiklere direnç gelişmesi nedeniyle bu ilaçların yeni türevleri geliştirilmiştir.

Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) prevalansında görülen artış, stafilokok enfeksiyonlarının ampirik tedavisinde kullanılacak antibiyotik seçeneklerini sınırlamaktadır. Glikopeptid grubu antibiyotiklerin stafilokoklara karşı etkisi oldukça güçlüdür ancak önemli yan etkilerinin olması, sadece hastanede yatan hastalarda kullanılabilmesi, tedavi maliyetinin yüksek olması ve son dönemde vankomisine dirençli suşların da ortaya çıkması, stafilokokların etken olduğu enfeksiyonların tedavisinde glikopeptidlere alternatif olabilecek yeni antibiyotiklerin arayışını gündeme getirmiştir [14]. Klindamisin, MRSA'nın neden olduğu deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan önemli bir alternatiftir. Bununla birlikte klindamisine karşı saptanan indüklenebilir makrolid, linkozamid ve streptogramin B direnci (iMLS_B) direnci, bu antibiyotiğin etkinliğini azaltmaktadır.

Bu çalışmada, indüklenebilir MLS_B direncini eritromisin ve klindamisin disklerinin kullanıldığı çift disk difüzyon testi (D test) ile saptamayı ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile MLS_B ve MS_B direncine yol açan *erm* ve *msr* genlerinin varlığını tespit etmeyi amaçladık.

Bu tez çalışmasında, İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na çeşitli yatan hasta servislerinden gönderilen çeşitli numunelerden izole edilen Stafilokok türleri kullanıldı. Stafilokok enfeksiyonlarında hızlı ve doğru bir şekilde tanının konması ve

antibiyotik duyarlılık profilinin belirlenmesi klinisyenin doğru bir şekilde tedaviye başlaması, hastanın prognozu, komplikasyonların azaltılması, hastanede kalış süresinin azaltılması ve hastane maliyetlerinin düşürülmesi açısından oldukça önemlidir.

Bu tez çalışması ile makrolid direnci oranları ve direnç ile ilişki genlerin hastanemizdeki izolatlarda dağılımının belirlenmesi amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. STAFİLOKOKLAR

2.1.1. Tarihçe

Stafilokoklar ilk kez 1878’de Robert Koch tarafından insan cerahatinde bulunmuştur. 1880’de Pasteur tarafından sıvı besiyerinde üretilmiş ve 1881 yılında Ogston bu mikroorganizmaların yüzeysel süpüratif inflamasyona, septisemi ve pyemiye yol açabileceğini, açıklayarak patojenitelerini vurgulamıştır [5, 15].

Staphylococcus terimi Yunanca *staphyle* (üzüm salkımı) kelimesinden türetilmiştir ve kümelenmeler yaptıklarından dolayı 1882 yılında Ogston tarafından bu mikroorganizmalara “*Staphylococcus*” ismi verilmiştir [4].

Rosenbach 1884’te stafilokokların ilk kez saf kültürünü yapmış ve karakteristik özelliklerini laboratuvarında inceleyerek, katı besiyerinde beyaz ve sarı renkli koloniler oluşturan iki farklı stafilokok tespit etmiştir. Beyaz renkli kolonileri *Staphylococcus albus*, sarı-portakal rengi kolonileri ise *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) olarak isimlendirmiştir. Winslow ve arkadaşları 1920 yılında stafilokok cinsini *Micrococcaceae* familyasına dahil etmiştir [5, 16, 17].

Penisilin keşfedilip 1941 yılında klinikte kullanılmaya başlanmasıyla stafilokok enfeksiyonlarının prognozu değişmiştir. Penisilinaz üreten stafilokoklar 1944 yılına gelindiğinde ilk kez Kirby tarafından bildirilmiştir. 1960’lı yılların sonunda ise hem hastanelerden hem de toplumdan izole edilen suşların %80’den fazlası penisiline dirençli hale gelmiştir [18, 19]. Penisilinaza dirençli ilk semisentetik antimikrobiyal ajan olan metisiline karşı 1961 yılında ilk dirençli *S. aureus* suşları bildirilmiştir. 1970’li yıllarda birçok antibiyotiğe (klindamisin, kloramfenikol, tetrasiklinler, makrolidler, rifampin, aminoglikozidler ve trimetoprim sulfametoksazol) direnç gelişmiştir [19]. Antibiyotiklere çoklu direnç gösteren MRSA suşları 1980’lerin sonlarında ve 1990’lı yıllarda tüm dünyaya yayılmış ve hastanelerde en sık rastlanan nozokomiyal patojenler arasında yerini almıştır [20].

Elli yıl kadar önce klinisyenler ve mikrobiyologlar, 1958 yılında septisemili hastalarda elde edilen verilerle KNS’lerin olası patojenliğine dikkat çekmişlerdir. 1970’li yıllarda, KNS’lerin piyogenik enfeksiyonlar ile ventriküloatrial şant enfeksiyonlarından sorumlu olabileceği saptanmıştır. 1980’li yıllara gelindiğinde KNS ile oluştuğu düşünülen enfeksiyonlar giderek artmıştır. “National Nosocomial

Infections Surveillance System (NNIS)” verilerine göre KNS’ler 1980’li yılların sonu 1990’lı yılların başlarında tüm patojenler içinde ilk beşte ve hastane kökenli kan izolatları arasında da ilk sırada gelmektedir. Yine NNIS 1995-2001 yılları arasında KNS’lerin nozokomiyal bakteriyemi etkenleri içinde %30’luk oran ile ilk sırada yer aldığını bildirmektedir [21]. Son yıllarda intravasküler kateter ve protezler gibi geçici veya kalıcı tıbbi cihazların çeşitli hasta gruplarında (Yoğun bakım hastaları, prematüre yeni doğanlar, kanser ve transplant hastaları gibi bağışık yanıtları yetersiz hastalar) daha sık kullanılmasına bağlı olarak bu fırsatçı patojenlerin klinik önemleri artmıştır [4, 21].

2.1.2. Sınıflandırma

Stafilokoklar önceleri *Planococcus*, *Micrococcus*, *Stomatococcus* cinsleri ile birlikte “*Micrococcaceae*” ailesi içinde sınıflandırılırken moleküler tekniklerin gelişmesiyle yapılan DNA-ribozomal RNA hibridizasyonları, 16S rRNA sekans analizleri gibi genetik çalışmalar ve kemotaksonomik analizler (hücre duvarı kompozisyonu, hücresel yağ asitleri gibi) aslında bu mikroorganizmaların birbirlerinden farklı olduklarını göstermiş ve tek bir aile içinde toplanmaması gerektiğini ortaya koymuştur [2]. Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology’nin yeni baskısında stafilokoklar *Firmicutes* şubesi, *Bacilli* sınıfında, *Bacillales* takımındaki *Staphylococcaceae* ailesi içinde Genus I olarak sınıflandırılmıştır [22].

2.1.3. Görünüm ve Boyanma Özellikleri

Stafilokoklar birden fazla düzlemde bölünerek üzüm salkımı şeklinde düzensiz kümeler oluşturan 0,5-1,5 µm çapında, hareketsiz, sporsuz, gram pozitif koklardır. Genellikle katalaz pozitif (*S. saccharolyticus* ve *S. aureus subsp. anaerobius* hariç), modifiye oksidaz negatif (*S. sciuri*, *S. lentus* ve *S. vitulinus* hariç), mikroorganizmalardır [2, 23].

2.1.4. Üreme Özellikleri

Zorunlu anaerop olan *S. saccharolyticus* ve *S. aureus subsp. anaerobius* dışında fakültatif anaerop olup çoğunlukla aerop üremeyi tercih ederler. Katı besiyerlerinde 18-24 saat içinde beyaz ya da altın sarısı pigmentli, 1-3 mm çapında, yuvarlak kenarlı, kabarık parlak yüzeyli, tereyağı kıvamında, S tipi, beta hemolitik veya non hemolitik koloniler yaparlar. Alfa hemoliz yapan stafilokok türü tespit edilmemiştir. Hücre zarında yer alan kolonilere altın sarısı rengini veren karotenoid yapısındaki pigmentler bazı *S. aureus* ve KNS'ler tarafından üretilir. Basit besiyerleri dahil birçok besi yerinde kolaylıkla ürerler. Besiyerine kan, serum, glikoz gibi maddeler konularak zenginleştirilirse üreme daha çabuk ve kolay olur [2, 5, 16].

2.1.5. Biyokimyasal Özellikleri

Optimal 30-37 °C ve 7-7.5 pH'da ürerler. *S. aureus* suşları koagülaz pozitifdir. Koagülaz pozitif olan diğer stafilokoklar; *S. intermedius*, *S. lugdunensis*, *S. hyicus*, *S. delphini*, *S. lutrae*, *S. schleiferi subsps coagulans* ve *subsps schleiferi*'dir. Stafilokoklar, glukozu fermentatif olarak parçalar ve son ürün olarak laktik asit oluştururlar. Ayrıca laktoz, sükroz, mannoz, trehaloz ve maltozu da fermente edebilirler. Mannitolü ise sadece *S. aureus* fermente eder. Stafilokokların çoğunluğu %7.5-10'luk NaCl içeren basit besiyerlerinde üreyebilirler. Nitratları nitritlere indirgerler furazolidon ve lizostafine duyarlı olmalarına karşın, basitrasine direnç gösterirler [2, 5, 16].

2.1.6. Virulans ve Patojenite

S. aureus konakta enfeksiyon oluştururken yapısında bulunan birçok yapısal elemanlardan, enzimlerinden ve toksinlerinden yararlanır. Bu patojenite faktörleri sayesinde fagositozdan kaçabilir, deri ve deri altına kolayca yayılabilir ve tipik apse formunu oluşturabilirler. Ayrıca toksinleri aracılığı ile farklı enfeksiyonlara da neden olurlar.

2.1.6.1. Yapısal Komponentler

Kapsüler Polisakkarit: *S. aureus* 'un özellikle mukoid türlerinde polisakkarit yapıda bir mikrokapsül vardır. Bu yapı, bakteriyi fagositozdan korur, mitojenle karşılaşmasından sonraki mononükleer hücrelerin proliferasyonunu inhibe eder ve konak hücreleri ile sentetik materyallere yapışmasını sağlar. Bugüne kadar tanımlanan 11 kapsüler serotip içinde insan enfeksiyonlarının %75'inden sorumlu olanlar tip 8 ve 5'tir [5, 24, 25].

Peptidoglikan Tabaka: Bakteri hücre duvarı; mikroorganizmaya şeklini veren, yapısal sertlik sağlayan ve dış çevre şartlarına karşı fiziksel bariyer oluşturan bir yapıdır. Hücre duvarına sertlik veren kısım peptidoglikan tabakasıdır. Bu tabaka N-asetilglukozamin ve N-asetilmüramikasitin β -1,4 bağı ile bağlanmasıyla oluşan tekrarlayan disakkarit birimlerden oluşur. Polimerdeki N-asetilmüramikasit rezidülerinin C3 karbonuna L-alanin, D-glutamin, L-lizin ve D-alanin aminoasitlerinden oluşan kısa bir tetrapeptid zinciri bağlıdır. Bu zincirdeki D-alanin rezidüsü diğer peptidoglikan zincirindeki N-asetilmüramik asite bağlı tetrapeptidin L-lizin rezidüsüne, 5 glisin aminoasitinden oluşan bir pentapeptid ile bağlanır [2, 5]. Stafilokokların peptidoglikan tabakası, makrofajların sitokin salınımını uyarır, kompleman aktivasyonuna yol açar ve trombosit agregasyonuna sebep olur. Ayrıca monositlerden interlökin-1 (IL-1) salınımını uyararak polimorfonükleer lökositlerin enfeksiyon bölgesine toplanmalarına ve sonuçta apse oluşumuna yol açarlar [26].

Teikoik Asit: Bakteri hücre duvarında bulunur, mukozalarda bulunan özgül reseptörleri (fibronektin, fibrinojen, laminin, trombospondin, elastin, kolajen, vitronektin ve sialoprotein) ile birleşerek stafilokokların enfeksiyon bölgesine yapışmasını sağlar. Teikoik asit, peptidoglikan tabakaya ya da lipofilik zincir arasından sitoplazmik membrana kovalan olarak bağlanmış, türe özgü fosfat içeren polimerlerden oluşur. Kalınlığı, bakteri türüne göre değişmekle birlikte 10–12 nm arasındadır. Teikoik asitler buldukları yere göre 2 kısma ayrılır. Bunlar; hücre duvarı ve membran teikoik asitleridir. Duvar teikoik asitlerinden N-asetil glukozamin (GlcNAc) rezidüleri içeren ve polisakkarit A olarak da adlandırılan ribitol teikoik asit

S. aureus'ta, glikozil rezidüleri içeren ve polisakkarit B olarak da adlandırılan gliserol teikoik asit ise *S. epidermidis*'te bulunur [27-29].

Protein A: *S. aureus*'un hücre duvarının dış yüzünde bulunan ve aynı zamanda dış ortama da salgılanan 42 kDa ağırlığında bir moleküldür. Bu protein IgG₃ hariç tüm insan IgG alt sınıflarının Fc bölgesine bağlanabilme yeteneğine sahiptir. İmmünglobulinlerin Fc bölgelerine bağlanan protein A, bakteriyi antikora bağlı fagositozdan ve komplemana bağlı vücut savunmasından korur [27].

2.1.6.2. Toksinler

S. aureus, beş sitolitik (membran eritici toksin) (alfa, beta, delta, gama ve Panton-Valentine lökositin), iki eksfoliyatif toksin (A ve B), 8 enterotoksin ve toksik şok sendromu toksinini (TSST-1) üretebilmektedir. Sitolitik toksinler hemolizin olarak da adlandırılmaktadır. Sitotoksinler nötrofilleri eriterek, lizozomal enzimlerinin açığa çıkmasına ve etraflarındaki dokuları haraplamalarına neden olur. Eksfoliyatif toksin A, enterotoksinler ve TSST-1 süperantijen olarak adlandırılan bir polipeptid sınıfına dahildirler. Süperantijenler makrofajlardaki MHC-2 (major histocompatibility complex 2) moleküllerine bağlanır. MHC-2 molekülleri spesifik olarak T-hücre reseptörlerinin beta alt birimine bağlanarak T-hücrelerinin proliferasyonuna ve doku hasarını başlatacak sitokinlerin salınımına neden olurlar [30].

Alfa Toksin: Eritrosit, polimorfonükleer lökosit, trombosit ve fibroblast gibi çok değişik hücrelere letal etki gösteren en önemli hemolizindir [26]. Geç logaritmik üreme safhasında hücre dışına salgılanarak hedef hücre membranı üzerinde por oluşturur, hücre dışına hızla potasyum ve diğer küçük moleküller çıkar, sodyum ve kalsiyum iyonları hücre içine girer [31]. Sonuç olarak osmotik dengesi bozulan hücre parçalanır. Alfa hemolizin ayrıca dermonekrotik etki ve nörotoksik etkiye de sahiptir. Nörotoksik etkiyi miyelin kılıflarında demiyelinizasyon oluşturarak yapar. Kanlı agarda üreyen *S. aureus* kolonilerinin çevresindeki beta hemolizden de bu toksin sorumludur [2, 5].

Beta Toksin (sfingomyelinaz C): İnsan eritrositleri, lökosit ve fibroblastları etkiler. Hemolitik aktiviteye sahip hücre dışı ortama salınan ve 35 kDa ağırlığında bir proteindir. Aktivasyonu için magnezyum ve kobalt iyonlarına gereksinimi vardır. Bu toksin sıcak-soğuk hemolizin olarak da bilinir. Eritrositler soğuğa maruz kaldığında beta toksinin hemoliz etkisinde artış görülür. Dermonekrotik etkisi bulunmaz [2]. Beta toksin aynı zamanda B grubu streptokoklar ve *Listeria monocytogenes* tarafından üretilen ve *S. aureus*'un hemolizini artırıcı etkiye sahip olan CAMP faktörle etkileşen ve sinerjik hemolize sebep olan yapıdır [5].

Gama Hemolizin ve Panton-Valentine Lökosidin: Gama hemolizin proteinleri hemolizin γ A (HlgA), hemolizin γ B (HlgB), ve hemolizin γ C (HlgC), olmak üzere üç farklı proteindir. Panton-Valentine lökosidin proteinleri ise olan LukS-P-V ve LukF-P-V olmak üzere iki farklı proteindir. HlgA, HlgC ve LukS-P-V proteinlerine, kimyasal olarak çözücü içinde yavaş ayrıştıklarından S (slow-eluting protein) proteinleri adı verilir. HlgB ve LukF-P-V proteinlerine ise çözücü içinde hızlı ayrıştıklarından F (fast-eluting protein) proteinleri adı verilir [2, 32]. Üç S proteininden her biri, iki F proteininden biri ile bağlanır. Böylece biyolojik aktiviteye sahip altı farklı çeşitte ikili kompleksler oluşur. Bu beş proteinden hiç biri tek başına hemolitik veya lökosidal aktiviteye sahip değildir. İkili kompleksler oluşturduklarında tümü lökositleri etkili bir şekilde eritirken, hemolitik aktiviteleri değişkenlik gösterir. Bu toksinler hedef hücrelerde por oluşturur ve hücre membranının başta potasyum olmak üzere katyonlara geçirgenliğini artırır ve lökosit sitoplazmasında degranülasyona yol açarak erimelerine neden olmaktadır [2, 32, 33]. Diğer por oluşturan lökosidinlerin aksine Panton-Valentine Lökosidin (PVL) eritrositleri haraplamaz, lökositler ve makrofajları etkiler. PVL geni bakteriye bir bakteriyofaj aracılığıyla geçer. Özellikle pulmoner ve deri enfeksiyonlarıyla ilişkili olduğu bulunmuştur [34].

Delta Hemolizin: Heterojen bir toksindir ve non-iyonik deterjanların içinde alt ünitelerine ayrıştır; biyolojik membranları parçalar ve adenilat siklazı aktive ederek cAMP salınımına neden olur. Bu enzimatik aktivite, stafilokoksik toksik şok sendromu ve stafilokokkal besin zehirlenmesinde rol oynar. İnsan, tavşan, koyun ve

maymun eritrositlerini eritir. Biyolojik etkinliği geniş olup, eritrosit, lökosit, makrofaj, lenfosit ve trombositleri hasara uğratan bir proteindir [2, 35]. Bu hemolizin *S. aureus* türlerinin %97sinde ve koagülaz negatif stafilokokların %50-70'inde bulunur [36].

Eksfoliyatif (epidermolitik) Toksin: Stafilokokal haşlanmış deri sendromuna yol açan toksinlerdir. Eksfoliyatif toksin A ve eksfoliyatif toksin B olmak üzere iki proteinden oluşur. Eksfoliyatif toksin A ısıya dayanıklıdır ve kromozomal kaynaklıdır. Eksfoliyatif toksin B ısıya duyarlı bir proteindir ve plazmid kaynaklıdır. Bu toksinler süperantijen özelliğindedir ve proteolitik (serin proteazlar) aktiviteye sahiptirler [2, 37]. Her iki toksinde epidermisdeki *stratum granulosum* tabakasını oluşturan hücrelerin interselüler bağlarının kopmasına ve *stratum granulosum*'un ayrılmasına neden olurlar [37]. Toksin sitoliz ya da inflamasyon yapmadığından epidermis tabakalarının gram boyamasında stafilokoklara ya da lökositlere rastlanılmaz. Bu da tanı koydurucu bir özelliktir [2, 27, 38].

TŞST-1: Toksik şok sendromu toksini-1 (TŞST-1) moleküler ağırlığı 22 kDa olan küçük bir protein olup ısıya ve proteolitik enzimlere dirençli bir ekzotoksindir ve süperantijen yapısındadır [2]. Süperantijenler, antijen sunan hücreler tarafından antijenik peptidlerin hücre içinde işlenip sunulma aşamalarına gerek duymadan MHC sınıf II reseptörlerine antijen bağlanma bölgesinin dışında, başka bir yerden bağlandıktan sonra T-hücre reseptörlerinin değişken bölgelerine bağlanarak bu hücrelerden aşırı miktarda IL-1, tümör nekroz faktör ve interferon- γ salınımına yol açarlar ve ciddi sistemik etkilere neden olurlar [2, 5]. Koagülaz negatif stafilokoklarında TŞST-1 üretebildikleri yapılan çalışmalarla gösterilmiş ve bu organizmalar tarafından oluşturulan TŞS vakaları bildirilmiştir [35].

Enterotoksinler: Isıya dirençli, 100 °C'ye 30 dakika dayanabilen, gastrik ve jejunal enzim hidrolizine dirençli, polipeptit yapısında süperantijendirler [17]. A, B, C1, C2, C3, D, E ve F olmak üzere sekiz farklı serolojik stafilokokal enterotoksin tipi tanımlanmıştır. Enterotoksin F TŞST-1 olarak adlandırılır. En sık besin zehirlenmesine yol açan toksin enterotoksin A'dır. B ise hastane enfeksiyonlarında çok karşılaşılan bir toksindir ve pseudomembranöz enterokolite neden olur [4].

Entero toksin B ve nadiren enterotoksin C menstürasyon dışı toksik şok sendromu vakalarının yaklaşık yarısından sorumludur. Diğer enterotoksinlerin prevalansı daha düşüktür [26].

2.1.6.3. Enzimler

Katalaz: Stafilokoklar (*S. saccharolyticus* ve *S. aureus subsp. anaerobius* hariç) katalaz enzimi ile hidrojen peroksiti su ve oksijene dönüştürürler. Stafilokokların streptokoklardan ayırımında kullanılır. Bakteriler, bu enzim sayesinde fagositlerin içinde toksik oksijen radikalleri tarafından öldürülmeye direnç kazanır [2, 39].

Koagülaz : *S. aureus* suşlarında iki tip koagülaz bulunur. Bunlar; fibrinojeni fibrine direkt dönüştüren bağlı koagülaz (Clumping Factor) ve bu dönüşümü serumdaki koagülaz reaktif faktör (CRF) ile yapabilen serbest koagülazdır. Serbest koagülaz protein yapısındadır ve proteolitik enzimlerle kolaylıkla inaktive edilir. Ayrıca bağlı koagülaz stafilokokların kümeleşmelerini de sağlar. Bu sayede stafilokoklar, girdikleri organizmada fibrin bir zırh ile kaplanır ve fagositoza karşı korundukları gibi aynı zamanda serumun bakterisid etkisini de önlediklerinden patojenite kazanırlar. Koagülaz enzimi lamda ve tüpte koagülaz olmak üzere 2 şekilde araştırılmaktadır. Lam deneyi ile kültür süzüntülerinde bağlı koagülaz ortaya konurken tüp deneyi ile kültür süzüntülerinde de bulunabilen serbest koagülaz tespit edilmektedir [17, 40, 41].

Hyalüronidaz (yayılma faktörü): Bu enzim *S. aureus* suşlarının %90'dan fazlasında bulunur ve antijenik özellikte olan bir enzimdir. Konak bağ dokusu matriksindeki hyalüronik asidi parçalar ve mikroorganizmanın dokudaki yayılımını artırır [42].

Fibrinolizin (Stafilokinaz): Tüm *S. aureus* suşları tarafından üretilir. Bu enzim plazmada bulunan plazminojeni aktive ederek plazmin oluşturur. Plazmin de fibrin pıhtılarını eriterek bakterinin yayılmasına neden olur [16].

Lipaz: Lipidleri hidrolize eder. Stafilocokların yağlı deride yerleşmesini sağlar [17, 43]. Stafilocokların yüzeyel dokuları invaze ederek fronkül ve karbonkül gibi enfeksiyonların oluşmasında rol oynadığı düşünülmektedir [42].

Nükleaz: Koagülaz pozitif *S. aureus*'ların %90-96'sında bulunan ısıya dirençli DNaz enzimleri endo ve ekzonükleaz aktivitesine sahip, nükleik asitleri 3'-fosfomononükleotidlere parçalayan fosfodiesterazlardır [17].

Penisilinaz (β -Laktamaz): Penisilindeki beta-laktam halkasını hidrolize ederek antimikrobiallere direnç gelişmesine neden olur. Penisilinaz plazmidler tarafından kodlanır ve suşlar arasında direncin hızla yayılmasına neden olur. Ülkemizde ve dünyada penisilinaz sentezleyen stafilocoklar son derece yaygın olup oranları %80-90'dır [43].

2.1.6.4. Slime Faktör

Slime, mikroorganizmanın konak hücreye veya yapay yüzeylere adezyonunu sağlayan bir yapıdır. Yüzeye adezyonda mikroorganizma ile yüzey arasındaki hidrofobik etkileşim ve hidrojen bağları etkilidir. Konak matriks proteinlerine bağlanmada aracılık eden ve MSCRAMM (mikrobiyal yüzey komponentini tanıyan adeziv matriks molekülleri) olarak da adlandırılan adezinler; fibronektin, fibrinojen, elastin, osteopontin ve kolajene bağlanırlar [2, 44]. Stafilocokların vücut içine yerleştirilen cihazlara yapışması ilk aşamayı oluşturmaktadır. Biyofilm tabakası oluştuğundan sonra kolonizasyon meydana gelmekte ve biyofilmden ayrılan mikroorganizmalar sepsise yol açmaktadır. Slime maddesi amorf kapsül yapısında, glikokaliks materyali olup %40 karbonhidrat, %27 protein içermektedir. Slime pozitif stafilocok suşlarının daha virülen ve antibiyotiklere daha dirençli oldukları bildirilmektedir. Slime faktör hücrel immün yanıtı baskılar, opsonizasyonu, nötrofil kemotaksisini ve nötrofil fagositozunu inhibe eder [2, 38].

2.1.7. Epidemiyoloji

Stafilocoklar doğada yaygın olarak bulunur. Cilt ve nazofarinkste bulunmalarından dolayı yayılması kolaydır ve birçok hastane kaynaklı

enfeksiyondan sorumludurlar. Stafilokoklar yüksek ısı, dezenfektanlar ve antiseptik solüsyonlara duyarlı olmasına rağmen, kuru yüzeylerde uzun süre canlılıklarını sürdürebilirler. Bu nedenle, mikroorganizmalar duyarlı kişilere direkt temas veya kontamine materyallerle bulaşabilirler [45]. Bakterinin etken olduğu hastane enfeksiyonlarında en önemli kaynak, hastalar veya hastane personelinin burun taşıyıcılığıdır. *S. aureus*; başta burun olmak üzere aksiller bölge, vajen, farinks veya yaralı deri bölgelerinde enfeksiyon oluşturmadan kolonize olabilir. Bu şekilde burun mukozası veya deride kolonize olan bakteri, küçük bir travma sonrası kana veya derin dokulara yayılır. Virülans faktörleri ile konak savunma mekanizmalarının etkilerine bağlı olarak ciddiyeti değişen sepsis veya toksik şok sendromu gibi enfeksiyonlara yol açabileceği unutulmamalıdır [27, 28].

2.1.8. Enfeksiyonları

S. aureus'un oluşturduğu enfeksiyonlar; deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, bakteriyemi ve endokarditler, organ enfeksiyonları, toksinleriyle oluşan hastalıklar olmak üzere dört grupta incelenebilir.

KNS'ler ise hastane kaynaklı enfeksiyonlarda önemli oranlarda izole edilirken, toplumdan edinilmiş enfeksiyonlarda da sık karşılaşılabilecek hale gelmiştir [21]. KNS'ler katater ve şant enfeksiyonu, protez kapak ve üriner sistem enfeksiyonu etkeni olabilmektedir.

2.1.8.1. Deri ve Yumuşak Doku Enfeksiyonları

İmpetigo: Daha çok küçük çocuklarda yüz ve ekstremitelerde görülen yüzeysel bir enfeksiyondur. Başlangıçta küçük makül tarzında iken, sonradan kırmızı bir zemin üzerinde iltihapla dolu bir vezikül gelişir. İmpetigo genellikle *S. aureus* tarafından oluşturulurken tek başına ya da *S. aureus* ile birlikte A grubu streptokokların da neden olduğu olgular tüm olguların %20'sinde rastlanır [2, 45].

Folikülit: Etken çoğunlukla *S. aureus*'tur. Kıl follikülleri ve apokrin bezlerin epidermise lokalize enfeksiyonudur. Tedavisinde lezyonun temizlenmesi, tuz kompresi ve topikal antibiyotikli ya da antifungal pomadların kullanılması yeterlidir [46].

Fronkül ve Karbonkül: Etken hemen daima *S. aureus*'tur. Fronkül kıl folliküllerinin enfeksiyonudur, ancak dermis ve subkütan dokuya da yayılım gösterir. Birden fazla komşu fronkülün birleşmesiyle karbonkül meydana gelir. Küçük fronküllerde sıcak nemli pansuman drenaj için genellikle yeterlidir. Karbonküller ve büyük fronküllerde insizyon ve drenaj gereklidir. Eğer lezyonu çevreleyen selülit veya ateş yoksa sistemik antibiyotik verilmemelidir. Karbonkül, çevresinde selülit veya ateşi olan fronkül veya yüz bölgesindeki fronküller sıklıkla antistafilokokal bir antibiyotikle (örn. floksasilin, amoksisilin-klavulanik asit veya sefaleksim) tedavi edilebilir. Daha önce hastanede yatış öyküsü olanlarda toplum kökenli metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) etken olabileceğinden dolayı trimetoprim-sülfametoksazol (TMP-SMZ) tedavi için düşünülebilir. Penisilin allerjisi olanlarda ise klindamisin, makrolid veya TMP-SMZ kullanılabilir [47, 48].

