

T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SİPROFLOKSASİN DİRENÇLİ MRSA SUŞLARINDA  
*gyrA* ve *parC* GEN MUTASYONLARININ MOLEKÜLER TESPİTİ

HATİCE AKDAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
ISPARTA 2005

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

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

Başkan : Doç. Dr. Ayşegül KUBİLAY

Üye : Yard. Doç. Dr. Gülgün TINAZ

Üye : Yard. Doç. Dr. Fatma Filiz ARI

ONAY

Bu tez 19/08/2005 tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

.../.../2005

**Prof. Dr. Çiğdem SAVAŞKAN**  
**Enstitü Müdürü**

**SİPROFLOKSASİN DİRENÇLİ MRSA  
SUŞLARINDA *gyrA* ve *parC* GEN  
MUTASYONLARININ MOLEKÜLER TESPİTİ**

**Hatice AKDAŞ**

**Yüksek Lisans Tezi  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
ISPARTA 2005**

## 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. Stafilokok Cinsi.....	3
2.2. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	4
2.2.1. <i>S. aureus</i> 'un Antijenik Özellikleri.....	5
2.2.2. <i>S. aureus</i> 'un Patojenitesini Sağlayan Özellikler.....	6
2.2.2.1. <i>S. aureus</i> 'un Enzimleri.....	6
2.2.2.2. <i>S. aureus</i> 'un Hemolizinleri.....	7
2.2.2.3. <i>S. aureus</i> 'un Toksinleri.....	8
2.2.3. <i>S. aureus</i> ' un Tespiti.....	9
2.2.3.1. Koagülaz Testi.....	9
2.2.3.2. Deoksiribonükleaz Testi.....	10
2.2.3.3. Termostabil Endonükleaz Testi.....	10
2.2.3.4. Katalaz Testi.....	10
2.2.3.5. Üreaz Testi.....	11
2.2.3.6. Mannitol Fermantasyonu.....	11
2.2.4. <i>S. aureus</i> 'un Oluşturduğu İnfeksiyonlar.....	11
2.2.5. Metisiline Dirençli <i>S. aureus</i> (MRSA).....	13
2.3. Kinolonlar.....	13
2.3.1. Kimyasal Yapı.....	14
2.3.2. Antimikrobiyal Etki.....	16
2.3.3. Etki Mekanizması.....	18
2.3.4. Direnç Mekanizmaları.....	20

2.3.4.1. Hedef Enzimde Değişiklik.....	20
2.3.4.2. Antibiyotiğin Hücre İçine Girişinin Azaltılması.....	21
2.3.4.2.1. Membran Permeabilitesinde Azalma.....	21
2.3.4.2.2. Aktif Pompalama ile Antibiyotiğin Dışarı Atılması.....	22
2.3.5. Farmakokinetik Özellikler.....	22
2.3.6. Klinik Kullanımları.....	24
2.4. <i>Staphylococcus aureus</i> 'ta Kinolon Direnci.....	25
3. MATERYAL ve METOT.....	28
3.1. Kullanılan Sarf Malzemeler.....	28
3.2. PZR Bileşenleri.....	28
3.3. Kullanılan Cihazlar.....	29
3.4. <i>S. aureus</i> Suşlarının Toplanması.....	29
3.5. <i>S. aureus</i> Suşlarının Üretimi ve Saklanması.....	29
3.6. Antibiyotik Duyarlılık Testleri.....	30
3.6.1. Katı Besiyerinin Hazırlanması.....	30
3.6.2. Duyarlılık Testleri İçin Bakteri Süspansiyonunun Hazırlanması.....	30
3.6.3. <i>S. aureus</i> Suşlarında Antibiyotik Duyarlılık Testleri.....	30
3.6.3.1. Disk Difüzyon Yöntemi.....	31
3.6.3.2. E-Testi Yöntemi.....	31
3.7. PZR Yöntemi ile <i>gyrA</i> ve <i>parC</i> Genlerinin Çoğaltılması.....	32
3.7.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	32
3.7.2. Örneklerin Hazırlanması.....	33
3.7.3. PZR Koşulları.....	33
3.8. Agaroz Jel Elektroforez İncelemeleri.....	34
3.9. PZR Ürünlerinin Jelden İzolasyonu.....	35
3.10. DNA Dizi Analizi.....	36
4. BULGULAR.....	38
4.1. Disk Difüzyon Bulguları.....	38
4.2. E-Testi Bulguları.....	40
4.3. PZR Bulguları.....	42
4.4. DNA Dizi Analizi Bulguları.....	43
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	45

