

***Staphylococcus aureus* SUŞLARINDA METİSİLİN  
DİRENCİNDEN SORUMLU *mecA*, *mecR1* ve *mecI*  
GENLERİNİN PZR (POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU)  
METODU İLE SAPTANMASI**

**Şerife ŞALVARCI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
ISPARTA 2006**

T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

*Staphylococcus aureus* SUŞLARINDA METİSİLİN DİRENCİNDEN  
SORUMLU *mecA*, *mecR1* ve *mecI* GENLERİNİN PZR (POLİMERAZ  
ZİNCİR REAKSİYONU) METODU İLE SAPTANMASI

Şerife ŞALVARCI

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
ISPARTA 2006

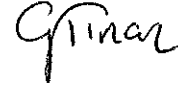
Fen Bilimleri Müdürlüğüne

Bu çalışma jürimiz tarafından BİYOLOJİ ANABİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

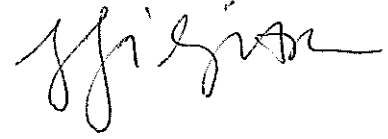
Başkan : Doç. Dr. Ayşegül KUBİLAY



Üye : Yrd. Doç. Dr. Gülgün TINAZ



Üye : Yrd. Doç. Dr. Fatma Filiz ARI



#### ONAY

Bu tez 17/07/2006 tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

.../.../

**Prof. Dr. Fatma GÖKTEPE**

**Enstitü Müdürü**

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER.....	i
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
1.GİRİŞ.....	1
2.KAYNAK BİLGİSİ.....	3
2.1. Stafilokoklar .....	3
2.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	4
2.1.2. <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	5
2.1.3. <i>Staphylococcus saprophyticus</i> .....	6
2.1.4. <i>Staphylococcus capitis</i> .....	6
2.1.5. <i>Staphylococcus warneri</i> .....	6
2.1.6. <i>Staphylococcus hominis</i> .....	7
2.2. <i>Staphylococcus aureus</i> 'un Hastalandırıcı Özellikleri.....	7
2.3. <i>Staphylococcus aureus</i> 'un Antijenik Özellikleri Ve Faj Tipleri.....	7
2.4. <i>Staphylococcus aureus</i> 'un Bazı Enzimleri.....	8
2.5. <i>Staphylococcus aureus</i> 'un Toksinleri.....	9
2.6. <i>Staphylococcus aureus</i> 'un Neden Olduğu Bazı Hastalıklar .....	10
2.7. <i>S. aureus</i> 'un Tespiti.....	11
2.7.1. Katalaz testi.....	11

2.7.2. Deoksiribonükleaz testi.....	11
2.7.3. Üreaz testi.....	12
2.7.4. Koagülaz testi.....	12
2.8. Stafilokoklarda Metisilin Direncinin Mekanizması .....	13
2.8.1. Penisilin Bağlayıcı Protein 2A (PBP2A).....	15
2.8.2. Mec Operonu Ve Düzeni.....	15
2.8.3. <i>mecDNA</i> .....	16
2.8.4. <i>mecA</i> .....	16
2.8.5. <i>mecI</i> ve <i>mecRI</i> .....	17
2.9. Metisilin Direnç Determinantının Biyolojisi Ve Gelişimi.....	18
2.10. Metisilin Direnç Çeşitleri.....	19
2.11. Metisilin Direnç Seviyelerini Etkileyen Kromozal Genler.....	20
2.11.1 <i>femX</i> , <i>femA-femB</i> .....	20
2.12. MRSA Enfeksiyonlarına Karşı Kullanılan Antibiyotikler.....	21
2.12.1. Penisilinler.....	21
2.12.2. Metisilin.....	22
2.12.3. Sefalosporinler.....	23
2.12.4. Vankomisin.....	23
2.12.5. Karbapanemler.....	25
2.12.6. Rifampin.....	26
2.12.7. Novobiosin.....	26
2.12.8. Gentamisin.....	27
2.12.9. Tobramisin.....	27
2.12.10. Mupirosin.....	28

2.12.11. Fosfomisin.....	29
3.MATERYAL VE METOT.....	30
3.1. Suşların Toplanması.....	30
3.1.1.Suşların Üretimi ve Saklanması.....	30
3.1.2. Besiyerlerinin ve Solüsyonların Hazırlanması.....	30
3.2. <i>S. aureus</i> Suşları İçin Duyarlılık Testleri.....	31
3.2.1. Disk Difüzyon Metodu.....	32
3.2.2. Epsilometre Testi (E Testi).....	33
3.3. DNA Teknikleri.....	33
3.3.1.Koloni Polimeraz Zincir Reaksiyonu .....	33
3.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	33
3.3.3. Agaroz Jel Elektroforezi.....	37
4. BULGULAR.....	39
4.1. Disk Difüzyon Bulguları.....	39
4.2. E-Testi Bulguları.....	41
4.3. PZR Bulguları .....	44
5.TARTIŞMA VE SONUÇ.....	46
6.KAYNAKLAR.....	50
ÖZGEÇMİŞ.....	56

**ÖZET*****Staphylococcus Aureus* Suşlarında Metisilin Direncinden Sorumlu *mecA*, *mecR1* ve *mecI* Genlerinin PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Metodu İle Saptanması****Şerife ŞALVARCI**

Metisiline dirençli *S. aureus* suşları (MRSA) hastane enfeksiyonları ve toplum kökenli enfeksiyonlardan sorumlu önemli patojenlerdir.

Bu çalışmanın ilk aşamasında Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nin değişik kliniklerinden izole edilmiş olan 38 adet *S. aureus* suşu toplandı. Bu suşlara oksasilin antibiyotiğine karşı disk difüzyon ve Epsilometre (E-testi) uygulandı. Bu testlerin sonucunda 38 adet *S. aureus* suşunun 35'nin oksasilin'e dirençli, diğer 3'ünün oksasilin'e karşı hassas olduğu tespit edildi.

Daha sonra her suşda *mecA*, *mecR* ve *mecI* genlerinin varlığı PZR metodu ile araştırıldı. PZR sonucunda oluşması beklenen 533 bp büyüklüğündeki *mecA* geni, 414 bp büyüklüğündeki *mecR1* geni ve 265 bp büyüklüğündeki *mecI* genleri % 1 agaroz jelde incelenmiştir. Koloni PZR sonucunda 38 suşun 35'i *mecA* pozitif, 3 suşda *mecA* negatif olarak tespit edilmiştir. *mecA* pozitif olan 35 suşun 32'si *mecR 1* pozitif diğer 3 suş *mecR 1* negatif olarak belirlendi.Yapılan bu çalışmada toplam 35 MRSA suşunda hiçbir *mecI* geni tespit edilmedi.

**ANAHTAR KELİMELER:** *Staphylococcus aureus*, metisilin direnci, *mecA* geni, *mecR1* geni, *mecI* geni, PZR.

**ABSTRACT****Detection Of The *mecA*, *mecRI* and *mecI* Genes Responsible For The Methicillin Resistance İn The Strains Of *Staphylococcus Aureus* By PCR  
(Polymerase Chain Reaction)****Şerife ŞALVARCI**

Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains (MRSA) are important pathogens, causing both community and nosocomial infections.

In the first part of this study, a total of 38 strains of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) were obtained from Suleyman Demirel University Hospital. Disk diffusion test and Epsilometry Test (E Test) were applied to *S.aureus* strains against the oxacilin antibiotic. Results of these tests showed that 35 out of 38 *S. aureus* strains were resistant and 3 were sensitive to methicillin.

The existence of the genes *mecA*, *mecRI* and *mecI* in each strain was then investigated by PCR method. *mecA* (533 pb), *mecRI* (414 pb) and *mecI* (265 bp) genes which are expected to result from PCR were examined in 1 % agarose gel. As a result of colony PCR, 35 strains out of 38 were found to be *mecA* positive, while the other 3 ones *mecA* negative. The 32 *mecA*-positive strains out of total 35 proved to be *mecRI* positive, while the other 3 ones *mecRI* negative. No *mecI* gene was detected in a total of 35 MRSA strains used in this study.

**KEY WORDS:** *Staphylococcus aureus*, methicillin resistance, *mecA* gene, *mecRI* gene, *mecI* gene, PCR.



## TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda bilgi ve deneyimi ile bana yardımcı olan değerli Danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Gülgün TINAZ'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Ayrıca bütün çalışmalarım sırasında maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen ablam Öğr.gör.Dr. Nesrin TÜRELİ'ye, ağabeyim Öğr.gör.Erhan TÜRELİ'ye, her zaman çalışmalarımda bana destek olan meslektaşım, ağabeyim Ertuğrul AKGÜN'e, Deneysel ve Gözlemsel Öğrenci Araştırma Merkezi'ndeki arkadaşlarım Seyhan ULUSOY, Meryem ATEŞ, ve İsmail ŞEN'e ve bu aşamaya gelmemde büyük emekleri olan anneme ve babama teşekkür ederim.

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. <i>S. aureus</i> suşları.....	5
Şekil 2.2. <i>mecA</i> , <i>mecRI</i> ve <i>mecI</i> genlerinin kromozal yerleşimi .....	17
Şekil 2.3. Penisilinin yapısı.....	22
Şekil 2.4. Metisilinin yapısı.....	23
Şekil 2.5. Sefolosporinin yapısı.....	23
Şekil 2.6. Vankomisin yapısı.....	24
Şekil 2.7. Karbapanemin yapısı.....	25
Şekil 2.8. Rifampinin yapısı.....	26
Şekil 2.9. Novobiosinin yapısı.....	27
Şekil 2.10. Gentamisinin yapısı.....	27
Şekil 2.11. Tobramisin yapısı.....	28
Şekil 2.12. Mupirosinin yapısı.....	28
Şekil 2.13. Fosfomisin yapısı.....	29
Şekil 2.14. Triptik Soy Agar besiyerinde üretilmiş <i>S. aureus</i> kolonileri .....	39
Şekil 2.15. MİK 1µg/ml ve oksasilin disk çapı 16mm olan <i>S. aureus</i> .....	41
Şekil 2.16. Okzasiline dirençli bir <i>S. aureus</i> suşu.....	42
Şekil 2.17. 38 adet <i>S. aureus</i> suşunun PZR ürünlerinin agaroz jelde görüntüsü.....	44
Şekil 2.18. 35 adet <i>S. aureus</i> suşunun PZR ürünlerinin agaroz jelde görüntüsü .....	45

**ÇİZELGELER DİZİNİ**

	Sayfa
Çizelge 2.1. Stafilokok cinsinin türleri.....	4
Çizelge 2.2. Kullanılan besiyerleri ve solüyonlar .....	31
Çizelge 2.3. <i>mecA</i> için PZR’de kullanılan bileşenler .....	34
Çizelge2.4. <i>mecR1</i> için PZR’de kullanılan bileşenler.....	35
Çizelge 2.5. <i>mecI</i> için PZR’de kullanılan bileşenler.....	35
Çizelge 2.6. Disk difüzyonunda antibiyotik zon çapları.....	40
Çizelge2.7. Disk difüzyonunda oksasilin sınır değerleri.....	41
Çizelge 2.8.E-testinde oksasilin sınır değerleri .....	41
Çizelge 2.9. E-testinde antibiyotik duyarlılık oranları .....	43
Çizelge 2.10. <i>S.aureus</i> suşu için PZR sonuçları .....	44

## 1.GİRİŞ

*Micrococcaceae* ailesinin bir üyesi olan *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), hücreleri tek başına yada bölünen hücreler ayrılmayıp ikili, dördü ve belirgin şekilde düzensiz “üzüme benzer” yapılar oluşturan Gram pozitif bir koktur.

*S. aureus* insalarda derinin dış yüzeyinde ve özellikle burun deliklerinde olmak üzere üst solunum yolunda yaygın bir şekilde bulunabilmektedir. Sağlıklı bireyler genelde stafilokokal taşıyıcı olduklarının farkında değildirler. Ancak, çıban ve apse gibi küçük deri enfeksiyonları yaşayabilirler. Bununla birlikte, *S. aureus* fırsatçı bir patojendir ve uygun koşulları bulması durumunda daha ciddi enfeksiyonlara yol açabilir (Stapleton ve Taylor 2000). Metisiline dirençli *S. aureus* suşları (MRSA) hastane enfeksiyonları ve toplum kökenli enfeksiyonlardan sorumlu önemli patojenlerdir (Vannuffel vd, 1998; Wichelhaus vd,1999; Jaffe vd, 2000; Udo vd,2000; Sakoulas vd, 2001; Tenover vd, 2001; Nishijima ve Kurokawa, 2002; Okuma vd, 2002; Lutz vd, 2003; Francois vd, 2003; Mallorqu ı- Fern andez vd, 2004; Castellanos vd, 2004; Keserü vd, 2005). Yanıklar ve cerrahi yara enfeksiyonları genellikle *S. aureus* tarafından invaze olur. Buralardaki *S. aureus* kaynaklı toksin üretimi ateş, hastalık ve bazı durumlarda da ölüme yol açan toksik şok sendromuna sebep olmaktadır (Stapleton ve Taylor 2000). *S. aureus*'un yol açtığı hastalıklar arasında pnömoni, mastitis, deri enfeksiyonları, impetigo, selülit, osteomyelit, endokardit, bakteremiye, üriner sistem enfeksiyonları yer almaktadır (Stapleton ve Taylor 2000 Smyth vd, 2004; Lee, 2006). *S. aureus*, oluşturduğu enterotoksin ile gıda zehirlenmesine de yol açmaktadır. 1950'lerden önceki *S. aureus* enfeksiyonlarının tedavisinde bir  $\beta$ -laktam antibiyotiği olan benzilpenisilin kullanılmaktaydı fakat 1950'lerin sonlarına doğru ise benzilpenisiline dirençli *S. aureus* suşlarının artışı endişelere yol açmaya başladı. Dirençli suşlar yapı itibariyle  $\beta$ -laktamı etkisiz kılan ve  $\beta$ -laktamaz adı verilen bir enzim üretiyorlardı.Bu yüzden  $\beta$ -laktamaz hidrolizine dirençli penisilin türevlerinin sentezlenmesine yönelik çalışmalar başladı. Bu çalışmalar 1959 yılında metoksi gruplarıyla disubstitute olmuş benzilpenisilin fenol grubuna sahip metisilin sentezinin elde edilmesiyle başarıya ulaşmıştır. Ancak, metisilin klinik olarak kullanılır kullanılmaz metisiline dirençli *S.*

*aureus* (MRSA) suşları izole edilmişlerdir (Tenover vd, 2001; Lowy, 2003; Castellanos vd, 2004; Keserü vd, 2005). Bu direnç  $\beta$ -laktamaz üretiminden değil antibiyotik etkisine karşı dirençli olup diğer türlerden elde edilen ilave penisilin bağlayıcı protein (PBP2a) ekspresyonundan kaynaklanıyordu (Lee, 2006). Yıllar geçtikçe farklı antibiyotik türlerinin kullanılması çoklu direnç gösteren MRSA suşlarının ortaya çıkmasına yol açtı. Bu durum hedef proteini kodlayan genlerdeki değişimler ile antibiotiklere karşı direnç sağlayan genlerin kazanımı ve birikimin bir sonucudur. Şu an ise glikopeptid antibiyotik vankomisin antimikrobiyal tedavi için bazı vakalarda tek çözüm olarak görüldüğü bir durumdayız. Diğer bakteriyel gruplardan gelip vankomisin direnci veren genlerin *S. aureus* içerisinde ifade edilebildiğinin gösterilmesi ve glikopeptide orta düzeyde direnç gösteren *S. aureus* suşlarının ortaya çıkmasıyla yeni antistafilokokal ilaçlara yönelik araştırmalara acil ihtiyaç duyulmaktadır. Dirençle savaşmaya yönelik yaklaşımlardan bir tanesi yeni hedefler bulmak, diğeri de mevcut bir antibiyotiğe karşı direnci azaltan yada hafifleten etmenler bulmaktır. *S. aureus* içerisindeki metisilin direncine yönelik araştırmalar metisilin direncini modüle eden hedef ve bileşikler olarak hareket edebilen hücre duvarı senteziyle ilgili yeni proteinlerin bulunmasını sağlamıştır (Stapleton ve Taylor 2000).