Süpüratif Hidradenit: Apokrin ter bezlerinin piyogenik enfeksiyonudur. Aksilla, perine ve genital bölgede görülür. Lezyonlar bazen kendiliğinden drene olabilir ve genellikle hipertrofik skar dokusu ile iyileşir. Tedavide topikal antimikrobiyaller ve drenaj uygulanır [27].

2.1.8.2. Organ Enfeksiyonları

Pnömoni: *S. aureus* pnömonilerinin %42'si 1 yaş altındadır. Stafilokok pnömonileri antibiyoterapi ve respiratuvar resüsitasyon tekniklerinin gelişmesine rağmen çocukluk çağı bakteriyel pnömonileri arasında en ciddi pnömoni grubudur. Bu hastalık daha çok bebek ve küçük çocuklarda görülüyorsa da bu yaş grubu ile sınırlı değildir [49]. Stafilokok sepsislerinde pulmoner tutulum %82 olarak bildirilmektedir [50]. Toplumdan edinilen pnömoniler genellikle influenza epidemilerinden sonra gözlenirler. Hastane kökenli *S. aureus* pnömonisi entübasyon yada aspirasyon sonucu meydana gelir ve %10 oranında ampiyem gelişir. Enfekte trombotik emboli yada triküspiddeki vejetasyonlara bağlı olarak hematojen yolla *S. aureus* pnömonisi gelişebilir. Tedavide semisentetik penisilinler veya glikopeptitler iki hafta süreyle kullanılmalıdır [14].

Ampiyem: Akciğer enfeksiyonlarına sekonder olarak plevral boşlukta biriken sıvı parapnömonik efüzyon olarak adlandırılır. Parapnömonik efüzyonlara sıklıkla bakteriyel ve viral pnömoniler neden olurlar ve bu efüzyonların komplike olması ile plevral boşlukta pü birikerek ampiyem ortaya çıkar [51]. Tanı plevral sıvının bakteriyolojik incelemesi ile konulur. Akciğer grafisi, bilgisayarlı tomografi ve ultrasonografi tanıda yardımcı olur. Tedavide ampiyem drene edilmeli ve antistafilokokal antibiyotikler kullanılmalıdır [14].

Osteomyelit: Akut osteomyelitin en sık nedeni *S. aureus*'dur. En sık 12 yaşın altındaki çocuklarda görülür. Yenidoğanda daha çok umbilikal enfeksiyon sonrası hematojen yayılımla özellikle alt ekstremitelerde gelişir. Erişkinlerde *S. aureus*'un hematojen yolla yayılımı sonucu vertebralarda osteomyelit ortaya çıkar. Komşuluk yoluyla oluşan osteomyelit cerrahi ve travmalar sonrası oluşur. Beta lakamazlara dirençli semisentetik penisilin ya da vankomisin ile 4 hafta tedavi edilmelidir [14].

Septik Artrit: Septik artrit, çeşitli mikroorganizmaların neden olduğu eklem enfeksiyonudur. *S. aureus*, Gram negatifler (*E. Coli* ve *K. Pneumonia*) ve grup B streptokoklar en sık etiyolojik ajanlardır [52]. Genellikle hastane kaynaklı enfeksiyonlarla ilişkilidir ve enfeksiyon ekleme en sık bakteriyemi sonucu hemotolojik inokulasyon yoluyla ulaşır [53]. Tutulan eklem şiş, sıcak ve ağrılıdır. Tanı eklem aspirasyonu ile konulur. Yayımda polimorfonükleer lökositler ve gram pozitif koklar görülür [14]. Tedavi için acil drenaj ve uzun süreli antibiyoterapi gerekir.

2.1.8.3. Toksin Aracılı Hastalıklar

Stafilokokal Haşlanmış Deri Sendromu (Ritter Hastalığı): Ritter sendromu olarak da bilinen tablo, stafilokoksik eksofoliyatif toksin A ve B'nin yol açtığı şiddetli bir enfeksiyondur. Yenidoğan ve çocuklarda, erişkinlere göre çok daha sık olarak rastlanmaktadır [54]. Hastalık büyük büller ve epidermisin geniş katlar halinde ayrılmasıyla karakterizedir. Büllerden mikroorganizma izole edilebilir. Sağlam görünen deri hafif bir sürtünme ile soyulur. Buna Nikolsky belirtisi pozitif denir.

Hızla antistafilokokal intravenöz antibiyoterapi başlanır, sıvı-elektrolit kaybı yerine konmalıdır [14, 55].

Toksik Şok Sendromu: Akut gelişen ateş, döküntü ve hipotansiyonla karakterize süperantijenlerle ilişkili şiddetli bir tablodur. Tabloya yol açan süperantijenler *S. aureus*'un toksik şok sendromu toksin-1 ve enterotoksini (B ve C) ile streptokokların pirojenik ve mitojenik toksinidir [56]. Vajinal tampon dışında vajinal enfeksiyonlar, kontraseptif araç kullanımı, düşükler, cerrahi yara enfeksiyonları ve ostemyelitler sonrasında da gelişebildiği fark edilmiştir [55]. Tedavide agresif kardiyopulmoner destek yaşamsal önem taşır. Toksin üreten odağın insizyon ve drenaj ile uzaklaştırılması gereklidir. Tedavide stafilokok ve streptokoklara etkili intravenöz antibiyoterapi seçilmelidir. İntravenöz immunglobulin (IVIG) bakteriyel süperantijenler üzerinde nötralizan etkiye sahip olup Toksik Şok Sendromu mortalitesini azaltmaktadır [57, 58].

Besin Zehirlenmeleri: Stafilokokkal besin zehirlenmeleri ısıya dayanıklı Tip A enterotoksini tarafından oluşturulur. Sorumlu gıda türü pasta, süt, krema, et, salam gibi proteinden zengin şeker veya tuz içeren besinlerdir [59]. Besin zehirlenmelerinde el ve burun taşıyıcılığı önemli rol oynar [60]. Toksinler ısıya dirençli olup kaynatmakla yada pişirmekle inaktive olmaz. İnkübasyon süresi 2-6 saattir. Akut sekresyon artışı, bulantı ve kusma, kramp tarzında karın ağrısı ve ishal görülür. Prognoz iyi olup tüm semptomlar 8 saatte düzelir. Tedavide sıvı-elektrolit kaybının yerine konulması esastır. Antibiyotik tedavisi gerekmez [14, 55].

2.1.8.4. Bakteriyemi ve Sepsis

Stafilokok kolonizasyon oranları diyabetiklerde, intravenöz ilaç bağımlılarında, HIV enfeksiyonlu olgularda, hemodiyaliz hastalarında ve cilt bütünlüğü bozulan hastalarda artar [61]. Toplumdan kazanılmış stafilokokal bakteriyemi genellikle sellülit, osteomyelit, endokardit ve pnömoni gibi bir odaktan kaynaklanırken, hastane kökenli stafilokokal bakteriyemiler daha çok kateterlerden ve diğer invaziv girişimlerden kaynaklanmaktadır. Stafilokokal bakteriyemilerin %86'dan fazlası nozokomiyal kökenlidir [55]. *S. aureus*'a bağlı bakteriyeminin

sepsis, endokardit, vaskülit ve metastatik enfeksiyonlarla komplike olabildiği bildirilmiştir [62]. Günümüzde toplum kaynaklı suşlarda da nazokomiyal suşlardaki gibi yüksek antimikrobiyal dirençlere rastlanmakta ve bu dirençli suşların neden olduğu bakteriyemiler de en az nozokomiyal suşlar kadar tehlike arz etmektedir. Hem toplum kaynaklı hem de hastane kaynaklı bakteriyemiler antimikrobiyal tedavi verilse bile yüksek mortaliteye sahiptirler [17, 55].

2.1.8.5. Endokardit

S. aureus'un etken olduğu endokarditler akut başlar, hızlı ilerler. En çok mitral kapağı tutar. Aort kapağı tutulumunda prognoz daha kötüdür. Hastaların çoğunda altta yatan başka bir kapak hastalığı yoktur. Mitral veya aort kapak tutulumlarında metastatik enfeksiyonlar çok yaygındır ve mortalite %40'lara ulaşır. İntravenöz ilaç alışkanlığı olanlar, yaşlılar, protez kapağı olanlar ve hastanede yatan hastalarda *S. aureus* endokarditi görülme olasılığı daha fazladır [4, 42].

2.1.8.6. Menenjit

Toplumdan kazanılmış bakteriyel menenjitlerin %2.4'ü *S. aureus*'a bağlıdır. Ancak mortalitesi %43'lere varır. İleri yaş, kardiyovasküler hastalıklar ve immun yetmezlik predispozan faktörlerdir. Olguların %57'sinde endokardit görülür [27].

2.1.8.7. Koagülaz negatif stafilokok enfeksiyonları

İzole edildiğinde kontaminan olarak kabul edilen koagülaz negatif stafilokokların (KNS) birçok çalışma ile ciddi oranda enfeksiyonlara neden olduğu gösterilmiştir [21]. İnsanlarda en fazla patojen olan türler *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus*'tur. Bunu *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis*, *S. hominis* ve *S. schleiferi* izlemektedir. KNS'lerin etken olduğu enfeksiyonların çoğu kateter veya yabancı cisim ile ilişkilidir. *S. epidermidis* enfeksiyonlarının büyük kısmı hastane kökenli iken *S. saprophyticus* enfeksiyonları ise genellikle toplum kaynaklıdır [55]. Protez kapak endokarditlerin ise en sık nedenidirler. Cerrahiden sonraki 2-12 ay arasında görülen protez kapak endokarditlerinin %60-80'inden *S. epidermidis* sorumludur. Diğer KNS'ler ve özellikle *S. lugdunensis*'in etken olduğu endokarditler bildirilmektedir. *S. lugdunensis* kapak destruksiyonuna yol açarak normal kapaktada

endokardit yapabilmektedir [63]. Katater ve şant enfeksiyonlarında en sık etken *S. epidermidis*'dir. Katater, şant, plastik protez gibi yabancı cisimlerin bulunduğu ortama ilgileri büyüktür. Bu cisimlerin etrafına organizma tarafından kaplanan fibronektin, fibrinojen, vitronektin gibi proteinler stafilocokların cisimlere kolayca yapışmasını sağlar. Bu şekilde biyofilm oluşturan *S. epidermidis*'ler oluşturdukları glikokaliks kapsül niteliğindeki bir maddenin içerisinde kalarak antibiyotiklerden ve organizmanın bağışıklık sisteminden korunurlar [2, 4]. Ayrıca özellikle sağlıklı kadınlarda *S. saprophyticus* komplike olmayan akut üriner sistem enfeksiyonuna yol açar [55]. Hastanede yatan hastalarda idrardan izole edilen tüm bakteriler içinde KNS'ler %5'ten daha düşük oranlardadır ve en sık etken *S. epidermidis*'dir [63].

2.1.9. Laboratuvar tanısı

Stafilokokların laboratuvarında identifikasyonu için öncelikle *Micrococcaceae* familyası içindeki *Micrococcus* cinsinden ayrılarak *Staphylococcus* cinsi içinde yer aldığı belirlenmesi gereklidir. *S. aureus*'un tür düzeyindeki identifikasyonu için koagülaz varlığı, mannitol fermantasyonu, termostabilnükleaz ve deoksiribonükleaz testleri yapılır. Buna karşın koagülaz negatif stafilocokların identifikasyonu daha komplekstir ve ticari tanımlama sistemlerini gerektirir [5].

2.1.9.1. Gram Boyama

Stafilokoklar, klinik örneklerin direkt Gram boyamasında 0,5-1,5 µm çapında, gram pozitif koklar şeklinde görülür, besiyerinden hazırlanan preparatta ise üzüm salkımı yapmış kümeler şeklinde Gram pozitif koklar görülür [2, 16].

2.1.9.2. Katalaz Testi

Stafilokok ve mikrokokları streptokok, enterokok ve streptokok benzeri bakterilerden ayırt etmede kullanılan bir testtir. Katalaz testinde temiz cam bir lam üzerine bir damla %3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2) damlatılır, taze kültürden alınan birkaç koloni ile karıştırılır. Stafilocoklardaki katalaz hidrojen peroksidi suya ve oksijene parçalar. Açığa çıkan oksijenden ötürü hızlı bir gaz çıkışı (kabarık) olur ve test pozitif olarak değerlendirilir. Test kanlı olmayan besiyerinden yapılmalıdır,

çünkü kanlı besiyerlerindeki eritrositlerde bir miktar katalaz olabilir ve yanlış pozitif sonuçlara neden olabilir [2].

2.1.9.3. Lizostafin Duyarlılık Testi

Lizostafin stafilokokları ozmotik lizise duyarlı hale getiren bir endopeptidazdır, bunu peptidoglikan tabakasındaki pentapeptit zincirlerini parçalayarak yapar. Lizostafin testinde 0.2 mL steril salin içeren tüpte hazırlanan bakteri solüsyonu üzerine 0,2 mL lizostafin eklenerek 35 °C’de 2 saat inkübe edilir. Süspansiyonun bulanıklılığının kaybolması lizostafin duyarlılığını gösterir. Lizostafine duyarlılık açısından stafilokoklar arasında farklılık vardır. Bu durum lizostafin testinin standardizasyonunu ve yorumlanmasını zorlaştırmaktadır. Disk difüzyon yöntemiyle de yapılan bu testte bakteri Mueller-Hinton agara 0.5 McFarland bulanıklılığında ekilerek 10 µg lizostafin içeren disk yerleştirilir. 24 saat 35 °C’de inkübe edilir. Stafilokok türlerinde 10-16 mm inhibisyon zonu oluşur fakat bu zon mikrokoklarda oluşmaz [2, 23].

2.1.9.4. Furazolidon Duyarlılık Testi

Kanlı agara 0.5 McFarland bulanıklılığında hazırlanmış bakteri süspansiyonundan ekilir ve ortasına 100 µg furazolidon diski konur. 35 °C’de 24 saat inkübe edilir. Stafilokoklar furazolidona duyarlıdır ve 15 mm’lik inhibisyon zonu oluşturur. Mikrokokların inhibisyon çapı ise 6-9 mm arasında değişmektedir [23].

2.1.9.5. Basitrasin Duyarlılık Testi

Bu testte 0.04 U basitrasin içeren diskler kullanılır. Stafilokoklar basitrasine dirençlidir, mikrokoklar ise basitrasin duyarlıdır [23].

2.1.9.6. Eritromisin varlığında (0.4 µg/mL) Gliserolden Asit Oluşturma Testi

Bu testte %1 gliserol, 0.4 µg/mL eritromisin ve bromkresol mavisi (indikatör) içeren agar bazlı besiyerine koloni çizgi şeklinde ekilir ve 3 gün 35 °C’de inkübe edilir. Stafilokoklar asit oluşturarak ekim çizgisi boyunca sarı renk oluşturur,

mikrokoklar asit oluşturmadığından değişmeden ekim çizgisi boyunca mor renkli kalırlar [2].

2.1.9.7. Modifiye Oksidaz Testi

Besiyerinden alınan bir koloni dimetilsülfoksit ve tetrametil parafenilendiamin dihidroklorid emdirilmiş filtre kağıdı üzerine sürülür. 30 saniye içinde mavi renk oluşması testin pozitif olduğunu gösterir. Mikrokok türleri modifiye oksidaz testi pozitif iken *S. lentus*, *S. sciuri*, *S. vitulinus* hariç tüm stafilocoklar negatiftir [2].

Tablo 1. Mikrokok ve stafilocokların ayırımında kullanılan fenotipik testler [17]

Testler	Mikrokoklar	Stafilocoklar
Lizostafin	Dirençli	Duyarlı
Furazolidon (100 µg) disk	Dirençli	Duyarlı
Basitrasin (0.04 U TaxoA disk)	Duyarlı	Dirençli
0.4 µg/mL Eritromisin varlığında gliserolden asit oluşturma	(-)	(+)
Anaerobik şartlarda glikozdan asit oluşturma	(-)	(+)
Modifiye oksidaz testi	(+)	(-)

2.1.9.8. Koagülaz Testi

S. aureus'un identifikasyonunda kullanılır. Koagülaz aktivitesinin belirlenmesi için tüp veya lam testleri kullanılabilir. Her iki test içinde EDTA'lı tavşan plazmasının kullanılması önerilmektedir. *S. aureus*'un dışındaki bazı bakteriler (*P. aeruginosa*, *S. marcescens* ve bazı enterokoklar) sitratı metabolize ederek plazmayı pıhtılaştırıp yanlış pozitif sonuç verir. Hücre dışına salınan koagülaz plazmadaki koagülaz reaktif faktör (CRF) adı verilen globülin benzeri bir proteinle bağlanır. Bu kompleks plazmada bulunan fibrinojeni pıhtılaştırır. İnsan plazması farklı miktarda CRF ve antistafilocokal antikor içerdiğinden koagülaz testinde insan plazması kullanılmamalıdır. Ayrıca antikoagülan olarak sitrat içeren plazmalar da bu test için kullanılamaz [5, 16].

Lam Koagülaz Testi: Hücre duvarında bulunan bağlı koagülaz veya kümeleşme faktörü (“clumping” factor) plazmada bulunan CRF’ye gerek duymaz. Bu faktör fibrinojen ile direkt reaksiyona girerek plazmayı pıhtılaştırır. Bu test için temiz bir lama bir damla saf su damlatılır. Kuşkulu stafilokok kolonilerinden öze ile alınarak bu damlayla karıştırılıp homojen süspansiyon elde edilir. Bu damlanın üzerine EDTA’lı tavşan plazması damlatılır ve elde çevirme hareketleri yaparak karıştırılır. Pozitif sonuçlarda 10-30 saniye sonra stafilokokların birbirine yapışmasına bağlı kümeleşme oluşur. Yüksek tuz oranı otoaglutinasyona yol açabileceğinden mannitol salt agar gibi besiyerlerindeki kolonilerden çalışılmamalıdır. Lam koagülaz negatif olan suşlar tüp koagülazla doğrulanmalıdır. *S. schleiferi* ve *S. lugdunensis* gibi bazı koagülaz negatif türlerde var olan “clumping” faktör nedeniyle test pozitif bulunabilir [2].

Tüp Koagülaz Testi: Bu yöntemde hücre dışına salınan serbest koagülaz, plazmada bulunan globülin yapısındaki CRF ile birleşerek trombine benzer yapıdaki stafilotrombini oluşturur. Stafilotrombinde fibrinojeni fibrine dönüştürerek plazmayı pıhtılaştırır. Bu test için steril bir tüp içine fizyolojik tuzlu su ile 1:5 oranında sulandırılmış EDTA’lı tavşan plazmasından 1 mL konulur, birkaç koloni öze ile alınıp plazma içerisinde ezilir. 35 °C’de 4 saat bekletilerek pıhtı oluşup oluşmadığına bakılır. Eğer pıhtı oluşmazsa 1 gece oda ısısında bekletilir. Bazı koagülaz negatif stafilokoklar (*S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. delphini*, *S. schleiferi sp. schleiferi*) da pozitif reaksiyon verebilir. *S. aureus* hem lam koagülaz, hem de tüp koagülaz pozitifdir [2, 5].

2.1.9.9. Mannitol Fermantasyonu

S. aureus ve koagülaz negatif stafilokokların ayrımında kullanılır. Bu test *S. aureus* kolonilerinde pozitifdir. Mannitol fermantasyon testinde %1 mannitol, %7.5 NaCl, pepton ve fenol kırmızısı içeren mannitol tuz agar kullanılır. *S. aureus* kolonileri mannitolü fermente ederek koloni çevresinde sarı bir zon oluşturur. Mannitol pozitif koloniler kanlı agara ekim yapıldıktan sonra koagülaz testi yapılmalıdır [2].

2.1.9.10. Deoksiribonükleaz Testi

Koagülaz testinde şüpheli reaksiyon veren stafilocokların incelenmesi için koagülaz sonuçlarını desteklemek için kullanılır. *S. aureus* nükleik asitleri hidrolize eden DNaz ve ısıya dirençli bir endonükleaz enzimine sahiptir. DNA içeren DNase agara koloni ekilir ve 35 °C’de 24 saat inkübe edilir. DNase enzimini içeren *S. aureus* besiyerindeki DNA’yı parçalayacaktır. Besiyerinde oluşan kolonilerin üzerine 1 N HCl ile eklendiğinde asit DNA’yı çökelteceğinden *S. aureus* kolonisinin etrafında şeffaf bir bölge oluşur, diğer bölgelerde DNA mevcut olduğundan bu alanlar bulanık görülür. DNase testinde pozitifliği daha iyi görmek için besiyerine toluidin mavisi eklenir. DNase pozitif kolonilerin etrafında pembe renkli bir hale görülür [2].

2.1.9.11. Termostabil Endonükleaz Testi

Bu testte standart bir lam üzerine 3 ml toluidin mavisi DNA agar ilave edilir. Agar katılaştıktan sonra 2 mm çapında kuyucuklar açılır. Açılan 10-12 kuyucuğa su banyosunda 15 dakika bekletilmiş örneklerden 0,01 ml ilave edilir ve nemli ortamda 35 °C’de 4 saat inkübe edilir. Sonrasında toluidin mavisi içeren agarda DNA’nın parçalanmasıyla açığa çıkan oligonükleotidler nedeniyle kuyucukların etrafında pembe ya da mor bir zon oluşması pozitif olarak değerlendirilir [2].

Tablo 2. En sık enfeksiyon etkeni stafilocok türlerinin ayırımı [17]

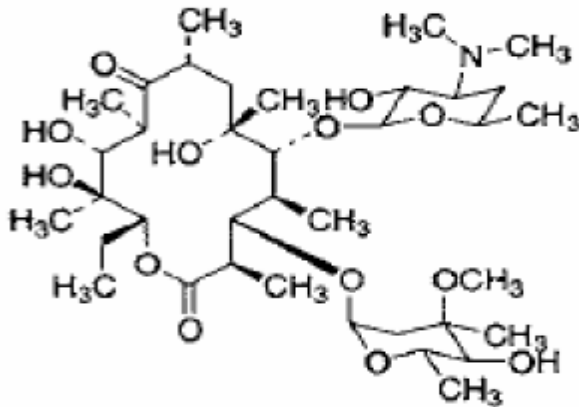
Test	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. saprophyticus</i>
Koagülaz	+	-	-
Mannitol fermantasyonu	+	-	+
DNaz	+	-	-
Anaerob ortamda üreyebilme	+	+	-
Novobiyosin direnci	-	-	+
Hemoliz	+	+/-	-

2.2.Makrolidler

Filipinler’de topraktan izole edilen bir *Saccharopolyspora erythraea* (orijinal adı *Streptomyces erythreus*) suşundan 1952 yılında elde edilen eritromisin, makrolidlerin ilk üyesidir [64, 65]. Eritromisin, hala bazı enfeksiyonlarda primer tedavide kullanılmakta ve bazen penisilin G ve diğer antibiyotiklere alternatif olmaktadır [64]. Ancak, emilim oranlarındaki değişiklik, kısa yarı ömrü, gastrointestinal yan etkiler ve artan direnç sorunu gibi klinik pratikte yaşanan dezavantajlar yeni arayışlara neden olmuştur [66].

2.2.1.Yapısı

Homojen bir antibiyotik grubu olan makrolidlerin ana yapısı makrosiklik lakton halkası ile buna eklenmiş desosamin ve kladinöz şekerlerinden oluşmaktadır. Lakton halkası üzerinde hidroksil, alkil, keton ve aldehid grupları bulunur. İçerdikleri lakton halkası sayısına göre makrolidler sınıflandırıldığında 14 üyeli (eritromisin, roksitromisin, klaritromisin, diritromisin, fluritromisin), 15 üyeli (azitromisin), 16 üyeli (spiramisin, josamisin, midekamisin, rokitamisin, miokamisin) gruplara ayrılmaktadır [67-69]. Eritromisinin moleküler yapısı Şekil 2.3’te gösterilmiştir.



Şekil 1. Eritromisinin kimyasal yapısı

2.2.2. Etki mekanizması

Makrolidler bakteriyel protein sentezini geri dönüşümlü olarak inhibe eden bakteriyostatik özellikte bir antibiyotik grubudur [10]. Bakteri 70S bakteriyel ribozomun 50S alt ünitesinin 23S rRNA birimine bağlanıp peptidil-tRNA translokasyonunu engelleyerek peptid zincirinin uzamasını durdururlar [70]. Makrolidler yüksek intrasellüler konsantrasyona erişip intrasellüler patojenlerin tedavisinde yararlı sonuçlar vermektedir [71, 72]. Eritromisin, halen oldukça yararlı bir antibiyotik olmasına rağmen, özellikle gastrointestinal irritasyon, sınırlı etki spektrumu, gastrik asit insitabilitesi, uygunsuz doz, az veya orta absorpsiyon ve doku penetrasyonu ve nispeten kısa yarı ömür gibi dezavantajlarından dolayı yerini azitromisin ve klaritromisin gibi yeni makrolid antibiyotiklere bırakmaktadır [64, 72].

2.2.3. Antimikrobiyal Aktivitesi

Enterobacteriaceae grubu ile *Pseudomonas aeruginosa*'ya etkili olmayan makrolid grubu antibiyotikler birçok Gram pozitif mikroorganizmaya ve bazı Gram negatiflere etkili olmaktadır. Makrolidlerin etkili oldukları mikroorganizmalar gözden geçirildiğinde penisiline duyarlı *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus viridans*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Moraxella catarrhalis*, *Bordetella pertussis*, *Legionella pneumophila*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Campylobacter jejuni*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Ureaplasma urealyticum*, *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi*, *Mycobacterium avium* ve bazı Rickettsia suşları dikkat çekmektedir. Metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus* suşlarının çoğu eritromisine duyarlı bulunmakla birlikte, tedavi sırasında direnç gelişme riski yüksektir [73, 74].

Gram pozitif bakterilere eritromisinin etkinliğinin en az iki katı oranında klaritromisin ve azitromisin etkinliği söz konusudur. Klaritromisin ek olarak *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium leprae*, *Toxoplasma gondii* ve *Babesia microti* üzerine etkilidir. *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *B. pertussis*, *N. gonorrhoeae*, *Campylobacter*, *Brucella melitensis*,

Gardnerella vaginalis, *Yersinia enterocolitica*, *Plasmodium* türleri azitromisinin daha fazla etkili olduğu mikroorganizmalardır [69, 75]. Sipiramisin *Toxoplasma gondii* tedavisinde kullanılan en etkili makroliddir [70].

2.2.4. Farmakokinetik Özellikleri

Eritromisindeki yapısal değişikliklerle elde edilen yeni makrolidler ve ketolidler sayesinde farmakokinetik özelliklerde iyileştirme elde edilmiştir. Tüm makrolidler alındıktan sonra enterohepatik dolaşıma girmektedir. Eritromisin karaciğerde konsantre olup, demetilasyonla kısmi olarak inaktive olur. İlacın belli bir bölümü safra ile atıldığından gaitada yüksek düzeylerde bulunur. Tüm vücuda dağılan eritromisin dokulara iyi nüfuz eder. Hücre içine kolayca girerek hücre içindeki bakterilere de etki eder. Bu sebeple hücre içine yerleşen mikroorganizmaların tedavisinde önemli bir yer tutmaktadır. Santral sinir sistemi ve beyin omur ilik sıvısı (BOS) içine inflamasyon halinde bile yeterli derecede geçemez. Anne sütüne ve plasentayı geçer ve gebelerde güvenle kullanılabilir. Klaritromisin ve azitromisinin aside dayanıklılığı daha fazladır ve oral biyoyararlanımı eritromisine göre daha iyidir [10, 76]. Klaritromisinin doku konsantrasyonu serum konsantrasyonundan 2-20 kat, azitromisinin 10-100 kat daha fazladır [77]. Eritromisin, klaritromisin ve diritromisin karaciğerde metabolize edilerek safraya salgılanır. Azitromisinin ise büyük kısmı safrayla değişmeden itrah edilir [70].

2.2.5. Klinik Kullanımı

Eritromisin birçok enfeksiyonda (*M. pneumoniae* pnömonisi, *Legionella* pnömonisi, difteri, boğmaca, *C. trachomatis* enfeksiyonları, diğer klamidyal enfeksiyonlar, eritrazma, basiller anjiomatosis) ilk seçenek olduğu gibi penisilin G'ye alternatif ilaç olarak da kullanılmaktadır [64, 69].