KAYNAKLAR.....	50
ÖZGEÇMİŞ.....	56

## ÖZET

### (Siprofloksasin Dirençli MRSA Suşlarında *gyrA* ve *parC* Gen Mutasyonlarının Moleküler Tespiti)

Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) birçok klinikte hastane kaynaklı infeksiyon etkeni olarak izole edilmektedir ve son yıllarda kinolon grubu antibiyotiklere karşı giderek artan oranda direnç kazanmaktadır.

Bu çalışmada ilk olarak, Isparta Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastane'sinin değişik klinik örneklerinden temin edilen 22 adet MRSA ve 2 adet metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA) suşunun siprofloksasin ve gatifloksasine duyarlılığı disk difüzyon ve E-testi yöntemleri ile belirlendi. Disk difüzyon testine göre, 22 MRSA suşunun hepsi siprofloksasine, 16'sının da gatifloksasine dirençli olduğu tespit edildi. E-testi sonuçlarına göre ise MRSA suşlarının hepsi siprofloksasine dirençli iken, suşlardan yalnızca 1'i gatifloksasine dirençli bulundu. Kontrol olarak kullanılan 2 MSSA suşunun beklendiği gibi siprofloksasin ve gatifloksasin antibiyotiklerine hassas olduğu tespit edildi.

Çalışmanın ikinci aşamasında her bir bakteri suşunun *gyrA* ve *parC* genlerinin kinolon direnç belirleyici bölge (KDBB)'leri polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltıldı ve bu bölgelerinde mutasyon olup olmadığı dizi analizi ile belirlendi. Siprofloksasin minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) değerleri 6 - >32 µg/mL aralıklarında tespit edilen MRSA suşlarının hepsinde *gyrA* geninde Ser84Leu ve *parC* geninde ise Ser80Phe mutasyonları tespit edildi. MSSA suşlarının *gyrA* ve *parC* genlerinin KDBB'lerinde bir mutasyon görülmedi.

**ANAHTAR KELİMELER:** MRSA, PZR, kinolon direnci

## ABSTRACT

### (Molecular Detection of *gyrA* and *parC* Gene Mutations in Ciprofloxacin Resistant MRSA Strains)

Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) have been isolated as a nosocomial infection agent in clinics of many hospitals. Recently MRSA has been increasingly getting resistance against quinolones.

In the first part of this study, 22 MRSA and 2 methicillin sensitive *S. aureus* (MSSA) strains obtained from Isparta Süleyman Demirel University Hospital were tested to determine their susceptibility to ciprofloxacin and gatifloxacin by using disk diffusion and E-test methods. All of the 22 MRSA strains were resistant to ciprofloxacin while 16 MRSA strains were resistant to gatifloxacin in disk diffusion method. Based on the results from E-test, all of the MRSA strains were resistant to ciprofloxacin and only one MRSA strain was resistant to gatifloxacin. As expected, 2 MSSA strains were found to be susceptible to both ciprofloxacin and gatifloxacin antibiotics.

In the second part of the study, the quinolone resistance determining regions (QRDRs) of the *gyrA* and *parC* genes of MRSA strains were amplified using PCR and sequenced to determine the presence or absence of mutations in the QRDR. All MRSA strains with the minimum inhibitory concentration (MIC) values of ciprofloxacin ranged between 6 - >32 µg/mL had Ser84Leu substitution in *gyrA* and one Ser80Phe substitution in *parC*. As being susceptible to both antibiotics, 2 MSSA strains did not have any mutation in the QRDR of the *gyrA* and *parC* genes.