Çizelge 2.1. Stafilokok cinsinin türleri

<i>Staphylococcus epidermidis</i> grubunda	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> grubunda	<i>Staphylococcus simulans</i> grubunda	<i>Staphylococcus sciure</i> grubunda
<i>S.epidermidis</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. simulans</i>	<i>S. sciure</i>
<i>S.capidis</i>	<i>S.cohnii</i>	<i>S.carnosus</i>	<i>S.lentus</i>
<i>S.warneri</i>	<i>S.xylosus</i>		
<i>S.haemolyticus</i>			
<i>S.hominis</i>			
<i>S.saccharolyticus</i>			

*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus auricularis*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus hycus* ve *Staphylococcus caseolyticus* herhangi bir gruba sokulamamışlardır (Bilgehan, 1992).

### 2.1.1. *Staphylococcus aureus*

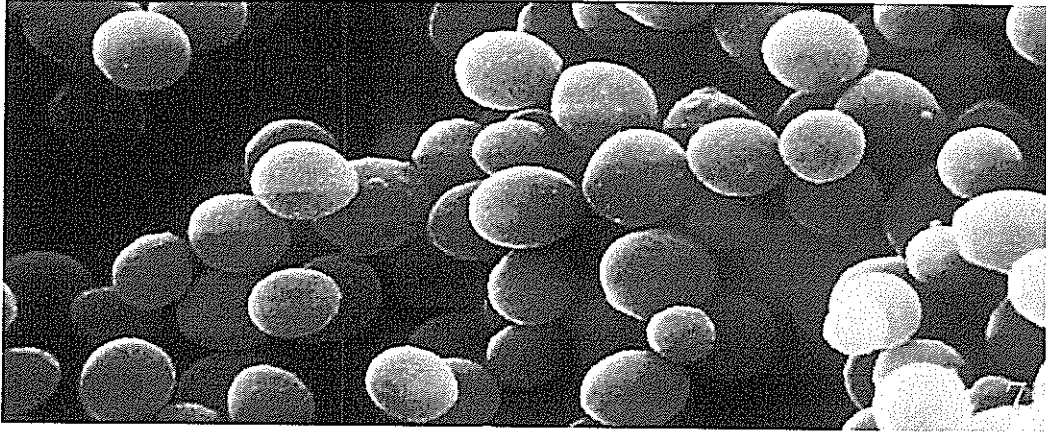
*S. aureus*, *Micrococcaceae* familyasının bir üyesi olan gram-pozitif koktur. (Stapleton ve Taylor 2000).

Üreme esnasında bölünme sonucu meydana gelen hücreler birbirlerinden ayrılmazlar ve üç boyut yönüne çoğaldıklarından üzüm salkımına benzer kümeler yaparlar. Klinik örneklerden alınan materyallerde 35°C'de 16-18 saat içinde gözle görülebilir koloniler oluştururlar. Üretilmesi için en yaygın olarak kanlı agar kullanılır. Teker teker incelendikleri zaman stafilokok hücreleri diğer koklara göre daha çok olmak üzere tam yuvarlağa yakın şekildedir. Sporsuz, hareketsiz ve kapsülsüzdürler. Hücre çeperleri özel yapıda olup peptidoglikan, teikoik asit ve türe özgü protein birimlerini içerir (Bilgehan, 1992).

*S. aureus* bazen altın staf olarak da adlandırılır. Bakterinin altın renkli görünüşünden dolayı bu isim verilmiştir. Aureus latincede altın anlamına gelmektedir.

*S. aureus* katalaz pozitifdir. Katalaz testi stafilokokileri enterokoki ve streptokokilerden ayırmada kolaylık sağlar. *S. aureus* diğer stafilokokilerden koagülaz testi ile ayrıştırılabilir. Diğer çoğu stafilokok türleri koagülaz negatifken *S. aureus* koagülaz pozitifdir.

Doğada oldukça yaygın olan, tozda, toprakta, eşya üzerinde, insan ve hayvan deri, burun mukozası, ağız ve nazofarinks floralarında *S. aureus* bakterileri bulunabilir (Bilgehan, 1992).



Şekil 2.1. *S. aureus* suşları (© 2005 Kenneth Todar University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology)

### 2.1.2. *Staphylococcus epidermidis*

*Staphylococcus epidermidis* türü çoğunlukla deri ve üst solunum yolları mukozasında bulunabilen koklar olup kültür içerisinde dörtlü veya ikili ya da düzensiz gruplar halinde nadiren tek tek görülürler. Bazıları sarı ya da turuncu pigment yapabilirler.

Tanısı *S. aureus*'a benzerdir ancak ondan koagülaz olumsuz, mannitole etkisiz, alfatoksin yapmaması ile ayrılır.

Bazıları bakteriosin ve stafilokoksin niteliğinde ve başka stafilokok ve bakteriler üzerinde bakteriyostatik veya bakterisit etki yapan antibiyotik maddeler oluştururlar.



İnsanlarda normal mukozada bulunmalarına karşılık en fazla buldukları yer insan derisidir. Daha çok genel düşüklük ve vücut direncinin çok azaldığı hallerde fırsatçı patojen olarak çeşitli enfeksiyonlara neden olurlar. Ayrıca başka bakterilerle birlikte ortak enfeksiyonlarda bulunabilirler.

*S. epidermidis*'in sebep olduğu hastalıklar arasında yumuşak dokuların abseleri, konjiktiva enfeksiyonları, pnömoni, artrit, menenjit, ampiyem, sepsis, endokardit, bazen idrar yolları enfeksiyonları sayılabilir ( Bilgehan, 1992 ).

### **2.1.3. *Staphylococcus saprophyticus***

Görünüm ve üreme özellikleri *S. epidermidis*'e benzemektedir. Daha çok anaerop koşullarda ürer. Aerop koşullarda üremesi çok zayıftır. Ayrıca anaerobik olarak glikozu fermente edememesiyle *S. epidermidis*'ten ayrılır.

Koagülaz negatif olan *S. saprophyticus* novobiosin'e dirençlidir. Normal florada bulunmaz. Direnci kırılmış insanlarda fırsatçı, patojen olarak enfeksiyonlar oluşturabilir. Daha çok kadınlarda olmak üzere idrar yolları enfeksiyonları görülmektedir. İdrar yolları epiteline özel olarak yapışma özelliği vardır (Bilgehan,1992).

Bu organizmanın sebep olduğu üriner sistem enfeksiyonlarına erkeklerde bayanlara göre daha az rastlanır (Joklik vd,1992).

### **2.1.4. *Staphylococcus capitis***

İnsan baş derisi, kaş, yüz, ense, kulak bölgeleri derisinde bulunur. İdrar yolları ve yara enfeksiyonlarından izole edilebilir.

### **2.1.5. *Staphylococcus warneri***

Hayvan derisinde bulunur. Nadiren insan enfeksiyonlarından izole edilebilir.

### 2.1.6. *Staphylococcus hominis*

İnsan deri flora elemanıdır. Fırsatçı enfeksiyonlardan izole edilen koagülaz negatif bir mikroorganizmadır.

### 2.2. *Staphylococcus aureus*'un Hastalandırıcı Özellikleri

Stafilokoklar organizmaya girdikleri yerde yerel olarak üreyerek hastalık yapabildikleri gibi dokular arasına ve kana yayılarak buralarda çeşitli ekstraselüler maddeler oluşturarak değişik klinik tablolara neden olabilirler (Bilgehan, 1992).

### 2.3. *Staphylococcus aureus*'un Antijenik Özellikleri Ve Faj Tipleri

Antijen yapısı stafilokoklarda kesin bir özellik göstermez. *S. aureus* bakterileri antijenik özellikleri bakımından karışık bir yapıya sahiptir. Bu gün *S. aureus*'un tiplendirilmesinde faj tiplendirilmesi kullanılmakta, gerektiğinde serolojik tiplendirmelerde yararlanılmaktadır. Bu bakterilerde otuzdan fazla antijen tanımlanmıştır. Özellikle epidemiyolojik amaçlar için sorumlu kökenlerin izlenmesinde faj tiplendirmesinin önemi büyüktür. Faj tiplendirilmesi Dünya Sağlık Örgütü'nün kabul ettiği yaklaşık 24 standart stafilokok faj kullanılarak yapılmaktadır. Bu bakteriofajlar her birisinin konuk olduğu özgül duyarlı *aureus* konak kökenlerinde sürdürülmekte ve denenecek stafilokok kökenlerine uygun yöntemler uygulanarak, onları eritmelerine göre tiplendirilmektedir. Sonunda incelenen stafilokok kökeni, duyarlı olduğu fajın grup ve tipine göre isimlendirilmektedir. Buna göre bir stafilokok kökeni duyarlı olduğu birden çok faj varsa hepsi birlikte gösterilmekte bu suretle faj modelleri ortaya çıkmaktadır.

*S. aureus*'un hücre çeperinin önemli bir maddesi protein A'dır. Hücre çeperinin yüzeyinde bulunur. Grup spesifik bir antijen özelliği gösterir. En önemli özelliği IgC'nin Fe parçasına bağlanabilme özelliğidir. Buna dayanılarak stafilokoklar IgG antikorları ile kaplanabilmekte ve bu antikorlara uyan diğer mikrop antijenlerinin araştırılmasında koaglutinasyon deneylerinde kullanılmaktadır. ProteinA'nın anti

fagositik ve antikomplemanter özelliği olup aşırı duyarlılık tepkimelerine de yol açar (Bilgehan, 1992).

#### **2.4. *Staphylococcus aureus*'un Bazı Enzimleri**

*S. aureus*'un ürettiği enzimler arasında katalaz, koagülaz, hiyaluronidaz, deoksiribonükleaz, lipaz ve penisilinaz sayılabilir.

Katalaz, bakterilerce üretilen katalaz enzimi myeloperoksidaz sistemince fagositik hücrelerde oluşturulan toksik serbest radikallerin ve hidrojenperoksidin inaktivasyonunu sağlar.

Koagülaz, tüm *S. aureus* suşları tarafından üretilen bu enzim fibrinojeni pıhtılaştırır. Koagülaz, protein bileşiminde ve özel antijen yapısındadır. Plazmada bulunan bir aktivatör ile birleşimi sayesinde pıhtılaşmayı gerçekleştirir.

Hemolizin, eritrositleri eriten enzimdir.

Hiyaluronidaz, bağ dokusunun yapısında bulunan asidin hiyalurodinaz depolimerizasyonu ve bu suretle stafilokokların doku içerisine yayılmasını sağlar. Antijen özelliği olan bir maddedir.

Lökosidin, lökositleri tahrip eden enzimdir. Özel antijen yapısındadır. Lökosidin yapan stafilokoklar lökositler tarafından fagosit edilseler bile lökosidin yapmayan stafilokokların aksine hücre içinde üremelerini sürdürürler.

Deoksiribonükleaz, bu enzim, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *C. perfringens* ve diğer bazı etkenler tarafından sentezlenir. Zedelenmiş dokularda bulunan hücrelerin DNA (deoksiribonükleik asit)'sini eriterek tahrip eder. Böylece, patojenler daha kolaylıkla yayılma olanağı bulurlar. Yaralarda bulunan ve yapısının büyük bir bölümünü ölmüş fagositik hücreler oluşturan irindeki hücre DNA'ları eridiğinden içlerinde bulunan mikroorganizmalar daha kolayca ve serbest hareket edebilmektedirler(Arda, 2000).

Penisilinaz, penisilin grubu antibiyotikleri hidrolize ederek penisilin ve sefalosporin gibi antibiyotiklere karşı direnç gelişimine yol açan bir enzimdir.

Lipaz, yağ asitlerini parçalayan enzimdir. Bu enzim plazma ve deri yüzeyinde bulunan yağ asitlerini parçalayarak mikroorganizmaların kutan ve subkutan dokular içerisinde yayılmasına yardımcı olur.

### 2.5. *Staphylococcus aureus*'un Toksinleri

Ekzotoksin ve hemolizinler, sıvı besiyerlerinde üretilmiş stafilokokların kültür süzüntülerinde ekzotoksin niteliğinde maddelerin bulunduğu anlaşılmıştır. Hastalandırıcı stafilokoklar tarafından meydana getirilen bu ekzotoksinler, hayvanlar için öldürücü ve deride nekroz meydana getiren yapısında çeşitli hemolizinler bulunduran termolabil bir karışımdır.

Yapılan incelemeler birbirlerinden antijen bakımından ayrı ve  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  diye isimlendirilen dört ayrı hemolizinin (ekzotoksinin) bulunduğunu ortaya koymuştur. ( Bilgehan, 1992 ). Ayrıca hastalık yapmayanlarda bir de epsilon hemolizini ayrıldığı bildirilmiştir (Unat, 1986).

Alfa hemolizin, tavşan eritrositlerini eriten, trombositleri tahribeden bir faktördür. (Bilgehan, 1992). Molekül ağırlığı 44000 kadardır. Tavşan alyuvarlarını 37°C de çabuk eritir, fakat insan eritrositlerini eritmez; pH 7,8 de ve 0°C de yarı yaşantısı üç gündür. 37°C de 30 dakika ısıtılmakla harap olur. Bunun oluşabilmesi için O<sub>2</sub> ve CO<sub>2</sub>'ye ihtiyaç vardır. Bu maddenin 1 mikrogramı fareyi öldürücü, tavşanda nekroz yapıcıdır. Bu madde damarların düz ve iskeletin çizgili adalelerinde spazm ve felç yapar, lökosit, trombosit ve çeşitli doku kültürü hücrelerini de yıkıcı veya bozucudur. Beta hemolizin ise koyun eritrositlerini erittiği halde tavşan eritrositlerini eritmez. Betalizin, tüpler 37°C de bir saat ve sonra buzdolabında 18 saat kaldıktan sonra alyuvarları eritmektedir. Betahemolizimli stafilokoklar kolonilerinin etrafında karama bölgesi yaparlar. Böylece değişen eritrositler yalnız soğukla değil birçok başka etkilerle de erirler. Betalizinin etkisiyle eritrositler delta

lizine daha duyarlı olurlar. Beta hemolizinler antijen yapıları bakımından alfa lizinden ayrıldılar. Bu toksinin deri nekrozu ve lökosit öldürücü etkisi yoktur. Bunun ortaya çıkması için O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> ye ihtiyaç yoktur. Beta hemolizin bir sphingomyelinase dir. Delta lizin havadakinden daha fazla CO<sub>2</sub> varken kan eriten ayrı bir toksindir; koyun, tavşan, at ve insan alyuvarlarına etkindir. Bu lizin en iyi 37°C de at ve insan eritrositlerini eritmekle ayrılır. Deri, lökosit ve hayvan öldürücüdür. Gama lizin antijen yapısı bakımından farklı, deri nekrozu yapan, tavşan insan ve daha başka hayvanların alyuvarlarını çabuk eriten, fakat koyun, kobay, at eritrositlerini eritmeyen veya geç eriten bir toksindir (Unat,1986).

## **2.6. *Staphylococcus aureus*'un Neden Olduğu Bazı Hastalıklar**

Follikülit, kıl folliküllerinin yüzeysel iltihabıdır.

Karbonkül, birden fazla kıl follikülünü tutan, deri altı dokulara ilerleme gösteren ciddi bir enfeksiyondur. Sistemik semptomlar hastalığa genellikle eşlik eder.

İmpetigo, daha çok çocuklarda görülür. Makül ve vezikül evrelerinden sonra akut gelişimi ile karakterize yüzeysel bir enfeksiyondur. Lezyonlar çok sayıda olup, bal rengi kabuklar tipiktir. A grubu streptokoklar da aynı tabloya yol açabilir.

Mastitit, emziren annelerde görülür. Doğumdan sonraki 2. ve 3. haftada meme başı çatlaklarının enfekte olması sonucu ortaya çıkar. *S. aureus* un etken olduğu diğer deri ve yumuşak doku enfeksiyonları; cerrahi ve travmatik yara enfeksiyonları ve selülitir.

Osteomyelit, bir kemik enfeksiyonudur, genellikle kemik enfeksiyonu vücudun bir yerindeki enfeksiyonun kan yoluyla kemiğe ulaşması ile olur, diğer bir oluşma şekli ise açık cilt yarası yoluyla.