Azitromisin *H. influenzae* ve *S. pneumoniae*'nin etken olduğu pnömonilerde, *M. catarrhalis*'in neden olduğu KOAH'ın akut alevlenmelerinde, streptokokal farenjitte, *S. pyogenes* ve *S. agalactiae*'nin neden olduğu deri enfeksiyonları ve klamidyal üretrit ve servisitte kullanılır. Azitromisinin ayrıca, klamidyanın (*C. trachomatis* ve *C. pneumoniae*) neden olduğu respiratuvar enfeksiyonlarda, *Mycoplasma* ve *H. pylori*'nin neden olduğu enfeksiyonlarda da etkili olduğu

gösterilmiştir. Cinsel yolla bulaşan *Haemophilus ducreyi*, *Treponema pallidum*, *Ureoplasma*, *G.vaginalis* ve gastrointestinal sistemde *Shigella*, *Salmonella* ve *Campylobacter* türlerinin neden olduğu enfeksiyonlarda da etkindir. Ayrıca azitromisin, *Mycobacterium avium complex*, *Cryptosporidium*, *Toxoplasma*, basiller anjiomatosisine neden olan visseral ve kutanöz lezyonlar gibi, daha az görülen enfeksiyonlara karşı ümit verici klinik etkinlik göstermiştir [64, 68, 78-80].

Klaritromisin, streptokokal farenjit, *S. pneumoniae*, *S. viridans*, *S. pyogenes*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*'in neden olduğu enfeksiyonlarda (maksiller sinüzit, KOAH'ın akut alevlenmesi gibi), duyarlı stafilokokların veya *S. pyogenes*'in neden olduğu deri enfeksiyonlarında kullanımı söz konusudur. Ayrıca; toplum kökenli pnömonide, *Legionella* pnömonisinde, *Toxoplasma* ve *H. pylori* enfeksiyonlarında da kullanılmaktadır. *M. leprae*'ye karşı bakterisidal etkili olduğu laboratuvar ve klinik olarak gösterilmiştir. AIDS'li hastalarda *M. avium*'un neden olduğu enfeksiyonlarda klaritromisin kullanımının tedavi ve profilakside oldukça etkin olduğu gösterilmiştir [64, 81, 82].

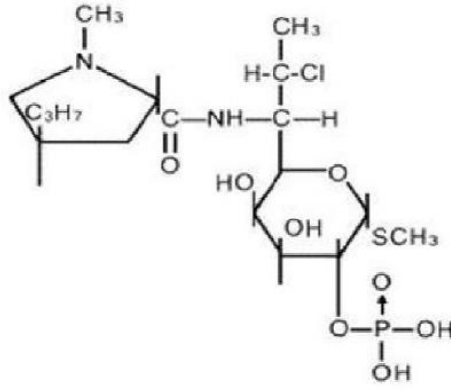
2.3. Linkozamidler

Linkozamidler 1962 yılında *Streptomyces lincolnensis*'ten elde edilmiştir. Linkomisin bu ailenin ilk üyesidir, daha sonra yarısentetik türevi klindamisin üretilmiştir. Penisilin alerjisi olan kişilerin penisiline duyarlı enfeksiyonları ile özellikle kemik ve eklemlerdeki stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılırlar. Gram pozitif bakterilerin çoğuna, anaeroplara ve bazı protozoonlara etkili olan klindamisin yan etkileri makrolidler gibi hafif olsa da bazen pseudomembranöz enterokolit gelişebileceği unutulmamalıdır [83].

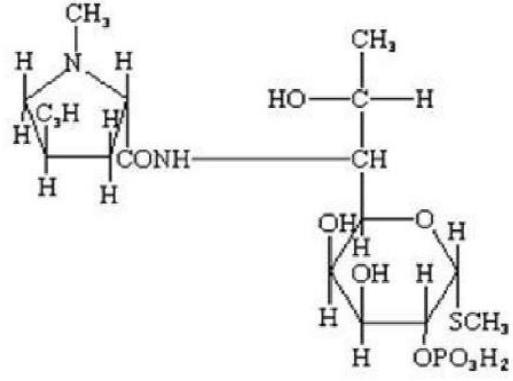
2.3.1. Yapısı

Linkomisin, kimyasal yapı olarak prolin amino asidi ile kükürtlü amino oktoz molekülünün oluşturduğu bir amiddir. Klindamisin linkomisin molekülünde 7. karbondaki hidroksil grubu yerine klor atomunun yerleşmesiyle elde edilen yarı sentetik bir antibiyotiktir. Bu yapısal değişiklik bazı farklılıklara yol açar. Klindamisin suda ve etanolde çözünür. Klindamisin hidroklorid nötral pH'da zayıf çözünür ve aşırı iritandır olduğundan parenteral kullanılmaz. Klindamisin fosfat

parenteral kullanıma uygundur ve inaktif klindamisin fosfat hidroliz edildikten sonra serbest klindamisine dönüşerek etkinlik kazanır [76, 83].



Şekil 2. Klindamisinin kimyasal yapısı



Şekil 3. Linkomisinin kimyasal yapısı

2.3.2. Etki mekanizması

Linkozamidler bakteri ribozomunun 50S alt birimine bağlanır ve peptidiltransferaz enzimini inhibe ederek protein sentezini önler [76, 83]. Linkozamidler, makrolidler ve kloramfenikolün bağlanma bölgeleri birbirine çok yakın ve örtüşür durumda olduğu için 50S ribozomal bağlanma bölgesi için yarışıp birbirlerinin antibakteriyel etkinliklerini bloke ederler. Bu yüzden birlikte kullanılmamaları gerekir. Linkozamidler ilaç dozuna, mikroorganizmanın türüne ve üreme özelliklerine göre bakteriyostatik veya bakterisid etki gösterir [64, 72]

2.3.3. Antimikrobiyal Aktivitesi

Etki spektrumları içinde *S.pneumoniae*, *S.viridans*, *S.pyogenes*, *S.aureus*, *B.fragilis*, *Fusobacterium spp.*, *Actinomyces*, *Propionibacterium*, *Eubacterium*, *Peptococcus spp.*, *Peptostreptococcus*, *Prevotella*, *Prophyromonas*, *C. perfringes*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Bacillus anthracis*, *B. cereus* ve *Nocardia spp.* vardır. Klindamisinin antibakteriyel aktivitesi linkomisinden daha iyidir. Stafilokok, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* ve viridans streptokoklara etkinliği eritromisinden iyidir. Klindamisin *B.fragilis*'e en etkin antibiyotiklerden biridir [64, 73, 76]. Metisiline dirençli stafilokoklar ile hastane kökenli stafilokoklar için %12-34'lük direnç

bildirilmektedir. Bu nedenle stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde klindamisin kullanılacaksa mutlaka duyarlılık testleri yapılmalıdır [70, 83].

2.3.4. Farmakokinetik Özellikleri

Linkozamidler dokulara ve vücut sıvılarına iyi dağılırlar. Menenjit varlığında bile beyin omurilik sıvısına geçişlerinin yetersizliği bir sorundur. Klindamisin polimorfonükleer lökositler ve makrofajlar içinde yüksek konsantrasyona ulaşır. Klindamisin idrar ve safra ile atılır. Hafif ve orta derecede böbrek yetmezliği olanlarda doz ayarlamasına gereksinim yokken, ağır böbrek ve karaciğer yetmezliğinde doz ayarlanmalıdır [64, 84].

2.3.5. Klinik Kullanımı

Klinik kullanımda linkozamidler ilk seçenek olarak anaerop enfeksiyonlarda tercih edilmektedir. Menenjit dışındaki tüm *B. fragilis* ve penisiline dirençli anaerop enfeksiyonlarda klindamisin tercih edilebilir [85]. Anaerobik akciğer enfeksiyonlarında, özellikle beta-laktam antibiyotiklere karşı allerjik olan hastalarda klindamisin iyi bir seçenektir. Karın ve barsağın penetran yaralanmaları sonrası gelişen karın içi enfeksiyonlarda, jinekolojik pelvik enfeksiyonlarda ve aspirasyon pnömonilerinde aminoglikozitler veya sefalosporinler ile kombine edilir.

Stafilokok ve streptokokların deri ve üst solunum yolu enfeksiyonlarında klindamisin seçilebilecek alternatif ilaçtır. Polimikrobik diyabetik ayak veya dekübitus ülser enfeksiyonlarında kombine edilir. Kemiğe penetrasyonu çok iyi olduğu için özellikle stafilokoksik osteomyelit tedavisinde tercih edilir.

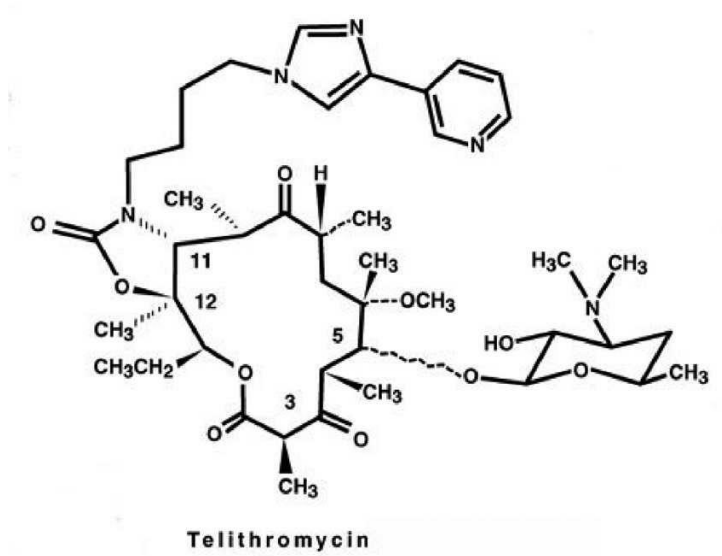
Kalp kapak hastalarında, diş çekim ve tedavisi işlemleri öncesinde profilakside kullanılabilir. Bakteriyel vaginosis tedavisinde klindamisin oral veya vaginal formları kullanılır. Akne vulgaris ve akne rozacea'da topikal klindamisin solüsyonları kullanılabilir. Klindamisin, toksoplazmozda primetaminle, *P. jiroveci* pnömonisinde primakinle, *P. falciparum* sıtması ve babesyozda kininle kombine edilerek kullanılır [64].

2.4.Ketolidler

Telitromisin klinik kullanıma giren ilk ketolid grubu antibiyotiktir. Telitromisin bir eritromisin derivativesi olmasına rağmen makrolidlerden belirgin derecede farklıdır [86].

2.4.1. Yapısı

Ketolid grubu antibiyotikler yapısal olarak 14 üyeli makrolidlere benzemektedirler. Ketolidler L-cladinose şekeri yerine 3-keto grubu içermektedir ve 6. pozisyonlarında hidroksi grubu yerine methoksi grubu taşırlar. Telitromisin ayrıca C11/C12 pozisyonunda siklik karbamat yan zinciri içermektedir [87, 88].



Şekil 4. Telitromisinin kimyasal yapısı

2.4.2. Etki mekanizması

Telitromisin bakteri 50S ribozomlarının 23S rRNA altünitesine bağlanarak protein sentezinin translasyon elongasyon basamağını inhibe eder. 23S rRNA 5 domainden oluşmaktadır. Hem makrolidler hem de telitromisin II ve V numaralı domaine bağlanırlar ancak telitromisin daha sıkı bağlanır. Sıkı tutunmayı C11/12 pozisyonundaki farklılıklar sağlamaktadır. Dirençli kökenler domain V'in yapısında

değişiklik yaparak makrolidlere direnç kazanırlar. Öte yandan telitromisin domain II'ye daha sıkı tutunduğu için domain V'deki değişikliklerin üstesinden gelebilmektedir. Bunun yanı sıra telitromisin ribozomların 50S ve 30S altbirimlerinin oluşumunu da bloke edebilmektedir [86, 89].

2.4.3. Antimikrobiyal Aktivitesi

Solunum yolları enfeksiyonlarının başta gelen etkeni olan *S. pneumoniae*'ye etkisi birçok in vitro çalışmada gösterilmiştir. Telitromisin; makrolidlere, kinolonlara ve B-laktamlara göre *S. pneumoniae*'ye etkisi 4–8 kat daha fazladır. Tonsillofarenjitin başlıca bakteriyel etkeni olan *S. pyogenes*'e karşı telitromisin birçok çalışmada etkin bulunmuştur [86]. Genel olarak telitromisin MSSA suşlarına etkili bulunurken, MRSA suşlarına etkisiz bulunmaktadır. Telitromisin enterokok etkinliği sınırlıdır [90].

Viridans grubu streptokoklar, *Listeria monocytogenes* ve çeşitli difteroid bakterilere etkili bulunmuştur. Telitromisin *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*, *Vibrio spp.*, *Campylobacter jejuni*, *Pleisomonas shigelloides* ve *Aeromonas hydrophilia* gibi çeşitli Gram negatif bakterilere etkisizdir. Öte yandan önemli solunum yolları patojenleri olan *Moraxella catarrhalis* ve *Haemophilus influenzae*'ye etkilidir. Telitromisin *L. pneumophila*'ya karşı in vitro oldukça etkili bulunmuştur. *C.pneumoniae*'ye karşı telitromisin bakterisidal bulunurken, azitromisin ve eritromisinden daha etkilidir [86]. Telitromisin, *Neisseria gonorrhoeae* ve *Ureaplasma urealyticum* suşlarına karşı oldukça etkili bulunmuştur [91].

2.4.4. Farmakokinetik Özellikleri

Telitromisin vücuda alındıktan sonra karaciğer ve gastrointestinal sistem tarafından metabolize edilir. Biyoyararlanım oranı yaklaşık %57'dir. Telitromisin %60–70 oranında serum proteinlerine bağlanır. Özellikle bronkopulmoner dokular, alveolar makrofajlarda çok yüksek konsantrasyonlara ulaşabilmektedir. Telitromisin post-antibiyotik etkisi diğer makrolidlere eşit yada daha fazla bulunmuştur [86].

2.4.5. Klinik Kullanımı

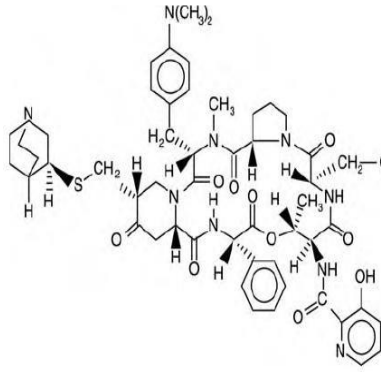
Telitromisin önemli solunum yolları patojenleri olan *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *S. pyogenes* için düşük MİK değerleri ve aynı zamanda yüksek solunum sistemi konsantrasyonlarına sahip olması nedeniyle solunum sistemi enfeksiyonları için uygun bir antibiyotiktir. Atipik pnömoni etkenleri *C. pneumoniae*, *L. pneumophila* ve *M. pneumoniae*'ye karşı etkilidir. Telitromisin toplum kökenli pnömoniler, akut maksiller sinüzit, farenjit-tonsilittlerde ve kronik bronşitin akut alevlenmelerinde kullanılabilir [86].

2.5 Streptograminler

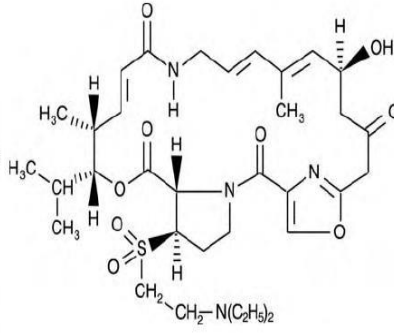
Streptograminler, *Streptomyces* spp'den izole edilen; Makrolid-Linkozamid-Streptogramin (MLS) ailesi içinde yer alan semi-sentetik antibiyotik grubudur. Sinerjik olarak çalışan ikili antibiyotiklerden oluşmaktadır. Bu çiftler Streptogramin A ve B, Pristinamisin I ve II, Virginamycin M ve S dir [92].

2.5.1. Yapısı

Streptograminler, *Streptomyces pristinaespiralis*'ten izole edilen; pristinomisin, oestreomisin, mikamisin ve virginamycin'in dahil olduğu aileye bağlıdır. Bu aile grup A ve grup B olarak iki moleküler yapıya bölünmüştür [93, 94]. Dalfoprustin grup A, kinopristin grup B streptogramindir [95]. Kinopristin/dalfoprustin (Q/D) kombinasyonuna FDA tarafından Eylül 1999'da kullanım onayı verilmiştir [93]. Her ikisi de suda çözünen bu bileşiklerin %30 kinopristin - %70 dalfoprustin (30:70, Q/D) şeklindeki kombine preparatı, intravenöz formuyla klinik kullanımda bulunmaktadır [94].



Şekil 5. Kinopristin kimyasal yapısı



Şekil 6. Dalfopristin kimyasal yapısı

2.5.2. Etki mekanizması

Q/D bakterilerde ribozomların 50S alt birimine irreversibl olarak bağlanarak protein sentezini inhibe eder. Dalfopristin aminoaçil-tRNA molekülünün ribozoma bağlanmasını engelleyerek, uzayan peptid zincirine yeni aminoasitlerin bağlanmasını önler. Protein sentezinin erken basamağına etkili olur. Kinopristin, protein sentezinin daha geç dönemine etki eder. Peptid uzamasını önler ve tamamlanmayan peptid zincirlerinin oluşmasına neden olur. Dalfopristin ribozomda değişikliğe neden olur ve kinopristinin ribozoma bağlanmasını kolaylaştırır. Tek başına oldukça sınırlı bir antibakteriyel etkisi olan bu bileşikler birlikte sinerjistik etki oluşturmaları nedeniyle diğer protein sentezi inhibitörlerinin aksine bakterisidal etkinlik gösterirler [96, 97].

2.5.3. Antimikrobiyal Aktivitesi

Q/D başlıca Gram pozitif bakterilere etkinlik göstermektedir. Gram pozitif bakterilerin çoğuna bakterisidal etki gösterirken enterokoklara karşı bakteriyostatik etkiye sahiptir. Vankomisine duyarlı ve dirençli *E. faecium*, *S. aureus* (MSSA, MRSA), koagulaz-negatif stafilokoklar (KNS), *S. pneumoniae* (penisilin ve eritromisine dirençli kökenler dahil), A grubu beta-hemolitik streptokok (AGBHS)'lar, viridans streptokoklar, *S. agalactiae* ve *Corynebacterium jeikeium*, *Listeria monocytogenes* etki spektrumu içindedir. Buna karşın *E. faecalis* kökenleri Q/D'ye dirençlidir. Bu nedenle enterokok enfeksiyonlarında kullanılmadan önce mutlaka tür tayini yapılması gerekir. MRSA ve MSSA etkinliği arasında önemli bir

farklılık yoktur. Ayrıca grup C ve G streptokoklar ve *Leuconostoc* türleri orta derecede duyarlıdırlar.

Aerob Gram negatif bakterilerden *Moraxella catarrhalis* ve *Legionella pneumophila*'ya, atipik bakterilerden *Mycoplasma pneumoniae* ve *Chlamydia pneumoniae*'ye etkilidir. *H. influenzae*'ya etkinliği daha düşüktür. Anaerob mikroorganizmalardan *Bacteroides* türleri, *Prevotella* türleri, *Fusobacterium* türleri ve *Clostridium difficile*'e in-vitro etkinliği iyi değildir. *Enterobacteriaceae* ailesi ile *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter* türleri gibi nonfermentatif Gram negatif bakteriler Q/D'ye doğal olarak dirençlidir [95, 96].

2.5.4. Farmakokinetik Özellikleri

Serum yarılanma ömrü ortalama 1.2 saattir. Proteinlere bağlanma oranı kinopristin için %23-32, dalfopiristin için %50-56'dır. Gram pozitif bakterilere karşı post-antibiyotik etkiye sahiptir [96]. Q/D karaciğerde sitokrom p-450 enzim sistemi yoluyla metabolize olur. Kinopristinin iki, dalfopiristin bir aktif metaboliti vardır [98]. İlaç ve metabolitleri; %75 oranında fekal yolla, %15-19 oranında değişmeden idrar ile atılmaktadır [99]. Karaciğer ve böbrek yetmezliğinde bazı farmakokinetik özelliklerinde değişimler saptanmakla beraber doz ayarlaması gerekmediği bildirilmektedir. Q/D hücre içinde yüksek konsantrasyonlara ulaşabilmektedir. Beyin-omurilik sıvısına geçişi çok iyi değildir [96].

2.5.5. Klinik Kullanım

FDA Q/D kombinasyonunu MSSA ve *S. pyogenes*'in neden olduğu komplike deri-yumuşak doku enfeksiyonları ve yaşamı tehdit eden VRE enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmasını önermektedir. Yapılan çalışmalarda Gram-pozitif etkenler ile oluşan; bakteriyemiler, kateter ilişkili enfeksiyonlar, Vankomisine dirençli *E. faecium* enfeksiyonları, komplike olsun veya olmasın deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, nozokomiyal pnömonilerde, kanser hastalarında çoğul ilaç direnci olan Gram-pozitif bakteriler ile oluşan bakteriyemilerin tedavisinde etkin bulunmuştur [99]. Kateter ile ilişkili *S. aureus* ve *S. epidermidis* enfeksiyonlarında vankomisin ile yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda benzer etkinlik oranları

bildirilmiştir. Bu nedenle stafilokokal bakteriyemisi olan ve vankomisini tolere edemeyen hastalarda Q/D kullanımı önerilebilir [96].

2.6. Makrolid, Linkozamid ve Streptogromin Antibiyotiklerine Karşı Direnç Mekanizmaları

Stafilokoklarda MLS antibiyotiklerine karşı direnç gelişiminde 23S rRNA'nın metilasyonu ile hedef bölge değişikliği, aktif eflüks pompa sistemiyle antibiyotiklerin dışarı atılması ve enzimatik olarak antibiyotiklerin direkt inaktivasyonu olmak üzere üç farklı direnç mekanizması tanımlanmıştır [100, 101].

2.6.1. Hedef Bölge Değişikliği

MLS_B grubu antibiyotiklerde en sık görülen ve en önemli direnç mekanizması hedef bölge değişikliğidir. 23S rRNA'daki hedef bölge değişikliğine bağlı direnç meydana gelir. 23S rRNA'nın sekonder yapısı incelendiğinde beş domain görülür. 'Domain 5' MLS_B direncinde önemlidir. Hedef bölge değişikliği iki yolla olur. Birincisi, streptokoklar ve stafilokoklarda en yaygın görülen mekanizma olan eritromisin ribozomal metilaz (*erm*) proteinleri ile, 23S rRNA'daki 'domain 5' in posttranskripsiyonel modifikasyonu; ikincisi ise streptokoklarda görülmeye başlanan 'domain 5'te mutasyona bağlı gerçekleşir [9, 89].

Ribozomal metilasyon; MLS grubu antibiyotiklerin ribozoma bağlanmasında esas rol alan bölge domain 5'teki A 2058 rezidüsüdür. Bu bölgenin metilasyonu sonucu hedefe bağlanma bozulmaktadır [102]. Gram negatif bakterilerden *E.coli*, *Haemophilus influenza*, gram pozitif bakterilerden *Streptococcus pneumoniae*, *Corynebacterium spp*'nin içinde yer aldığı geniş bir bakteri grubunda farklı *erm* genleri izole edilmiştir. Ayrıca çeşitli gram pozitif ve gram negatif anaerob bakterilerde, spiroketlerden *Borellia burgdorferi* ve *Treponema denticola*'da *erm* genleri tespit edilmiştir. Bütün *erm* genleri aynı adenin rezidüsünün metilasyonuna neden olan enzimleri kodlayarak MLS_B fenotipindeki direncin oluşumuna yol açar [103]. Patojen bakterilerde görülen dört önemli gen sınıfı; *ermA*, *ermB*, *ermC*, ve *ermF*'dir. *ermA* ve *ermC* genleri stafilokoklarda sık görülürken *ermB* geni nadir görülür. *ermF* geni *Bacteroides* türleri ve anaeroplarda yaygındır. Streptokoklar ve enterekoklarda ise *ermB* geni yaygın olarak bulunur [8, 89]. Patojen

bakterilerdeki direnç genleri plazmidler ya da transpozonlarla aktarılır [104]. *ermA* geni ilk Winsconson'da izole edilen *S. aureus* 1206 geninde saptanmıştır. Tn554 transpozonunda bulunan gen *S. aureus* kromozomundaki tek bir spesifik bölgeye girme eğilimindedir (primer insersiyon alanı). *ermA* genini içeren Tn554 transpozonu, tobramisin direncinden sorumlu olan pub110 plazmidini içeren IS431 insersiyon dizisi ile birlikte stafilokokal genomun mec bölgesinde yer alır ve eritromisin direncini kodlar. *ermB* geni ise, 28 kb'lık bir penisilinaz plazmidini olan pl2582'nin bir parçası olarak Tn551 transpozonunda bulunur. *ermC* geni ise 3,7-kb'lık bir plazmid olan pE194'de bulunmuştur [104-106].

MLS_B tipi dirençte rol alan *erm* geninin ekspresyonu yapısal veya indüklenebilir olarak iki şekilde görülür. Yapısal dirençte metilaz mRNA tarafından aktif olarak üretilmekte ve yapısal dirence sahip olan suşlar, 14, 15, 16 karbonlu tüm makrolitlere, linkozamidlere, ketolidlere ve streptogramin B'ye dirençlidir [92].

iMLS_B direnci olan bakteri metilaz kodlama yeteneğini kaybetmiş inaktif mRNA üretir. Bu mRNA ancak indükleyici makrolitlerin varlığında aktifleşebilir. İndüklenebilir *erm* geni taşıyan suşlar indükleyici olan 14 ve 15 üyeli makrolitlere dirençli, indükleyici olmayan 16 üyeli makrolitlere, streptogramin B, linkozamid ve ketolidlere duyarlıdır. *erm* genlerinin yapısına bağlı olarak indüklenebilir direnç farklı fenotiplerle karşımıza çıkarken, yapısal direnç MLS_B grubu antibiyotiklere yüksek düzey çapraz dirençle karakterize direnç fenotipi göstermektedir [9, 13, 89].

Mutasyon; 23S rRNA'da domain 5'te görülen mutasyonlar (delesyon, duplikasyon ve diğer mutasyonlar) nadir görülmekle birlikte önemlidir. Metilaz genlerinin yapısal ekspresyonuna yol açar. A2058'deki mutasyon MLS_B direncine sebep olur, A2059'daki mutasyon ise sadece makrolit ve linkozamidleri etkilemektedir [92, 103, 107].

2.6.2. Aktif Efluks Pompa Sistemi

Gram pozitif koklarda makrolidler ve streptogramin B'ye karşı dirençten sorumlu farklı pompa sistemleri bulunmuştur. ATP bağımlı bu pompa proteinlerinin sentezinden *msrA/B* (metionin sülfoksit redüktaz), *mef* (makrolid efluks) ve *vga* genleri sorumludur [89, 108, 109]. Stafilokoklarda *msrA*, *msrB* geni tarafından kodlanan enerji bağımlı efluks pompası, hücre içine giren makrolid ve streptogramin

B'yi dışarı atarak bu antibiyotiklere karşı dirence yol açar fakat linkozamidlere karşı dirençte rol oynamaz [100, 108]. pUL 5050 plazmidini üzerinde yer alan *msrA* geni ilk olarak *S. epidermidis*'te tanımlanmıştır. *msrA* geni tarafından kodlanan ve ABC süper ailesine ait *msrA* proteinin homologu *S. aureus*'un klinik izolatlarında da gösterilmiştir [110, 111]. *msrB* geni *S. xylosus*'ta tanımlanmıştır [110]. Plazmid ile kodlanan *msrA* geni bakteride 14, 15 üyeli küçük makrolidlere ve streptogramin B'ye karşı indüklenebilir (MS_B fenotipli direnç) dirence yol açan protein pompasını kodlar [112]. *mef* (makrolit effluks) geni sıklıkla eritromisine dirençli *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, grup C streptokok ve enterokoklarda görülen effluks M tipi bir pompayı kodlar. Bu fenotipi taşıyan suşlar 14 ve 15 üyeli makrolitlere dirençli iken klindamisin ve streptogramin B'ye duyarlı kalmaktadırlar (MS_B fenotipli direnç) [107].

2.6.3. Enzimatik inaktivasyon

Antibiyotiğin enzimatik inaktivasyonu yoluyla oluşan direnç, sadece yapısal olarak ana antibiyotiğe benzeyen antibiyotiklere karşı dirence sebep olur [8, 89].

Linkozamidlere direnç gelişimi, plazmidde kodlanan, birbirleriyle yakın ilişkili *linA* ve *linA'* (linkozamid nükleotidil transferaz) genleri tarafından kodlanan iki nükleotidil transferaz ile olur. Bu enzimler linkomisinini üçüncü pozisyonundaki, klindamisinini dördüncü pozisyonundaki hidroksil grubuna ATP, GTP, CTP veya UTP'den Mg²⁺ varlığında nükleotid grubu eklenmesiyle linkozamidlere yüksek düzeyde dirence yol açar. Bu yolla makrolid ve streptograminlere karşı direnç gelişmez. *linA* ve *linA'* genlerinin büyük oranda homolog olduğu gösterilmiştir. *S.aureus*'ta *linA'* geni pLP856 plazmidini üzerinde bulunmaktadır. Tek başına linkozamid direnci bazen *S. aureus*'ta daha sık olarak da bazı KNS'lerde (*S. sciurri*, *S. cohnii*, *S. xylos*) gözlenir. *linA* geni *S. haemolyticus*'ta, *linA'* *S. aureus*'ta saptanırken, *linB* geni *E. faecium*'da saptanmıştır [89, 103].