**KEY WORDS:** MRSA, PCR, quinolone resistance



## TEŞEKKÜR

Tez alıŐmamn yürütölmesinde bilgi ve deneyimiyle bana yol gösteren danıŐman hocam Yrd. Do. Dr. Fatma Filiz ARI' ya , sevgi ve destekleriyle hayatımın her aşamasında yanımda olan aileme teşekkür ederim.

Hatice AKDAŞ

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Şekil 2.1. <i>S. aureus</i> 'un genel görünümü.....	4
Şekil 2.2. Klorokinden nalidiksik asidin sentezlenmesi.....	13
Şekil 2.3. Kinolon ve naftridon çekirdeğinin yapısı.....	15
Şekil 2.4. Kinolon halkası.....	15
Şekil 2.5. Nalidiksik asit ve oksolinik asidin kimyasal yapıları.....	16
Şekil 2.6. Siprofloksasin ve ofloksasin kimyasal yapıları.....	17
Şekil 2.7. Gatifloksasin, moksifloksasin ve sparfloksasinin kimyasal yapıları.....	18
Şekil 2.8. Grepafloksasin ve gemifloksasinin kimyasal yapıları .....	18
Şekil 2.9. Bakteriyel DNA'da negatif süpersarmalin oluşumu.....	19
Şekil 2.10 Topoizomerazlar ve DNA replikasyonu.....	20
Şekil 3.1. DNA örneğindeki baz dizisinin saptanması.....	37
Şekil 4.1. Siprofloksasine dirençli ve gatifloksasine hassas <i>S. aureus</i> suşu.....	38
Şekil 4.2. E-testinde direnç ve duyarlılığın tespiti.....	40
Şekil 4.3. <i>gyrA</i> genine ait PZR ürünlerinin agaroz jelde görüntüsü.....	42
Şekil 4.4. <i>parC</i> genine ait PZR ürünlerinin agaroz jelde görüntüsü.....	42
Şekil 4.5. 6 nolu MRSA suşunda dizi analiz sonuçlarına göre mutasyon tespiti.....	43

**ÇİZELGELER DİZİNİ**

	<b>Sayfa</b>
Çizelge 3.1. Disk difüzyonunda siprofloksasin ve gatifloksasin sınır değerleri.....	31
Çizelge 3.2. E-testinde siprofloksasin ve gatifloksasin sınır değerleri.....	32
Çizelge 3.3. <i>gyrA</i> ve <i>parC</i> genlerinin PZR koşulları.....	33
Çizelge 4.1. Disk difüzyonunda antibiyotik duyarlılık oranları.....	39
Çizelge 4.2. E-testinde antibiyotik duyarlılık oranları .....	41
Çizelge 4.3. Suşların <i>gyrA</i> ve <i>parC</i> aminoasit değişiklikleri ile siprofloksasin ve gatifloksasin MİK değerleri.....	44

## 1. GİRİŞ

Stafilokoklar nozokomiyal ve toplum kaynaklı infeksiyonların en önemli etkenlerindedir ve *Staphylococcus aureus* stafilokok infeksiyonlarında öncelikli patojen olarak yer alır. 1940'ların başında penisilin klinik kullanıma girmesi ile stafilokok infeksiyonlarının tedavisinde önemli bir başarı elde edilmekle birlikte stafilokoklarda penisilin direncinin 1940'lı yılların ortalarından itibaren giderek arttığı görülmüştür. 1960'larda stafilokoklar tarafından üretilen ve penisilini parçalayan enzimlere (penisilinaz) dayanıklı metisilin gibi penisilin türevlerinin geliştirilmesiyle stafilokok infeksiyonlarının tedavisinde ikinci kez başarı sağlanmıştır. Ancak kısa bir süre sonra stafilokoklarda metisilin direnci tanımlanmış ve 1980'li yılların başından itibaren de metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) suşlarında çoklu antibiyotik direnci ortaya çıkmaya başlamıştır. MRSA'nın ciddi infeksiyonlara neden olmasının dışında diğer bir ürkütücü yanı da penisilinaz enzimine dayanıklı tüm penisilin türevlerine (oksasilin, nafsilin, kloksasilin), sefalosporin, klindamisin, eritromisin, tetrasiklin ve aminoglikozidler gibi diğer antibiyotiklere de dirençli olmasıdır (Yıldız ve Aygen, 2002).