Zatürre, adıyla da tanınan pnömoni, hava keseciklerinin (alveol) kılcal damarlardan sızan sıvıyla dolması sonucu ortaya çıkan, daha sonra pıhtılaşan bu sıvının etkilediği bölgenin süngersi yapısını yitirip sertleşmesiyle gelişen bir akciğer iltihabıdır.

Sepsis, kan'a geçen enfeksiyonun tüm organlara yayılmasıdır.

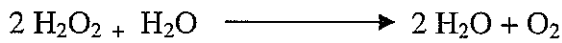
Endokardit, kalp kapaklarının iltihabına endokardit adı verilir.

Bakteremi, kanda bakterilerin bulunmasıdır.

## 2.7. *S. aureus*'un Tespiti

Stafilokok cinsinin türlerini birbirinden ayırmak için ve tanımlamak için aşağıdaki testlerden yararlanılır.

**2.7.1. Katalaz testi:** Bu test, bazı mikroorganizmalarca sentezlenen katalaz enzimini (hidrojenperoksit oksidoredüktaz) saptamak amacıyla yapılır ve identifikasyonda kullanılır. Bu enzim ekseri sitokrom ihtiva eden aerobik bakterilerde ve bazı fakültatiflerde bulunur. Katalaz bir hemoprotein olup prostetik grubunda, her molekülde, 4 atomlu ve 3 değerli demir ( $Fe^{+++}$ ) bulunur. Enzim, hidrojen peroksit'i ( $H_2O_2$ ) su ( $H_2O$ ) ve oksijene ( $O_2$ ) ayrıştırır. Hidrojen peroksitin ayrışmasında, bir molekülü substrate donör olarak görev yapar.



**2.7.2. Deoksiribonükleaz testi:** Bu test, mikroorganizmaların ısıya dayanıklı olan deoksiribonükleaz (DNase) enzimini sentezleyebilme yeteneklerini ölçmede kullanılır. Enzim, hücre çekirdeklerinde bulunan deoksiribonükleik asit'i (DNA) depolimerize ederek ayrıştırır.

Ayrıca, *S. aureus*'ların DNase'lerinin ısı karşısında termonükleaz stabilitesini ölçmede de yararlanılır. DNase aktivitesi, özellikle, koagülaz negatif reaksiyon veren

*S. aureus*'ların patojenitelerini tayinde yardımcı olur. Bu yönden, *S. aureus* (+) ve *S. epidermidis* (-) dir.

Termonükleaz testinde, ısı karşısında, *S. aureus* tarafından sentezlenen DNase varlığı ortaya konur ve *S. epidermidis* ve diğer mikrokokların oluşturduklarından farkı ortaya konur.

**2.7.3. Üreaz testi:** Bu test, mikroorganizmaların üreyi hidrolize eden üreaz enzimini saptamak amacıyla yapılır. Üreaz hidrolizasyon testi bakterilerin cins ve türlerini tayinde işe yarar.

Üre, karbonik asit'in bir diamid'idir. Bütün amidler de kolayca hidrolize olurlar. Ürenin hidrolizasyon da spesifik bir enzim olan üreaz tarafından katalize edilir. Reaksiyonun sonunda iki molekül amonyak ve karbondioksit meydana gelir.

Üreaz aktivesi için optimal pH 7.0 dir. Besiyerinde amonyağın meydana gelmesi pH'nın yükselmesine neden olur. Amonyagın meydana geldiği de indikatör boya ve Nessler ayıracı ile ortaya konur.

**2.7.4. Koagülaz testi:** Bu test, özellikle stafilokoklarda bulunan ve kan plazmasını pıhtılaştırıran koagülaz enzimini (stafilokoagulase) ortaya koyma, patojenik olanlarla nonpatojenik olanları ayırmak amacı ile yapılır. Patojenik olan *S. aureus* pozitif reaksiyon vermesine karşın *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus* negatif reaksiyon gösterir. Aslında koagülaz'ın patojenite ile ilişkisi de tam olarak aydınlatılmamıştır.

Protein karakterinde, ekstrasellüler, ısıya dayanıklı (60 °C ve 30 dakika) olan koagülaz DNA'yı da ayrıştırdığı için bir deoksiribonükleaz (DN'ase) karakteri taşır.

Bazı araştırmacılar, koagülaz enzimini, normal plazma faktörü ile reaksiyon vererek trombin benzeri subtansı oluşturan ve protrombin benzeri bir madde olduğunu da bildirmişlerdir. Bu madde sonradan fibrinojen'i aktive ederek fibrin haline dönüştürür. Stafilokoklar dışında bazı mikroorganizmalar da koagülasyon meydana getirebildikleri saptanmıştır. Ancak buradaki reaksiyon enzimatik olmayıp, plazma antikoagülatanın tahrip olması etkisinin ortadan kalkmasıyla meydana gelir.

Koagülaz enziminin fazla olması reaksiyonun daha çabuk ve belirgin olarak meydana gelmesine neden olur. Stafilokoklarda koagülaz aktivitesinin, bu etkenlerinin oluşturduğu diğer toksik substanslarla bir bağlantısı olmadığı bildirilmiştir (Arda, 2000).

Koagülaz deneyi *S. aureus*'un tanımlanmasında en güvenilir deneydir.

## 2.8. Stafilokoklarda Metisilin Direncinin Mekanizması

*S. aureus*'daki metisilin direnci 21-67 kb uzunluğundaki *mec* stafilokokal kaset kromozomu (SCCmec) olarak adlandırılan mobil element üzerinde lokalize durumdaki *mecA* geninin kazanılması sonucu olarak elde edilmektedir (Okuma vd, 2002; Shukla vd, 2004). *mecA* geni, *mecI* ve *mecRI* denilen iki düzenleyici gen ile birlikte SCCmec üzerinde ~4.2-kb'lik *mec* kompleksi oluşturur. *mec* kompleksinin *S. aureus*'daki metisilin direncini tespit etmek için kilit element olduğu düşünülmektedir. *mecI* (represör gen) ve *mecRI* (sinyal dönüştürücü gen) *mecA* ekspresyonunu büyük ölçüde kontrol etmesine rağmen ilave genler de *mecA* ekspresyonunu regüle edebilir (Shukla vd, 2004).

PBP2a adı verilen bir penisilin bağlayıcı proteinin (PBP) değişmiş bir biçimini kodlayan *mecA* genini taşıyan MRSA suşları beta-laktam antibiyotiklerine karşı direnç gösterirler (Kuwahara-Arai vd, 1996; Sakoulas, 1999; Weller, 1999; Skov vd, 1999; Araj vd, 1999; Kobayashi vd, 2000; Jaffe vd, 2000; Katayama vd, 2001; Petinaki vd, 2001; Rowe vd, 2002; Francois vd, 2003; Lowy, 2003 Shukla vd, 2004; Japoni vd, 2004; Lee, 2006).

Klinik MRSA izolatlarının yüzde 90'dan fazlası kromozomları üzerinde *mecA* genini taşırlar. *mec* kompleksi içerisinde bu genlerin fonksiyonunu etkileyen herhangi bir mutasyonun metisilin direncini de etkilediği bilinmektedir. *mecI* içerisindeki nükleotid (nt) pozisyon 202'deki aynı C→T mutasyonunu içeren farklı klinik MRSA suşlarının değişken miktarlarda *mecA* kopyaları ürettiği ve bu durumun da bu suşlar



içerisindeki değişken represör aktivitesini gösterdiği Rosato ve diğerleri tarafından belirtilmiştir. Son zamanlarda ise Katayama ve diğerleri *mecA*'daki çoklu mutasyonların beta-laktamlara karşı yüksek düzeyli direnç ürettiğini göstermiştir (Shukla vd, 2004).

*mecA* ekspresyonu esasen *mecA* geninin sağ tarafında lokalize olmuş *mecRI* ve *mecI* genlerinin kodladığı *mec* regülatörü tarafından kontrol edilmektedir ve metisilin direncine de beta-laktamların varlığı sebep olmaktadır. Yani, *mecI* genellikle *mecA* ekspresyonunu baskı altında tutar. Fakat, bakteriyel hücrelerin beta-laktamlara maruz kalmasıyla bu fonksiyon ortadan kalkar. Bununla birlikte, *mec* regülatörü bölgelerinde ortaya çıkan mutasyonlar ve de *MecI*'nin baskı fonksiyonu içerisinde sonuç olarak ortaya çıkan kayıp nedeniyle yeni MRSA izolatlarının beta-laktamlara karşı yapısal olarak dirençli hale getirildiği de bilinmektedir. Bu mutasyonlar *mecI* yada *mecA* promoter bölgedeki nükleotid yer değiştirmelerdir veya *mecI* 'deki nükleotid kayıplarıdır (Kobayashi vd, 2001).

Beta -laktamların *S. aureus*'daki ilk hedefleri penisilin bağlayıcı dört proteindir (PBPs). Beta-laktamların PBP ile etkileşimi sitoplazmik zarın dış yüzeyinde meydana gelir ve bölünme sisteminde kayba ve peptidoglikan çapraz bağlanmada azalmaya sebep olur. Stafilokoklar, penisilinaza ek olarak hemen hemen bütün  $\beta$ -laktam antibiyotikleri ve onların türevlerine karşı daha güçlü bir direnç yani metisilin direncini geliştirmişlerdir. Metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA), ek direnç determinantları biriktirme eğilim gösterirler, bu durum da çoklu dirençli MRSA'ların oluşumuna sebep olup artan tedavi sorunlarına yol açar. Bu gelişme, çoklu dirençli MRSA'nın tedavisinde kullanılan son antibiyotiğin etkinliğini tehdit eden vankomisin dirençli MRSA'nın izolasyonu ile son zamanlarda en yüksek noktasına ulaşmıştır. Bu yüzden, antibakteriyel ilaçlar için yeni hedeflerin belirlenmesi ve direnci kontrol etmeye yönelik yeni stratejilerin hazırlanması için büyük ihtiyaç vardır (Berger-Bächi, 1999).

### 2.8.1. Penisilin Bağlayıcı Protein 2A (PBP 2A)

MRSA, kromozom içerisindeki (40-60 Kb) uzunluğunda *mec* element olarak adlandırılan geniş bir yabancı DNA uzantısının ve 76 KD a pensilin bağlayıcı proteini olan PBP2a'yı (PBP2' olarak da adlandırılır) kodlayan *mecA*'nın varlığı nedeniyle metisiline duyarlı *S. aureus* izolatlarından genetik açıdan farklılık göstermektedir. *mecA* geninin *Staphylococcus sciuri*'den kaynakladığı ileri sürülmüştür. Bu türden gen kazanımıyla ilgili mekanizmanın bilinmemesine rağmen bir izolattan alınan *mec* elementi üzerinde mevcut bulunan *ccrA* ve *ccrB* adında iki genin *mec* elementi kesip çıkararak kromozom içerisine entegre edebilen rekombinaz proteinleri kodladıkları görülmüştür. Çok sayıda MRSA izolatının incelenmesi neticesinde *mecA* geni kazanımının bir kez meydana geldiği ve MRSA izolatlarının da tek bir klondan gelen türevler oldukları sonucuna varılmıştır. *mec* elementinin dizi ve bileşimi izolatlar arasında çeşitlilik göstermesine rağmen *mecA* geninin kendisi hayli korunumludur. Diğer PBP'ler ile ortak olarak PBP2a penisilin bağlayıcılık özelliğiyle ilişkili genel yapısal motiflere sahiptir fakat  $\beta$ -laktam antibiyotiklere karşı afinitesi büyük ölçüde azalmıştır. Sonuç olarak, diğer PBP'lerin transpeptidasyon faaliyetlerini inhibe eden metisilin tedavisi düzeylerinde PBP2a peptidoglikan içerisindeki glikan zincirlerinin çapraz bağlanmasını sağlayarak aktif kalmaktadır. PBP2a diğer PBP'leri tam olarak karşılayamaz çünkü metisilin bulunduğu ortamda büyüyen hücreler çapraz bağlanma derecesi açısından belirgin bir azalma sergilemektedirler. Bununla birlikte, sınırlı derecede bulunan çapraz bağlanma hücrenin hayatta kalmasını sağlayacak kadar yeterlidir (Stapleton ve Taylor 2000).

### 2.8.2. Mec Operonu Ve Düzeni

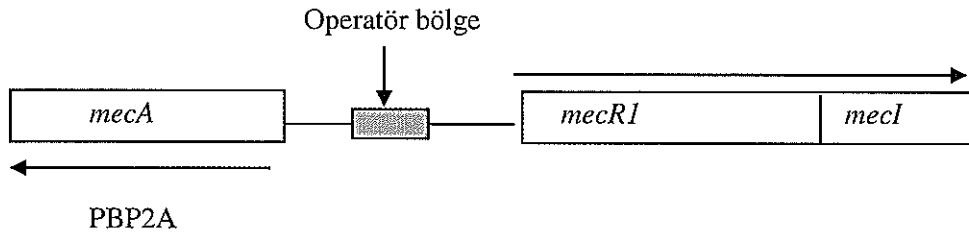
*Mec* elemanı çeşitli yollarla farklı *S. aureus* kökenlerine girmiş, bu kökenler de genetik geçmişleri açısından çeşitlilik gösteren farklı MRSA ırkları ortaya çıkarmıştır. Büyüklük ve genetik bileşenler açısından farklılık gösteren üç tür *mec* elemanı tanımlanmıştır. Bu elemanlar *mecA* geni ve *mecA* geninin transkripsiyon yönüne ters yönde transkribe olan düzenleyici elemanlar *mecR1* ve *mecI* 'yı içermektedir. *MecR1* *Basillus licheniformis* ve stafilokokal penisilini algılayan bir

protein olan BlaR1'e dizi benzerliği vardır. *mecI*, *mecA* represörü olarak görev yapar ve  $\beta$ -laktamaz represörü BlaI'ye benzerlik gösterir.

### 2.8.3. *mec* DNA

Yaklaşık olarak 30-50 kb arasında olan kromozomal *mec* DNA metisiline hassas suşlarda bulunmazken metisiline dirençli suşlarda bulunur. *Mec* bölgesi daima *S. aureus* kromozomunun pur-nov-his gen grubunun yanında bulunur.

*Mec* DNA bölgesi, *mecA*, yapısal gen olan penisilin bağlayıcı proteini (PBP2a), *mecR1* ve *mecI* ve *mecA*'nın transkripsiyonunu kontrol eden düzenleyici elementleri içerir (Chambers,1997; Kobayashi vd,1999).



Şekil 2.2. *mecA*, *mecR1* ve *mecI* genlerinin kromozal yerleşimi

### 2.8.4. *mecA*

*mecA*, metisilin direncini belirleyen, indüklenebilir bir 76-kDa PBP olan ve PBP 2a'yı kodlamaktadır. Hem duyarlı hem de dirençli *S. aureus* suşları dört tane önemli PBP'yi yani yaklaşık moleküler ağırlıkları 85, 81, 75 ve 45 kDa olan PBP 1, 2, 3, 4'ü üretir. PBP'ler serin proteazlardan gelişen, membrana bağlı pp-peptidazlardır ve biyokimyasal faaliyetleri serin proteazlarınkine benzerdir. Bu enzimler bakteriyel hücre duvarının peptidoglikanını çapraz bağlayan transpeptidasyon reaksiyonunu katalize eder.  $\beta$ -laktam antibiyotikleri, PBP aktif bölge serinine kovalent olarak bağlanan substrat analoglardır. Bu durumda enzim yaklaşık olarak MIClerler aynı kansantrasyon oranlarında inaktive olur.  $\beta$ -laktam antibiyotiklerinin pek çoğuna yüksek afinitesi olan PBP 1, 2 ve 3 hücre büyümesi ve duyarlı suşların hayatta kalması için gerekli olup  $\beta$ -laktamların bu PBP'lerle bağlanması ise ölümcüldür.

Metisilin dirençli hücrelerde,  $\beta$ -laktam antibiyotiklerine karşı düşük afinitesiyle birlikte PBP 2a başka şekilde olsa ölümcül olan antibiyotik konsantrasyonlardaki yüksek afiniteli PBP'lerin gerekli fonksiyonlarının yerini tutabilir (Chambers,1997).