Stafilokoklarda streptograminleri enzimatik yolla inaktive eden *vat* (virginamisin faktör A asetiltransferaz), *vatB*, *vgb* (virginamisin faktör b) genleri tanımlanmıştır. *vat* ve *vatB* geni streptogramin A ve türevi antibiyotikleri inaktive eden asetiltransferaz enzimini kodlar. Streptogramin B'yi inaktive eden laktonaz

enzimi ise *vgb* geni tarafından kodlanır. *vgb* hiçbir zaman tek başına bulunmaz, *vat* veya *vga* ile birlikte. Bu genler plazmid üzerinde yer alır [103, 113].

S. aureus'ta, eritromisin direncine yol açan *ereA* ve *ereB* (eritromisin esterifikasyon) genlerinin kodladığı laktonaz enzimi makrolid halkasının esteratik keserek bu dirence yol açar [89].

2.6.4. MLS_B Direncinin Saptanması

a. Fenotipik Yöntemler

İndüklenebilir direncin belirlenmesi için CLSI önerileri doğrultusunda eritromisin ve klindamisin diskleri kullanılarak yapılan ve D test (Çift Disk Difüzyon testi) adı verilen özel bir disk yakınlaştırma testi kullanılmaktadır. Eritromisin çok düşük konsantrasyonlarda dahi MLS_B direncini indüklediği için tercih edilir. Klindamisin (2µg) ve eritromisin (15µg) diskleri 15-26 mm'lik mesafe ile yerleştirilir [114].

Klindamisin inhibisyon zonunun eritromisin inhibisyon zonuna bakan kısmında bir küntleşme olması D test pozitif olarak yorumlanır. Bu durum iMLS_B direncini gösterir. Eritromisin ve klindamisin dirençli olarak rapor edilir. Her iki antibiyotiğe birden duyarlı bulunan izolatlar S fenotipi olarak, her iki antibiyotiğe birden dirençli bulunan izolatlar yapısal MLS_B fenotipi (cMLS_B) olarak, eritromisine dirençli, klindamisine duyarlı olan izolatlar ise MS_B fenotipi klindamisin dirençli, eritromisin duyarlı olan izolatlar L fenotipi olarak kabul edilir [89, 114, 115].

CLSI, eritromisin dirençli klindamisin duyarlı stafilocokların indüklenebilir klindamisin direnç testi yapılmadan rapor edilmemesi gerektiğini bildirmektedir [116]. Çünkü iMLS_B direncinin belirlenmesindeki başarısızlık klindamisin tedavisinde klinik başarısızlığa yol açacaktır. Buna karşılık tüm eritromisin dirençli stafilocoklar klindamisine de dirençli olarak değerlendirilirse gerçekten klindamisin duyarlı bir suşun neden olduğu enfeksiyonun tedavisinde klindamisin kullanılmaması da yine tedavi başarısızlığıyla sonuçlanacaktır [9, 11].

İdrardan izole edilen *S. saprophyticus* suşları için rutin D test uygulaması tavsiye edilmemektedir. Akut ve komplike olmayan üriner sistem enfeksiyonlarının tedavisinde yaygın olarak kullanılan nitrofurantoin, kotrimaksazol gibi antibiyotikler

idrarda yeterli konsantrasyona ulaştığı için D test yapılması gerekli görülmemiştir [117].

b. Moleküler Yöntemler

D- testi uygulaması ve değerlendirilmesi kolay, ucuz bir yöntem olmasına rağmen altın standart yöntem PCR ile direnç genlerinin gösterilmesidir [118]. Stafilokoklarda MLS_B direncinden sıklıkla sorumlu olarak gösterilen *ermA*, *ermB*, *ermC*, *ereA*, *ereB*, *msrA*, *msrB*, *vatA*, *vatB*, *linA* ve *linB* genlerinin PCR yapılarak moleküler yöntemlerle gösterilebilmesi mümkündür [119].

PCR, üç farklı sıcaklıkta çalışan basamakların bir döngü halinde tekrarlanması ile gerçekleştirilir. İlk basamak denatürasyondur. Bu basamakta 94 °C'ye dek ısıtılan DNA'nın iki zinciri birbirinden ayrılır. İkinci basamak birleşmedir. Sıcaklığın düşürülmesi ile primerler çoğaltılacak bölgenin uçlarında yer alan kendilerine özgül dizileri tanır, hidrojen bağları ile bağlanır. Primerlerin ortamdaki derişimlerinin, kalıp DNA'dan milyonlarca kez daha fazla olması sayesinde, ayrılan kalıp DNA zincirleri tekrar birbirlerine değil, primerler kalıp DNA zincirlerine bağlanırlar. Primerlerin özgül olarak bağlanması için kullanılan sıcaklık genellikle 50-70 °C arasındadır. Üçüncü basamak primerlerin uzamasıdır. Karışım, DNA polimerazın çalıştığı optimum sıcaklığa getirildiğinde primerlere bağlanmış olan enzim, bunların 3' ucuna, kalıp DNA'ya uygun nükleotitleri ekleyerek DNA sentezi yapar. Bu üç basamak bir döngüyü oluşturur ve her tekrarlanışında iki primer arasında kalan özgül DNA parçasının her iki zincirinin birer kopyası çıkarılır. Çoğaltılan DNA parçaları bir çok değişik yöntemle görüntülenebilir. Bunlardan en yaygın olanı agaroz jel elektroforezdir [120]. Bu yöntemlerden biri de ticari olarak geliştirilmiş, nükleik asit amplifikasyonu ile birlikte eş zamanlı artış gösteren floresans sinyalin ölçülmesiyle kısa sürede sonuç veren real-time PCR yöntemidir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Bakteri İzolatlarının Eldesi

Çalışmaya, 2014 Şubat-2014 Temmuz tarihleri arasında İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesinde çeşitli yatan hasta servislerinden gönderilen klinik numunelerden izole edilen toplam 308 stafilokok izolatı dahil edilmiştir. Aynı hastadan alınan birden fazla örnekte üreyen izolatlar çalışma dışı bırakılmıştır.

3.2. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

İzolatların, antibiyotiklere duyarlılıkları, 2011 CLSI kriterlerine göre disk difüzyon yöntemi kullanılarak saptanmıştır [116]. Bakterilerin 18-24 saatlik kültürlerinden BHI Broth kullanılarak, 0.5 McFarland bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonları (1.5×10^8 kob/ml), Mueller Hinton agar yüzeyine steril eküvyonla yayılmıştır. Antibiyotik duyarlılıkları için kullanılan diskler agar üzerine yerleştirilmiş ve 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Antibiyotik diskleri çevresinde oluşan inhibisyon zon genişliğine göre izolatlar duyarlı, orta derecede duyarlı ve dirençli olarak gruplandırılmıştır. Tüm testlerde *S. aureus* ATCC 25923 kökeni kontrol suşu olarak kullanılmıştır.

Antibiyotik duyarlılıkları için eritromisin 15 µg (Bioanalyse), telitromisin 15 µg (Bioanalyse), klindamisin 2 µg (Bioanalyse), kinopristin-dalfopristin 15 µg (Bioanalyse), oksasilin 1 µg (Bioanalyse), penisilin-G10 ünite (Bioanalyse), sefoksitin 30 µg (Bioanalyse), sefazolin 30 µg (Bioanalyse), vankomisin 30 µg (Bioanalyse), teikoplanin 30 µg (Bioanalyse), linezolid 30 µg (Bioanalyse), tetrasiklin 30 µg (Bioanalyse), gentamisin 10 µg (Bioanalyse), rifampisin 5 µg (Bioanalyse), trimetoprim-sülfametoksazol (SXT) 1.25/23.75 µg (Bioanalyse), fusidik asid 10 µg (Bioanalyse), moksifloksasin 5 µg (Bioanalyse), norfloksasin 10 µg (Bioanalyse) ve levofloksasin 5 µg (Bioanalyse) diskleri kullanılmıştır.

3.3. *S.aureus* ve Koagulaz Negatif Stafilokokların Tanımlanması

Laboratuvarımıza gelen örnekler %5 koyun kanlı ve EMB agara inoküle edildi. Ekim yapılan petriyer 24–48 saat süreyle 37°C'de aerob ortamda inkübe edildi. Kan örnekleri BACTEC 9240 (Becton Dickinson Diagnostic Instrument System, Sparks,

MD, USA) cihazında $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de yedi günlük inkübasyona kaldırılarak takip edildi. Otomatize kan kültür cihazında üreme saptanan şişelerden %5 koyun kanlı agar, EMB agar besiyerlerine pasaj ekimleri yapıldı. Kanlı agarda üreyen koloniler koloni morfolojisi, gram boyama, katalaz ve koagülaz deneylerinin sonucuna göre *S. aureus* ve KNS olarak tanımlandı. Geleneksel tanımlamanın doğrulanması ve koagülaz negatif stafilocokların tür düzeyinde tanımlanması için BD Phoenix 100 (Becton Dickinson Diagnostic Instrument System, Sparks, MD, USA) otomatize sistem kullanıldı.

Çalışmanın diğer aşamaları için izolatlar saf olarak %15 gliserol içeren triptik soy buyyon besi yerinde -40°C 'de saklandı. Daha sonra izolatları canlandırmak için "Brain-heart infusion broth" (BHI Broth), %5 koyun kanlı agar, antibiyotik duyarlılık testi için de Mueller Hinton agar (MHA) kullanıldı. İzolatların antibiyotik duyarlılıkları, MHA besiyerinde CLSI standartlarına göre Kirby-Bauer Disk Difüzyon yöntemi ile araştırıldı.

3.4. Çift Disk Difüzyon Testi (D Test)

Antibiyotik duyarlılık sonuçlarına göre eritromisine dirençli olarak değerlendirilen *S. aureus* ve KNS izolatlarının iMLS_B direnç fenotipi eritromisin (15µg) ve klindamisin (2 µg) disklerinin kullanıldığı D test ile CLSI'da belirtilen kriterlere göre saptandı. Diskler, 0.5 McFarland (1.5×10^8 kob/ml) bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonundan yaygın ekim yapılan MHA üzerine merkezden merkeze 15-26 mm arayla yerleştirildi [121].

Plaklar $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 18-24 saat inkübe edildi. Eritromisin diski etrafında inhibisyon zon çapı $13\text{mm} \leq$ ve klindamisin inhibisyon zonunda iki disk arasında eritromisin diskine yakın olan kısımda düzleşme görülen izolatlar iMLS_B fenotipi direnç; eritromisin ve klindamisin her ikisine dirençli olan izolatlar cMLS_B fenotipi direnç; eritromisine dirençli klindamisine duyarlı izolatlar MS_B fenotipi direnç, eritromisin duyarlı klindamisin dirençli izolatlar L fenotipi direnç olarak değerlendirildi [100].

3.5. *ermA*, *ermC*, *msrA*, *msrB* genlerinin PCR Yöntemiyle Araştırılması

Çift disk difüzyon testi (D-test) yöntemi ile saptanan, indüklenabilir klindamisin direnci (iMLS_B) pozitif 71 izolat, klindamisin ve eritromisin dirençli (cMLS_B fenotip) 68 izolat, eritromisin dirençli klindamisin duyarlı (MS_B fenotip) 71 izolat ve eritromisin duyarlı klindamisin dirençli (L fenotip) 4 izolat olmak üzere toplam 214 izolatta *ermA*, *ermC*, *msrA* ve *msrB* genlerinin varlığı PCR ile araştırıldı. DNA ekstraksiyonu gerçekleştirilinceye kadar stoklanan bakteri izolatları -40°C'de (Sanyo Biomedical Freezer, Japan) saklandı.

3.5.1. DNA Ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu Thermo Scientific Genejet Genomic DNA purification kiti ile üretici firmanın (Thermo Scientific, USA Lot No:K0721, K0722) önerileri doğrultusunda modifiye ederek aşağıdaki şekilde yapıldı:

- Bakteri hücre duvarını parçalamak için 200 µl 0.1 M Trisbase (pH=8) hazırlandı. İçerisine 100 µl koloni steril tek kullanımlık öze ile alınıp pipetaj yapılarak karıştırıldı ve karışım derin dondurucuya kaldırıldı (-40 °C), çözüldükten sonra 95 °C'de 10 dk kaynatıldı.
- Karışım 3000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi ve süpernatant 180 µl olacak şekilde alındı, pellet atıldı.
- Karışıma 200 µl Lizis solüsyonu ve 20 µl Proteinaz K eklendi vortekslendi.
- Hücrelerin tam anlamıyla parçalanması için 56 °C'de inkübe edildi ve ara ara vortekslendi.
- Karışıma 20 µl Rnase A solüsyonundan eklenip vortekslendi ve 10 dk oda ısında inkübe edildi.
- Karışıma 400 µl %50'lik Etanol eklendi ve vortekslendi.
- Hazırlanan lizat toplama tüpüne yerleştirilen Genejet Genomic DNA Purifikasyon (GGDP) tüpüne aktarıldı. 1 dk 6000xg'de santrifüj edildi. Alt sıvıyı içeren toplama tüpü atıldı. GGDP tüpü 2 ml'lik yeni bir toplama tüpüne kondu (Her kullanımdan sonra GGDP tüpü sıkıca kapatıldı).

- 500 µl Wash Buffer I (30 ml %96'lık Etanol eklenmiş) eklendi ve 1 dk 8000xg'de santrifüj edildi. Alttaki sıvı atıldı, GGDP tüpü toplama tüpüne geri kondu.
- 500 µl Wash Buffer II (30 ml %96'lık Etanol eklenmiş) eklendi ve 3 dk max hızda(>=12000xg) santrifüj edildi. Toplama tüpü atıldı ve GGDP tüpü yeni 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne kondu.
- DNA'yı saflaştırmak için 200 µl Elution Buffer GGDP tüpüne eklendi, 2 dk oda ısısında inkübe edildi, sonra 1dk 8000xg'de santrifüj edildi.
- GGDP tüpü atıldı, mikrosantrifüj tüpündeki saf DNA kullanılmaya kadar -40°C'de saklandı.

3.5.2. Direnç genlerinin saptanması

PCR işlemi, Geneamp PCR System 9700 (Applied Biosystems®,USA) termal döngü cihazında kullanılan primerlere uygun reaksiyon koşullarında *ermA*, *ermC*, *msrA* ve *msrB* gen bölgeleri amplifiye edilerek yapıldı. PCR için kullanılan primerler Tablo 3'te gösterilmiştir. Çalışmada Lina ve arkadaşlarının kullandığı primer dizilimleri kullanılmıştır [110]. Çalışmada kullanılan *ermA*, *ermC*, *msrA*, *msrB* primerleri İnvitrogen (USA) firması tarafından sentez edilmiştir.

Tablo 3. PCR'da kullanılan özgül primerler [110]

Primer	Dizi (5'-3')	Ürün
<i>ermA</i> F	GTT CAA GAA CAA TCA ATA CAG AG	421 bç
<i>ermA</i> R	GGA TCA GGA AAA GGA CAT TTT AC	
<i>ermC</i> F	GCT AAT ATT GTT TAA ATC GTC AAT TCC	572 bç
<i>ermC</i> R	GGA TCA GGA AAA GGA CAT TTT AC	
<i>msrA</i> F	GGC ACA ATA AGA GTG TTT AAA GG	940 bç
<i>msrA</i> R	AAG TTA TAT CAT GAA TAG ATT GTC CTG TT	
<i>msrB</i> F	TAT GAT ATC CAT AAT AAT TAT CCA ATC	595 bç
<i>msrB</i> R	AAT TTA TAT CAT GAA TAG ATT GTC CTG TT	

3.5.3. *ermA*, *ermC*, *msrA*, *msrB* Genleri için PCR Karışımları ve Uygun Döngü Koşulları

3.5.3.1 *ermA* geni varlığı araştırılması:

erm A geninin 421 bç gen segmentini hedef alan PCR karışımı toplam reaksiyon hacmi 50 µl olacak şekilde 10 mmol/L Tris-HCl (pH:8.3), 50 mmol/L KCl (10XMgfree, Thermoscientific), 1.5 mmol/L MgCl₂ (stok 25 mmol, Thermoscientific), dNTP karışımından 200 mmol/L (stok her biri 10 mmol, Thermoscientific), her bir primer çiftinden (stok 100 pmol/µl, Invitrogen) 60 pmol/µl, Taq DNA polimerazdan 0,25 Ü (stok 5 Ü/µl, Thermoscientific) alınarak steril 30.55 µl distile su eklenerek amplifikasyon karışımı hazırlandı. Hazırlanan bu karışıma ekstrakte edilen DNA örneğinden 5 µl eklendi ve amplifikasyon için termal cyclus'a yerleştirildi. Negatif örnek olarak distile su kullanıldı. *ermA* geni PCR ile kuvvetli pozitif olarak bulunan bir izolat, diğer PCR reaksiyonları için pozitif kontrol olarak kullanıldı.

PCR Amplifikasyon Aşamaları ;

94 °C'de 5 dk	ön denatürasyon	
94 °C'de 1 dk	hedef DNA denatürasyonu	} 35 döngü
53 °C'de 1dk	primer bağlanma	
72 °C'de 1 dk	primer uzaması	
72 °C'de 7 dk	son uzama + 4 °C'de bekleme konumu	

3.5.3.2 *ermC* geni varlığı araştırılması:

ermC geninin 572 bç gen segmentini hedef alan PCR karışımı toplam reaksiyon hacmi 50 µl olacak şekilde 10 mmol/L Tris-HCl (pH:8.3), 50 mmol/L KCl (10XMgfree, Thermoscientific), 1.5 mmol/L MgCl₂ (stok 25 mmol, Thermoscientific), dNTP karışımından 200 mmol/L (stok her biri 10 mmol, Thermoscientific), her bir primer çiftinden (stok 100 pmol/µl, Invitrogen) 50 pmol/µl, Taq DNA polimerazdan 1,25 Ü (stok 5 Ü/µl, Thermoscientific) alınarak steril 31.75 µl distile su eklenerek amplifikasyon karışımı hazırlandı. Hazırlanan bu karışıma ekstrakte edilen DNA örneğinden 5 µl eklendi ve amplifikasyon için termal cycler'a yerleştirildi. Negatif örnek olarak distile su kullanıldı. *ermC* geni PCR ile kuvvetli pozitif olarak bulunan bir izolat, diğer PCR reaksiyonları için pozitif kontrol olarak kullanıldı.

PCR Amplifikasyon Aşamaları ;

94 °C'de 5 dk	ön denatürasyon	
94 °C'de 1 dk	hedef DNA denatürasyonu	} 35 döngü
52 °C'de 1 dk	primer bağlanma	
72 °C'de 1 dk	primer uzaması	
72 °C'de 7 dk	son uzama + 4 °C'de bekleme konum	

3.5.3.3 *msrA* geni varlığı araştırılması:

PCR karışımı;

msrA geninin 940 bp gen segmentini hedef alan PCR karışımı; toplam reaksiyon hacmi 50 µl olacak şekilde 10 mmol/L Tris-HCl (pH:8.3), 50 mmol/L KCl (10X Mgfree, Thermoscientific), 1.5 mmol/L MgCl₂ (stok 25 mmol, Thermoscientific), dNTP karışımından 200 mmol/L (stok her biri 10 mmol, Thermoscientific), her bir primer çiftinden (stok 100 pmol/µl, Invitrogen) 50 pmol/µl, Taq DNA polimerazdan 1.25 Ü (stok 5 Ü/µl, Thermoscientific) alınarak steril 31.75 µl distile su eklenerek amplifikasyon karışımı hazırlandı. Hazırlanan bu karışıma ekstrakte edilen DNA örneğinden 5 µl eklendi ve amplifikasyon için termal cykler'a yerleştirildi. Negatif örnek olarak distile su kullanıldı. *msrA* geni PCR ile kuvvetli pozitif olarak bulunan bir izolat, diğer PCR reaksiyonları için pozitif kontrol olarak kullanıldı.

PCR Amplifikasyon Aşamaları ;

94 °C'de 5 dk	ön denatürasyon	
94 °C'de 1 dk	hedef DNA denatürasyonu	} 35 döngü
52 °C'de 1dk	primer bağlanma	
72 °C'de 1,2 dk (80 sn)	primer uzaması	
72 °C'de 7 dk	son uzama + 4 °C'de bekleme konumu	

3.5.3.4 *msrB* geni varlığı araştırılması:

PCR karışımı;

msrB geninin 595 bç gen segmentini hedef alan PCR karışımı toplam reaksiyon hacmi 50 µl olacak şekilde 10 mmol/L Tris-HCl (pH:8.3), 50 mmol/L KCl (10XMgfree, Thermoscientific), 1.5 mmol/L MgCl₂ (stok 25 mmol, Thermoscientific), dNTP karışımından 200 mmol/L (stok her biri 10 mmol, Thermoscientific), her bir primer çiftinden (stok 100 pmol/µl, Invitrogen) 50 pmol/µl, Taq DNA polimerazdan 1.25 Ü (stok 5 Ü/µl, Thermoscientific) alınarak steril 31.75 µl distile su eklenerek amplifikasyon karışımı hazırlandı. Hazırlanan bu karışıma ekstrakte edilen DNA örneğinden 5 µl eklendi ve amplifikasyon için termal cycler'a yerleştirildi. Negatif örnek olarak distile su kullanıldı. *msrB* geni PCR ile kuvvetli pozitif olarak bulunan bir izolat, diğer PCR reaksiyonları için pozitif kontrol olarak kullanıldı.

PCR Amplifikasyon Aşamaları ;

94 °C'de 5 dk	ön denatürasyon	
94 °C'de 1 dk	hedef DNA denatürasyonu	} 35 döngü
54 °C'de 1dk	primer bağlanma	
72 °C'de 1,2 dk (80 sn)	primer uzaması	
72 °C'de 7 dk	son uzama + 4 °C'de bekleme konumu	

3.5.4. PCR Ürünlerinin Saptanması:

PCR ile amplifiye edilen ilgili DNA bölgeleri agaroz jel elektroforezi ile belirlendi.

3.5.4.1. Elektroforez Jelinin Hazırlanması

PCR ürünü DNA'ların incelenmesi ve boyutlarının belirlenmesi için agaroz konsantrasyonu %2 olacak şekilde 1X TBE (Tris Base, Borik asit, EDTA) tamponu ile agaroz jel hazırlandı. 10X TBE stok solüsyonundan 100 ml alınarak 900 ml distile su ile karıştırılarak 1X yoğunluğunda çözelti hazırlandı. Hazırlanan solüsyonun 100 ml'sine moleküler saflıkta agarozdan 2 g eklendi. Bir cam balon içerisinde mikrodalga fırında eritildi, sıcakken agaroz içeriğine 5 µl safe nucleic stain eklendi. Mikrodalga fırında eritilen agaroz, yatay elektroforez jel tankına (Thermo Scientific EASYCAST OWL Model B2 Midi Gel Electrophoresis System, USA) döküldü ve soğumaya bırakıldı. Oda sıcaklığında 20-30 dk bekletilerek katılaşması sağlandı. Jel donduktan sonra taraklar çekilerek kuyucuklar hazırlandı ve jel tankı hazırlanan 1X TBE solüsyonu ile yeteri miktarda dolduruldu.

3.5.4.2. Amplikonların Agaroz Jele Yerleştirilmesi

Agaroz jel kuyucuklarına 7 µl amplifikasyon ürünü ile 2 µl 6X yükleme tamponu karıştırılarak jele yüklendi. Marker olarak 100 bp'lik DNA markerdan (Geneaid, Taiwan) 5 µl alınarak orta kuyucuğa yerleştirildi. Tankın güç kaynağı (Thermo Scientific EC XL 300 Power Supply, USA) çalıştırılarak 40 MA –100 V akım verildi ve 60 dk elektroforez sürdürüldü. Yükleme tamponundaki bromfenol mavisi jelin 2/3'üne ulaştığında elektroforez durduruldu.

3.5.4.3. Agaroz Jelin Görüntülenmesi

Elektroforez sonrası jel tanktan çıkarıldı ve jel görüntüleme sistemi (BIO RAD Gel İmaging Device, USA) ile 302 nm dalga boyundaki ultraviyole ışığı altında görüntülenerek incelendi ve resimleri çekildi. Hedef bölge ile uyumlu amplikonlar 100 bp DNA Ladder (Geneaid, Taiwan) belirteçleri ile karşılaştırılarak pozitif olarak değerlendirildi.

3.6. PCR İçin Kullanılan Sarf Malzemelerin ve Solüsyonların Hazırlanması

Moleküler testlerde kullanılmak üzere belirtilen solüsyonlar hem stok hem de günlük olarak hazırlandı.

3.6.1. 10X TBE (pH: 8.8) Solüsyonunun Hazırlanması

Tris-base 108 g,

Borik asit 55 g,

EDTA 8.3 g tartılarak 1 litre distile suda çözüldü.

Oda ısısında muhafaza edildi. (Tris-base Sigma, USA MW: 121.14 g/mol, Lot: SLBK0463V; Borik asit Sigma, USA MW: 61,83 g/mol, Lot:BCBM2648V; EDTA Sigma, USA MW: 372,24 g/mol, Lot: SLBH4839V)

3.6.2. dNTP Karışımının Hazırlanması

PCR ana karışımında (master mix) kullanılacak olan 10mM dNTP (Deoxyribonucleotide triphosphate, Thermo Scientific, USA Lot: 00205003) hazırlandı. Bunun için herbiri 100 mM stok konsantrasyonda gelen dATP, dGTP, dCTP ve dTTP'tan 10'ar µl alınarak 60 µl ultrapür su eklendi. Kullanılıncaya kadar -20/-70 °C'de muhafaza edildi.

3.6.3. Agaroz

PCR ürünlerinin jel elektroforezi için DNaz ve RNaz aktivitesi olmayan moleküler saflıkta agaroz (İnvitrogen, USA Lot: 0000326681) kullanıldı. Oda ısısında muhafaza edildi.

3.6.4. Taq DNA Polimeraz

PCR ile amplifikasyon karışımının hazırlanmasında her örnek başına 1,25 U Taq polimeraz (Stok 5 U/µl) Thermo Scientific, USA Lot: 00200925) enzimi kullanıldı. Enzim -20/-70 C°'de muhafaza edildi.

3.6.5. Primer Seçimi, Kontrolü ve Liyofilize Primerlerin Kullanıma Hazırlanması

Bakteriyel DNA’da hedeflenen 4 gen bölgesinin moleküler yöntemlerle ile incelenmesinde kritik öneme sahip olan primerlerin dizisinin belirlenmesi ve ticari olarak sentezletilmesi için ayrıntılı literatür taraması yapıldı ve GeneBank’tan ilgili hedef gen bölgelerinin tüm sekansı incelendi. Belirlenen primer dizileri liyofilize olarak temin edildi. Liyofilize halde gelen primerler ultrapür su ile 100 pmol/µl olacak şekilde dilüe edilerek stok primerler hazırlanarak -20/-70 °C’de muhafaza edildi.

3.7. İstatiksel Analiz

Bu yöntemler ile elde edilen veriler rakamsal olarak kodlanarak “SPSS 16.0 for Windows®” programı kullanılarak gruplar arası değişkenleri test etme amacıyla *Pearson Chi-Square*, *Fisher’s Exact test* ile incelendi. İstatistiksel hata payı 0.05 olarak alındı.

4. BULGULAR

Çalışmaya, 2014 Şubat-2014 Temmuz tarihleri arasında İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesinde yatan hastalardan izole edilen 51 (%16,5) *S. aureus*, 257 (%83,5) KNS olmak üzere toplam 308 stafilyokok izolatı dahil edilmiştir. Aynı hastadan alınan birden fazla örnekte üreyen izolatlar çalışma dışı bırakılmıştır. *S. aureus* izolatlarının 16'sı metisiline dirençli (MRSA), 35'i metisiline duyarlı (MSSA) olarak tanımlanmış, KNS izolatlarının 208'i metisiline dirençli (MRKNS) , 49'u metisiline duyarlı (MSKNS) bulunmuştur. Klinik örneklerin 133'ü (%43,19) kadın ve 175'i (%56,81) erkek hastalara aittir.

S. aureus izolatlarının %47,1'i kan, %17,7'si yara, %7,8'i periton sıvısı, %5,9'u idrar, %5,9'u ameliyat materyali, %3,9'u trakeal aspirat, %3,9'u eklem sıvısı, %3,9'u balgam, %3,9'u diğer materyallere ait örneklerden izole edilmiştir. KNS izolatlarının %92,2'si kan, %3,1'i idrar, % 2,3'ü yara, %1,2'si katater, %0,8'i ameliyat materyali, %0,4'ü eklem sıvısına ait örneklerden izole edilmiştir. Çalışmamızda klinik örneklerden izole ettiğimiz stafilyokok izolatlarının materyal dağılımı Tablo 4'te görülmektedir.