MRSA ile infekte olguların tedavisinde kinolon grubu antibiyotikler ise alternatif çözüm olarak kullanılmaktadır. Günümüzde, başlangıç itibariyle yüksek antibakteriyal aktiviteye sahip kinolon grubu antibiyotiklere karşı da direnç geliştiren MRSA suşları tespit edilmekte ve kinolonların etkinliğinde önemli ölçüde azalma kaydedilmektedir (Ruiz vd., 2001).

Kinolonlar antimikrobiyal etkilerini bakterilerin DNA replikasyonunda rol alan DNA giraz ve topoizomeraz IV enzimlerini inhibe ederek gerçekleştirir ki bu durum; DNA'da oluşan kırıklardan kaynaklanan bakteri ölümlerine yol açar. Her iki enzim de tetramerik yapıda olup, DNA giraz iki GyrA ve iki GyrB alt ünitesinden ve topoizomeraz IV ise iki ParC ve iki ParE alt ünitesinden meydana gelir (Hooper, 2002).

Kinolon grubu antibiyotiklere karşı direnç gelişiminde, DNA giraz enziminin A alt ünitesini kodlayan *gyrA* geni ve topoizomeraz IV enziminin A alt ünitesini kodlayan *parC* geni mutasyonlarının önemli rol oynadığı ve aminoasit değişikliği taşıyan mutant alt ünitelerden oluşan enzimlerin üretildiği suşlarda kinolonlara hassasiyetin azaldığı tespit edilmiştir (Ferrero vd., 1995).

Çeşitli kinolon grubu antibiyotiklere dirençli *S. aureus* suşlarında yapılan çalışmalarda özellikle topoizomeraz IV enziminin *ParC* alt ünitesinde yalnızca tek bir aminoasit değişikliğinin bile direnç gelişimine yol açtığı, ayrıca farklı kinolon antibiyotiklerine karşı farklı oranlarda direnç geliştiği gözlenmiştir (Schmitz vd., 1999; Sierra vd., 2002).

Çalışmamızda siprofloksasine dirençli olduğu belirlenen MRSA suşlarında kinolon direncine sebep olan *gyrA* ve *parC* gen mutasyonlarının araştırılması ve bu mutasyonların yeni bir kinolon olan gatifloksasine direnç gelişimini nasıl etkilediğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## 2. KAYNAK BİLGİSİ

### 2.1. Stafilokok Cinsi

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'de *Staphylococcus*, *Stomatococcus*, *Micrococcus* ve *Planococcus* cinsleri *Micrococcaceae* familyası içinde incelenirler. Bu cinslerin DNA'daki G + C oranlarında (%30-70 mol) ve hücre duvarı yapılarında farklılıklar olmasına karşın, nükleik asit hibridizasyon deneyleri 16S rRNA sıralarının incelenmesi sonucunda bu dört cins *Micrococcaceae* familyası altında toplanmıştır (Koneman vd., 1997).