*mecA* geninin dizisi, farklı MRSA suşları arasında iyi bir şekilde korunmuştur. Genetik ve epidemiolojik çalışmalar *mec* elemanının *S. aureus*'da metisilin dirençli koagülaz negatif stafilokoklardan yatay geçişle kazanıldığını göstermektedir. Ancak, suştan suşa geçiş biçimi ise henüz tam olarak açıklanamamıştır. *Mec* elemanının kaynağı hala belli değildir (Berger-Bächli, 1999; Chambers,1997). Metisiline dirençli stafilokokların *mecA*'sına % 88 oranında amino asit benzerliği taşıyan bir *mecA* homologu *Staphylococcus sciuri*'de tespit edilmiştir (Chambers,1997; Couto vd,2000; Lowy, 2003; Japoni vd, 2004). İlginçtir ki *mecA* homologuna bu türde çoğu zaman rastlanmaktadır. Bu durum, her ne kadar mevcut *S. sciuri mecA* geni metisiline direnç vermemesine rağmen *S. sciuri*'nin PBP2' kodlayıcısı *S. aureus mecA*'nın değişmiş bir versiyonu olabileceği varsayımına yol açabilir (Berger-Bächli, 1999). Bu ve diğer veriler *mecA*'nın muhtemelen *S. scuri*'ye yakın bir koagulaz negatif *Staphylococcus* türünden meydana geldikleri tezini desteklemektedir. Metisiline dirençli tüm *S. aureus* suşları *mecA*'yı kazanan çok az sayıdaki ata suşların soyundan gelen klonal suşlardır. *mecA*'nın metisiline dirençli stafilokoklar tarafından nasıl kazanıldığı tam olarak bilinmemektedir (Chambers,1997).

*mecA* geni, stafilokok türleri arasında oldukça iyi korunmuştur. *mecA* geninin ürünü olan PBP2a, yüksek moleküler ağırlıklı bir PBP'dir. Yüksek afiniteli PBP'lerde mevcut olan penisilin bağlayıcı bölgenin aynısı PBP2a'da da bulunmaktadır. *mecA* geninin ilk 300 nükleotidlik promotör bölgesi ve regülatör genleri dizi olarak stafilokokların  $\beta$ -laktamaz bölgeleriyle benzerdir.

### 2.8.5. *mecI* ve *mecRI*

*mecI* ve *mecRI* genleri, *mecA* promotörünün hemen yukarı kısmında lokalize olup farklı yönde eksprese olan düzenleyici genlerdir (Kuwahara vd, 1996; Hakenbeck ve Coyette,1998; Kobayashi vd, 1999; Weller,1999; Mallorqu ı- Fernandez vd, 2004;

Lee, 2006). Moleküler düzen, yapı, fonksiyon ve regülasyon (düzenleme) mekanizması açısından stafilokokal  $\beta$ -laktamaz regülatör elemanları olan *blaI* ve *blaRI*'ye benzerlik gösterirler. *blaI*,  $\beta$ -laktamaz geninin transkripsiyonunu (ifade edilmesini) baskı altında tutan DNA bağlayıcı bir proteindir. *blaRI* ise  $\beta$ -laktam antibiyotiklerinin varlığında  $\beta$ -laktamaz geninin transkripsiyonunu indükleyen bir PBP'dir. MecI ve MecR1 da *blaI* ve *blaRI*'ye benzer bir mekanizma ile *mecA*'nın regülasyonunda rol oynarlar.

1970'ten önceki klinik izolatların büyük kısmında *mecRI*'in penisilin bağlayıcı bölgesinde ve tam *mecI* geninin büyük bir kısmında delesyonlar mevcuttu. Bu suşlarda PBP2a üretimi konstitütiftir yani sürekli. 1980'den beri ise izole edilen suşların çoğunda ise düzenleyici genlerdeki delesyonların yerini *mecI* genindeki polimorfizmler ve *mecA* promoter bölgesindeki mutasyonlar almıştır (Chambers, 1997).

## 2.9. Metisilin Direnç Determinantının Biyolojisi Ve Gelişimi

Metisilin dirençli ilk *S. aureus* klonları, ilk penisilinaz dirençli penisilinin klinik kullanıma sunulduğu 1961 yılında ortaya çıkmıştır. O tarihten bu yana metisilin direnci çeşitli durumlarda ve farklı *S. aureus* suşları şeklinde ortaya çıktığı görülmüştür. Metisilin direnci, penisilin bağlayıcı protein PBP2'yi (PBP2a) kodlayan *mecA* geninin kazanımı yüzündendir. 2-kb *mecA* geni, 32 ila 60-kb *mec* elemanı üzerinde lokalize olmuştur ve metisiline hassas suşlarda bulunmaz. *mecA* geninin dizisi, farklı MRSA'larda ve metisilin dirençli koagülaz-negatif suşlar arasında iyi bir şekilde korunmuştur (Berger-Bächi, 1999). Genetik ve epidemiyolojik çalışmalar *S. aureus*'daki *mec* elemanının koagülaz-negatif stafilokoklardan horizontal transfer yoluyla aktarıldığını ileri sürmektedir. Ancak *mec* elemanının asıl orijini hala bilinmemektedir.

## 2.10. Metisilin Direnç Çeşitleri

Yabani tür suşlardaki heterojen ve homojen direnci olgusu tam olarak açıklanamamaktadır. Heterojen dirençli klinik izolatlar daha önce tanımlanmış hiçbir faktörde eksik değildir. Heterojen suşlardaki hücre duvarı, yüksek basınçlı likit kromotografi çözümüyle ile duyarlı suşlardaki hücre duvarından ayırt edilememektedir.

*fem*, *aux* ve diğer faktörler yabani tür suşlardaki heterojen ve homojen direnci açıklamıyor görünmesine rağmen (örneğin; fenotipin duyarlı, heterojen yada homojen olup olmadığına bakılmaksızın yeterli ölçüde tanımlanmış olanlar mevcut olup normal olarak fonksiyon göstermektedirler) bu faktörlerin anlaşılması üzerine dayanan dirençle ilgili çalışan bir model önerilebilir. Heterojen suşlar, bir faktör bakımından eksik olabilir yada biyokimyasal bir yol (bu muhtemelen ne de olsa “yabancı” bir PBP olan PBP 2a fonksiyonları için önemli olan hücre duvarı sentezi içindir) açısından kritik bir modifikasyonu bulunmayabilir. O zaman homojen suşlar genetik ortamları tam anlamıyla fonksiyonel PBP 2a’ya imkan tanıyan mutanlara uygun zemin hazırlayan  $\beta$ -laktam antibiyotik seçici baskısı ile heterojen suşlardan meydana gelirler (Chambers,1997).

Metisilin direncinin merak uyandıran bir özelliği heterodirenç olarak adlandırılan fenomendir. Heterojen özellikteki MRSA farklı alt-popülasyonlardan oluşmaktadır. Bunlara yüksek metisilin konsantrasyonlarına dirençli küçük bir azınlık konumundaki hücreleri ve duyarlı suşların sahip olduğunun biraz üstünde dirence bazen sahip olabilen çoğunluk konumundaki hücreleri de içermektedir. Oldukça dirençli alt-popülasyonların sayısı ve MRSA içerisindeki görülme sıklığı “ (suşa) özel” ve yinelenebilir bir özelliktir. Birkaç istisna ile birlikte, genellikle, oldukça dayanıklı alt-klonlar izole edildikleri zaman yüksek dirençlerini muhafaza ederler. Aynı mekanizmanın klinik ortamda da çalıştığı düşünülmektedir. Bu durum, MRSA’ya karşı  $\beta$ -laktam tedavisinin başarısız olma sebeplerinden biri olan artan direnç sahibi suşların seçimine sebep olmaktadır. MRSA suşları, direnç profillerine göre oldukça homojen şekilde direnç gösteren dirençli suşlardan çeşitli derecelerde

heterojen direnç gösteren suşlara kadar değişiklik gösteren itibari dört anlatım sınıfına bölünebilir.

Ancak, bu farklı anlatım sınıfları arasında karşılıklı uygun ilişki sağlayan mekanistik yada genetik bir model bugüne kadar elde edilememiştir. Genetik manipulasyonlar *mecA*'nın metisilin direnci için primer genetik determinant olduğunu göstermiştir fakat optimal direnç için ek kromozal genler de gerektirmektedir.

MRSA içerisindeki metisilin direnç, direnç seviyelerini etkileyen genomik farklılıkların yanı sıra büyüme ortamına ve sıcaklık, pH, osmolarite, divalent katyonlar ile anaerobiosis gibi dış etkenlere de oldukça bağlıdır (Berger-Bächi, 1999).

## 2.11. Metisilin Direnç Seviyelerini Etkileyen Kromozal Genler

MRSA suşlarının transpozon mutagenesi sonucunda oluşan metisiline hassas mutantlar üzerinde yapılan çalışmalar, fiziksel olarak *mec* elemanından ayrı, direnç gelişimine katkıda bulunan *fem* ( factors essential for methicillin resistance) yada *aux* (yardımcı faktörler)olarak adlandırılan başka kromozomal genlerin olduğunu ortaya çıkarmıştır (Berger-Bächi, 1999). Bu *fem* genleri hem hassas hemde dirençli suşların her ikisinde de bulunmaktadır. *femA*, *femB*, *femC*, *femD*, *femE*, *femF*, ve *femX* olmak üzere yedi *fem* geni karakterize edilmiştir.

### 2.11.1 *femX*, *femA*-*femB*

PBP2'nin susstratı üzerindeki gerektirdiği koşullar oldukça katıdır. Metisilin direnci sadece karakteristik muropeptid pentaglisin yan zinciri üretebilen suşlarda ifade edilebilir. Bu yan zincir, glisin kalıntılarının en az üç proteinin kontrolü altında glycyl-t-RNA'lardan muropeptide dizisel eklenmesiyle sentezlenmektedir. Bu proteinler birbirlerine biraz dizi benzerliği göstermekte olan *FemX*, *FemA* ve *FemB*'dir. gly2-gly3 ve gly4-gly5'in eklenmesi, sırasıyla, *femAB* operonu tarafından kodlanmış *FemA* ve *FemB* ile kontrol edilir. Son zamanlarda, gly1'in *FemX*

tarafından eklenmesine ilişkin bir aday (*fmbB*, fem benzerlik faktörü) saptanmıştır. *femAB* inaktivasyonu nedeniyle glisin yan zincirinin uzunluğunun azalması bozuk büyüme, azalan hücre duvarı dönüşümü ve peptidoglikan çapraz bağlanma ile bütün  $\beta$ -laktamlara karşı aşırı duyarlılığa sebep olur. *femAB*-eksik mutantlar hayatta kalabilmek için denkleştirici mutasyonlara ihtiyaç duyarlar ve ayrıca diğer antibiyotiklere karşı da aşırı hassastırlar. *fmbB* geninin gerekli olduğu görülmektedir. Bu durum pentaglisin yan zincirinin PBP2' fonksiyonu için mutlak gereksinim olduğunu göstermektedir. Sentez oranındaki azalma yada peptidoglikan prekürsörünün bileşimi gibi başka herhangi bir değişikliğin de metisilin direnci üzerinde olumsuz etkisi vardır fakat yan zincirin kısalması kadar belirgin değildir (Berger-Bächi, 1999).

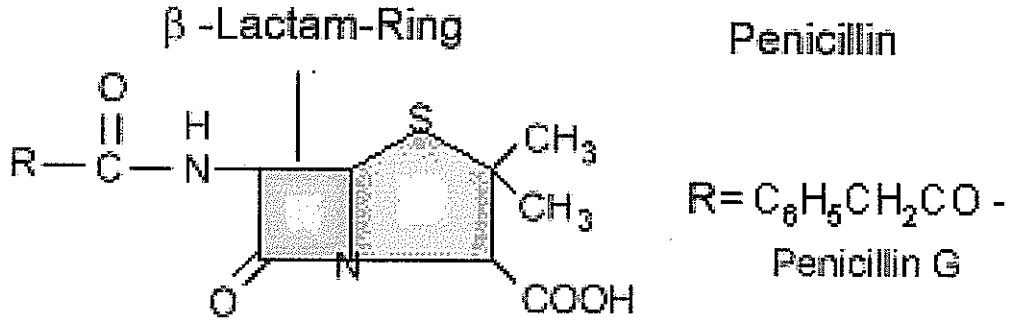
## **2.12. MRSA Enfeksiyonlarına Karşı Kullanılan Antibiyotikler**

### **2.12.1. Penisilinler**

Doğal penisilinler; Penisilin sistematik olarak kullanıma giren ilk antibiyotiktir. Önce 1929'da Sir Alexander Fleming tarafından *Penicillium notatum*'un, stafilokokların üremesini durdurduğu tesadüfen gözlenmiş ve daha sonraları, 1940'lı yıllarda Dr. Florey ve arkadaşları tarafından etkili madde yine aynı küften izole edilmiştir. Bugün hala küfün fermantasyonu ile elde edilmektedir, ancak *P. notatum* yerine *P. chrysogenum* kullanılmaktadır (Yüce, 1988).

Semisentetik penisilinler; doğal penisilin yan zincirinin amidaz enzimi ile ayrılmasından sonra değişik kökler "Penem" denen penisilin çekirdeğine eklenerek, aside dayanıklı, penisilinaza dirençli ve daha geniş etki sahası penisilinler elde edilir (Yüce, 1988).



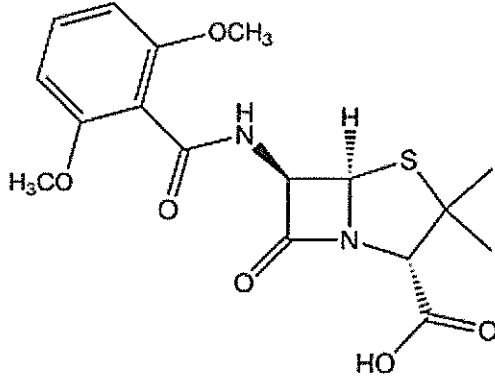


Şekil 2.3. Penisilinin yapısı (www.merian.fr.bw.schule.de/.../ blactam.GIF)

Direnç mekanizması, penisilindeki stafilokoksik direnç ,  $\beta$ -laktamaz'ı kodlayan gen olan *blaZ* tarafından yapılmaktadır. Bu ağırlıklı ekstra sellüler enzim, stafilokoki  $\beta$ -laktam antibiyotiklerine çevrildiğinde sentezlenir ,  $\beta$ -laktam'ı inaktif hale getirerek  $\beta$ -laktam halkasını hidroliz eder. *blaZ* ; antirepresör *blaR1* ve represör *blaI*, adındaki iki genin kontrolü altındadır. Son dönemdeki çalışmalar  $\beta$ -laktamaz sentezinden sorumlu sinyal yolunun BlaR1 ve BlaI düzenleyici proteinlerinin sırayla ayrılmalarını gerektirdiğini göstermiştir.  $\beta$ -laktam'a maruz bırakıldığında,BlaR1, transmembran sensör -değiştiricisi, kendisini ayırır. Zhang ayrılan protein'in doğrudan veya dolaylı olarak (bu yolda ek bir protein,BlaR2,gerekebilir) BlaI represörünü ayıran bir proteaz olarak işlev gördüğünü ve *blaZ*'ın enzim sentezlemesine olanak verdiğini varsaymaktadır (Lowy, 2003).

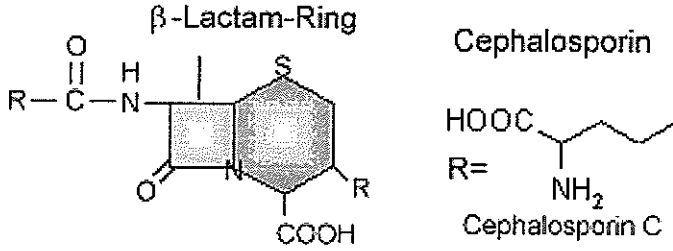
**2.12.2. Metisilin:** Metisilin stafilokokların yaptığı penisilinaza dirençli olduğundan bu enzimi sentezleyen stafilokoklara karşı aktiftir (Yüce, 1988).

Bu gruptaki benzer ilaçlar içinde plazma proteinlerine en düşük oranda bağlanandır. %90 böbreklerden atılır (Obuz vd, 1992).