Tablo 4. Stafilyokok izolatlarının izole edildiği klinik materyallerin dağılımı

Materyal cinsi	KNS		<i>S.aureus</i>		Toplam Kişi n(%)
	MSKNS n(%)	MRKNS n(%)	MSS n(%)	MRSA n(%)	
Kan	41(83,7)	196(94,2)	13(37,1)	11(68,7)	261(84,7)
Yara	3(6,1)	3(1,4)	8(22,8)	1(6,3)	15(4,9)
İdrar	4(8,2)	4(1,9)	3(8,6)	0(0)	11(3,6)
Katater	1(2,0)	2(1,0)	0(0)	0(0)	3(1)
Balgam	0(0)	0(0)	0(0)	2(12,5)	2(0,6)
Trakeal aspirat	0(0)	0(0)	2(5,7)	0(0)	2(0,6)
Periton sıvısı	0(0)	0(0)	4(11,4)	0(0)	4(1,3)
Eklem sıvısı	0(0)	1(0,5)	2(5,7)	0(0)	3(1)
Ameliyat materyali	0(0)	2(1,0)	1(2,9)	2(12,5)	5(1,6)
Vagen-serviks	0(0)	0(0)	1(2,9)	0(0)	1(0,3)
Abse materyali	0(0)	0(0)	1(2,9)	0(0)	1(0,3)
Toplam	49(100)	208(100)	35(100)	16(100)	308(100)

İzolatların izole edildiği hastaların yaş dağılımları incelendiğinde 61-70 yaş aralığında 73 hasta, 51-60 yaş aralığında 66 (%21,4) hasta, 71-80 yaş aralığında 57 (%18,5) hasta saptanmıştır. Hastanemizde pediatri servisi bulunmadığı için <20 yaş aralığında sadece 5 (%1,6) hasta saptanmıştır. İzolatların yaş gruplarına göre dağılımları Tablo 5'te gösterilmiştir.

Tablo 5. İzolatların yaş gruplarına göre dağılımları.

Yaş Gurubu	İzolat sayısı				Toplam kişi n(%)
	MSKNS n(%)	MRKNS n(%)	MSSA n(%)	MRSA n(%)	
11-20 yaş	4(8,2)	1(0,5)	0(0)	0(0)	5(1.6)
21- 30 yaş	4(8,2)	8(3,8)	5(14,3)	1(6,2)	18(5.8)
31-40 yaş	3(6,1)	20(9,6)	3(8,6)	1(6,2)	27(8.8)
41-50 yaş	5(10,2)	17(8,2)	4(11,4)	3(18,8)	29(9.4)
51-60 yaş	12(24,5)	39(18,8)	12(34,3)	3(18,8)	66(21.4)
61-70 yaş	8(16,3)	57(27,4)	4(11,4)	4(25)	73(23.7)
71-80 yaş	6(12,2)	44(21,1)	5(14,3)	2(12,5)	57(18.5)
>80 yaş	7(14,3)	22(10,6)	2(5,7)	2(12,5)	33(10.7)
Toplam	49(100)	208(100)	35(100)	16(100)	308(100)

İzole edilen *S. aureus* izolatlarının 31'i (%10) Dahili Bölümlere, 12'si (%3,9) Cerrahi Bölümlere, 8'i (%2,6) Yoğun Bakım Ünitelerine aitti, Acil Servis Bölümüne ait *S. aureus* izolatı izole edilmedi. İzole edilen KNS izolatlarının ise 109'u (%35,4) Dahili Bölümlere, 96'sı (%31,2) Yoğun Bakım Ünitelerine, 41'i (%13,3) Cerrahi Bölümlere, 11'i (%3,6) Acil Servis Bölümüne aitti. Çalışmamızda kullanılan stafilokok izolatlarının izole edildiği materyallerin kliniklere göre dağılımı Tablo 6'da sunulmuştur.

Tablo 6. Stafilokok izolatlarının izole edildiği materyallerin kliniklere göre dağılımı

KLİNİK	KNS		S.aureus		Toplam kişi n(%)
	MSKNS n(%)	MRKNS n(%)	MSSA n(%)	MRSA n(%)	
Dahiliye	8(16,3)	36(17,2)	6(17,1)	2(12,5)	52(16.9)
Beyin Cerrahisi	5(10,2)	17(8,2)	3(8,5)	1(6,25)	26(8.4)
Dahiliye Yoğun Bakım Ünitesi	0(0)	19(9,1)	0(0)	1(6,25)	20(6.5)
Anestezi Yoğun Bakım Ünitesi	0(0)	43(20,7)	0(0)	2(12,5)	45(14.6)
Enfeksiyon	3(6,2)	4(1,9)	0(0)	0(0)	7(2.3)
Nöroloji	2(4,1)	12(5,8)	1(2,9)	1(6,25)	16(5.2)
Nefroloji	1(2,0)	7(3,4)	6(17,1)	1(6,25)	15(4.9)
Kadın Doğum Servisi	1(2,0)	1(0,5)	1(2,9)	0(0)	3(1)
Kalp damar Cerrahisi	1(2,0)	8(3,9)	0(0)	0(0)	9(2.9)
Göğüs Hastalıkları	1(2,0)	3(1,4)	0(0)	1(6,25)	5(1.6)
Acil Servis	8(16,3)	3(1,4)	0(0)	0(0)	11(3.6)
Ortopedi	0(0)	1(0,5)	2(5,7)	2(12,5)	5(1.6)
Genel Cerrahi	3(6,2)	0(0)	1(2,9)	0(0)	4(1.3)
Üroloji	2(4,1)	1(0,5)	1(2,9)	0(0)	4(1.3)
Gastroenteroloji	1(2,0)	8(3,9)	0(0)	0(0)	9(2.9)
Dermatoloji	2(4,1)	2(1,0)	6(17,1)	1(6,25)	11(3.6)
Nöroloji Yoğun Bakım Ünitesi	3(6,2)	19(9,1)	1(2,9)	2(12,5)	25(8.1)
Kalp Damar Cerrahisi Yoğun Bakım Ünitesi	1(2,0)	3(1,4)	0(0)	0(0)	4(1.3)
Tıbbi Onkoloji	1(2,0)	3(1,4)	2(5,7)	1(6,25)	7(2.3)
Hematoloji	2(4,1)	10(4,8)	0(0)	0(0)	12(3.9)
Beyin Cerrahisi Yoğun Bakım Ünitesi	3(6,2)	3(1,4)	2(5,7)	0(0)	8(2.6)
Kulak Burun Boğaz	0(0)	1(0,5)	0(0)	0(0)	1(0.3)
Psikiyatri	1(2,0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(0.3)
Kardiyoloji	0(0)	2(1,0)	2(5,7)	1(6,25)	5(1.6)
Plastik Cerrahi Serv.	0(0)	0(0)	1(2,9)	0(0)	1(0.3)
Kardiyoloji Koroner Yoğun Bakım	0(0)	2(1,0)	0(0)	0(0)	2(0.6)
Toplam	49(100)	208(100)	35(100)	16(100)	308(100)

S. aureus izolatlarının 16'sı (%31,4)'i MRSA, 35'i (%68,6) MSSA olarak bulunmuştur. *S. aureus* izolatlarının hepsi vankomisin, linezolid ve kinupristin/dalfopristine duyarlı bulunmuştur. MSSA ve MRSA izolatları sırasıyla eritromisine %94,3 ve %62,5, klindamisine %100 ve %81,2, telitromisine %97,1 ve %75, teikoplanine %100 ve %93,7, fusidik aside %100 ve %56,2, gentamisine %97,1 ve %62,5, levofloksasine %94,3 ve %31,2, SXT'ye %100 ve %50, penisiline %8,6 ve %0,0, tetrasikline %94,3 ve %56,2, rifampisine %94,3 ve %50, moksifloksasine %97,1 ve %37,5, norfloksasine %97,1 ve %31,2, sefazoline %97,1 ve %12,5 oranında duyarlı olarak bulunmuştur. Çalışmaya alınan izolatların antibiyotiklere duyarlılıkları Tablo 7'de gösterilmiştir.

KNS izolatlarının 49'u (%19,1) MSKNS, 208'i (%80,9) MRKNS olarak bulunmuştur. KNS izolatlarının hepsi vankomisine duyarlı bulunmuştur. MSKNS ve MRKNS izolatlarında sırasıyla eritromisine %49 ve %15, klindamisine %90 ve %66, telitromisine %94 ve %76,5, teikoplanine %98 ve %93,8, linezolide %100 ve %93,7, kinupristin/dalfopristine %96 ve %87,5, fusidik aside %53,1 ve %18,3, gentamisine %96 ve %45,7, levofloksasine %96 ve %23,5, SXT'ye %86 ve %38, penisiline %2 ve %0,0, tetrasikline %69,4 ve %57,2, rifampisine %96 ve %50, moksifloksasine %94 ve %27,9, norfloksasine %92 ve %24, sefazoline %80 ve %3,4 oranında duyarlı olarak bulunmuştur.

KNS izolatlarında; eritromisin, klindamisin, telitromisin, oksasilin, sefoksitin, sefazolin, gentamisin, rifampisin, tetrasiklin, levofloksasin, moksifloksasin, norfloksasin, fusidik asid ve SXT antibiyotiklerinde duyarlılık – dirençlilik açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0,05$).

S. aureus izolatlarında; eritromisin, klindamisin, telitromisin, oksasilin, sefoksitin, sefazolin, gentamisin, rifampisin, tetrasiklin, levofloksasin, moksifloksasin, norfloksasin, fusidik asid ve SXT antibiyotiklerinde duyarlılık – dirençlilik açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0,05$).

Diğer antibiyotiklerde KNS ve *S. aureus* izolatlarında duyarlılık – dirençlilik açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$).

Tablo 7. Stafilokok izolatlarının test edilen antibiyotiklere duyarlılık oranları.

Antibiyotik	KNS =257				S.aureus=51			
	MSKNS	MRKNS	Toplam	P	MSSA	MRSA	Toplam	P
	n(%)	n(%)	n(%)		n(%)	n(%)	n(%)	
Eritromisin	24(49)	31(15)	55(21,4)	<0,001*	33(94,3)	10(62,5)	43(84,3)	0,008**
Klindamisin	44(90)	137(66)	181(70,4)	<0,001*	35(100)	13(81,2)	48(94,1)	0,027**
Telitromisin	46(94)	159(76,5)	205(79,8)	0,006*	34(97,1)	12(75)	46(90,1)	0,029**
Oksasilin	49(100)	0(0)	49(19)	<0,001*	35(100)	0(0)	35(68,7)	<0,001*
Sefoksitin	49(100)	0(0)	49(19)	<0,001*	35(100)	0(0)	35(100)	<0,001*
Sefazolin	39(80)	7(3,4)	46(17,9)	<0,001*	34(97,1)	2(12,5)	39(76,4)	<0,001**
Gentamisin	47(96)	95(45,7)	142(55,2)	<0,001*	34(97,1)	10(62,5)	44(86,3)	<0,003**
Penisilin	1(2)	0(0)	1(0,4)	0,191**	3(8,6)	0(0)	3(5,9)	0,543**
Rifampisin	47(96)	104(50)	151(59)	<0,001*	33(94,3)	8(50)	41(80,4)	<0,001**
Tetrasiklin	34(69,4)	119(57,2)	153(60)	0,118*	33(94,3)	9(56,2)	42(82,4)	0,002**
Levofloksasin	47(96)	49(23,5)	96(37,4)	<0,001*	33(94,3)	5(31,2)	38(74,5)	<0,001**
Moksifloksasin	46(94)	58(27,9)	104(40,5)	<0,001*	34(97,1)	6(37,5)	40(78,4)	<0,001**
Norfloksasin	45(92)	50(24)	95(37)	<0,001*	34(97,1)	5(31,2)	39(76,4)	<0,001**
Vankomisin	49(100)	208(100)	257(100)	-	35(100)	16(100)	51(100)	-
Teikoplanin	48(98)	195(93,8)	243(94,6)	0,481**	35(100)	15(93,7)	50(98)	0,314**
Linezolid	49(100)	194(93,7)	243(94,5)	0,079**	35(100)	16(100)	51(100)	-
FusidikAsid	26(53,1)	38(18,3)	64(24,9)	<0,001*	35(100)	9(56,2)	44(86,3)	<0,001**
Trimetoprim/ sulfametaksazol	42(86)	79(38)	121(47)	<0,001*	35(100)	8(50)	43(84,3)	<0,001**
Kinopristin/ Dalfopristin	47(96)	182(87,5)	229(89,1)	0,089*	35(100)	16(100)	51(100)	-
Toplam	49(100)	208(100)	257(100)		35(100)	16(100)	51(100)	

*Pearson Chi-Square, **Fisher's Exact test

KNS izolatları arasında en sık rastlanan türler *S. hominis* (%35), *S. epidermidis* (%25) ve *S. haemolyticus* (%14,4) olarak saptanmıştır. Tablo 8'de izole edilen tüm KNS türleri gösterilmiştir.

Tablo 8. İzole edilen KNS türlerinin dağılımı

KNS türü	MSKNS n(%)	MRKNS n(%)	Toplam n(%)
<i>S. epidermidis</i>	12(24,5)	52(25)	64(25)
<i>S. haemolyticus</i>	6(12,2)	31(14,9)	37(14,4)
<i>S. hominis</i>	20(40,8)	71(34,1)	91(35)
<i>S. saprophyticus</i>	4(8,2)	19(9,1)	23(8,9)
<i>S. capitis</i>	4(8,2)	6(2,8)	10(4,0)
<i>S. equorum</i>	1(2,0)	11(5,3)	12(4,7)
<i>S. gallinarum</i>	0(0)	2(1,0)	2(0,8)
<i>S. warnerii</i>	2(4,1)	2(1,0)	4(1,6)
<i>S. cohnii</i>	0(0)	4(1,9)	4(1,6)
<i>S. hyicus</i>	0(0)	1(0,5)	1(0,4)
<i>S. chromogenes</i>	0(0)	1(0,5)	1(0,4)
<i>S. sciuri</i>	0(0)	4(1,9)	4(1,6)
<i>S. kloosii</i>	0(0)	1(0,5)	1(0,4)
<i>S. lentus</i>	0(0)	2(1,0)	2(0,8)
<i>S. schleiferi</i>	0(0)	1(0,5)	1(0,4)
Toplam	49(100)	208(100)	257(100)

4.1. Fenotipik yöntemlerle belirlenen iMLS_B direnci sonuçları

S. aureus izolatlarının 43'ü (%84,3) S fenotipi, 2'si (%3,9) MS_B fenotipi, 3'ü (%5,89) iMLS_B fenotipi ve 3'ü (%5,89) cMLS_B fenotipi olarak belirlenmiştir. MRSA izolatlarının 10'u (%62,5) S fenotipi, 2'si (%12,5) MS_B fenotipi, 1'i (%6,3) iMLS_B fenotipi, 3'ü (%18,7) cMLS_B fenotipi olarak belirlenirken, MSSA izolatlarının 33'ü (%94,3) S fenotipi, 2'si (%5,71) iMLS_B fenotipi olarak belirlenmiştir. MS_B fenotipi ve cMLS_B fenotipi MSSA izolatlarında tespit edilmemiştir. İzole edilen *S. aureus* izolatlarının direnç fenotipleri Tablo 9'da gösterilmiştir.

S. aureus izolatlarında S tipi ve cMLS_B tipi direnç fenotiplerinde MRSA ve MSSA izolatları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p < 0,05$).

Diğer değişkenler açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. ($p > 0,05$)

Tablo 9. *S. aureus* izolatlarında D-test yöntemi kullanılarak belirlenen direnç fenotipleri

Direnç Fenotipi	MRSA=16	MSSA=35	Toplam=51	p
	n (%)	n (%)	n (%)	
S tipi	10(62,5)	33(94,3)	43(84,3)	0,008*
MS _B tipi	2(12,5)	0(0)	2(3,9)	0,094*
iMLS _B tipi	1(6,3)	2(5,7)	3(5,9)	1,000*
cMLS _B tipi	3(18,7)	0	3(5,9)	0,027*
L tipi	0(0)	0(0)	0(0)	-

*Fisher's Exact test

İzole edilen KNS izolatlarının 51'i (%19,8) S fenotipi, 69'u (%26,9) MS_B fenotipi, 73'ü (%28,4) iMLS_B fenotipi, 60'ı (%23,3) cMLS_B fenotipi ve 4'ü (%1,6) L fenotipi olarak belirlenmiştir. MRKNS izolatlarının 28'i (%13,5) S fenotipi, 51'i (%24,5) MS_B fenotipi, 70'i (%33,7) iMLS_B fenotipi, 55'i (%26,4) cMLS_B fenotipi, 4'ü (%1,9) L fenotipi olarak belirlenirken, MSKNS izolatlarının 24'ü (%49) S fenotipi, 18'i (%36,7) MS_B fenotipi, 2'si (%4) iMLS_B fenotipi, 5'i (%10,2) cMLS_B fenotipi olarak belirlenmiştir. İzole edilen KNS türlerinin direnç fenotipleri Tablo 10'da gösterilmiştir.

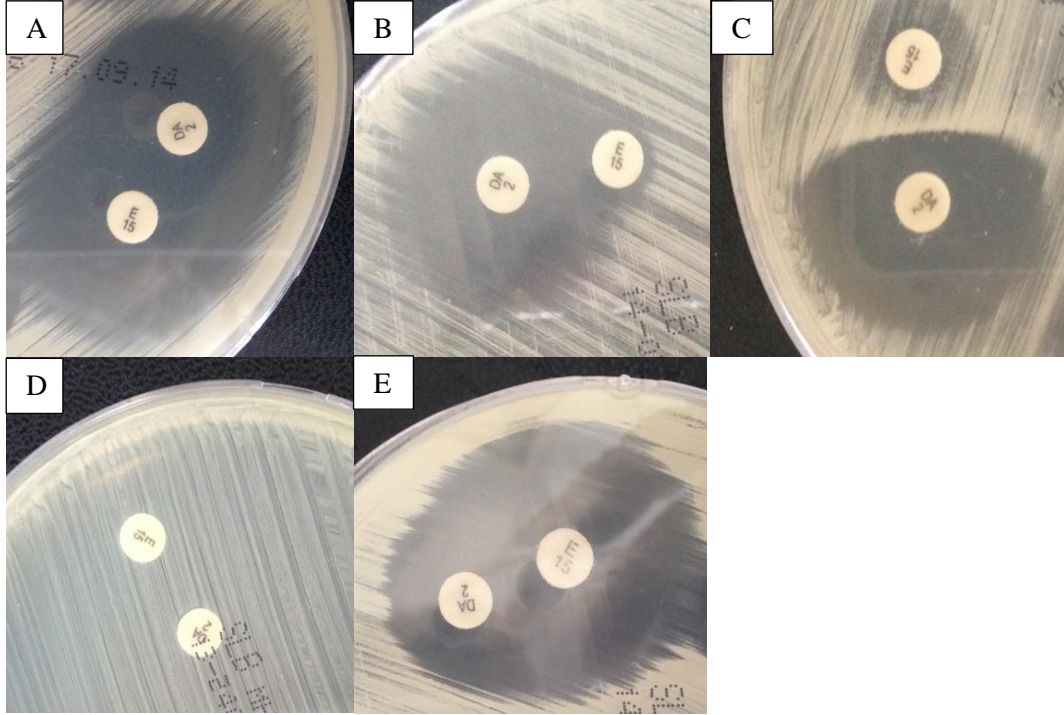
KNS izolatlarında S tipi, iMLS_B tipi ve cMLS_B tipi direnç fenotiplerinde MRKNS ve MSKNS izolatları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p < 0,05$).

Diğer değişkenler açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p > 0,05$).

Tablo 10. KNS izolatlarında D-test yöntemi kullanılarak belirlenen direnç fenotipleri

Direnç Fenotipi	MRKNS=208	MSKNS=49	Toplam=257	p
	n (%)	n (%)	n (%)	
S tipi	27(13)	24(49)	51(19,9)	<0,001*
MS _B tipi	51(24,5)	18(36,7)	69(26,9)	0,083*
iMLS _B tipi	71(34,2)	2(4,1)	73(28,4)	<0,001*
cMLS _B tipi	55(26,4)	5(10,2)	60(23,3)	0,016*
L tipi	4(1,9)	0(0)	4(1,5)	1,000**

*Pearson Chi-Square, **Fisher's Exact test



Şekil 7. D- test ile tespit edilen MLS_B direnç fenotipleri (A: Eritromisin ve klindamisin duyarlı S fenotip, B: Eritromisin dirençli, klindamisin duyarlı D-test negatif MS_B fenotip, C: Eritromisin dirençli, klindamisin duyarlı D-test pozitif indüklenebilir fenotip, D: Eritromisin ve klindamisin dirençli yapısal fenotip, E: Klindamisin dirençli, eritromisin duyarlı, L fenotip)

4.2. Moleküler yöntemlerle belirlenen $iMLS_B$ direnci sonuçları

Toplam 308 stafilokok izolatından çift disk difüzyon testi (D-test) yöntemi ile saptanan $iMLS_B$ fenotipi gösteren 76 (%25), $cMLS_B$ fenotipi gösteren 63 (%20,5), MS_B fenotipi gösteren 71 (%23) ve eritromisin duyarlı, klindamisin dirençli (L fenotipi) 4 (%1) izolatta *ermA*, *ermC*, *msrA* ve *msrB* genleri PCR yöntemiyle araştırılmıştır. Toplam 214 izolatta *ermA*, *ermC*, *msrA* ve *msrB* genlerinin tespiti için yapılan PCR sonrasında; 166 izolatta (%54) en az bir direnç geninin varlığı gösterildi. İzolatların 97'sinde (%31,5) tek gen saptanırken, 69 izolatta (%22,4) birden fazla gen tespit edildi. Toplam 84 (%39,3) izolatta *ermC*, 18 (%8,4) izolatta *ermA* geni, 67 (%31,3) izolatta *msrA* geni, 82 (%38,3) izolatta *msrB* geni tespit edildi.

MS_B fenotipi gösteren 71 (%100) izolatın 61 (%86)'inde en az bir direnç geni izlenmiştir. MS_B fenotipi gösteren 2 (%100) MRSA izolatında *msrA* ve *msrB* genleri

birlikte saptanmıştır, *ermA* ve *ermC* genleri saptanmamıştır. MS_B fenotipi gösteren MSSA izolatlarında direnç geni bulunmamıştır. MS_B fenotipi gösteren *S. aureus* izolatlarında en sık *msrA* ve *msrB* genleri saptanmıştır.

MS_B direnç fenotipi gösteren 69 (%100) KNS izolatından 1 (%1,4) MRKNS izolatında *ermA*, 1 (%1,4) MRKNS izolatında *ermC*, 1 (%1,4) MRKNS izolatında *msrA*, 3 (%4,3) MSKNS ve 7 (%10,1) MRKNS izolatında *msrB* genine tek başına rastlanmıştır. MRKNS izolatlarından 1'inde (%1,4) *ermA* ve *msrB* genlerine birlikte, 10 (%14,5) MSKNS ve 33 (%48) MRKNS izolatında *msrA* ve *msrB* genlerine birlikte, 1 (%1,4) MRKNS ve 1 (%1,4) MSKNS izolatında *ermC*, *msrA*, *msrB* genlerine birlikte rastlanmıştır. MSKNS izolatlarının 4'ünde (%5,8) ve MRKNS izolatlarının 6'sında (%8,7) hiçbir gen tespit edilmemiştir. MS_B fenotipi gösteren KNS izolatlarında en sık birlikte *msrA* ve *msrB* genleri saptanmıştır. MS_B fenotipi gösteren izolatlarda PCR ile tespit edilen gen bölgeleri Tablo 11'de gösterilmiştir.

Tablo 11. MS_B fenotipi gösteren izolatlarda PCR ile tespit edilen gen bölgeleri

Direnç geni	MSKNS	MRKNS	MSSA	MRSA	Toplam
<i>ermA</i>	0(0)	1(1,9)	0(0)	0(0)	1(1,4)
<i>ermC</i>	0(0)	1(1,9)	0(0)	0(0)	1(1,4)
<i>msrA</i>	0(0)	1(1,9)	0(0)	0(0)	1(1,4)
<i>msrB</i>	3(16,7)	7(13,8)	0(0)	0(0)	10(14)
<i>ermA+ermC</i>	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
<i>ermA+msrB</i>	0(0)	1(1,9)	0(0)	0(0)	1(1,4)
<i>msrA+msrB</i>	10(55,6)	33(64,8)	0(0)	2(100)	45(63,4)
<i>msrA+ermA+ermC</i>	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
<i>msrA+msrB+ermA</i>	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
<i>ermC+msrA+msrB</i>	1(5,5)	1(1,9)	0(0)	0(0)	2(3)
<i>msrA+msrB+ermA+ermC</i>	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
Hiçbirini taşımayanlar	4(22,2)	6(11,8)	0(0)	0(0)	10(14)
Toplam	18(100)	51(100)	0(0)	2(100)	71(100)

iMLS_B fenotipi gösteren 76(%100) izolattın 54 (%71)'ünde en az bir direnç geni izlenmiştir. iMLS_B fenotipi gösteren toplam 3 (%100) *S. aureus* izolatından 1 (%33,3) MSSA izolatında *ermA*, 1 (%33,3) MRSA izolatında *ermC* geni tek başına saptanmıştır, 1 (%33,3) MRSA izolatında hiç gen bulunmamıştır.

iMLS_B direnç fenotipi gösteren 73 (%100) KNS izolatından 1 (%1,4) MRKNS izolatında *ermA* geni, 1 (%1,4) MSKNS ve 42 (%59) MRKNS izolatında *ermC* geni, 2 (%2,8) MRKNS izolatında tek başına *msrB* geni saptanmıştır. iMLS_B fenotipindeki hiçbir izolatta tek başına *msrA* genine rastlanmamıştır. MRKNS izolatlarından 1'inde (%1,4) *ermA* ve *ermC* genlerine birlikte, MRKNS izolatlarından 5'inde (%7) *ermC*, *msrA* ve *msrB* genlerine birlikte rastlanmıştır. iMLS_B direnç fenotipi gösteren MSKNS izolatlarının 1'inde (%1,4) ve MRKNS izolatlarının 20'sinde (%28,2) hiçbir gen tespit edilmemiştir. iMLS_B direnç fenotipi gösteren KNS izolatlarında en sık *ermC* geni tespit edilmiştir. iMLS_B fenotipi gösteren izolatlarda PCR ile tespit edilen gen bölgeleri Tablo 12'de gösterilmiştir.

Tablo 12. iMLS_B fenotipi gösteren izolatlarda PCR ile tespit edilen gen bölgeleri

Direnç geni	MSKNS	MRKNS	MSSA	MRSA	Toplam
<i>ermA</i>	0(0)	1(1,4)	1(50)	0(0)	2(2,6)
<i>ermC</i>	1(50)	42(59,2)	0(0)	1(100)	44(57,9)
<i>msrA</i>	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
<i>msrB</i>	0(0)	2(2,8)	0(0)	0(0)	2(2,6)
<i>ermA+ermC</i>	0(0)	1(1,4)	0(0)	0(0)	1(1,3)
<i>ermA+msrB</i>	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
<i>msrA+msrB</i>	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
<i>msrA+ermA+ermC</i>	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
<i>msrA+msrB+ermA</i>	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
<i>ermC+msrA+msrB</i>	0(0)	5(7,0)	0(0)	0(0)	5(6,6)
<i>msrA+msrB+ermA+ermC</i>	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
Hiçbirini taşımayanlar	1(50)	20(28,2)	1(50)	0(0)	22(29)
Toplam	2(100)	71(100)	2(100)	1(100)	76(100)

cMLS_B direnç fenotipi gösteren 63(%100) izolatın 50 (%79,4)'sinde en az bir direnç geni izlenmiştir. cMLS_B fenotipi gösteren toplam 3 (%100) *S. aureus* izolatından 1 (%33,3) MRSA izolatında tek başına *ermC*, 1 (%33,3) MRSA izolatında *ermA* ve *ermC* geni birlikte, 1 (%33,3) MRSA izolatında *ermC*, *msrA* ve *msrB* genleri birlikte saptanmıştır.

cMLS_B direnç fenotipi gösteren 60 (%100) KNS izolatından 12 (%21,1) MRKNS izolatında *ermA* geni, 1 (%33,3) MSKNS ve 17 (%29,8) MRKNS izolatında *ermC* geni, 1 (%1,8) MRKNS izolatında *msrA* geni, 2 (%3,5) MRKNS izolatında tek başına *msrB* geni saptanmıştır. MRKNS izolatlarından 2'sinde (%3,5) *ermC* ve *msrB* genlerine birlikte, MSKNS izolatlarından 1'inde (%33,3), MRKNS izolatlarından 4'sinde (%7) *msrA* ve *msrB* genlerine birlikte rastlanmıştır. MSKNS izolatlarından 1'inde (%33,3), MRKNS izolatlarından 6'sında (%10,5) *ermC*, *msrA* ve *msrB* genlerine birlikte rastlanmıştır. cMLS_B direnç fenotipi gösteren MRKNS izolatlarının 13'ünde (%22,8) hiçbir gen tespit edilmemiştir. cMLS_B direnç fenotipi gösteren KNS izolatlarında en sık *ermC* geni tespit edilmiştir. cMLS_B direnç fenotipi gösteren izolatlarda PCR ile tespit edilen gen bölgeleri Tablo 13'te gösterilmiştir.