*Micrococcaceae* familyası içerisinde klinik öneme sahip tek cins *Staphylococcus*'dur. *Staphylococcus* türleri Gram pozitif, 0.5-1.5µm çapında kok şeklinde, spor oluşturmayan, hareketsiz, katalaz pozitif ve fakültatif anaerob bakterilerdir. *Staphylococcus* cinsinin çok sayıda türü olmasına rağmen bunlardan sadece 17'si insanlarda üretilmiştir. Bu türler DNA/DNA ilişkileri ve fenotipik özelliklerine göre 4 grup altında toplanırlar:

**1- *S. epidermis* grubunda;** *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. hominus* ve *S. saccharolyticus*

**2- *S. saprophyticus* grubunda;** *S. saprophyticus*, *S. cohnii*, *S. xylosus*

**3- *S. simulans* grubunda;** *S. simulans* ve *S. carnosus*

**4- *S. sciure* grubunda;** *S. sciure* ve *S. lentus* türleri yer almaktadır.

*S. aureus*, *S. auricularis*, *S. intermedius*, *S. hycus* ve *S. caseolyticus* bu grupların dışında tutulurlar (Bilgehan, 1994).

Stafilokoklar; insan ve hayvanlar için fırsatçı patojenlerdir. İnsanlarda hastalık yapan başlıca *Staphylococcus* türleri koagülaz (+) olan *S. aureus* ile koagülaz (-) olan *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus*'dur (Bilgehan, 1994; Koneman vd., 1997; Arda, 2000).

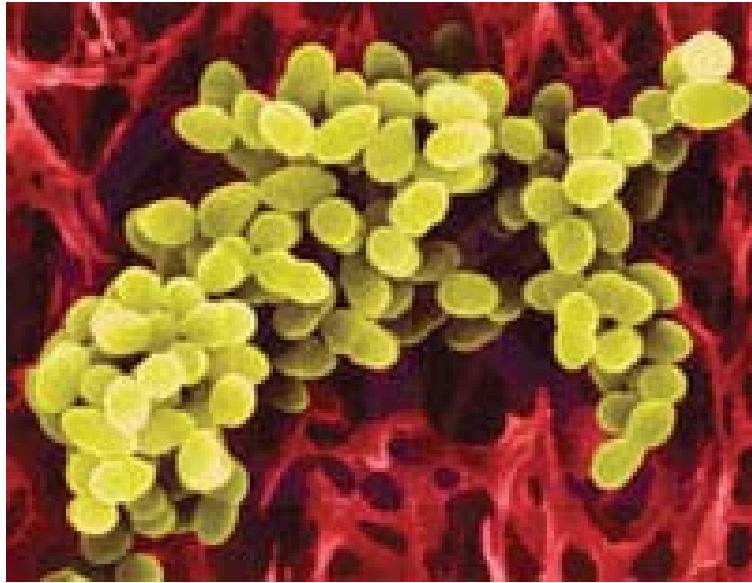
## 2.2. *Staphylococcus aureus*

*S. aureus*; pigmentli, koagülaz pozitif, mannitol, sükröz, maltoz ve trehaloz'dan asit yapabilen, alfa toksin yapan, novobiocin'e duyarlı, kapsülsüz bir bakteridir (Bilgehan, 1994).

*S. aureus* suşları optimum olarak 37°C ve pH 7,4'de ürerler. Bu bakteriler fakültatif anaerob olmalarına karşın genellikle aerob üremeyi tercih ederler (Bilgehan, 1994; Ögütman, 1992; Brook vd., 1995).

Basit besiyerleri dahil birçok besiyerinde üreseler de kanlı besiyerlerinde daha iyi çoğalırlar ve kolonilerinin etrafında tam hemoliz meydana getirirler. Jelöz besiyerlerinde ise yuvarlak kenarlı, mat, kabarık, parlak yüzeyli S tipinde ve 1-2 mm çapında koloniler oluştururlar. Eğer ortam uygunsuzsa bu kolonilerin çapı 6-8 mm'ye ulaşabilir (Bilgehan, 1994).

Sporsuz ve hareketsiz kok formundaki bu bakteriler katı besiyerlerinde üzüm salkımına benzer kümeler şeklinde, sıvı besiyerlerinde ise tekli, ikişerli ve dörtlü koklar ya da kısa zincirler şeklinde bulunabilirler (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. *S. aureus*'un genel görünümü ([www.unpisi.it/images/stafilococco](http://www.unpisi.it/images/stafilococco))

*S. aureus* doğal olarak en fazla burun ve boğaz boşluğunu örten mukaza dokusunda yer alır ve buradan pek çok yere yayılır. Deride ise en çok ellerde, kollarda ve yüzde bulunur. Aynı zamanda insan ve hayvanların dışkılarında, abseli yaralarda, sivilce ve çıbanlarda da yoğun olarak bulunmaktadır (Bilgehan, 1992).