Şekil 2.4. Metisilin yapısı(<http://en.wikipedia.org/wiki/Methicillin>)

**2.12.3. Sefalosporinler:** Temel yapı penisiline benzer. Bunda da antibakteriyel etkide rol oynayan, beta-laktam halkası vardır. Yalnız, penisilindeki beşli thiazolidine halkası altılı dihydrothiazine halkası ile yer değiştirmiştir. Bu temel yapıya cephem çekirdeği denir. Cephem çekirdeğinden çok değişik özellikte sefalosporinler, değişik köklerin bu nüveye eklenmesiyle elde edilir. (Yüce, 1988)



Şekil 2.5. Sefalosporinin yapısı ([www.merian.fr.bw.schule.de/.../blactam.GIF](http://www.merian.fr.bw.schule.de/.../blactam.GIF))

#### 2.12.4. Vankomisin :

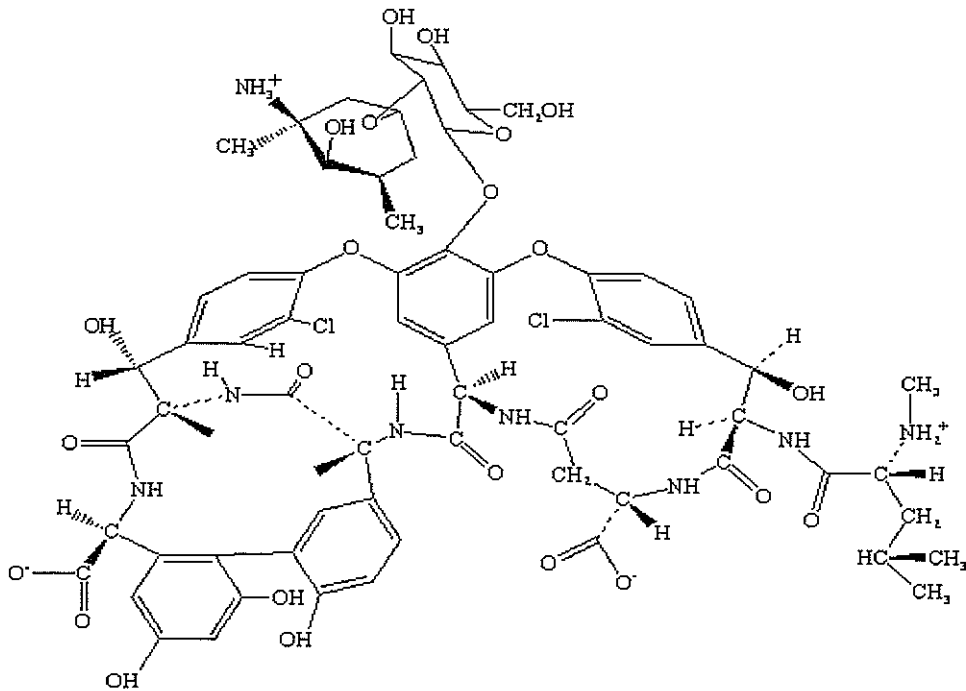
Vankomisin, *Streptococcus orientalis* tarafından üretilen bir antibiyotiktir. *Flavobacterium* hariç sadece gram-pozitif bakterilere, özellikle de stafilokoklara karşı aktiftir. Vankomisin, 1500 moleküler ağırlıklı bir glikopeptiddir. Suda çözünebilir ve oldukça kararlıdır.

Vankomisin, gelişmeye başlamış peptidoglikan pentapeptidin D-Ala-D-Ala terminusuna sıkıca bağlanarak hücre duvarı sentezini inhibe eder. Bu da transglikosilazı inhibe eder ve peptidoglikanın daha fazla uzaması ve çapraz

bağlanmayı engeller. Böylece, peptidoglikan zayıflar ve hücre lisisine duyarlı hale gelir. Hücre membranı da zarar görür. Bu durum da antibakteriyel etkiye yol açar.

Vankomisin direnci, D-Ala terminalinin D-laktat terminaliyle değiştiği peptidoglikan temel yapıtaşının D-Ala-D-Ala bağlanma bölgesinin modifikasyonu yüzündendir. Bu durum vankomisin yüksek afinite ile hedefine bağlanmasını kolaylaştıran hidrojen bağında ve aktivitede kayba yol açar.

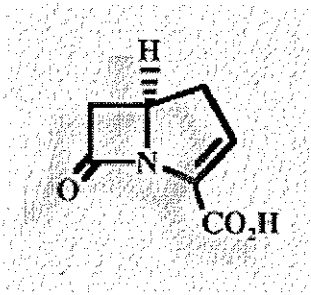
Vankomisin, 0.5-10 µg/mL'lik konsantrasyonlardaki gram-pozitif bakteriler için bakterisidaldir. Betalaktamaz üreten ve nafsilin ile metisiline dayanıklı olanları da dahil olmak üzere çoğu patojenik stafilokok 4 µg/mL yada daha azı ile öldürülmektedir. Vankomisin, stafilokokları nispeten yavaşça ve sadece hücreler aktif olarak bölünüyorsa öldürür. Oranı ise hem vücut hem de tüp içerisindeki penisilin oranından daha azdır. Vankomisin, yüksek aminoglikozit direnç seviyeleri göstermeyen *E faecium* ve *E faecalis* suşlarına karşı gentamisin ve streptomisin ile sinerjistikdir (Katzung,1998).



Şekil 2.6. Vankomisin yapısı (www.bmb.leeds.ac.uk/.../cephalosporin\_nuc.gif)

### 2.12.5. Karbapanemler

Karbapanemler kimyasal yapıları betalaktam antibiyotiklere benzeyen yeni bir ilaç grubudur. Bu grubun insanlarda ayrıntılı incelemesi yapılan ilk ilacı imipenemdir. İmipenem Gram negatif çomaklardan, Gram-pozitif organizmaları ve anaerobları da kapsayan geniş bir spektrumda oldukça iyi bir etkinlik sağlar. Beta-laktamazlara dirençli fakat renal-tubullerdeki dihidropeptidazlar tarafından inaktive edildiği için idrarda düşük yoğunluklarda bulunur. Bu nedenle klinikte kullanılırken renal dihidropeptidazı inhibe eden silastatin ile birlikte verilir. İmipenem serebrospinal sıvı da dahil vücuttaki doku ve sıvılara iyi geçer. Genellikle 0,5-1 g, 6 saat aralarla intravenöz verilir(yarı-ömür 1 saat). Böbrek yetmezliğinde daha düşük dozlarda, fakat hemodializden sonra, ek doz verilmelidir. İmipenemin tedavideki önemi tam olarak belirlenmemiştir. Diğer ilaçlara dirençli imipeneme duyarlı organizmaların oluşturduğu enfeksiyonlarda kullanılabilir. *Pseudomonas*'lar imipeneme hızla direnç kazandıkları için birlikte bir aminoglikozit kullanılması gerekir. İmipenemle bir aminoglikozidden oluşan kombinasyon febril ve nötropenik hastalarda etkin bir tedavi oluşturmaktadır. İmipenemin en sık rastlanan yan etkileri bulantı, kusma, diyare, deri döküntüleri ve infuzyon bölgesindeki reaksiyonlardır. Renal yetmezlikte ortaya çıkan yüksek serum düzeyleri nöbetlere neden olabilir. Penisiline alerjik hastalar imipeneme de alerjik olurlar(Katzung,1995).

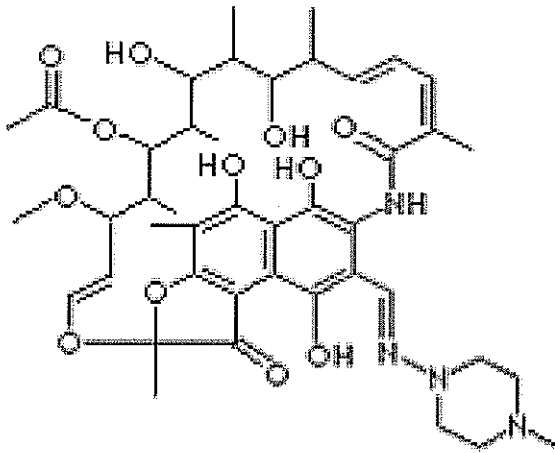


Şekil 2.7. Karbapanemin yapısı ([www.bio.cam.ac.uk/~salmond/pics/carbapenem.jpg](http://www.bio.cam.ac.uk/~salmond/pics/carbapenem.jpg))

### 2.12.6. Rifampin

Rifampin *Streptomyces mediterranei* tarafından oluşturulan rifamisinin büyük molekülü (molekül ağırlığı 823), yarı yapay ve karmaşık bir türevidir. Bazı Gram pozitif ve Gram-negatif koklara, bazı enterik bakterilere, mikobakterilere, klamidyalara, ve poks-viruslara karşı in vitro etkilidir. Rifampin tek ilaç olarak kullanıldığında bu tür dirençli mutantların ortaya çıkması kolaylaşır. Diğer hiçbir ilaçla çapraz direnç oluşturmaz.

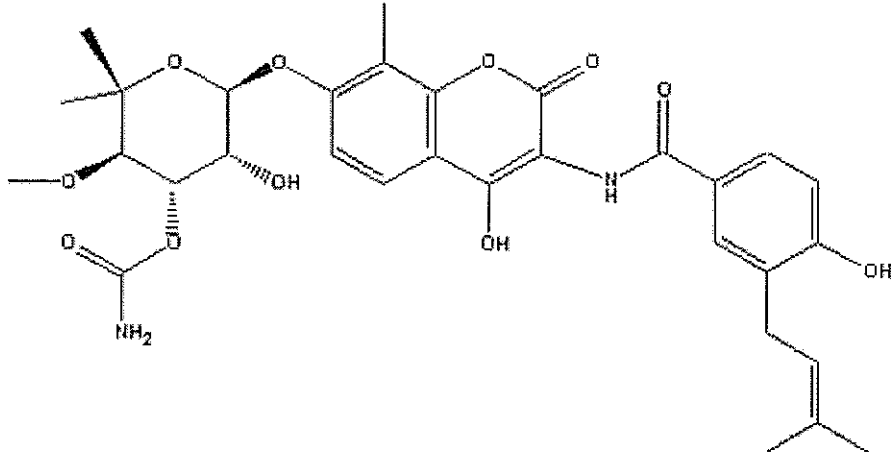
Rifampin DNA bağımlı RNA polimeraza kuvvetle bağlanarak bakteri ve klamidyalarda RNA sentezini inhibe eder. İnsan RNA polimerazı rifampinden etkilenmez. (Katzung,1995)



Şekil 2.8. Rifampinin yapısı ([www.chemicaland21.com/.../phar/RIFAMPIN.htm](http://www.chemicaland21.com/.../phar/RIFAMPIN.htm))

### 2.12.7. Novobiosin

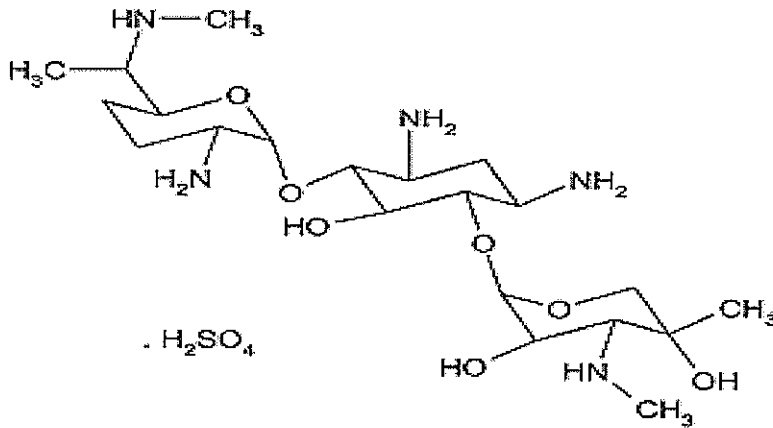
Novobiosin bulunduğu ortamda hemen DNA replikasyonunu inhibe ettiği için duyarlı bakteriler üzerine etkisi büyüktür (Kılıçturgay vd, 1996).



Şekil 2.9. Novobiosinin yapısı ([www.rit.edu/.../504\(704\)/gyrase\\_inhibitors.htm](http://www.rit.edu/.../504(704)/gyrase_inhibitors.htm))  
novobiosin

### 2.12.8. Gentamisin

Gentamisin sülfat olarak hem topikal hem de parenteral olarak kullanılmaktadır. Daha ziyade gram negatif basillerin oluşturduğu enfeksiyonlarda etkilidirler (Kılıçturgay vd, 1996).

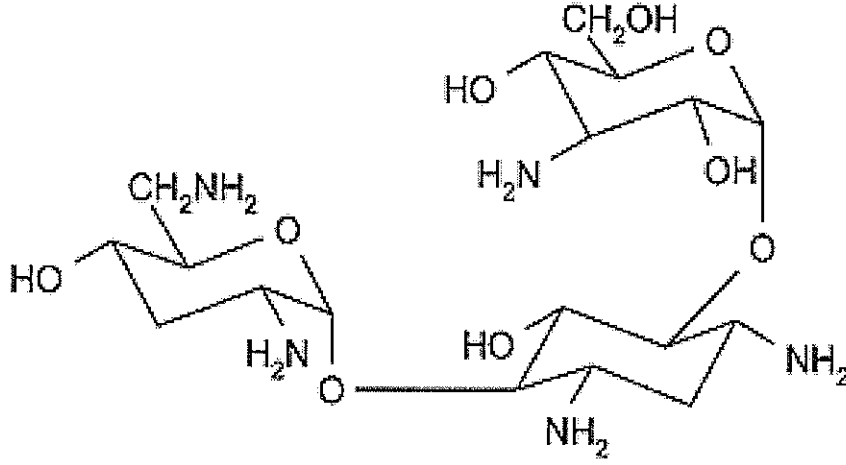


Şekil2.10.Gentamisinin yapısı ([www.axxora.com/antibiotics-LKT-G1658/opfa.1.1...](http://www.axxora.com/antibiotics-LKT-G1658/opfa.1.1...))

### 2.12.9. Tobramisin

Tobramisin sülfat olarak hem topikal hem de parenteral olarak kullanılmaktadır. Tobramisin geniş ölçüde gram negatif basil enfeksiyonlarında kullanılmaktadır. *P*

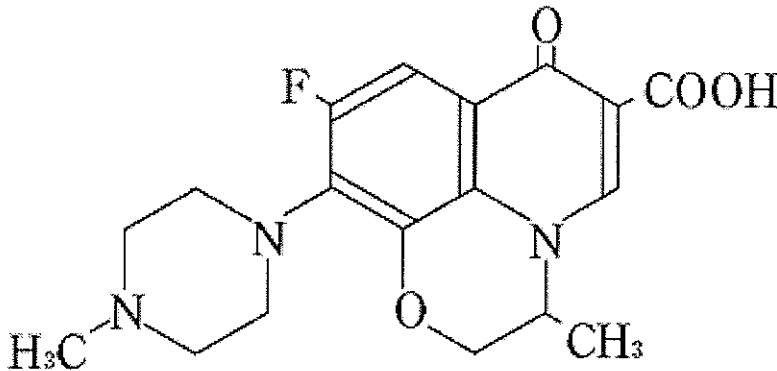
*aeruginosa* üzerine etkisi gentamisinden daha fazla olup *serratia* türleri üzerine etkisi gentamisinden daha azdır. Tobramisin gentamisinden daha az nefrotoksiktir ( Kılıçturgay vd, 1996).



Şekil 2.11. Tobramisinin yapısı (www.axxora.com/ antibiotics-LKT-T5604/opfa.1.1...)

### 2.12.10. Mupirosin

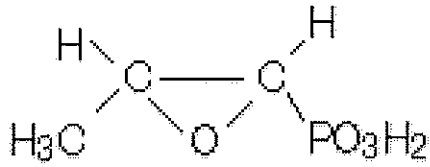
Mupirosin, *Pseudomonas fluorescens* 'in doğal olarak ürettiği bir pseudomanik asittir. Mupirosin, izölösil-tRNA sentetazı inhibe ederek Stafilokokları inhibe eder ve öldürür(Chambers,1997).