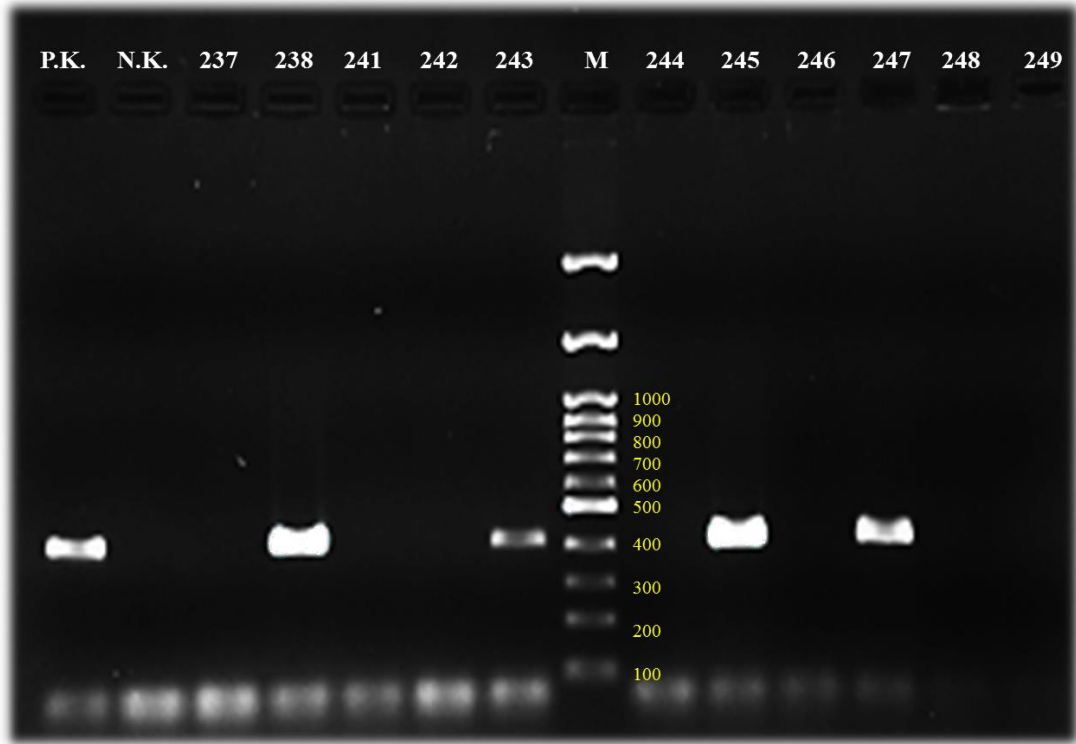
Tablo 13. cMLS_B fenotipi gösteren izolatlarda PCR ile tespit edilen gen bölgeleri

Direnç geni	MSKNS	MRKNS	MSSA	MRSA	Toplam
<i>ermA</i>	0(0)	12(21,1)	0(0)	0(0)	12(19)
<i>ermC</i>	1(33,3)	17(29,8)	0(0)	1(33,3)	19(30,2)
<i>msrA</i>	0(0)	1(1,8)	0(0)	0(0)	1(1,6)
<i>msrB</i>	0(0)	2(3,5)	0(0)	0(0)	2(3,2)
<i>ermA+ermC</i>	0(0)	0(0)	0(0)	1(33,3)	1(1,6)
<i>ermC+msrB</i>	0(0)	2(3,5)	0(0)	0(0)	2(3,2)
<i>msrA+msrB</i>	1(33,3)	4(7)	0(0)	0(0)	5(7,9)
<i>msrA+ermA+ermC</i>	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
<i>msrA+msrB+ermA</i>	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
<i>ermC+msrA+msrB</i>	1(33,3)	6(10,5)	0(0)	1(33,3)	8(12,7)
<i>msrA+msrB+ermA+ermC</i>	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
Hiçbirini taşımayanlar	0(0)	13(22,8)	0(0)	0(0)	13(20,6)
Toplam	3(100)	57(100)	0(0)	3(100)	63(100)

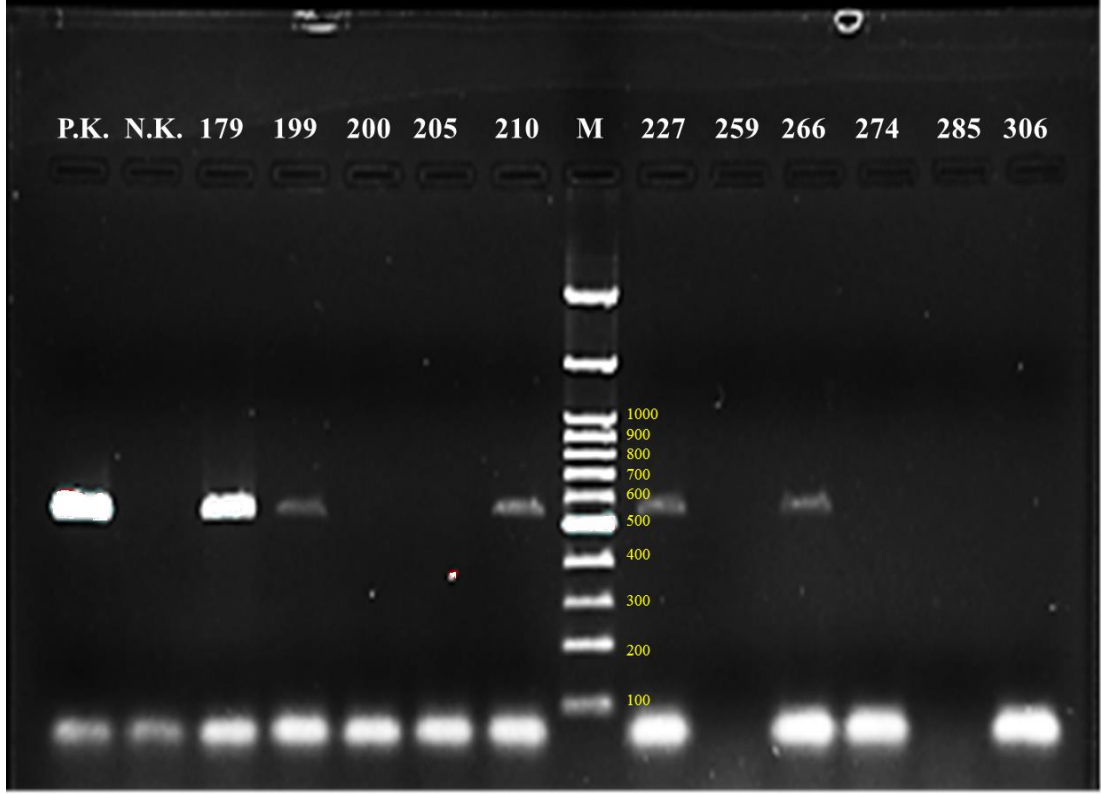
L fenotipi gösteren 4 (%100) MRKNS izolatından 1 (%25)'inde sadece *ermC* geni izlenmiştir. Diğer 3 izolatta hiç gen bulunmamıştır.

Direnç genleri pozitif bulunan izolatların, jel görüntüleme sistemi (BIO RAD Gel İmaging Device, USA) ile 302 nm dalga boyundaki ultraviyole ışığı altında görüntüleri şekil 8, şekil 9, şekil 10, şekil 11 gösterilmiştir.

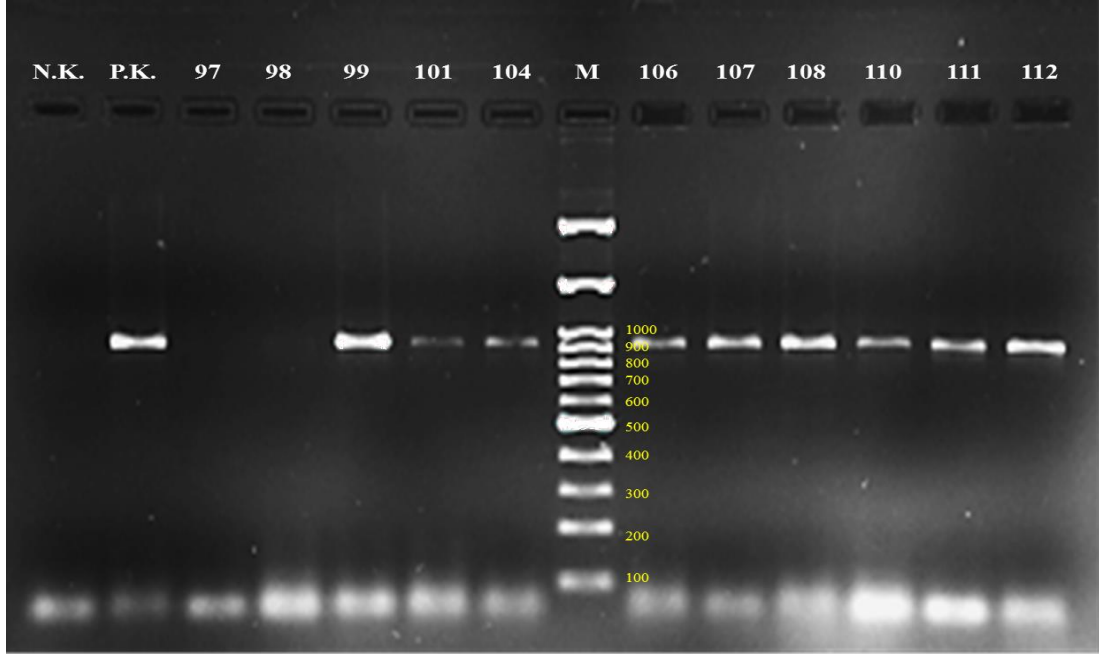
Şekil 8. *ermA* geninde direnç ile ilişkili 421 bp'lik gen bölgesinin agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: 100 bp'lik Marker, PK: Pozitif kontrol, NK: Negatif kontrol, 238, 243, 245, 247 nolu izolatlar *ermA* geni pozitif)



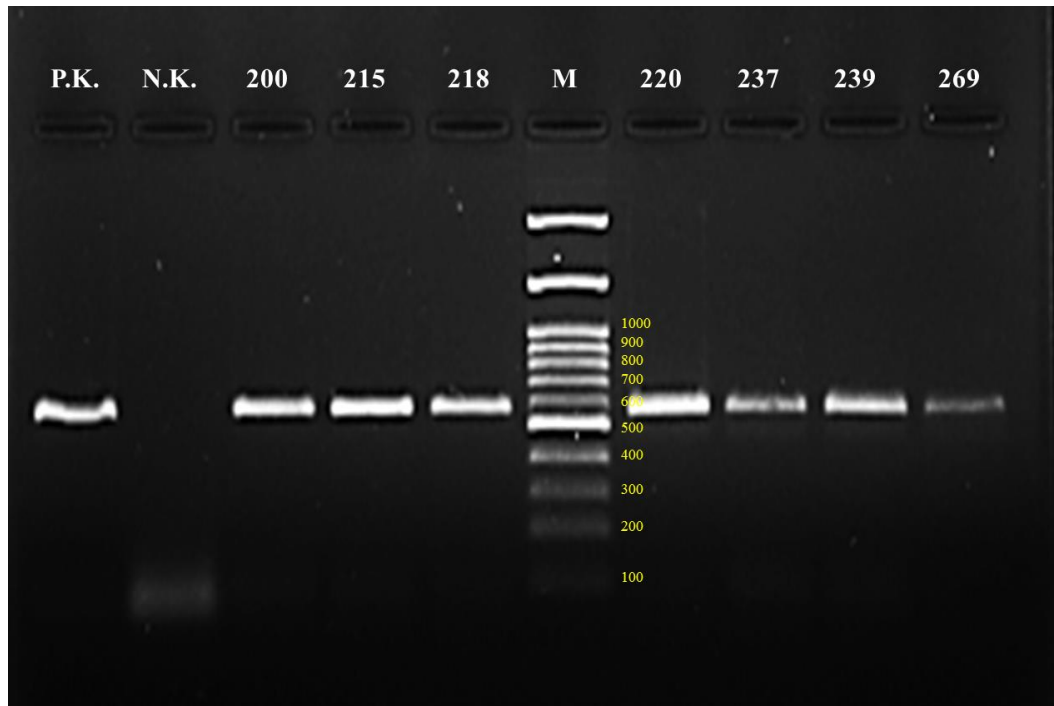
Şekil 9. *ermC* geninde direnç ile ilişkili 572 bp'lik gen bölgesinin agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: 100 bp'lik Marker, PK: Pozitif kontrol, NK: Negatif kontrol, 179, 199, 210, 227, 266 nolu izolatlar *ermC* geni pozitif)



Şekil 10. *msrA* geninde direnç ile ilişkili 940 bp'lik gen bölgesinin agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: 100 bp'lik Marker, PK: Pozitif kontrol, NK: Negatif kontrol, 99, 101, 104, 106, 107, 108, 110, 111, 112 nolu izolatlar *msrA* geni pozitif)



Şekil 11 *msrB* geninde direnç ile ilişkili 595bp'lik gen bölgesinin agaroz jel elektroforez görüntüsü (M: 100 bp'lik Marker, PK: Pozitif kontrol, NK: Negatif kontrol, 200, 215, 218, 220, 237, 239, 269 nolu *msrB* geni pozitif)



5. TARTIŞMA

Stafilokoklar tüm dünyada yüksek oranda morbidite ve mortaliteye neden olan, hastane ve toplum kaynaklı birçok enfeksiyonun etkenidirler. Başta *S. epidermidis* olmak üzere KNS'ler tedavi amaçlı santral kateter, kalp kapağı, eklem protezi gibi yabancı cisim kullanımı arttığı için önemli hastalık etkenlerinden biri haline gelmiştir [122, 123]. Penisilinlerin 1940'larda kullanıma girmesiyle stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde önemli bir aşama kaydedilmiş, ancak kısa bir süre sonra penisilnaz üreten suşların ortaya çıkmasıyla direnç problemi ortaya çıkmıştır [124]. Beta-laktamaza dayanıklı bir antibiyotik olan metisiline dirençli *S. aureus* izolatları ilk olarak 1961 yılında bildirilmiş ve sonrasında MRSA ülkemizde de hastane enfeksiyonu etkenleri içinde ilk sıralarda yer almış ve yıllar içinde görülme sıklığında artış saptanmıştır [125].

Çalışmamıza dahil edilen *S. aureus* izolatlarının 35'i (%69) MSSA, 16'sı (%31) MRSA, KNS izolatlarının, 49'u (%19) MSKNS, 208'i (%81) MRKNS olarak bulunmuştur.

Ülkemizde yapılan çalışmalarda Avkan Oğuz ve arkadaşları 184'ü *S. aureus*, 102'si KNS olmak üzere 286 izolatın dahil edildiği çalışmada *S. aureus* izolatlarının 82 (% 44.6)'sinin ve KNS izolatlarının 73'ünün (%71.6) metisiline dirençli olduğunu saptamışlardır. [126].

Isparta'da Çetin ve arkadaşları yaptıkları çalışmada 532 stafilokok izolatından *S.aureus* olanların 101'ini (% 63) MSSA, 59'unu (%37) MRSA, KNS izolatlarının 172'sini (%46) MSKNS, 200'ünü (%54) MRKNS olarak tespit etmişlerdir. [127].

Gönüllü ve arkadaşları İstanbul'da yaptıkları çalışmada 436 stafilokok izolatından *S.aureus* olanların 166'sını (%62) MSSA ve 103'ünü (%38) MRSA, KNS izolatlarının 69'unu (%42) MSKNS ve 98'ini (%58) MRKNS olarak bulmuşlardır. [128].

Yaşar ve arkadaşları İstanbul'da 35'i *Staphylococcus aureus* ve 65'i KNS olmak üzere, toplam 100 stafilok izolatını araştırdığı çalışmada, *S.aureus* izolatlarının 21'ini (%60) MSSA, 14'ünü (%40) MRSA; KNS izolatlarının 24'ünü (%37) MSKNS, 41'ini (%63) MRKNS olarak bulmuşlardır. [129].

Ekşi ve arkadaşları Gaziantep'de yaptığı 201 *S. aureus* izolatını içeren çalışmalarında 101 (%50,2) izolatı MRSA, 100 izolatı (%49,8) MSSA olarak

tanımlamışlardır. *S. aureus* izolatları arasında metisilin direncini yüksek bulmuşlardır. [130].

Gündüz ve arkadaşları 2012 yılında yaptıkları 306 stafilokok izolatını içeren bir çalışmada, 177 *S. aureus* izolatının 124'ünü (% 70) MSSA olarak, 53'ünü (% 30) MRSA; KNS izolatlarının ve 8'ini (% 6) MSKNS, 121'ini (% 94) MRKNS olarak bulmuşlardır. [131].

Tekin ve arkadaşları Diyarbakır'da yaptıkları çalışmada 254 *S. aureus* izolatının 139'unu (% 54.7) MSSA, 115'ini (45.3%) MRSA olarak bulmuşlardır. [132].

Seifi ve arkadaşları 2012 yılında yaptıkları 211 *S. aureus* izolatını içeren çalışmada izolatların 88'ini (%42) MRSA, 123'ünü MSSA (% 58) olarak saptamışlardır. [133].

Çalışmamız hem KNS hem de *S. aureus* izolatlarındaki metisilin direnci açısından diğer çalışmalarla uyumlu bulunmuştur. Ekşi ve arkadaşları bizim çalışmamız ve diğer çalışmalardan farklı olarak *S. aureus* izolatlarında metisilin direncini yüksek saptamışlardır. Bizim çalışmamızda olduğu gibi Gündüz ve arkadaşları KNS izolatlarında metisilin direncini daha yüksek saptamışlardır. KNS izolatlarındaki yüksek metisilin direncine, üçüncü basamak olan hastanemizdeki geniş spektrumlu antibiyotik kullanımının neden olabileceği düşünülmüştür. Hastanemizde MRSA oranlarının MSSA oranlarına göre daha düşük olması, bilinçli antibiyotik kullanımının bir sonucu olabileceği gibi, çalışılan *S. aureus* izolatlarının sayısının az olmasına bağlı olabileceği de düşünülmüştür.

Çalışmamızda izolatların izole edildiği hastaların yaş dağılımları incelendiğinde 61-70 yaş aralığında 73 (%23.7) hasta, 51-60 yaş aralığında 66 (%21,4) hasta, 71-80 yaş aralığında 57 (%18,5) hasta saptanmıştır. Hastanemizde pediatri servisi bulunmadığı için <20 yaş aralığında sadece 5 (%1,6) hasta saptanmıştır.

Çalışmamıza dahil edilen 308 stafilokok izolatında disk difüzyon yöntemiyle eritromisin, klindamisin, Q/D, telitromisin, vankomisin, teikoplanin, linezolid, gentamisin, fusidik asid duyarlılıkları çalışılmıştır. MSSA ve MRSA izolatları sırasıyla eritromisine %5,7 ve %37,5, klindamisine %0 ve %18,8, telitromisine %2,9 ve %25 dirençli bulunmuştur. *S. aureus* izolatlarının hepsi Q/D duyarlı bulunmuştur.

MSKNS ve MRKNS izolatları sırasıyla eritromisine %51 ve %85, klindamisine %10 ve %34, telitromisine %6 ve %23,5, Q/D %4 ve %12,5 dirençli saptanmıştır. Özellikle MRSA izolatlarının oluşturduğu ciddi enfeksiyonların tedavisinde vazgeçilmez diğer bir antibiyotik grubu glikopeptidlerdir. *S. aureus* izolatlarının hepsi vankomisin ve linezolide duyarlı saptanmıştır. MSSA ve MRSA izolatları sırasıyla teikoplanine %0 ve %6,3, MSKNS ve MRKNS izolatları sırasıyla teikoplanine %2 ve %6,2, linezolide %0 ve %6,3 dirençli saptanmıştır. KNS izolatlarının hepsi vankomisine duyarlı bulunmuştur. *S. aureus* izolatlarında glikopeptidlere karşı ülkemizde yapılan çalışmalarda direnç bildirilmemiştir [134]. MSSA ve MRSA izolatları sırasıyla gentamisine %2,9 ve %37,5; fusidik aside %0 ve %43,8 dirençli; MSKNS ve MRKNS izolatları sırasıyla gentamisine %4 ve %54,3, fusidik aside %46,9 ve %81,7 dirençli saptanmıştır.

Stafilokok kaynaklı enfeksiyonlarda tedavi alternatiflerinden biri olan makrolidler, düşük yan etkiye sahip olmaları, geniş spektrumları, yüksek doku ve serum düzeyine ulaşmaları ile stafilokok enfeksiyonlarında tercih edilmektedir. Ancak 1980'lerden bu yana makrolidlerin yaygın ve uygunsuz kullanımı dirençli stafilokokların tüm dünyada hızla artmasına sebep olmuştur. MLS_B grubu antibiyotikler içinde yer alan klindamisin özellikle deri, yumuşak doku, kemik ve intra-abdominal enfeksiyonların tedavisinde sık kullanılan, oral ve intra venöz formları bulunan ve böbrek yetmezliğinde doz ayarlaması gerektirmeyen, penisilin alerjisi olan hastalarda tercih edilen bir antibiyotiktir. Ayrıca MRSA suşlarındaki Panton-Valentin lökositini ve enterotoksin gibi diğer virülans faktörlerini baskılayabilmesi klindamisini avantajlı kılmaktadır. [13, 123, 135, 136]. MLS_B grubu antibiyotiklere direnç gelişmesi nedeniyle bu ilaçların yeni türevleri geliştirilmiştir. Ketolidler, eritromisinin yarı-sentetik türevleri olup, yeni geliştirilen bu antibiyotik grubunun ilk üyesi telitromisindir. Bu iki antibiyotik grubu arasındaki bazı yapısal farklar nedeniyle ketolidler, 23S rRNA'nın V. kangalının yanı sıra II. kangalına da bağlanırlar. Bu özellik ketolidlerin, eritromisine dirençli gram-pozitif mikroorganizmalar da dahil olmak üzere pek çok patojene karşı daha etkili olmasını sağlamaktadır [137].

Metisiline dirençli suşlar; genetik direnç aktarımı sırasında diğer antibiyotik direnç genlerinin de beraber aktarımı nedeniyle çoğunlukla makrolidler,

aminoglikozitler, klindamisin, florokinolon, ko-trimoksazol gibi birçok antibiyotiğe de dirençlidirler [138].

Yılmaz ve arkadaşları *S. aureus* 'larda makrolid direncini %12.6, KNS'lerde %18.3 saptamış, Çetin ve arkadaşları makrolid direncininin %44.4 oranı ile KNS'lerde daha sık görüldüğünü saptamıştır [115, 127]. Bizim çalışmamızda özellikle eritromisin direnci daha yüksek saptanmıştır. Bu sonucun üçüncü basamak olan hastanemizdeki geniş spektrumlu antibiyotik kullanımına bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Sarıbaş ve arkadaşları; eritromisin direncini sırasıyla *S. aureus* izolatlarında %29.4 ve KNS izolatlarında %61.7 oranında bulmuşlardır. Yapısal MLS_B direnç fenotipi gösteren izolatların hepsini telitromisine dirençli bulmuşlardır. MLS_B dirençli bakteriyel enfeksiyonların tedavisi için önerilen bir antibiyotik olan telitromisinin, indüklenebilir dirence benzer direnç fenotipi gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Diğer merkezlerde de telitromisin direnç paternlerinin belirlenmesi ve bu bulgunun klinik öneminin araştırılmasının yararlı olacağını tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da telitromisin yapısal dirençli izolatların çoğunluğunda (%84) dirençli bulunmuştur. [137].

Ekşi ve arkadaşları 201 *S. aureus* izolatının hepsini vankomisin, teikoplanin, Q/D ve linezolid duyarlı olarak saptamıştır. Bizim çalışmamızda da benzer olarak *S. aureus* izolatlarının hepsi vankomisin, Q/D ve linezolid duyarlı saptanmıştır. [130].

Gül ve arkadaşları 265 MRSA'da cMLS_B fenotipi gösteren izolatların %2.7'sinde Q/D direnci saptamışlardır. Bizim çalışmamızda MRSA izolatlarının hiçbirinde Q/D direnci saptanmamıştır [139].

Doğruman Al ve arkadaşları MSKNS ve MRKNS izolatlarında sırasıyla fusidik asit direncini %11 ve %39; gentamisin direncini %55 ve %48 olarak bulmuşlardır [140].

Kişioğlu ve arkadaşları MRSA ve MSSA izolatlarında fusidik asit direncini sırasıyla %21,8 ve %10,4; gentamisin direncini %93,8 ve %3,5 saptamıştır [141]. Çetin ve arkadaşları MSSA izolatlarının hepsini fusidik aside duyarlı saptamışlar, MRSA izolatlarında fusidik asid direncini %11,9, MSKNS izolatlarında %16,9, MRKNS izolatlarında %43 bulmuşlardır [127]. Bizim çalışmamızda benzer olarak

MSSA izolatlarının hepsi fusidik aside duyarlı bulunmuştur. MRSA, MSKNS ve MRKNS'lerde fusidik asid direnci daha yüksek saptanmıştır. Bu durum MSSA dışındaki stafilokoklarda fusidik asid kullanımında dikkatli olunması gerektiğini düşündürmüştür.

Çalışmamızdaki izolatların antibiyotik direnç oranları diğer çalışmalardaki kadar yüksek saptanmamıştır. Bu da bize hastanemizin antibiyotik kullanım politikalarını düzgün uyguladığını göstermiştir. Bu sonuçlar çalışmamızla büyük oranda benzerlik göstermektedir. Mikroorganizmaların antibiyotiklere dirençlilik özellikleri bölgelere ve hastanelere göre farklılık göstermektedir. Direncin izlenmesi ampirik tedaviye yol gösterici olacaktır.

Bizim çalışmamızda 308 stafilokok izolatına D-test yöntemi uygulanmıştır. *S. aureus* izolatlarının 43'ü (%84,3) S fenotipi, 2'si (%3,9) MS_B fenotipi, 3'ü (%5,9) iMLS_B fenotipi ve 3'ü (%5,9) cMLS_B fenotipi olarak belirlenmiştir. MRSA izolatlarının 10'u (%62,5) S fenotipi, 2'si (%12,5) MS_B fenotipi, 1'i (%6,3) iMLS_B fenotipi, 3'ü (%18,7) cMLS_B fenotipi olarak, MSSA izolatlarının 33'ü (%94,3) S fenotipi, 2'si (%5,71) iMLS_B fenotipi olarak belirlenmiştir. MS_B fenotipi ve cMLS_B fenotipi MSSA izolatlarında tespit edilmemiştir. İzole edilen KNS izolatlarının 51'i (%19,8) S fenotipi, 69'u (%26,9) MS_B fenotipi, 73'ü (%28,4) iMLS_B fenotipi, 60'ı (%23,3) cMLS_B fenotipi ve 4'ü (%1,6) L fenotipi olarak belirlenmiştir. MRKNS izolatlarının 27'si (%13) S fenotipi, 51'i (%24,5) MS_B fenotipi, 71'i (%34) iMLS_B fenotipi, 55'i (%26,4) cMLS_B fenotipi, 4'ü (%1,9) L fenotipi olarak belirlenirken, MSKNS izolatlarının 24'ü (%49) S fenotipi, 18'i (%36,7) MS_B fenotipi, 2'si (%4) iMLS_B fenotipi, 5'i (%10,2) cMLS_B fenotipi olarak belirlenmiştir. Tüm stafilokok izolatlarında %30,5 oranında en sık S fenotipi (94/308) saptanmıştır. KNS izolatlarında en sık iMLS_B fenotipi, *S. aureus* izolatlarında en sık S fenotipi saptanmıştır. Çalışmamızda klinik örneklerden izole edilen tüm stafilokoklarda indüklenebilir klindamisin direnç prevalansı %24,6 olarak bulunmuştur.