*S. aureus*' un bazı özel direnç mekanizmaları gıdalarda bulunmasını ve gelişmesini sağlamaktadır. Spor oluşturmadığı halde vücut dışında canlılığını uzun süre koruyabilen tek insan patojenidir (Bilgehan, 1992; Arda, 2000).

### 2.2.1. *S. aureus*'un Antijenik Özellikleri

*S. aureus* bakterileri antijenik özellikleri bakımından kompleks bir yapıya sahip olup bu bakterilerde otuzdan fazla antijen bulunmuştur. *S. aureus* en önemli antijenik özellikleri arasında; hücre duvarının ana bileşenleri olan teikoik asit, peptidoglikan, proteinA ve hücre duvarının dışında bulunan kapsül yer almaktadır.

Teikoik asit, poliribitol fosfat moleküllerinden meydana gelmiş lineer polimer bir yapıya sahiptir ve peptidoglikon tabakasındaki N-asetil muramik asit (NAMA) molekülüne fosfodiester bağlarıyla kovalent olarak birleşmiştir. Yapısında bulunan şekerler, amino şekerler, kolin ve D-alanin teikoik asite antijenik özelliğini meydana getirmede önemli rol oynarlar (Arda, 2000).

*S. aureus*'un peptidoglikan tabakası N-asetil muramik asit (NAMA) molekülüne tutunmuş tetrapeptitlerin, pentaglisin köprülerine çapraz bağlanmasıyla oluşur. Peptidoglikan tabakasındaki çok sayıdaki çapraz bağ *S. aureus*'a sağlamlık kazandırarak konak dokularında bu bakterinin canlılığını sürdürebilmesini sağlar (Joklik vd., 1992; Ögütman, 1992).

ProteinA *S. aureus* suşların çoğunda, peptidoglikon tabakasına kovalent bağlarla bağlanmış olan bir yüzey proteindir. İmmunoglobulin (Ig) G molekülünün Fc reseptörüne bağlanarak opsonizasyonu önler (Baron vd., 1994).



Kapsül hücre duvarının dışında ve bundan ayrı olarak bulunup jelatinöz, viskoz, elastik ve mukoid karakterdedir. Antifagositik özelliğe de sahip olan *S. aureus*' un kapsülü, bakterinin polimorf nükleer hücreler tarafından kolayca fagosite edilmesini önlemektedir. Kapsül antijenik bir madde olduğundan vücuda verildiğinde kendine karşı spesifik humoral ve selüler bağışıklık sistemini uyarmaktadır (Öğütman, 1992; Brook vd., 1995; Arda, 2000).

### **2.2.2. *S. aureus*'un Patojenitesini Sağlayan Özellikler**

*S. aureus* organizmaya girdiği yerde doğal olarak üreyerek hastalık yapabildiği gibi dokular arasına ve kana yayılarak burada çeşitli ekstraselüler maddeler oluşturmak suretiyle de çeşitli infeksiyonlara neden olabilmektedir. Bu ekstraselüler maddeler arasında enzimler, hemolizinler ve toksinler sayılabilir (Arda, 2000).

#### **2.2.2.1. *S. aureus*'un Enzimleri**

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

Katalaz enzimi fagositik hücreler içindeki serbest radikalleri ve hidrojen peroksidi inaktive eder. Hidrojen peroksidi toksik olmayan su ve oksijene dönüştüren katalaz enziminin aktivitesi stafilokokları streptokoldan ayırmaya yardımcı olmaktadır (Öğütman, 1992; Brook vd.,1995).