Şekil 2.12. Mupirosinin yapısı (pharma.kolon.co.kr:8080/ test/newstopic/main\_c...)

### 2.12.11. Fosfomisin

Peptidoglikan sentezinde ilk adım, tek karbonhidrat olan N-asetilmuramik asidin elde edilmesidir. Bu olay enzimatik olarak fosfoenol piruvat'ın N-asetilglukozamine bağlanması ile gerçekleşir. Fosfomisin bir fosfoenolpiruvat analogudur ve N-asetilmuramik asit sentezini engeller. Fosfomisin geniş spektrumlu bir antibiyotiktir(Kılıçturgay vd, 1996).



Şekil 2.13. Fosfomisinin yapısı (pharma1.med.osaka-u.ac.jp/.../ Antiinfective.html)



### **3.MATERYAL ve METOT**

#### **3.1. Suşların Toplanması**

Bu çalışmada Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nin değişik kliniklerinden izole edilmiş olan 38 adet *S. aureus* suşu kullanılmıştır.

##### **3.1.1.Suşların Üretimi ve Saklanması**

Çalışmada kullanılacak suşlar uzun süreli saklama amacıyla üzere Triptik Soy Broth (Merck) besiyerine ekilerek 37°C'de 24 saat üretimin ardından %1 gliserol içeren tüplere aktarılarak -80 ° C'de derin dondurucuda (Heto) muhafaza edilmiştir. Daha sonra antibiyotik duyarlılık testi ve PZR çalışmaları için kullanılacak olan *S. aureus* suşları önce kanlı agara ekilmiştir. 37°C'de 24 saat üreyen bakteriler buradan Triptik Soy Agar besiyerine alınarak 37°C'de 24-48 saat inkübe edilmiş ve +4° C'de günlük kullanım için saklanmıştır.

##### **3.1.2. Besiyerlerinin ve Solüsyonların Hazırlanması**

Besiyeri olarak Triptik Soy Broth (Merck) ve Triptik Soy Agar ayrıca hassasiyet testleri için de Müller Hinton besiyerleri hazırlanmıştır. Besiyerleri saf su üzerine belirtilen miktarlarda eklenerek hazırlanmıştır. Hazırlanan bu besiyerleri 121°C'de 15 dakika otoklavda (Selecta Steril Max 25) sterilize edilmiştir. Sterilize edilen besiyerleri uygun sıcaklığa gelince plastik petrilere dökülerek steril kabinde katılaşmaları beklenmiş ve çizim yoluyla ekim yapılmıştır. Ekim yapılan petrilere 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiş ve daha sonra kullanılmak üzere +4 °C'ye konulmuştur.

Çizelge 2.2. Kullanılan besiyerleri ve solüyonlar

Besiyerleri ve solüsyonlar	Gram/litre
Triptik Soy agar	40g
Müller Hinton agar	38g
Triptik Soy broth	30g
Müller Hinton broth	21g
TBE (10x)	108g Tris base 55g Borik asit 9.3 EDTA
Lizis tamponu	%1 Triton X 100 10 mM Tris HCl 100 mM NaCl 1 mM EDTA
Jel Yükleme tamponu	%25 Fikol %0.25 Brom fenol mavisi %8 (w/v) Sükroz

### 3.2. Metisilin Direnci İçin Duyarlılık Testleri

Metisilin direncini tespit etmek için yaygın bir şekilde kullanılan yöntemler direnç ekspresyonunu artırmak için modifiye edilmiş kültür koşullarına bağlıdır. Bu modifikasyonlar (bazı suşların yaygın olması durumunda metisilin direnciyle en iyi şekilde tespit edilmelerine rağmen) oksasilin kullanımıyla birlikte 37°C yerine 30-35°C'lik sıcaklıkta kuluçka ısısı ve 16-18 saat yerine 24 saatlik kuluçka dönemini kapsamaktadır. Oksasilin yada metisilinden başka etkenler (örneğin, sefalosporin yada imipenem) içeren duyarlılık testleri güvenilir değildir. Metisilin dirençli suşlar yanıltıcı bir şekilde tüp içerisindeki bazı  $\beta$ -laktam antibiyotiklerine duyarlı görünebilirler, fakat yine de dirençlidirler çünkü PBP 2a üretim mekanizması çapraz direnç ile neticelenir. Ulusal Klinik Laboratuar Standartları Kurulu (NCCLS), metisiline dirençli stafilocoklara yönelik test yöntemlerini düzenli olarak gözden geçirmektedir. Spesifik test önerileri için bu kaynağa danışılmalıdır.

Metisilin direncinin heterojen yapısı duyarlılık testinin doğruluğu için içsel bir kısıtlamadır. PCR veya DNA melez üretimine dayalı *mecA* saptama testleri suşların en heterojenini bile doğru bir şekilde tespit edecektir ve metisilin direnci için altın standart olarak düşünülmelidir. Fenotipik olarak dirençli fakat *mecA* yönünden negatif olan *S. aureus* suşları için metisilin ve oksasilin MIC'leri hemen hemen her zaman  $< 16 \mu\text{g/ml}$ 'dir ve suşlar muhtemelen klinik açıdan önemli değildir çünkü  $\beta$ -laktam antibiyotikleri muhtemelen onlara karşı etkilidir. *mecA* yönünden negatif ve büyük kısmı koagulaz negatif olup yüksek direnç düzeylerine ( $> 32 \mu\text{g/ml}$ ) sahip nadir stafilokok suşları olduğu bildirilmiştir. Bu organizmaların yol açtığı enfeksiyonları tedavi etmenin yolu belli değildir. Bununla birlikte MIC'ler serum içerisinde elde edilebilir  $\beta$ -laktam antibiyotik konsantrasyonlarından daha büyük olduğu için vankomisin tercih edilebilir (Chambers,1997).

### 3.2.1. Disk Difüzyon Metodu

Disk difüzyon yönteminde belirli bir miktar antibiyotik emdirilmiş kağıt diskler, test mikroorganizmasından hazırlanan standart süspansiyonun yayıldığı agar plakları yüzeyine yerleştirilir. Böylelikle, diskteki antibiyotik agar içerisine yayılır ve bakteriye etkili olduğu düzeylerde üremeyi engeller. Bunun sonucunda, disk çevresinde bakterilerin üremediği dairesel bir inhibisyon alanı oluşur (Gülşay, 2002).

Çalışmamızda her bir suş için Mc-Farland 0.5 bulanıklığında hazırlanan standart bakteri süspansiyonunun yaklaşık 2 mL'si Mueller Hinton agar bulunan petrilere tüm besiyerinin üzerini kaplayacak şekilde yayıldı. Besiyeri üzerine steril pensle oksasilin (Oxoid) antibiyotiğini içeren diskler yerleştirildikten sonra petrilere 35°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda disklerin çevresinde bakterilerin test edilen antibiyotiğe duyarlılık derecesini ifade eden bakterilerin üremediği dairesel alanın çapı ölçülerek duyarlı, orta ve dirençli suşlar NCCLS'nin kriterlerine göre belirlendi.

### 3.2.2. Epsilometre Testi (E Testi)

Difüzyon temeline dayanan ancak diskler yerine belirli ve sürekli bir konsantrasyon değişimi olacak şekilde antibiyotik içeren plastik striplerin kullanıldığı bir yöntemdir. İnkübasyon süresi sonunda, elips şeklindeki inhibisyon alanının stripi kestiği konsantrasyon MİK olarak belirlenir (Gülay, 2002)

Çalışmamızda her bir suş için Mc-Farland 0.5 bulanıklığında hazırlanan standart bakteri süspansiyonunun yaklaşık 2 mL'si Mueller Hinton agar bulunan petrilere tüm besiyerinin üzerine kaplayacak şekilde yayıldı. Petriler steril kabinde 20 dakika kurutulduktan sonra besiyeri yüzeyine steril pensle oksasilin E-testi şeritleri konularak 35°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda elips şeklindeki inhibisyon zonunun şeridi kestiği noktadaki konsantrasyon değeri NCCLS' nin kriterlerine göre MİK değeri olarak kaydedildi.

### 3.3. DNA Teknikleri

#### 3.3.1. Koloni Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Çalışmada her suş örneği için eppendorf tüplere 50 µL lizis tamponu koyularak sterilize edilmiş olan kürdanlarla petrilere 1-2 koloni alıp çalkalayarak çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra tüplerin ağzı parafilmle kaplanarak 20 dakika kaynatılmıştır. Soğuyan tüpler parafilminden temizlenip, 14000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. (Hettich Universa 132).

Santrifüjden sonra süpernatantın 3 µL si PZR için kullanılmıştır.

#### 3.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

DNA 'nın istenilen bir parçasının in vitro koşullarda uygun primerler kullanılarak, sıcaklığa dayanıklı enzim yardımı ile çoğaltılmasıdır.

Bu çalışmada toplanan *S. aureus* suşlarında *mecA*, *mecR1* ve *mecI* genlerinin varlığı araştırılmıştır. Bu genleri çoğaltmak için kullanılan primerlerin nükleotit dizilimi aşağıdadır.

***mecA***

primer1 (5' AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C 3')

primer2 (5' AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C 3')

***mecR1***

primer1 (5' TGG TAT TTG GTT TAG TGA A 3')

primer2 (5' GAT TAG GTT TAG GCA TTG A 3')

***mecI***

primer1 (5' AAT GGC GAA AAAGCA CAA CA 3')

primer2 (5' GAC TTG ATT GTT TCC TCT GTT 3')

Çizelge 2.3. *mecA* geni için PZR'de kullanılan bileşenler

<i>mecA</i> primeri I	4 µL
<i>mecA</i> primeri II	4 µL
Genomik DNA	2 µL
MgCl <sub>2</sub> (Fermentas)	3 µL
dNTP mix(Fermentas)	2 µL
Buffer x10 (PCR tamponu) (Fermentas)	5 µL
Steril saf su	30 µL
Toplam hacim	50 µL

PZR başladıktan 5 dakika sonra 0,5 µL Taq Polimeraz (Fermentas) eklenir.

Çizelge 2.4. *mecR1* geni için PZR'de kullanılan bileşenler

<i>mecR1</i> primeri I	1 µL
<i>mecR1</i> primeri II	1 µL
Genomik DNA	3 µL
MgCl <sub>2</sub>	3 µL
dNTP mix	4 µL
Buffer x10 (PCR tamponu)	6 µL
Steril saf su	32 µL
Toplam hacim	50 µL

PZR başladıktan 5 dakika sonra 0,5 µL Taq Polimeraz (Fermentas) eklenir.

Çizelge 2.5. *mecI* geni için PZR'de kullanılan bileşenler

<i>mecI</i> primeri I	1 µL
<i>mecI</i> primeri II	1 µL
Genomik DNA	3 µL
MgCl <sub>2</sub>	3 µL
dNTP mix	4 µL
Buffer x10 (PCR tamponu)	6 µL
Steril saf su	32 µL
Toplam hacim	50 µL

PZR başladıktan 5 dakika sonra 0,5 µL Taq Polimeraz (Fermentas) eklenir. Genellikle PZR çalışmalarının büyük çoğunluğunda *Thermus aquaticus* (Taq) bakterilerinden elde edilen termostabil Taq DNA polimeraz enzimi kullanılmaktadır. Taq DNA polimeraz optimal sıcaklıkta (70-80°C) saniyede 35-100 nükleotidin polimerizasyon ve 5'3'ekzonükleaz aktivitesini gerçekleştirme yeteneğine sahiptir. Taq polimeraz genellikle 5 ünite/µl konsantrasyonda gelir ve -20°C'de saklanır. (Sanıç vd.)

***mecA* geni için PZR koşulları:**

94° C'de 5 dakika (denatürasyon)	}	1 döngü
85° C'de 2 dakika (taq DNA polimeraz ilavesi)		
50° C'de 45 saniye ( primerlerin bağlanması)		
72° C'de 2 dakika (polimerizasyon)		

94° C'de 45 saniye,	}	30 döngü
50° C'de 45 saniye,		
72° C'de 1 dakika		

72 ° C'de 5 dakika 1 döngü gerçekleşir ve PZR tamamlanır.

***mecRI* geni için PZR koşulları:**

94° C'de 5 dakika	}	1 döngü
85° C'de 2 dakika		
50° C'de 45 saniye		
72° C'de 2 dakika		

95° C'de 60saniye	}	30 döngü
55° C'de 60saniye		
72° C'de 2 dakika		

72 ° C'de 5 dakika 1 döngü

***mecI* geni için PZR koşulları:**

94° C'de 5 dakika	}	1 döngü
85° C'de 2 dakika		
50° C'de 45 saniye		
72° C'de 2 dakika		

95° C'de 60saniye,  
 50° C'de 60saniye,  
 72° C'de 2 dakika } 30 döngü  
 72 ° C'de 5 dakika 1 döngü gerçekleşir ve PZR tamamlanır.

PZR işlemi sonucu negatif çıkan her örnek için yukarıdaki işlemler en az iki kez daha tekrarlanmıştır. PZR sonucu 533 bp büyüklüğündeki *mecA*, 414 bp büyüklüğündeki *mecR1* geni ve 265 bp büyüklüğündeki *mecI* geni agaroz jel elektroforezinde incelenmiştir.

Bu çalışmada kullanılan PZR makinesinin modeli 'Techne Genius'tur.

### 3.3.3. Agaroz Jel Elektroforezi

Amplifiye edilen PZR ürünleri değişik yöntemlerle belirlenebilir. En yaygın olarak kullanılanı agaroz jel elektroforezidir. PZR ile elde edilen ürünler agaroz jel kullanılarak elektrik alanında büyüklüğüne göre ayrılır. Agaroz jelde DNA bantlarının görülebilmesi için PZR ürünlerinin flouresan bir boyayla (ör. Ethidiumbromid) muamele edilmesi gerekir. Ethidium bromid'le boyanan DNA bantları ultraviyole (UV) transilliminator veya epiilliminator ışığı altında görünür hale gelir. Beklenen PZR ürünlerinin varlığı DNA molekül ağırlık standartları (DNAmarker) veya pozitif kontroldeki bant büyüklüğü ile karşılaştırılarak belirlenir (Sanıç vd.).

PZR sonucu ortaya çıkan ürünleri incelemek için %1'lik agaroz jel hazırlanmıştır. Bu jel için 0.3g agaroz (Sigma) ve 30mL 10XTBE kullanılmıştır. Hazırlanışı TBE içinde agaroz çözülerek kaynatılması şeklindedir. Kaynatılan jel soğumaya bırakılır. Jel dökme tablasının kenarları otoklav bandı ile düzgün bir şekilde bantlanmıştır. Daha sonra sekizli tarak tablaya yerleştirilmiştir. Soğuyan jel tablanın bir kenarından yavaşça kabarcık oluşmayacak şekilde dökülmüştür. Jelin katılaşması beklenmiştir. Jel katılaştıktan sonra tarak dikkatli bir şekilde çıkarılmıştır. Jel içinde 10XTBE bulunan tanka yerleştirilmiştir. Ürünleri karşılaştırmak için marker (Fermentas1kb

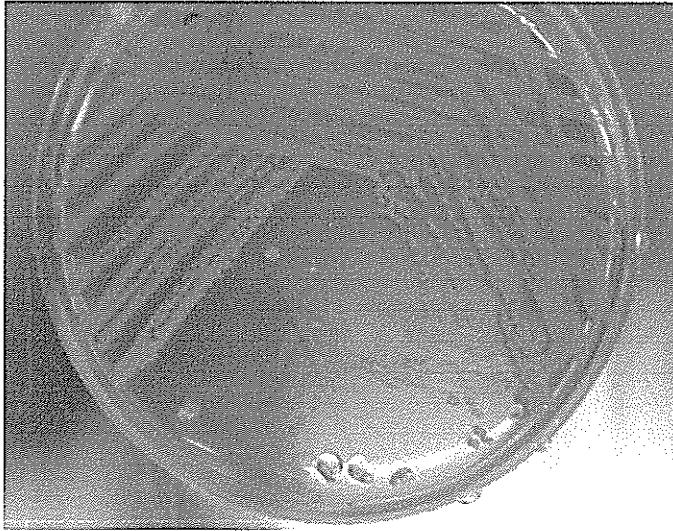


ladder) 3  $\mu$ L olarak jele yüklenmiştir. Her 15  $\mu$ L örneğe 3  $\mu$ L jel yükleme solüsyonu eklenerek jele yüklenmiştir. Elektroforez tankı güç kaynağına (Biolab Power PAC 300) bağlanmış ve 100 Volt akım şiddeti 1 saat süresince uygulanmıştır. Bir saat sonunda jel tanktan alınıp 20 dakika boyunca Etidyum bromür'le muamele edilmiştir. DNA bantları jel görüntüleme sisteminde görüntülenerek incelenmiştir.