MLS_B grubu antibiyotikler farklı kimyasal yapıya sahip olmakla birlikte benzer bir mekanizmayla etkilerini gösterirler. MLS_B grubu antibiyotiklerin bakteri ribozomundaki bağlanma bölgeleri örtüştüğü için çapraz direnç gelişimi önemli bir sorundur [13, 127]. Bu yüzden duyarlılık testlerinin doğru bir yöntemle uygulanması

ve doğru yorumlanması için Fiebelkorn ve arkadaşları 2003 yılında yaptıkları çalışma ile eritromisine dirençli *S. aureus* ve KNS'lerde indüklenebilir klindamisin direncini tespit etmek için basit ve rutin laboratuvarlarda kolayca uygulanabilen çift disk difüzyon testini (D-test) geliştirmişlerdir. Bu yöntemde; 15µg eritromisin diskinden 15-26 mm'lik mesafelere yerleştirilen 2µg klindamisin diskinin inhibisyon zonunun eritromisin diskine bakan tarafında düzleşme olması indüklenebilir klindamisin direncini göstermektedir. D-test ile iMLS_B, cMLS_B ve MS_B direnç fenotipleri belirlenebileceğini bildirmişlerdir. Yapısal direnç disk difüzyon testiyle rahatlıkla gözlemlenirken, indüklenebilir klindamisin direnci standart antibiyotik duyarlılık testleri (disk difüzyon, sıvı dilüsyon veya E test) ile saptanamamaktadır [9, 100]. Yapısal MLS_B dirençli (cMLS_B) izolatlar bu gruptaki antibiyotiklerin tümüne dirençli iken, indüklenebilir dirençli (iMLS_B) izolatlar linkozamid ve streptogramin B'ye duyarlı, ancak makrolidlere dirençli görülmektedir [9]. Klindamisin ile tedavide dikkat edilmesi gereken nokta iMLS_B direncidir. iMLS_B direncine sahip stafilokok enfeksiyonlarında klindamisin kullanımı ile klinik başarı ve başarısızlıklar bildirilmiştir. Linkozamid tedavisi sırasında duyarlı izolatların yok edilmesi ile yapısal dirençli izolatlar seleksiyona uğramaktadır. En iyi seçim şiddetli enfeksiyonlarda linkomisin kullanımından kaçınmaktır [13]. CLSI, indüklenebilir klindamisin direncinin saptanması için D-test yönteminin uygulanmasını tavsiye etmektedir [116].

Schreckenberger ve arkadaşları iki farklı hastanede yaptıkları çalışmada %76 ve %61, Seifi ve arkadaşları %73.9, Juyal ve arkadaşları %56.7, Ekşi ve arkadaşları %87, Yılmaz ve arkadaşları %77,1 oranında MSSA izolatlarında ise en sık S fenotipini saptamışlardır [115, 130, 133, 142, 143]. Bizim çalışmamızda da benzer olarak %94,3 oranında MSSA izolatlarında ise en sık S fenotipi saptanmıştır. Bu sonuç hastanemize başvuran bu hastalarda MLS_B grubu antibiyotiklerin bilinçsizce kullanılmadığını göstermiştir. Aynı zamanda çalışmamızda MSKNS izolatlarında da S fenotipi yüksek saptanmıştır.

Çalışmamızda 257 KNS izolatının 69 (%26,9)'unda MS_B direnç fenotipi bulunmuştur. Sarıbaş ve arkadaşları 58 KNS izolatında ise %24.1 oranında MS_B direnci tespit etmişlerdir, Gönüllü ve arkadaşları 167 KNS izolatında MS_B fenotipini %17.4, Aktaş ve arkadaşları 78 KNS izolatında MS_B fenotipini %21.8 oranında

bulmuşlardır [128, 137, 144]. Gönüllü ve arkadaşları MS_B fenotipini, KNS izolatlarında (%17.4), *S. aureus* izolatlarına (%6) göre daha sık bulmuştur. Yılmaz ve arkadaşları da 804 KNS izolatında MS_B fenotipini (%14), *S. aureus* izolatlarına (%4) göre daha sık bulmuştur [115, 128]. Bizim çalışmamızda da benzer olarak MS_B fenotipi KNS izolatlarında (%26,9) *S. aureus* izolatlarından (%3,9) daha yüksek oranda saptanmıştır. Çolakoğlu ve arkadaşları da çalışmamızla uyumlu olarak MS_B fenotipi prevalansını *S. aureus* izolatları için %5.9 oranında saptamıştır [100].

Dünya genelinde indüklenebilir klindamisin direnç prevalansı %3,6 ile %94 arasında değişmekte, ülkeden ülkeye, hatta aynı ülkede merkezler arasında bile farklılık gösterebilmektedir [100, 142, 145]. Çalışmamızda klinik örneklerden izole edilen *S. aureus* izolatlarında indüklenebilir klindamisin direnç prevalansı %5,9 oranında saptanmıştır. *S.aureus* izolatları için iMLS_B prevalansını Çolakoğlu ve arkadaşları %19.4, Avkan Oğuz ve arkadaşları %7.1, Çetin ve arkadaşları %15, Aktaş ve arkadaşları %20,8, Gönüllü ve arkadaşları %11.9, Yılmaz ve arkadaşları %20, Dizbay ve arkadaşları %6.8, Juyal ve arkadaşları %7,9 oranında saptamışlardır [100, 115, 126, 128, 143, 144, 146, 147].

Schreckenberger ve arkadaşları Amerika'da aynı şehirde bulunan iki farklı hastanede *S.aureus* izolatlarında iMLS_B prevalansını %16,8 ve %14,5 KNS izolatlarında iMLS_B prevalansını %35,4 ve %13,5 oranında bulmuşlardır [142].

Dinç ve arkadaşları 211 MRSA izolatı ile yaptıkları çalışmada iMLS_B prevalansını %83.9 oranında saptamış, bu çalışmadaki yüksek oran MRSA izolatlarında diğer antibiyotiklere de yüksek oranda direnç görülmesine bağlı olabileceğini akla getirmiştir [148].

Çalışmamızda klinik örneklerden izole edilen KNS izolatlarında indüklenebilir klindamisin direnç prevalansı %28,4 oranında saptanmıştır. KNS izolatlarında iMLS_B fenotipini Yılmaz ve arkadaşları %24,3, Avkan Oğuz ve arkadaşları %34.3, Çetin ve arkadaşları %13,4, Aktaş ve arkadaşları %20.5, Gönüllü ve arkadaşları %11,4, Dizbay ve arkadaşları %14,1, Juyal ve arkadaşları %19,4 oranında saptamışlardır [115, 126, 128, 143, 144, 146, 147].

Çalışmamızda klinik örneklerden izole edilen KNS izolatlarında cMLS_B direnç prevalansı %23,3 oranında saptanmıştır. KNS izolatlarında cMLS_B fenotipini

Çetin ve arkadaşları %30,9, Aktaş ve arkadaşları %57,7, Gönüllü ve arkadaşları %26,3, Schreckenberger ve arkadaşları iki farklı hastanede yaptıkları çalışmada %37,4 ve %25,8 oranında saptamıştır [128, 142, 144, 147]. Çalışmamız diğer çalışmalarla uyumlu bulunmuştur fakat Aktaş ve arkadaşları yüksek oranda ve en sık cMLS_B fenotipini saptamışlardır. Aktaş ve arkadaşlarının bulduğu sonuç bize klindamisinin bu hastanede kullanım oranının yüksek olabileceğini düşündürmüştür.

Bizim hastanemizde KNS izolatlarında en sık iMLS_B fenotipi saptanmıştır, bu da bize hastanemizde indüklenabilir klindamisin direncinden dolayı klindamisin kullanımından kaçınıldığını düşündürmüştür.

MRSA izolatlarında diğer çalışmalara bakıldığında cMLS_B fenotipi daha sık saptanmasına rağmen, çalışmamızda farklı olarak S fenotipi daha sık saptanmıştır. Bunun nedeninin çalışmadaki numune sayısının az olmasına bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Bizim çalışmamızda KNS izolatlarında en sık iMLS_B fenotipi, *S. aureus* izolatlarında en sık S fenotipi saptanmıştır. KNS izolatlarında metisilin dirençli olanlarda üç direnç fenotipi de birbirine benzer oranlarda metisilin duyarlı olanlara göre daha yüksek bulunmuştur. Bütün çalışmalara bakıldığında bu farklı sonuçlar, ülkelere, bölgelere göre ve hatta her hastanenin florasının ve izole edilen bakteri türlerinin farklı olmasına bağlı MLS_B direnç paterninin değişebileceğini desteklemiştir. Aynı zamanda bu sonuç hastaneler arasındaki antibiyotik kullanım politikalarının farklı olmasından dolayı ve çalışmalarda ki numune sayısının farklılığı ile de ilişkilendirilebilir.

Çalışmamızda D-test yöntemi ile saptanan iMLS_B fenotipi gösteren 76 (%25), cMLS_B fenotipi gösteren 63 (%20,5), MS_B fenotipi gösteren 71 (%23) ve eritromisin duyarlı, klindamisin dirençli (L fenotipi) 4 (%1) izolatta *ermA*, *ermC*, *msrA* ve *msrB* genleri in-house PCR yöntemiyle araştırılmıştır. iMLS_B fenotipi gösteren 3 *S. aureus* izolatının 1'inde (%33,3) *ermA*, 1'inde (%33,3) *ermC* geni saptanmış, 1'inde (%33,3) hiçbir gen saptanmamıştır. iMLS_B fenotipi gösteren 73 KNS izolatının 2'sinde (%2,7) *ermA*, 49'unda (%67,1) *ermC*, 5'inde (%6,8) *msrA*, 7'sinde (%9,6) *msrB*, 1 izolatta (%1,3) *ermA* ve *ermC*, 5 izolatta (%6,8) *ermC*, *msrA* ve *msrB* birarada saptanmış, 21 izolatta (%28,7) hiçbir gen saptanmamıştır. cMLS_B fenotipi

gösteren 3 *S. aureus* izolatının 1'inde (%33,3) *ermC*, 1'inde (%33,3) *ermA* ve *ermC*, 1'inde (%33,3) *ermC*, *msrA* ve *msrB* genleri birarada saptanmıştır. cMLS_B fenotipi gösteren 60 KNS izolatının 12'sinde (%20) *ermA*, 27'sinde (%45) *ermC*, 12'sinde (%20) *msrA*, 16'sında (%26,6) *msrB*, 2'sinde (%3,3) *ermC* ve *msrB*, 5'inde (%8,3) *msrA* ve *msrB*, 7'sinde (%11,6) *ermC*, *msrA* ve *msrB* genleri birarada, 13 izolatta (%21,6) hiçbir gen saptanmamıştır. MS_B fenotipi gösteren 2 *S. aureus* izolatının 2'sinde (%100) de *msrA* ve *msrB* genleri birarada saptanmış, *ermA* ve *ermC* genleri saptanmamıştır. MS_B fenotipi gösteren 69 KNS izolatının 2'sinde (%2,9) *ermA*, 3'ünde (%4,3) *ermC*, 46'sında (%66,6) *msrA*, 55'inde (%79,7) *msrB*, 43 izolatta (%62,3) *msrA* ve *msrB*, 1 izolatta (%1,4) *ermA* ve *msrB*, 2 izolatta (%2,9) *ermC*, *msrA* ve *msrB* genleri birarada saptanmış, 10 izolatta (%14,5) hiçbir gen saptanmamıştır. KNS izolatlarında %38,8 ile en sık *ermC* geni, *S. aureus* izolatlarında da % 50 ile en sık *ermC* geni saptanmıştır.

MLS_B grubu antibiyotiklere direnç genellikle hedef bölgenin modifikasyonu, ilacın inaktivasyonu veya efluks (dışa atım) mekanizmaları aracılığıyla gelişir [147]. Stafilokok türlerinde klindamisine karşı dirence yol açan en önemli mekanizma *erm* geni ile kodlanan 23S rRNA metilaz aracılı ribozomal modifikasyondur. Stafilokoklarda metilaz enzimi en sık *ermA* ve *ermC* genleri tarafından kodlanır. Makrolid ve streptogramin B (MS_B fenotipi) direncine neden olan aktif atım pompalarını kodlayan *msrA* ve *msrB* genleri de tanımlanmıştır [89, 149, 150]. Ülkemizde MLS_B direnci ile ilgili az sayıda genotipik çalışma mevcuttur.

Çetin ve arkadaşları eritromisine dirençli 301 stafilokok izolatında *S. aureus* izolatlarında %62 oranında en sık *ermA* ve KNS izolatlarında %30 oranında en sık *ermC* genini, Aktaş ve arkadaşları 78 KNS ve 24 *S. aureus* izolatında sırasıyla %78.2 ve %62,5 oranında en sık olarak *ermC* genini saptamışlardır [144, 151]. Sarıbaş ve arkadaşları 112 *S. aureus* izolatında %76,7 oranında en sık *ermA*, 58 KNS izolatında %63,7 oranında en sık *ermC* genini ve Gatermann ve arkadaşları da Almanya'da 305 eritromisin dirençli KNS izolatında en sık *ermC* genini (%65.6) saptamışlardır [137, 152]. Gherardi ve arkadaşları benzer olarak İtalya'da yaptıkları çalışmada, 70 KNS izolatında *ermC* genini daha sık saptamışlardır [153]. Bizim çalışmamızda da benzer olarak KNS izolatlarında en sık *ermC* geni saptanmış, Çetin ve arkadaşlarından farklı

olarak *S. aureus* izolatlarında ise en sık *ermC* geni bulunmuştur, bu sonuç Aktaş ve arkadaşlarının çalışmasıyla uyumlu saptanmıştır.

Sarıbaş ve arkadaşları MS_B fenotipi gösteren 14 KNS izolatının 11'inde %78,5 oranında *msrA* geni saptamışlardır [137]. Aksu ve arkadaşları 85 KNS izolatının 61'inde (%71,8) *msrA* ve *msrB* genlerini birlikte saptamışlardır [154]. Gül ve arkadaşları MS_B fenotipi gösteren 26 KNS izolatının hepsinde, Gherardi ve arkadaşları da MS_B fenotipinde olan tüm izolatlarda *msrA* genini saptamışlardır [139, 153]. Bizim çalışmamızda Sarıbaş ve arkadaşlarının çalışmasına benzer olarak MS_B fenotipi gösteren 69 KNS izolatında %66,6 oranında *msrA* geni yüksek saptanmış ve Aksu ve arkadaşlarının çalışmasında olduğu gibi %62,3 oranında *msrA* ve *msrB* gen birlikteliği bulunmuştur. MS_B fenotipi olan izolatlarda efluks mekanizmasından sorumlu *msrA* ve *msrB* genleri beklenildiği gibi yüksek saptanmıştır.

Çalışmamızda, 45 (%21) stafilokok izolatı fenotipik olarak eritromisine dirençli saptanmasına rağmen, bu izolatlarda araştırdığımız direnç genlerinden hiçbirisi belirlenememiştir. Benzer olarak Sarıbaş ve arkadaşları yaptıkları çalışmada eritromisin dirençli 8 (%6.5) izolatta moleküler testlerle araştırılan *erm* genlerini saptamadıklarını bildirmişlerdir. Bu izolatlarda diğer nadir direnç genlerinin olabileceğini belirtmişlerdir [101]. Eritromisine dirençli olduğu halde gen saptanamayan izolatlar için Chaieb ve arkadaşları 2007 yılında yaptığı çalışmanın sonuçlarında; MLS_B direncinden sorumlu *erm* genlerinin, plazmid üzerinde küçük bir bölgede taşındığından bunların aktarımı sırasında kaybolabileceğini düşündüklerini belirtmişlerdir [155].

Çalışmamızda D-testi negatif olan, MS_B fenotipindeki 5 izolatta tek başına veya *msrA* ve *msrB* genine ilaveten *erm* genlerini de içeren izolatlar olduğu görülmüştür. Bu izolatlardan 3'ünde *ermC*, 2'sinde *ermA* tespit edilmiştir. Bu durum D-testi negatif olsa bile bazı izolatlarda *erm* genlerinin olabileceğini göstermektedir. Direnç genlerini taşıyan bu izolatlarda gen ekspresyonunun hangi mekanizma ile gerçekleştiği henüz tam olarak bilinmediğinden, in vitro olarak duyarlı görünen izolatlar in vivo şartlarda direnç geliştirebilmektedirler. Bu durumdan dolayı klindamisine duyarlı gözükten izolatların oluşturduğu enfeksiyonlarda tedavi başarısızlığı görülebilmektedir.

Çalışmamızda 4 klindamisin dirençli, eritromisin duyarlı (L fenotipi) olan 3 KNS izolatında direnç genleri saptanmamıştır, bu dirençten *linA* geninin sorumlu olabileceği düşünülmüştür, bu izolatlardan sadece 1'inde *ermC* geni pozitif bulunmuştur.

6.SONUÇ

MLS_B grubu antibiyotiklerin ülkemizde genel olarak kullanıldığı enfeksiyonlar sıklıkla stafilokokların dışındaki gram pozitif bakterilerin neden olduğu, toplum kaynaklı, komplike olmayan solunum yolu enfeksiyonlarıdır. Bu tip enfeksiyonlarda MLS_B grubu antibiyotiklerin kullanımının, florada mevcut stafilokok türlerinde de direnci indüklemesi muhtemeldir. Bu yüzden stafilokokların neden olduğu enfeksiyonlarda önemli bir yeri olan klindamisin direnç durumu bildirilmeden önce MLS_B direnç fenotipi belirlenmelidir. Standart antibiyotik duyarlılık testleri ile iMLS_B direnci gösteren stafilokok izolatlarında klindamisin için yanlış duyarlı sonuç verilebileceği için D-test ile iMLS_B direnç varlığının araştırılması oldukça önemlidir. MLS_B direnci ülkeden ülkeye hatta bölge, şehir ve hastaneler arasında farklılıklar gösterir. Bu nedenle her merkez kendi direnç profilini ortaya çıkarmalı ve ampirik antibiyotik tedavi seçiminde bu durumu göz önüne almalıdır.

Son yıllarda tedavide protez ve kateter gibi yabancı cisimlerin uygulanması ve bağıışıklığı baskılanmış hasta sayısının giderek arttığı dikkate alındığında, çalışmamızın verileri, KNS izolatlarının tiplendirilmesi ve antibiyotik direnç özelliklerinin bilinmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Moleküler yöntemler direnci belirlemede kullanılan fenotipik testlerin doğruluğunu test etmede “altın standart” olarak kullanılabilse de, ancak varlığı bilinen genlerin araştırılması, direnç durumunu belirlemede kısıtlı veya yetersiz kalabilmektedir. Her laboratuarda olmaması, deneyimli personel ve ekipman gereksinimi de dezavantajlarıdır.

Çalışmamızda fenotipik olarak dirençli olduğu belirlenen 45(%21) izolatta hiçbir direnç geni belirlenmemiştir. Bu bulgu bize, bu çalışmada değerlendirilemeyen diğer direnç genlerinin veya dirençten sorumlu olabilecek henüz tanımlanmamış farklı mekanizmaların olabileceğini göstermiştir.

Çalışmamızda MS_B direnç fenotipi gösteren 5 KNS izolatında *erm* genleri tespit edilmiştir. Bu durum stafilokoklarda D-test negatif olsa bile bazı izolatlarda *erm* genlerinin olabileceği ve buna bağlı olarak da klindamisine duyarlı gözükken bu izolatlarda tedavi başarısızlığı gelişebileceğini göstermiştir. Bu yüzden klinisyenler, antibiyotik duyarlılık sonuçlarında MS_B fenotipini gördüklerinde olası bir

indüklenebilir direnç varlığı nedeniyle klindamisin kullanımından kaçınılmaktadırlar. Bu yaklaşım, özellikle *S. aureus* enfeksiyonlarında olası bir tedavi başarısızlığını önleyebilir, ancak klindamisin tedavisine cevap verebilecek enfeksiyonlarda klindamisin kullanılmamasına da yol açabilir. Bu durum tedavide gereksiz yere diğer pahalı antibiyotiklerin kullanılması sonucunda maddi kayba, ayrıca bu antibiyotiklerin yaygın kullanımına bağlı maruz kalan organizmalarda yeni direnç gelişimine neden olacaktır.

Sonuç olarak hastanemizde yatan hastalardaki stafilokok izolatlarında indüklenebilir MLS_B direnç oranı %24.4 olarak bulunmuş ve ilişkili genlerin dağılımı belirlenmiştir. Bu konuda yapılacak bölgesel ve ulusal çalışmalar tedavi protokollerinin belirlenmesi, morbidite ve mortalitenin azaltılması, hasta ve ülke ekonomisinin zarara uğratılmaması açısından önemlidir. Ülkemizde direnç genlerinin durumu ile ilgili az sayıda yayın olması bu konu üzerinde daha fazla çalışma yapılmasının gerekliliğini ortaya koymaktadır.

7. ÖZET

Klinik Örneklerden İzole Edilen Stafilokoklarda Makrolid, Linkozamid ve Streptogramin B Direncinin Fenotipik ve Genotipik Yöntemlerle Araştırılması

Stafilokoklar, tüm dünyada yüksek oranda morbidite ve mortaliteye neden olan, hastane ve toplum kaynaklı birçok enfeksiyonun etkenidir. Zaman içinde önce penisilinlere ardından metisilin ve glikopeptidler olmak üzere çok sayıda antibiyotiğe direnç geliştirmişlerdir. Metisilin direnci, makrolidler gibi alternatif antibiyotiklerin kullanımına neden olmuştur. Ancak tüm dünyada gelişen makrolid direnci bu antibiyotiklerin kullanımını sınırlamıştır.

Çalışmaya, 2014 Şubat-2014 Temmuz tarihleri arasında İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesinde yatan hastalardan izole edilen 308 stafilokok izolatu dahil edilmiştir. Bu çalışmada, çeşitli klinik örneklerden izole edilen stafilokok izolatlarının MLS_B direncinin fenotipik ve genotipik yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır. MLS_B direncini fenotipik olarak saptamak için çift disk difüzyon testi (D test) yapılmış ve izolatlar iMLS_B, cMLS_B, MS_B, S ve L fenotipi olarak belirlenmiştir. Eritromisine dirençli olan izolatlarda ve L fenotipinde direnç mekanizmalarının saptanması için inhouse PCR ile *ermA*, *ermC*, *msrA* ve *msrB* genleri araştırılmıştır.

Çalışmaya alınan 51 *S. aureus* izolatının 35'i (%69) MSSA, 16'sı (%31) MRSA, 257 KNS izolatının, 49'u (%19) MSKNS, 208'i (%81) MRKNS olarak bulunmuştur. *S. aureus* izolatlarının 43'ü (%84,3) S fenotipi, 2'si (%3,9) MS_B fenotipi, 3'ü (%5,9) iMLS_B fenotipi ve 3'ü (%5,9) cMLS_B fenotipi olarak belirlenmiştir. KNS izolatlarının 51'i (%19,8) S fenotipi, 69'u (%26,9) MS_B fenotipi, 73'ü (%28,4) iMLS_B fenotipi, 60'ı (%23,3) cMLS_B fenotipi ve 4'ü (%1,6) L fenotipi olarak belirlenmiştir. İzolatların 97'sinde (%31,5) tek gen saptanırken, 69 izolatta (%22,4) birden fazla gen saptanmıştır. Toplam 84 (%39,3) izolatta *ermC*, 18 (%8,4) izolatta *ermA* geni, 67 (%31,3) izolatta *msrA* geni, 82 (%38,3) izolatta *msrB* geni tespit edilmiştir. cMLS_B fenotipi gösteren 60 KNS izolatının 27'sinde (%45) *ermC* geni saptanmıştır. MS_B fenotipi gösteren 46 (%66,6) KNS izolatında *msrA* geni saptanmış ve %62,3 oranında *msrA* ve *msrB* gen birlikteliği bulunmuştur. KNS izolatlarında %38,8 ile en sık *ermC* geni, *S. aureus* izolatlarında da % 50 ile en sık *ermC* geni saptanmıştır.

Çalışmamızda, 45 (%21) Stafilokok izolatu eritromisine dirençli saptanmasına rağmen, bu izolatlarda araştırdığımız direnç genlerinden hiçbirisi belirlenmemiştir. MS_B direnç fenotipi gösteren KNS izolatlarının 5'inde bir veya daha fazla *erm* geni tespit edilmiştir. Bu durum KNS'lerde D test negatif olsa bile bazı izolatlarda *erm* genlerinin olabileceği ve buna bağlı klindamisine duyarlı gözükken bu izolatlarda tedavi başarısızlığı gelişebileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak rutin duyarlılık testleri ile belirlenemeyen indüklenebilir MLS_B direncinin D test ile kolaylıkla belirlenebilmesi nedeniyle stafilokokal enfeksiyonlarda iyi bir seçenek olan klindamisin kullanımına daha doğru şekilde karar verilebilir. Çalışmamızda MS direnç fenotipi gösteren KNS izolatlarında bir yada daha fazla *erm* geni tespit edilmiştir. Bu durum D-test negatif olan izolatların bazılarında *erm* genlerinin bulunabileceği buna bağlı olarak da klindamisine duyarlı gözükken bu izolatlarda tedavi başarısızlığına yol açabilir. Fenotipik olarak duyarlı görülen izolatlarda da direnç genlerinin belirlenmiş olması direnç tespitinde fenotipik yöntemlerin yetersiz olduğunu ve moleküler yöntemlerle doğrulanması gerekliliğini göstermiştir. Çalışmamızda eritromisin dirençli olduğu halde araştırdığımız hiçbir direnç genini taşımayan izolatların bulunması dirençten sorumlu bilinmeyen mekanizmaların ve diğer gen bölgelerinin olabileceğini de göstermiştir.

Anahtar kelimeler: *S. aureus*, MLS_B direnci, D test, *ermA*, *ermC*, *msrA*, *msrB*

8.SUMMARY

Investigation of the Macrolide, Lincosamide and Streptogramin B Resistance by Phenotypic and Genotypic Methods in Staphylococci Isolated from Clinical Samples

Staphylococci are causative agents of various hospital and community acquired infections that lead to highly morbidity and mortality all over the world. By the time, they developed resistance initially to penicillin and then various antibiotics including glycopeptides and methicillin. Methicillin resistance led to usage of alternative antibiotics such as macrolides. However, the macrolide resistance which occurred all over the world limited their usage.

In this study, 308 staphylococci strain that were isolated from in-patients in Izmir Katip Celebi University Faculty of Medicine Ataturk Education and Research Hospital in February-July 2014 were included. In this study, it was aimed to investigate MLS_B resistance of Staphylococcus strains isolated from various clinical samples by phenotypic and genotypic methods. Double disc diffusion test (D test) was performed to determine MLS_B resistance phenotypic and the strains were identified as iMLS_B, cMLS_B, MS_B, S and L phenotypes. *ermA*, *ermC*, *msrA* and *msrB* genes were investigated by inhouse PCR in order to determine resistance mechanisms in erythromycin-resistant strains and L phenotype.

Of the strain 35 (69%) and 16 (31%) of 51 *S. aureus* isolates were MSSA and MRSA, respectively. 49 (19%) and 208 (81%) of 257 KNS isolates were found as MSKNS and MRKNS, respectively. 43 (84.3%), 2 (3.9%), 3 (5.9%), 3 (5.9%) of the *S. aureus* strains were determined as S, MS_B, iMLS_B and cMLS_B phenotypes, respectively. 51 (19.8%), 69 (26.9%), 73 (28.4%), 60 (23.3%) and 4 (1.6%) of KNS strains were determined as S, MS_B, iMLS_B, cMLS_B and L phenotypes, respectively. Only one gene was detected in 97 (31.5%) of the isolates, while more than one gene were detected in 69 (22.4%) isolates. *ermC*, *ermA*, *msrA* and *msrB* genes were detected in totally 84 (39.3%), 18 (8.4%), 67 (31.3%) and 8 (38.3%) isolates, respectively. *ermC* gene was detected in 27 (45%) of 60 KNS strains with cMLS_B phenotype. *msrA* gene was detected in 46 (66.6%) KNS isolates with MS_B phenotype and *msrA* and *msrB* gene coupling was determine in 43(62.3%) KNS isolates. The

most common gene was *ermC* gene in KNS strains with 38.8% ratio and in *S. aureus* strains with 50%.

In this study, although 45 (21%) staphylococci isolates were determined as erythromycin-resistant, the related resistance genes could not be identified in these isolates. One or more *erm* genes were determined in 5 KNS isolates which showed MS_B resistance phenotype. This shows that *erm* genes can be found in some of the KNS isolates even though their D tests are negative and treatment can be failed in these isolates which are seem to be sensitive to clindamycin.

In conclusion, inducible MLS_B resistance which can not be determined with routine susceptibility tests can be determined easily by the D test. As a result the use of clindamycin which is a good option for staphylococcal infections can be decided more accurately. In our study CNS strains with MS resistance phenotype, one or more types of *erm* genes were detected. This result indicates that when D test is negative in CNS strains, some strains may still have *erm* genes, and consequently treatment failure might occur in these apparently clindamycin sensitive strains. These resistance gene- carryng fenotipically sensitive strains may show in vivo resistance and may lead to unsuccessfullness of the therapy. The resistant strains without the *erm* ve *msr* resistance gene may carry infrequent resistance determinants or even mechanisms responsible for resistance which has not discovered yet.

Keywords: *S. aureus*, MLS_B resistance, D test, *ermA*, *ermC*, *msrA*, *msrB*

9. KAYNAKLAR

1. Murray P R, Baron JE, Jorgensen HJ, *et al.* Manual of Clinical Microbiology, 9th 1: 2007;28:390-411.
2. Koneman EW AS, Janda WM, *et al.* Gram positive cocci part I:Staphylococci and related gram positive cocci. Colar Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology 6th ed. Lippincott Company Philadelphia USA, 2006;12:623-662.
3. Çetinkaya Y ÜS. Stafilokok nazal taşıyıcılık: Önemi ve Tedavisi. Hastane İnfeksiyonları Dergisi 1999;3:22-32.
4. Bannerman TL. Staphylococcus, Micrococcus and other catalase positive cocci that grow aerobically. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH(eds): Manual of Clinical Microbiology, 8th ed ASM Press, Washington D.C. 2003:384-404.
5. Tünger A. Staphylococcus aureus: Mikrobiyoloji, patogenez ve epidemiyoloji. Gram-Pozitif Bakteri İnfeksiyonları, 1st edn. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi 2004:9-22.
6. Rupp ME, Archer GL. Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. Clin Infect Dis 1994;19(2):231-243; quiz 244-235
7. Nakajima Y. Mechanisms of bacterial resistance to macrolide antibiotics. J Infect Chemother 1999;5(2):61-74.
8. Roberts MC, Sutcliffe J, Courvalin P, *et al.* Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. Antimicrob Agents Chemother 1999;43(12):2823-2830.
9. Fiebelkorn K, Crawford S, McElmeel M, *et al.* Practical disk diffusion method for detection of inducible clindamycin resistance in Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci. Journal of clinical microbiology 2003;41(10):4740-4744.

10. Yalçın AN. Makrolidler. Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S (eds.). Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler Ankara Bilimsel Tıp Yayınevi. 2003:325-333.
11. Kaya S. Toplumdan Kazanılmış Metisiline Dirençli Staphylococcus Aureus Enfeksiyonlarının Tedavisi. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2008;28(6):956-961.
12. Vester B, Douthwaite S. Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA. Antimicrob Agents Chemother 2001;45(1):1-12.
13. Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. Clin Infect Dis 2002;34(4):482-492.
14. Usluer G. Staphylococcus aureus'un Neden Olduğu İnfeksiyonlar. Usluer G, Ulusoy S, Ünal S. Gram-Pozitif Bakteri İnfeksiyonları. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara 2004:39-52.
15. Akan E. Staphylococcus. Tıbbi Mikrobiyoloji 2.Baskı, Saray Yayınları İzmir. 1993:1-18.
16. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyoloji, Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları İzmir: Fakülteler Kitabevi, Barış Yayınları 2000:239-268
17. Cengiz AT. Staphylococcus aureus. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, 1.Baskı Ustaçelebi Ş. Ankara: Güneş Kitabevi 1999:339-349
18. Öztürk R. Penisilinler. Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S (eds.) Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler. Ankara Bilimsel Tıp Yayınevi. 2003:223-237
19. Ünal S. Staphylococcus aureus: Direnç mekanizmaları. Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S (eds.) Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler. Ankara. Bilimsel Tıp Yayınevi. 2003:23-38
20. Schmitz FJ, Jones ME. Antibiotics for treatment of infections caused by MRSA and elimination of MRSA carriage. What are the choices? Int J Antimicrob Agents 1997;9(1):1-19

21. Gülay Z. Koagulaz-negatif Stafilokoklar: Mikrobiyoloji, epidemiyoloji ve patogenezi. . Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S (eds.) Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler. Ankara Bilimsel Tıp Yayınevi. 2003:73-102
22. Garrity G, Holt J. Bergey's Manual of systematic bacteriology: an overview of the roadmap to the manual. Bergey's Manual Trust/Springer: New York 2000
23. Bannerman TL, Peacock S.J. Murray P R, Baron JE, Jorgensen HJ, Landry LM, Pfaller AM. Manual of Clinical Microbiology, 9th 1: (28) 390-411, 2007. Staphylococcus, Micrococcus ve diğer katalaz pozitif koklar (Çev. Ed: Gümral R.). Klinik Mikrobiyoloji cilt 1, Başustaoğlu A, Atlas Kitapçılık, Ankara, 2009.
24. Lowy FD. Staphylococcus aureus infections. New England Journal of Medicine 1998;339(8):520-532
25. Shulman ST. Staphylococci, Staphylococcal disease, and toxic shock syndrome. In: Shulman ST, Phair JP, Peterson LR, Warren JR (eds). The Biologic and Clinical Basis of Infectious Disease 5th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1997:505-514
26. Murray PR, Rosenthal KS, al. KGe. Staphylococcus and related organisms. Medical Microbiology 4th ed. St. Louis Mosby Inc; 2002:202-216
27. Waldvogel FA. Staphylococcus aureus (including staphylococcal toxic shock). In: Mandel GL, Bennet JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th.ed. New York: Churchill Livingstone, 2000:2070-2092
28. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, *et al.* The Gram positive cocci. I. Staphylococci and related organisms. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 5th ed. Lippincott/The Williams & Wilkins Co., Philadelphia, Pa 1997:539-576
29. Arda M. Temel mikrobiyoloji ders notları, Mikrobiyoloji Kulübü Arama Siteleri Linkleri, <http://www.mikrobiyoloji.org/docgoster.asp?dosya=110013100> 2006

30. Murray P.R., Rosenthal K.S., M.A. P. *Staphylococcus and Related Organisms* in: *Medical Microbiology- Fifth Edition*. Elsevier Mosby. 2005:221-236
31. Valeva A, Palmer M, Bhakdi S. Staphylococcal exotoxin: formation of the heptameric pore is cooperative and proceeds through multiple intermediate stages. *Biochemistry* 1997;36:13298-13304
32. Etienne J. Panton-Valentine leukocidin: a marker of severity for *Staphylococcus aureus* infection? *Clin Infect Dis* 2005;41(5):591-593
33. Welinder-Olsson C, Floren-Johansson K, Larsson L, *et al.* Infection with Panton-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* t034. *Emerg Infect Dis* 2008;14(8):1271-1272
34. Boyle-Vavra S, Daum RS. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Panton-Valentine leukocidin. *Lab Invest* 2007;87(1):3-9
35. Crass BA, Bergdoll MS. Involvement of coagulase-negative staphylococci in toxic shock syndrome. *J Clin Microbiol* 1986;23(1):43-45
36. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* 2000;13(1):16-34
37. Takagi Y, Futamura S, Asada Y. Action site of exfoliative toxin on keratinocyte. In: *Journal of Investigative Dermatology*. 1990: Abstract 94, p. 52-543.
38. Cengiz A, Us E, Cengiz A. The clinical importance of slime production. *İnönü Üniv Tıp Fak Derg* 2006;13:193-197
39. Yenen, O.S. (Çev.Ed). Jawetz, Melnick ve Adelberg *Tıbbi Mikrobiyoloji*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri 2010:224-230
40. Bilgehan H. *Klinik mikrobiyoloji özel bakteriyoloji ve bakteri enfeksiyonları* Bornova: Barış Yayınları 1994:188-211

41. Baird D, Collee JG, Marmion SP, *et al.* Staphylococcus: clusterforming Gram-positive cocci, Practical Medical Microbiology 1996:245-262
42. Tünger A, Çavuşoğlu C, M. K. Stafilokoklar ve Benzer Bakteriler. Asya Mikrobiyoloji. 2005:72-81
43. Livermore DM. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev 1995;8(4):557-584
44. Patti JM, Jonsson H, Guss B, *et al.* Molecular characterization and expression of a gene encoding a Staphylococcus aureus collagen adhesin. J Biol Chem 1992;267(7):4766-4772
45. Başustaoğlu ACÇE. Murray, P.R., Rosenthal, K.S ve Pfaller, M.A. Tıbbi Mikrobiyoloji. (6th ed). Ankara: Atlas Kitapçılık 2010:209-225
46. Evirgen Ö. Deri ve Yumuşak Doku İnfeksiyonlarında Ampirik Tedavi Yogun Bakim Dergisi. 2012;10:120-127
47. Stevens DL, Bisno AL, Chambers HF, *et al.* Practice guidelines for the diagnosis and management of skin and soft-tissue infections. Clin Infect Dis 2005;41(10):1373-1406
48. Pasternack MS, MN. S. Cellulitis, necrotizing fasciitis, and subcutaneous tissue infections. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. 7th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2010:1289-1312
49. İmamoğlu OU, Doğusoy I, Okay T, *et al.* Staphylococcus Aureus Pnömonilerinde Gelişen Cerrahi Komplikasyonlar. Türk Göğüs Kalp Damar Cer Derg. 2001;9:97-100
50. Caksen H, Ozturk MK, Uzum K, *et al.* Pulmonary complications in patients with staphylococcal sepsis. Pediatr Int 2000;42(3):268-271

51. Colice GL, Curtis A, Deslauriers J, *et al.* Medical and surgical treatment of parapneumonic effusions : an evidence-based guideline. *Chest* 2000;118(4):1158-1171
52. Dessi A, Crisafulli M, Accossu S, *et al.* Osteo-articular infections in newborns: diagnosis and treatment. *J Chemother* 2008;20(5):542-550
53. Lampe R. Osteomyelitis and suppurative arthritis. *Nelson Textbook of Pediatrics*. 17th ed. Philadelphia, PA: WB Saunders 2004:2297-2302
54. Vayalunkal JV, Jadavji T. Children hospitalized with skin and soft tissue infections: a guide to antibacterial selection and treatment. *Paediatr Drugs* 2006;8(2):99-111
55. Dündar V, Öztürk Dündar D. Stafilokok İnfeksiyonları. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. (eds). *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. Nobel Tıp Kitabevleri. İstanbul. 2002:1507-1516
56. Alouf JE, Muller-Alouf H. Staphylococcal and streptococcal superantigens: molecular, biological and clinical aspects. *Int J Med Microbiol* 2003;292(7-8):429-440
57. Ladhani S, Garbash M. Staphylococcal skin infections in children: rational drug therapy recommendations. *Paediatr Drugs* 2005;7(2):77-102
58. Palit A, Inamadar AC. Current concepts in the management of bacterial skin infections in children. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2010;76(5):476-488
59. Schmid D, Fretz R, Winter P, *et al.* Outbreak of staphylococcal food intoxication after consumption of pasteurized milk products, June 2007, Austria. *Wien Klin Wochenschr* 2009;121(3-4):125-131
60. Ulutan F. Besin zehirlenmeleri. Ed. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. *Enfeksiyon hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul Nobel Tıp Kitapevleri 2008:1064-1070

61. Lowy FD. Staphylococcal infections. Harrison' s Principles of Internal Medicine. Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL (Eds.) NewYork, McGraw-Hill Companies, 2005:814-823
62. Ing M, Baddour L, Bayer A. Bacteremia and infective endocarditis: pathogenesis, diagnosis, and complications. The staphylococci in human disease. Churchill Livingstone, New York, NY 1997:331-354
63. Aydın K. Koagülaz Negatif Stafilokokların neden olduğu infeksiyonlar ve tedavi seçenekleri. Usluer G, Ulusoy S, Ünal S. Gram-Pozitif Bakteri İnfeksiyonları. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara 2004:105-119
64. Sivapalasingam S SN. Macrolides, clindamycin, and ketolides. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds): Principles and Practice of Infectious Diseases, 7. baskı, Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia 2010:427-448
65. Usluer G. Ketolidler,. Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S (eds): Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler, 1. baskı, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara 2008:387-396
66. Aydın K. Makrolidler ve linkozamidler,. ANKEM Derg 2007;21(Ek2):57-61
67. Douthwaite S. Structure-activity relationships of ketolides vs. macrolides. Clin Microbiol Infect 2001;7 Suppl 3:11-17
68. Pechere JC. New perspectives on macrolide antibiotics. Int J Antimicrob Agents 2001;18 Suppl 1:S93-97
69. Kayaalp O. Makrolid ve linkozamid antibiotikler,. Tıbbi Farmakoloji, cilt 1, 5. baskı, Feryal Matbaacılık, Ankara 1989:240-247
70. Joseph DC, Moellering Y, RC. M. Antibacterial Agents. In:. Murray PR,Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC(eds), Manual of Clinical Microbiology. 8th ed. ASM pres 2003:1039-1073

71. Allen NE. Effects of macrolide antibiotics on ribosome function. *Macrolide Antibiotics*. Springer 2002, 261-280.
72. Calia F, Oldach D. Macrolide (and Azalide) Antibiotics: Erythromycin, Azithromycin, Clarithromycin, and Dirithromycin In *Infectious Diseases*, chapter 23. Second editon 1998:242-259
73. Aracil B, Minambres M, Oteo J, *et al.* Susceptibility of strains of *Streptococcus agalactiae* to macrolides and lincosamides, phenotype patterns and resistance genes. *Clin Microbiol Infect* 2002;8(11):745-748
74. Credito KL, Lin G, Pankuch GA, *et al.* Susceptibilities of *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* to ABT-773 compared to their susceptibilities to 11 other agents. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(1):67-72
75. Gupta S, Leatham EW, Carrington D, *et al.* Elevated Chlamydia pneumoniae antibodies, cardiovascular events, and azithromycin in male survivors of myocardial infarction. *Circulation* 1997;96(2):404-407
76. Kayaalp O. Makrolid ve Linkozamid antibiyotikler. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farkmakoloji, 7. baskı, Güneş kitap evi, Ankara 1994:719-734
77. Zuckerman JM, Qamar F, Bono BR. Macrolides, ketolides, and glycylicyclines: azithromycin, clarithromycin, telithromycin, tigecycline. *Infect Dis Clin North Am* 2009;23(4):997-1026, ix-x
78. Ohrt C, Willingmyre GD, Lee P, *et al.* Assessment of azithromycin in combination with other antimalarial drugs against *Plasmodium falciparum* in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46(8):2518-2524
79. Tabbara KF, Abu-el-Asrar A, al-Omar O, *et al.* Single-dose azithromycin in the treatment of trachoma. A randomized, controlled study. *Ophthalmology* 1996;103(5):842-846
80. Wittner M, Rowin KS, Tanowitz HB, *et al.* Successful chemotherapy of transfusion babesiosis. *Ann Intern Med* 1982;96(5):601-604

81. Ji B, Jamet P, Perani EG, *et al.* Powerful bactericidal activities of clarithromycin and minocycline against *Mycobacterium leprae* in lepromatous leprosy. *J Infect Dis* 1993;168(1):188-190
82. Pierce M, Crampton S, Henry D, *et al.* A randomized trial of clarithromycin as prophylaxis against disseminated *Mycobacterium avium* complex infection in patients with advanced acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1996;335(6):384-391
83. Kılıç SS. Linkozamidler. Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S (eds.). *Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler*. Ankara.Bilimsel Tıp Yayınevi. 2003:345-357
84. Panzer JD, Brown DC, Epstein WL, *et al.* Clindamycin levels in various body tissues and fluids. *J Clin Pharmacol New Drugs* 1972;12(7):259-262
85. Kremsner PG, Radloff P, Metzger W, *et al.* Quinine plus clindamycin improves chemotherapy of severe malaria in children. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39(7):1603-1605
86. Küçükbaşmacı Ö. Ketolid grubu ilk antibiyotik. Telitromisin *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2008:156-161
87. Shain CS, Amsden GW. Telithromycin: the first of the ketolides. *Ann Pharmacother* 2002;36(3):452-464
88. Xiong YQ, Le TP. Telithromycin (HMR 3647): The first ketolide antibiotic. *Drugs Today (Barc)* 2001;37(9):617-628
89. Duygu E. Streptokoklarda makrolid, linkozamid, streptogramin B direnci. 6. Antimikrobik ve Kemoterapi Günleri Program ve Özet kitabı *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No:47* 2004;47,:22-28
90. Bearden DT, Neuhauser MM, Garey KW. Telithromycin: an oral ketolide for respiratory infections. *Pharmacotherapy* 2001;21(10):1204-1222

91. Aydın D, Kucukbasmaci O, Gonullu N, *et al.* Susceptibilities of Neisseria gonorrhoeae and Ureaplasma urealyticum isolates from male patients with urethritis to several antibiotics including telithromycin. Chemotherapy 2005;51(2-3):89-92
92. Başustaoğlu A. Murray PR, Baron J E, Jorgensen HJ, Landry LM, Pfaller AM. Manual of Clinical Microbiology, 9th ed, 1: (71) 1114- 1135, 2007. Louis B. Rice ve Robert A. Bonomo (Çev. Ed: Gür D.) Antibakteriyel ilaçlara direnç mekanizmaları. Klinik Mikrobiyoloji cilt 1, Atlas Kitapçılık, Ankara, 2009.
93. Murchison A. Quinupristin–dalfopristin: a streptogramin antibiotic. Primary care update for ob/gyns 2002;9(5):176-177
94. Allington DR, Rivey MP. Quinupristin/dalfopristin: a therapeutic review. Clin Ther 2001;23(1):24-44
95. Livermore DM. Quinupristin/dalfopristin and linezolid: where, when, which and whether to use? J Antimicrob Chemother 2000;46(3):347-350
96. Ulusoy S. Streptograminler (Kinopristin/Dalfopristin) ANKEM Derg 2004;18(Ek2):174-177
97. Tenson T, Lovmar M, Ehrenberg M. The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. J Mol Biol 2003;330(5):1005-1014
98. Delgado G, Jr., Neuhauser MM, Bearden DT, *et al.* Quinupristin-dalfopristin: an overview. Pharmacotherapy 2000;20(12):1469-1485
99. Küçükbayrak A., D. Ö. İki Yeni Protein Sentez İnhibitörü: Linezolid ve Streptograminler (Kinopristin/dalfopristin) İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection) 2006;20:145-151
100. Colakoğlu S, Alişkan H, Turunç T, *et al.* Klinik örneklerden izole edilen Staphylococcus aureus suşlarında indüklenebilir klindamisin direnç prevalansı. Mikrobiyoloji Bülteni 2008;42(3):407-412

101. Saribas Z, Tunckanat F, Pinar A. Prevalence of erm genes encoding macrolide-lincosamide-streptogramin (MLS) resistance among clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in a Turkish university hospital. *Clin Microbiol Infect* 2006;12(8):797-799
102. Turng B, Sinha J, Deal M, *et al.* Detection and interpretation of macrolide-lincosamide-streptogramin resistance among *Staphylococcus* with phoenix automated microbiology system and BDxpert™ system. 15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Copenhagen Denmark 2005:1134-2161
103. Başustaoğlu A, Murray P R, Baron J E, Jorgensen HJ, Landry LM, Pfaller A.M. *Manual of Clinical Microbiology*, 9th ed, vol. 1:(78), 1248-1256, 2007. Rasheed JK, Cockerill F, Tenover FC. Patojen bakterilerde antimikrobiyal direnç genlerinin saptanması ve tanımlanması (Çev. Ed: Çavuşoğlu C.). *Klinik Mikrobiyoloji cilt 1*, , Atlas Kitapçılık, Ankara, 2009
104. Thakker-Varia S, Jenssen WD, Moon-McDermott L, *et al.* Molecular epidemiology of macrolides-lincosamides-streptogramin B resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1987;31(5):735-743
105. Chavez-Bueno S, Bozdogan B, Katz K, *et al.* Inducible clindamycin resistance and molecular epidemiologic trends of pediatric community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Dallas, Texas. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49(6):2283-2288
106. Volokhov D, Chizhikov V, Chumakov K, *et al.* Microarray analysis of erythromycin resistance determinants. *J Appl Microbiol* 2003;95(4):787-798
107. Eady EA, Ross JI, Tipper JL, *et al.* Distribution of genes encoding erythromycin ribosomal methylases and an erythromycin efflux pump in epidemiologically distinct groups of staphylococci. *J Antimicrob Chemother* 1993;31(2):211-217

108. Janapatla RP, Yan JJ, Huang AH, *et al.* Inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates causing bacteremia at a university hospital in southern Taiwan. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007;58(2):203-209
109. Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother* 2005;56(1):20-51
110. Lina G, Quaglia A, Reverdy ME, *et al.* Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43(5):1062-1066
111. Yücesoy M. Gram Olumlu Bakterilerdeki Direncin Moleküler Temelleri. . Yüce A, Çakır N (eds.). *Hastane Enfeksiyonları*. İzmir: Güven Kitapevi 2003:78-86
112. Martineau F, Picard FJ, Lansac N, *et al.* Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44(2):231-238
113. Allignet J, Aubert S, Morvan A, *et al.* Distribution of genes encoding resistance to streptogramin A and related compounds among staphylococci resistant to these antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40(11):2523-2528
114. Steward CD, Raney PM, Morrell AK, *et al.* Testing for induction of clindamycin resistance in erythromycin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2005;43(4):1716-1721
115. Yilmaz G, Aydın K, Iskender S, *et al.* Detection and prevalence of inducible clindamycin resistance in staphylococci. *J Med Microbiol* 2007;56(Pt 3):342-345
116. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, fifteenth informational supplement, document M02 and M07 CLSI, Wayne, Pa, USA, 2011

117. CLSI. Clinical and laboratory standarts institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, fifteenth informational supplement. M100-S15. Wayne, PA. USA: 2005
118. Malbruny B, Nagai K, Coquemont M, *et al.* Resistance to macrolides in clinical isolates of Streptococcus pyogenes due to ribosomal mutations. J Antimicrob Chemother 2002;49(6):935-939
119. Çokça F. Tetrasiklinler. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri 2008:308-313
120. Durmaz R. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Tipleri. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji 2. baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul. 2001:35-43
121. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Eighteenth informational supplement, M100-S18, 2008. CLSI, Wayne, PA.
122. Akçay S Ş, Oğuzoğlu N, İnan A Ş, *et al.* Deri ve yumuşak doku infeksiyonlarından izole edilen metisiline dirençli Stapylococcus aureus suşlarının fusidik asit ve mupirosin duyarlılığı. KLİMİK Derg 2005;18(3):117-20
2005;18(3):117-120
123. Ekşi F, Gayyurhan E D, A. B. Gaziantep Üniversitesi Hastanesinde izole edilen Stapylococcus aureus suşlarının antimikrobiyal duyarlılıkları. ANKEM Derg. 2008;22(4):203-208
124. Dündar V. Metisiline Dirençli Stafilokok İnfeksiyonları. Klimik Dergisi Cilt 13, Özel Sayı 2000 26-27
125. Kılıç A, Baysallar M, Küçükkaaslan A, *et al.* Metisiline dirençli Staphylococcus aureus suşlarının kinupristin/dalfopristine in vitro duyarlılığı. İnfeksiyon Dergisi 2004;18:453-456

126. Avkan Oğuz V, Yapar N, Sezak N, *et al.* Stafilokoklarda indüklenebilir Klindamisin direnci ve diğer antibiyotiklere duyarlılık oranları. Mikrobiyoloji Bülteni 2009; 43: 37-44 2009;43:37-44
127. Sesli Çetin E, Güneş H, Aynalı A, *et al.* Makrolid-Linkozamid-Streptogramin B direnci gözlenen klinik stafilokok izolatlarında fusidik asidin *in vitro* aktivitesinin değerlendirilmesi. ANKEM Derg. 2008; 22(2): 59-63 2008;22(2):59-63
128. Gönüllü N, Karaköse A R, Çatal F, *et al.* Klinik Örneklerden İzole Edilen Stafilokok Suşlarının Makrolid ve Linkozamid Direnç Fenotipleri. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2009;39(1-2):12-15
129. Yaşar Kart K, Bilir Aybar Y, Pehlivanoğlu F, *et al.* Stafilokok Suşlarında Makrolid Linkozamid-Streptogramin B (Mlsb) Direnç Fenotipi Haseki Tıp Bülteni 2011;49:102-104
130. Eksi F, Gayyurhan ED, Bayram A, *et al.* Determination of antimicrobial susceptibility patterns and inducible clindamycin resistance in Staphylococcus aureus strains recovered from southeastern Turkey. J Microbiol Immunol Infect 2011;44(1):57-62
131. Gunduz T, Akgul S, Ozcolpan G, *et al.* Investigation of inducible clindamycin resistance among clinical isolates of staphylococci. African Journal of Microbiology Research 2012;6(10):2294-2298
132. Tekin A, Dal T, Deveci O, *et al.* Assessment of methicillin and clindamycin resistance patterns in Staphylococcus aureus isolated from a tertiary hospital in Turkey. Infez Med 2013;21(2):111-116
133. Seifi N, Kahani N, Askari E, *et al.* Inducible clindamycin resistance in Staphylococcus aureus isolates recovered from Mashhad, Iran. Iran J Microbiol 2012;4(2):82-86
134. Duman Y, Serindağ A, Tekerekoğlu MS. Klinik örneklerden izole edilen Staphylococcus aureus' ların antimikrobilyallere direnç durumu. İnönü Üni Tıp Fak Derg 2009;16(3):145-148

135. Moran GJ, Krishnadasan A, Gorwitz RJ, *et al.* Methicillin-resistant *S. aureus* infections among patients in the emergency department. *N Engl J Med* 2006;355(7):666-674
136. Levin TP, Suh B, Axelrod P, *et al.* Potential clindamycin resistance in clindamycin-susceptible, erythromycin-resistant *Staphylococcus aureus*: report of a clinical failure. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49(3):1222-1224
137. Saribaş Z, Tunçkanat F, Özçakır O, *et al.* Stafilocok klinik izolatlarında Makrolid-Linkozamid Streptogramin B (MLSB) ve telitromisin direncinin araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2010;44:177-186
138. Peacock SJ. *Staphylococcus*. In Borriello SP, Murray PR, Funke G. (Ed). *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. 10th Ed. Hodder Arnold, London, United Kingdom. 2005:771-832
139. Gul HC, Kilic A, Guclu AU, *et al.* Macrolide-lincosamide-streptogramin B resistant phenotypes and genotypes for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Turkey, from 2003 to 2006. *Pol J Microbiol* 2008;57(4):307-312
140. Al FD, Akça G, Sipahi B, *et al.* Kan örneklerinden soyutlanan stafilocok suşlarının antibiyotiklere direnç durumları. *Ankem Derg* 2005;19(1):14-16
141. Kişioğlu S, Karataş A, Aygün G, *et al.* *Staphylococcus aureus* kökenlerinde Makrolid-Linkozamid-Streptogramin direnci. *Klinik Dergisi*. 2001;16(1):351
142. Schreckenberger PC, Ilendo E, Ristow KL. Incidence of constitutive and inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci in a community and a tertiary care hospital. *J Clin Microbiol* 2004;42(6):2777-2779
143. Juyal D, Shamanth AS, Pal S, *et al.* The prevalence of inducible clindamycin resistance among staphylococci in a tertiary care hospital - a study from the garhwal hills of uttarakhand, India. *J Clin Diagn Res* 2013;7(1):61-65

144. Aktas Z, Aridogan A, Kayacan CB, *et al.* Resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics in staphylococci isolated in Istanbul, Turkey. *J Microbiol* 2007;45(4):286-290
145. Siberry GK, Tekle T, Carroll K, *et al.* Failure of clindamycin treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* expressing inducible clindamycin resistance in vitro. *Clin Infect Dis* 2003;37(9):1257-1260
146. Dizbay M, Günel O, Ozkan Y, *et al.* Nozokomiyal stafilokok izolatları arasında yapısal ve indüklenbilir klindamisin direnci. *Mikrobiyoloji Bült* 2008;42(2):217-221
147. Cetin ES, Gunes H, Kaya S, *et al.* Macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance phenotypes in clinical staphylococcal isolates. *Int J Antimicrob Agents* 2008;31(4):364-368
148. Dinç BM, Karabiber N, EA. A. Klinik örneklerden izole edilen metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) izolatlarında makrolid-linkozamidstreptogramin B direnci ve fusidik asit duyarlılığı. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Derg* 2009;66:89-94
149. Zelazny AM, Ferraro MJ, Glennen A, *et al.* Selection of strains for quality assessment of the disk induction method for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococci*: a CLSI collaborative study. *J Clin Microbiol* 2005;43(6):2613-2615
150. Fernandes CJ, O'Sullivan MV, Cai Y, *et al.* Agar dilution method for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus* spp. *J Clin Microbiol* 2007;45(12):4018-4020
151. Cetin ES, Gunes H, Kaya S, *et al.* Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides and streptogramins among clinical staphylococcal isolates in a Turkish university hospital. *J Microbiol Immunol Infect* 2010;43(6):524-529

152. Gatermann SG, Koschinski T, Friedrich S. Distribution and expression of macrolide resistance genes in coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Infect* 2007;13(8):777-781
153. Gherardi G, De Florio L, Lorino G, *et al.* Macrolide resistance genotypes and phenotypes among erythromycin-resistant clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci, Italy. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2009;55(1):62-67
154. Aksu N, Kuştimur S, Karahan Z C, *et al.* Distribution of erm andmsr Genes Encoding Resistance to Macrolide, Lincosamide and Streptogramin B Antibiotics in Clinical *Staphylococcus* Isolates. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 2012;32(6):1530-1535
155. Chaieb K, Zmantar T, Chehab O, *et al.* Antibiotic resistance genes detected by multiplex PCR assays in *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from dialysis fluid and needles in a dialysis service. *Jpn J Infect Dis* 2007;60(4):183-187