#### 4. BULGULAR

Bu çalışmanın ilk aşamasında Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nin değişik kliniklerinden izole edilmiş olan 38 adet *S. aureus* suşu toplanmış ve toplanan bu izolatlar üretim için triptik soy broth ve agar kullanılarak katı besiyerine ekim yapılmıştır. Üretimden sonra uzun süre depolama için % 1 gliserin içeren tüplerde -80°C'de muhafaza edilmiştir.

Bu çalışmada kullanılan 38 adet *S. aureus* suşunun oksasilin duyarlılıkları oksasilin antibiyotik diskleri ve E-testi kullanılarak araştırılmıştır. Daha sonra oksasilin duyarlık testleri yapılan suşlarda *mecA*, *mecR1* ve *mecI* genlerinin varlığı PZR metodu ile araştırılmıştır.



Şekil 2.14. Triptik Soy Agar besiyerinde üretilmiş *S. aureus* kolonileri

##### 4.1. Disk Difüzyon Bulguları

Çalışmaya alınan suşların duyarlılıkları 1 µg oksasilin diskleri (Oxoid) kullanılarak ve NCCLS standartlarına uygun olarak disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Uygulanan disk difüzyon metoduna göre 3 *S. aureus* suşu oksasilin'e hassas 35

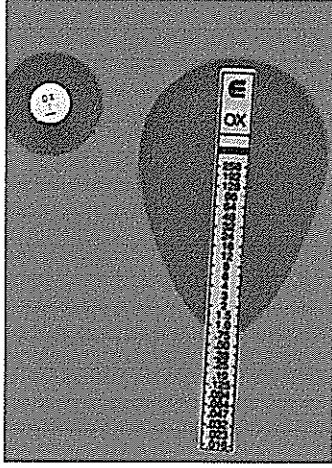
*S. aureus* suşu ise oksasilin'e dirençli bulunmuştur. Oksasilin disk difüzyon testinin sonuçları Çizelge 2.6'da verilmiştir.

Çizelge 2.6. Disk difüzyonunda antibiyotik zon çapları

Suş No	Oksasilin (mm)
<b>MSSA</b>	
1	20
2	20
3	17
<b>MRSA</b>	
4	0
5	0
6	0
7	0
8	0
9	0
10	0
11	0
12	0
13	0
14	0
15	0
16	0
17	0
18	0
19	0
20	11
21	0
22	0
23	0
24	0
25	0
26	0
27	0
28	0
29	0
30	0
31	0
32	0
33	0
34	0
35	0
36	0
37	0
38	0

Çizelge 2.7. Disk difüzyonunda oksasilin sınır değerleri

Antibiyotik	Hassas	Dirençli
	Disk çapı	
Oksasilin	≥20 mm	≤13mm

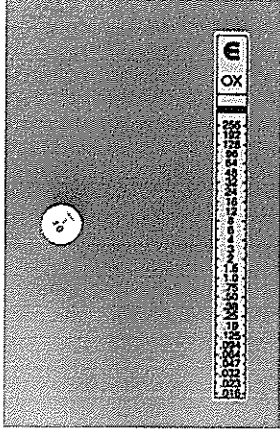
Şekil 2.15. MİK 1µg/ml ve oksasilin disk çapı 16mm olan *S. aureus*

#### 4.2. E-Testi Bulguları

Çalışmaya alınan suşların duyarlılıkları oksasilin ve E-testleri kullanılarak ve NCCLS kriterlerine uygun olarak MİK değerleri belirlenmiştir. Buna göre 38 *S. aureus* suşundan 3 tanesi oksasilin antibiyotiğine hassas diğer 35 suşun dirençli olduğu tespit edildi. Yapılan bu testin sonuçları çizelge 2.9'da gösterilmiştir.

Çizelge 2.8. E-testinde oksasilin sınır değerleri

Antibiyotik	Hassas	Dirençli
	Disk çapı	
Oksasilin	≤2µg/ml	≥4µg/ml



Şekil 2.16. Okzasiline dirençli bir *S.aureus* suşu

Çizelge 2.9. E-testinde antibiyotik duyarlılık oranları

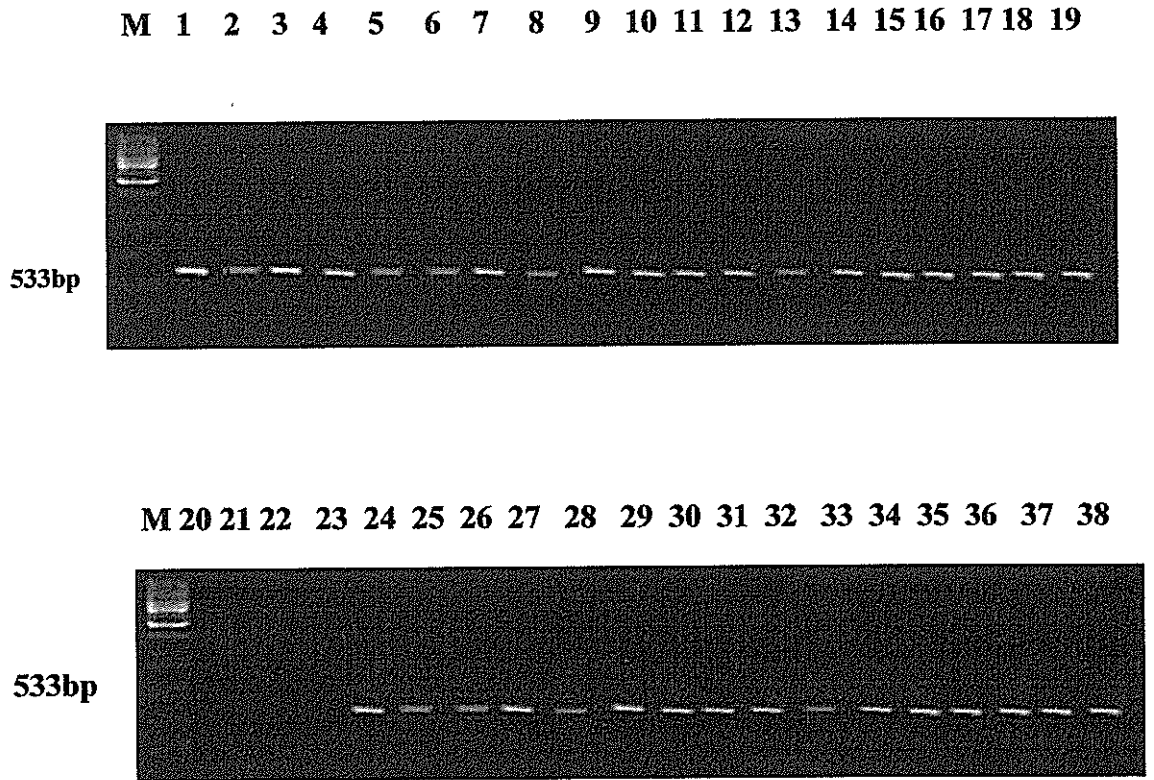
Suş No	Oksasilin MİK (µg / ml)
<b>MSSA</b>	
1	0.38
2	0.6
3	0.5
<b>MRSA</b>	
4	128
5	256
6	62.5
7	128
8	256
9	256
10	256
11	256
12	256
13	256
14	256
15	256
16	256
17	256
18	256
19	256
20	64
21	128
22	256
23	256
24	256
25	256
26	256
27	256
28	256
29	256
30	256
31	256
32	256
33	256
34	256
35	256
36	62.5
37	256
38	256

### 4.3. PZR Bulguları

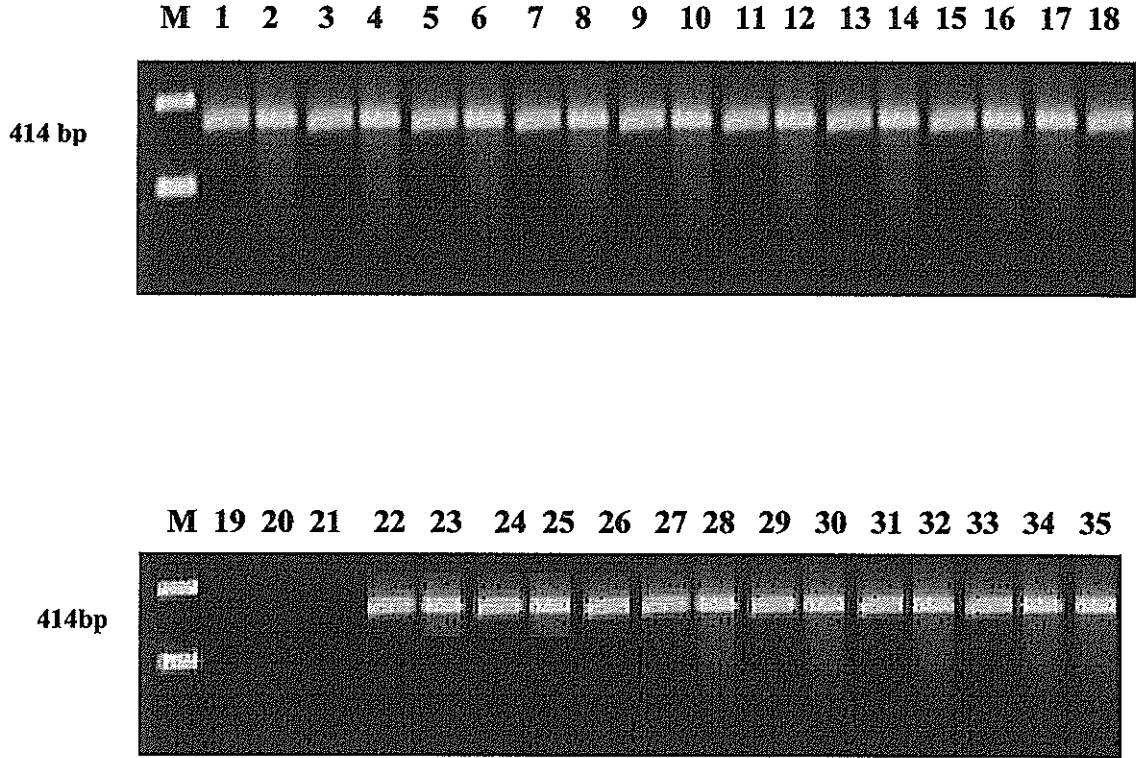
Bu çalışmada 533 bp'lik *mecA*, 414 bp'lik *mecR1* ve 265 bp'lik *mecI* genlerinin varlığı PZR metodu kullanılarak araştırılmıştır.

Çizelge 2.10. *S. aureus* suşu için PZR sonuçları

	<i>mecA</i>		<i>mecR1</i>		<i>mecI</i>	
	+	-	+	-	+	-
<i>S. aureus</i>	35	3	27	8	0	35



Şekil 2.17. 38 adet *S. aureus* suşunun PZR ürünlerinin agaroz jelde görüntüsü M (Marker), 20, 21, 22 no'lu 3 adet suş *mecA* negatif ;diğer 35suş *mecA* pozitif



Şekil 2.18. 35 adet *S. aureus* suşunun PZR ürünlerinin agaroz jelde görüntüsü M (Marker), 19, 20, 21, no'lu 3 adet suş *mecR1* negatif, diğer 32 suş *mecR1* pozitif

Bu çalışmada incelenen 35 adet MRSA suşunun hiçbirinde *mecI* genine rastlanılmamıştır.



## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Stafilokokların hastanelerde sorun yaratması yüzyılı aşkın bir süreden beri bilinmekle birlikte direnç sorunu zaman içinde farklılık göstermiştir. Önceleri stafilokoklarda görülen direnç problemi, daha sonra 1970'li yıllardan başlayarak Gram negatif bakterilerde de yaşanmaya başlanmıştır.

Penisilinin tedavide kullanılmaya başlandığı 1940'lı yıllarda yaygın olarak rastlanılan, hatta salgınlar yaparak çok sayıda hastanın kaybedilmesine neden olan stafilokoklar, özellikle de *S. aureus* infeksiyonları başarıyla tedavi edilmiştir. Bu infeksiyonlarda penisilin büyük umut kaynağı olmuştur. Ancak penisilinin bu altın dönemi çok fazla sürmemiş, suşlar giderek direnç kazanmaya başlamıştır. Stafilokoklarda penisiline direnç penisilinin kullanımından kısa süre sonra gelişmiş ve yaklaşık altı yıl sonra hastane kökenli suşların %25'i dirençli hale gelmiştir. 15-20 yıl sonra toplum kökenli suşlarda da direnç %25'e ulaşmıştır.

Penisilnaz oluşturan bu bakterilere karşı yeni penisilin türevleri geliştirilmiş, fakat 1960'lı yıllara gelindiğinde özellikle *S. aureus* suşlarında penisilinaza dirençli metisilin, oksasilin ve nafsilin gibi penisilinlere de dirençli suşlar yavaş yavaş bildirilmeye başlanmıştır. Metisiline dirençli suşlar giderek artış göstermiş ve özellikle hastanelerin kabusu haline gelmiştir. Metisiline dirençli suşların yanı sıra birçok antibiyotiğe direnç gösteren suşlar bildirilmeye başlanmıştır.

Metisilin direnci 1960'lı yıllarda tek tük bildirilirken sonraki yıllarda bazı ülkelerde önemli bir sağlık sorunu olacak düzeyde artış göstermiştir. Bazı ülkelerde %80'lere varan oranlarda MRSA infeksiyonları bildirilmektedir. Ülkemizde de bazı merkezlerde %70'lere ulaşan MRSA infeksiyonları bildirilmiştir. Metisiline dirençli suşlara antibiyotiklerin çok fazla kullanıldığı ve invaziv girişimlerin en çok uygulandığı yoğun bakım ve bazı cerrahi kliniklerinde rastlanmaktadır.

Birçok ülkede uygulanan etkili önlemler ile bu oranlar önemli ölçüde azalmıştır. İsveç ve Danimarka gibi ülkelerde MRSA oranları %0.1-0.3 gibi çok düşük

düzydedir. Bunda bilinçli antibiyotik kullanımı, uygun dezenfeksiyon-antisepsi uygulamaları, etkili izolasyon önlemleri ve en önemlisi eğitimin rolü büyüktür.

Bazı Akdeniz ülkelerinde ise metisiline direnç oranları günümüzde de hala yüksektir. Örneğin son yıllarda yapılan çalışmalarda Yunanistan'da metisiline dirençli *S. aureus*'ların %62.5-67, İtalya'da %34.4, Fransa'da %33.6 olduğu bildirilmektedir. Metisiline ve diğer antimikrobik maddelere direnç sadece *S. aureus* suşlarında değil, çoğu zaman klinik örneklerden izole edildiğinde kontaminant olabileceği düşünölen koagölaz negatif stafilokoklarda da gözlenmektedir.

Metisiline dirençli *S. aureus* suşları ile metisiline dirençli *S. epidermidis* (koagölaz negatif stafilokoklar) suşlarının antimikrobik maddelere direnç durumları birbirine benzerse de metisiline dirençli *S. epidermidis* suşları, *S. aureus* suşları gibi epidemik yayılım göstermezler. Bu nedenle metisiline dirençli *S. epidermidis* suşları ile kolonize/infeksiyonlu hastaların izole edilmesi gerekli olmayabilir.

Hastanelerin korkulu rüyası olan ciddi salgınlar oluşturan stafilokoklarda metisilin direnci intrensek (kromozomal) veya kazanılmış-plazmidal olabilir. Kromozomal metisilin direnci farklı bir penisilin bağlayan proteinin (PBP) sentezlenmesi sonucu gelişir. PBP 2a olarak isimlendirilen bu enzimin beta-laktam antibiyotiklere afinitesi düşüktür. Penisilin bağlayan proteinlerin çoğu tüm beta-laktam antibiyotiklerle bloke edilmesine rağmen, PBP 2a, beta-laktam antibiyotiklere bağlanamaz.

Stafilokoklarda düşük afiniteli PBP 2a sentezi sonucu gelişen metisilin direnci *mecA* geni tarafından kodlanmaktadır. *mecA* geninin veya PBP 2a'nın moleküler yöntemlerle belirlenmesi mümkündür. Fakat rutin amaçla yaygın kullanılmamaktadır.

Bu yüzdendir ki metisiline dirençli olan stafilokoklar diğer beta-laktam ve beta-laktamaz inhibitörlü antibiyotikler ve karbapenemlere dirençli kabul edilirler. Bazen yeni bir PBP sentez edilmeden PBP'nin beta-laktam antibiyotiklere afinitesinin azalması sonucunda da direnç gelişebilir.

Stafilokoklarda ayrıca aşırı miktarda beta-laktamaz oluşturulmasına bağlı olarak da metisiline direnç gelişebilir ancak seyrek rastlanılan bir durumdur. Metisiline dirençli stafilokok infeksiyonlarında suşların birçok antibiyotiğe dirençli olması nedeniyle 1958 yılında kullanıma sunulan fakat yan etkileri nedeniyle uzun süre pek rağbet görmemiş ilk glikopeptit antibiyotik olan vankomisin ve daha sonra geliştirilen bir diğer glikopeptit antibiyotik teikoplanin, günümüzde çok sık kullanılmaktadır. Birkaç yıl öncesine kadar *S. aureus* suşlarında vankomisine ve teikoplanine dirençli suş saptanmamıştır. Ancak 1996'da Japonya'dan, bunu takiben A.B.D.'nden glikopeptitlere duyarlılığı azalmış suşlar bildirilmeye başlanmıştır (Gürler, 2003).

Bu çalışmada klinik örneklerden izole edilen toplam 38 adet *S. aureus* suşu çalışmaya alınmıştır. İlk olarak suşların oksasilin antibiyotiğine duyarlılığı NCCLS standartlarına uygun olarak yapılan disk difüzyon testi ve E-testi ile belirlenmiştir. Yapılan disk difüzyon ve E-testine göre 3 *S. aureus* suşu oksasilin antibiyotiğine hassas diğer 35'i ise dirençli bulunmuştur.

Oksasilin disk testi ve E-testine göre metisiline dirençli suşlarda metisilin direncinden sorumlu olan *mecA*, *mecR1*, *mecI* genlerinin varlığı PZR metodu ile araştırılmıştır. Çalışılan suşların %92,1'inde *mecA* pozitif, *mecA* pozitif olan suşların %91,4'ü *mecR1* pozitif olarak tespit edildi. Çalışılan suşların hiçbirinde *mecI* genine rastlanamamıştır.

Literatürde daha önce yapılan çalışmalar ile *mecA* geninin metisilin direncinden sorumlu kilit element olduğu ispatlanmıştır. Fakat metisilin direncine katkıda buldukları düşünülen *mecR1*, *mecI* ve *fem* faktörleri gibi diğer faktörlerin metisilin direncine olan etkileri ve birbirleri ile olan ilişkileri tam olarak aydınlatılamamıştır ve bu konuda literatürde çok kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır.

Kobayashi ve arkadaşları metisilin direncinden sorumlu olan *mecA*, *mecR1* ve *mecI* genlerinin varlığını *S. aureus* suşlarında araştırmışlar ve araştırmaları sonucu suşları *mecA*, *mecR1* ve *mecI* genlerinin varlığına göre 4 farklı gruba ayırmışlardır. Birinci grup; *mecR1* ve *mecI*'in her ikisine birden sahip olan metisilin dirençli suşlar, ikinci

grup; *mecI* geni hiç olmayan ve *mecRI* geni bazılarında bulunan metisilin dirençli suşlar, üçüncü grup; bu regülatör genlerin her ikisine de sahip olmayan metisilin dirençli suşlar, dördüncü grup ise ne *mec* regülatör genlerine ne de *mecA* genine sahip olmayan metisilin'e hassas suşlardan oluşmuştur. Lee tarafından yapılan diğer bir araştırmada ise *mecA* genini taşıdığı halde *mecI* genine sahip olmayan *S. aureus* suşlarının varlığı rapor edilmiştir. Çalışmamızda elde edilen bulgular literatürde bulunan kısıtlı sayıda olan çalışmalarla uyum göstermektedir. Bu çalışmada kullanılan MRSA'larda *mecI* geninin olmaması, represörün yokluğunda *mecA* geninin sürekli olarak eksprese olmasına ve metisilin direncinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır.

Literatürde bulunan çalışmalar ve yaptığımız bu çalışmadan elde edilen bulgular, *mecRI* ve *mecI* genlerinin varlığı ile metisilin direnci arasında direk bir ilişki kurulamayacağını göstermektedir. Bu sonuçlar, bilinen mekanizmaların dışında başka faktörlerinde metisilin direncinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Ancak bu konunun daha iyi anlaşılabilmesi için detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır.

## 6. KAYNAKLAR

Araj, G.F., Talhouk, R.S., Simaan, C.J., Maasad, M.J., 1999. Discrepancies Between *mecA* PCR and Conventional Tests Used for Detection of Methicillin resistant *Staphylococcus Aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 11, 47-52.

Arda, M., 2000. *Temel Mikrobiyoloji*, 297-314.

[www.axxora.com/antibiotics-LKT-T5604/opfa.1.1](http://www.axxora.com/antibiotics-LKT-T5604/opfa.1.1)

Berger-Bächi, B., 1999. Genetic Basis of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 56, 764-770.

Bilgehan, H., 1992. *Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları*, 188-210.

[www.bio.cam.ac.uk/~salmond/pics/carbapenem.jpg](http://www.bio.cam.ac.uk/~salmond/pics/carbapenem.jpg)

[www.bmb.leeds.ac.uk/.../cephalosporin\\_nuc.gif](http://www.bmb.leeds.ac.uk/.../cephalosporin_nuc.gif)

Castellanos, R.G., Mallorquí- Fernández, G., Marrero, A., Potempa, J., Coll, M., Gomis-Rüth, F.X., 2004. On the Transcriptional Regulation of Methicillin Resistance. *The Journal of Biological Chemistry*. 17, 17888-17896.

Chambers, H.F., 1997. Methicillin Resistance in *Staphylococci*: Molecular and Biochemical Basis and Clinical Implications. *Clinical Microbiology Reviews*, 10, 781-791.

[www.chemicaland21.com/.../phar/RIFAMPIN.htm](http://www.chemicaland21.com/.../phar/RIFAMPIN.htm)

Couto, I., Sanches, I.S., Sáleaó, R., Lencastre, H., 2000. Molecular Characterization of *Staphylococcus sciuri* Strains Isolated from Humans. *JCM*. 1136-1143

<http://en.wikipedia.org/wiki/Methicillin>

Francois, P., Pittet, D., Bento, M., Pepey, B., Vaudaux, P., Lew, D., Schrenzel, J., 2003. Rapid Detection Of Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus* Directly From Sterile Or Nonsterile Clinical Samples By A New Molecular Assay. *Journal of Clinical Microbiology*.41.1.,254-260.

Gülay, Z., 2002. Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Yorumu *Toraks Dergisi Nisan 2002 Cilt 3 Sayı 1* 75-88.

Hakenbeck, R., Coyette, J.,1998. Resistant Penicilin-binding proteins.CMLS.54, 332-340.

Gürler, N., 2003. 2003 yılı 3. Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi

Jaffe, R.I., Lane, J.D., Albury, S.V., Niemeyer, D.M., 2000. Rapid Extraction from and Direct Identification in Clinical Samples of Methicillin –Resistant *Staphylococci* Using the PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 3407-3412.

Japoni, A., Alborzi, A., Orafa, F., Rasouli, M., Farshad, S., 2004. Distribution Paterns of Methicillin Resistance Genes *mecA* in *Staphylococcus aureus* Isolated From Clinical Specimens 173-178.

Joklik, W.K., Willet, H.P., Amos, D.B., Wilfert, C.M.,1992. *Zinsser Microbiology*, 401-406.

Katayama, Y., Ito, T., Hiramatsu, K.,2001. Genetic Organization of the Chromosome Region Surrounding *mecA* in Clinical *Staphylococcal* Strains: Role of IS431-Mediated *mecI* Deletion in Expression of Resistance in *mecA* Carriying, Low-Lewel Methicillin Resistant *Staphylococcus Haemolyticus*.*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.45.7, 1955-1963.

Katzung, B.G.,1998. *Basic & Clinical Pharmacology*.737.

Keserü, J.S., Gál, Z., Barabás, G., Benkő, I., Szabó, I., 2005. Investigation of  $\beta$ -Lactamases in Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* for Further Explanation of Borderline Methicillin Resistance. Department of Human Genetics, Medical and Health Science Center. 51:300-304.

Kılıçturgay, K., Gökırmak, F., Töre, O., Gedikliođlu, S., Göral, G., Helvacı, S., 1996. Temel Mikrobiyoloji ve Parazitoloji. 91-100.

Kobayashi, N., Alam, M.M., Urasawa, S., 2001. Genomic Rearrangement of the *mec* Regulator Region Mediated by Insertion of IS431 in Methicillin-Resistant *Staphylococci*. American Society for Microbiology, 45.1.335-338.

Kuwahara-Arai, K., Kondo, N., Hori, S., Tateda-Suzuki, E., Hiramatsu, K., 1996. Suppression of Methicillin Resistance in a *mecA*-Containing Pre-Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strain is Caused by the *mecI* -Mediated Repression of PBP 2' Production. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2680-2685.

Lee, J.H., 2006. Occurrence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains From Cattle and Chicken, and Analyses of Their *mecA*, *mecR1*, and *mecI* Genes. Veterinary Microbiology. 113, 137-141.

Lowy, Franklin D., 2003. Antimicrobial Resistance: The Example of *Staphylococcus aureus* 111, 1265-1273.

Lutz, L., Machado, A., Kuplich N., Barth, A.L., 2003. Clinical Failure of Vancomycin Treatment of *Staphylococcus aureus* Infection in a Tertiary Care Hospital in Southern Brazil. The Brazilian Journal of Infectious Diseases 7(3):224-228.

Mallorqu i-Fern andez, G., Marrero, A., Garcı a-Piqu e, S., Garcı a-Castellanos, R., Gomis-RCuth, F.X., 2004. Staphylococcal Methicillin Resistance: fine focus on folds and functions. Institut de Biologia Molecular de Barcelona. 18-26.

[www.merian.fr.bw.schule.de/.../blactam.GIF](http://www.merian.fr.bw.schule.de/.../blactam.GIF)

Nishijima, S., Kurokawa, I., 2002. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* Isolated From Skin Infections. International Journal of Antimicrobial Agents. 19,241-243.

Obuz, V., Perçin, A.S., Cantürk, M., 1992. Farmakoloji Notları.99

Okuma, K., Iwakawa, K., Turnidge, J.D., Grubb, W.B., Bell, J.M., O'Brien, F.G., Coombs, G.W., Pearman, J.W., Tenover, F.C., Kapi, Tiensasitorn, C., Ito, T., Hiramatsu, K., 2002. Dissemination of New Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clones in the Community. Journal of Clinical Microbiology. 40.11.4289-4294.

<http://pharma1.med.osaka-u.ac.jp/.../Antiinfective.html>

[http://pharma.kolon.co.kr:8080/test/newstopic/main\\_c...](http://pharma.kolon.co.kr:8080/test/newstopic/main_c...)

Petinaki, E., Arvaniti, A., Dimitracopoulos, G., Spiliopoulou, I., 2001. Detection of *mecA*, *mecRI*, and *mecI* Genes Among Clinical Isolates of Methicillin-Resistant Staphylococci By Combined Polymerase Chain Reactions. The British Society for Antimicrobial Chemotherapy .47, 297-304

[www.rit.edu/.../504\(704\)/gyrase\\_inhibitors.htm](http://www.rit.edu/.../504(704)/gyrase_inhibitors.htm) novobiosin

Rowe, F., Superti, V.S., Scheibe, R.M., Dias, C.G., 2002. Agar Diffusion, Agar Dilution, E Test, and Agar Screening Test in the Detection of Methicillin Resistance in Staphylococci. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 43, 45-48.

Sakoulas, G., 1999. Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*: Mechanisms and Clinical Implications. Combined ID Conference.



Sakoulas, G., Gold, H.S., Venkataraman, L., DeGirolami, P.C., Eliopoulos, G.M., Qian, Q., 2001. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Comparison of Susceptibility Testing Methods and Analysis of *mecA*- Positive Susceptible Strains Journal of Clinical Microbiology. 39.11.3946-3951

Saniç, A., Erođlu, C., Kizirgil, A. PCR ve RFLP Yöntemleri İle Mycobacterium Türlerinin İdentifikasyonu 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu Ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu.

Shukla, K.S., Ramaswamy, V.S., Conradt, J., Stemper, M.E., Reich, R., Graviss, E.A., 2004. Novel Polymorphisms in *mec* Genes and a New *mec* Complex Type in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates Obtained in Rural Wisconsin. American Society for Microbiology, 48, 3080-3085.

Skov, L.R., Pallesen, L.V., Poulsen, R.L., Espersen, F., 1999. Evaluation of a New 3-h Hybridization Method for Detecting the *mecA* gene in *Staphylococcus aureus* and Comparison with Existing Genotypic and Phenotypic Susceptibility Testing Methods. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 43, 467-475.

Smyth, C.J., Smyth, D.S., Kennedy, J., Twohig, J., Bolton, D., 2004. *Staphylococcus aureus*: From Man or Animals - an Enterotoxin Iceberg? Food Pathogen Epidemiology Microbes, Maladies and Methods. Proceeding of an International EU-RAIN Conference Hosted by Istituto Zooprofilattico Sperimentale.

Stapleton, P.D., Taylor, P. W., 2002. Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*: Mechanisms and Modulations. Science Progress, 85, 57-72.

Tenover, F.C., Biddle, J.W., Lancaster, M.V., 2001. Increasing Resistance to Vancomycin and Other Glycopeptides in *Staphylococcus aureus*. Centers for Disease. 2,327-332.

Udo, E.E., Mokadas, E.M., Al-Haddad, A., Mathew, B., Jacob, Sanyal S.C., 2000. Rapid Detection of Methicillin Resistance in Staphylococci Using a Slide Latex Agglutination Kit. International Journal of Antimicrobial Agents. 15, 19-24.

Unat, E.K., 1986. Tıp bakteriyolojisi ve virolojisi. İnsanda hastalık yapan bakteriler, virüsler ve bunlarla oluşan infeksiyon hastalıkları. 432.

Vannuffel, P., François, P., Bouyer, M., Gigi, J., Vandercam, B., Reynaert, M., Gala, J., 1998. Rapid and Specific Molecular Identification of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Endotracheal Aspirates from Mechanically Ventilated Patients. Journal of Clinical Microbiology. 2366-2368.

Weller, T.M.A., 1999. The Distribution of *mecA*, *mecR1*, and *mecI* and Sequence analysis of *mecI* and the *mec* Promoter Region in Staphylococci Expressing Resistance to Methicillin. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 43, 15-22.

Wichelhaus, T.A., Kern, S., Schäfer, V., Brade, V., 1999. Rapid Detection of Epidemic Strains of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of Clinical Microbiology. 37 (3) 690-693.

Yüce, K., 1988. Antibiyotikler ve İnfeksiyon Hastalıklarında Tedavi Prensipleri 1-60.

**ÖZGEÇMİŞ**

Adı Soyadı : Şerife ŞALVARCI

Doğum Yeri : Isparta

Doğum Yılı : 15.02.1978

Medeni Hali : Bekar

**Eğitim ve Akademik Durumu:**

Lise :1992 – 1996 Isparta Gürkan (Süper) Lisesi

Lisans :1997 - 2001 Dokuz Eylül Üniversitesi Buca Eğitim

Fakültesi Fen Bilgisi Öğretmenliği

Yabancı Dil :İngilizce

**İş Deneyimi:**

2002 - 2003 : Şanlıurfa Akziyaret İlköğretim Okulu

2003 - 2006 : Isparta Güneykent Yunus Emre İlköğretim Okulu