*S. aureus* koagülaz enzimi sayesinde fibrinle sarılarak fagositozdan korunur. Bu bakterinin serbest ve bağlı koagülaz olmak üzere 2 tip koagülaz enzimi vardır. Serbest koagülaz ekstraselüler bir enzim olup serumdaki koagülaz reaksiyon faktör yardımıyla fibrinojeni fibrine dönüştürür. Bağlı koagülaz ise hücre duvarının yüzeyinde lokalize olmuştur. Bu enzim stafilokokların kümeleşmesine neden olur ve fibrinojeni direkt olarak fibrine dönüştürür.

Stafilokinaz enzimi plazmadaki plazminojeni aktive ederek plazmin oluşturur. Plazmin de fibrinolitik etkiyle fibrin tabakasını zayıflatarak ve infeksiyonun dokular arasına yayılmasına neden olur (Bilgehan, 1994; Koneman vd., 1997).

Hiyaluronidaz bağ dokusunun önemli bir yapı taşı olan hiyduronik asidi parçalayarak mikroorganizmaların dokulara kolayca yayılmasını sağlar. Yayılma faktörü olarak da bilinen bu enzim antijen özelliğe sahiptir (Arda, 2000).

DNA'yı hidrolize eden deoksiribonükleaz enzimi çoğunlukla koagülaz pozitif stafilokoklar tarafından oluşturulmakta olup *S. aureus*'un tanımlanmasında kullanılan önemli göstergelerden biridir.

Lipaz enzimi plazma ve deri yüzeyinde bulunan yağ asitlerini parçalayarak mikroorganizmaların kutan ve subkutan dokular içerisinde yayılmasına yardımcı olarak fronkül, karbonkül ve bül gibi infeksiyonların oluşumuna yol açar.

*S. aureus* suşları salgıladıkları penisilinaz enzimi ile penisilin grubu antibiyotikleri hidrolize ederek penisilin ve sefalosporin gibi antibiyotiklere dirençli hale gelirler (Bilgehan, 1994).

#### **2.2.2.2. *S. aureus*'un Hemolizinleri**

*S. aureus*'un hemolizinleri; alfa, beta, gama ve delta olmak üzere dört gruba ayrılır.

Alfa hemolizin eritrositleri parçalayan, deride nekrozlara neden olan, lizozimi etkisiz kılan ve doku kültürlerinde sitolitik etki yapan bir toksindir. Monositlere etkisiz olmalarına karşın makrofaj ve trombositleri parçalamaktadırlar. Kas, böbrek korteksi ve dolaşım sistemi organları üzerinde tahribat yaparak önemli patolojik sonuçlara neden olmaktadır.

Beta hemolizin, sfingomiyelinaz olarak da bilinir. Bu hemolizin soğukta sfingomiyelin üzerine etki yaparak eritrositleri eritir.

Gama hemolizinin etki mekanizması bilinmemesine karşın belirgin bir hemolitik etkisi vardır. Stafilokoklara bağlı kemik infeksiyonlarında kanda bu toksine karşın antikor düzeyleri yükselmektedir.

Delta hemolizin eritrosit, makrofaj, lenfosit, nötrofil ve trombositlerin hücre zarlarını deterjanlara benzer bir etki ile parçalayan, ileumdaki su emilimini önleyen ve bu organda iyon permeabilitesini artıran bir hemolizindir (Bilgehan, 1994; Brook vd., 1995; Koneman vd., 1997).

### **2.2.2.3. *S. aureus*'un Toksinleri**

*S. aureus*'un en önemli toksinleri arasında leukosidin, ekfoliyatin, enterotoksinler ve toksik şok sendromu toksini-1 yer almaktadır.

Leukosidin, polimorf çekirdekli hücre membranlarına direkt toksik etki yaparak sitoplazmada degranulasyona ve lizise neden olan bir ekzotoksindir. Bu toksin potasyum ve diğer katyonların hücresel permeabilitesinde değişiklik yaparak etki gösterirler.

Ekfoliyatin, “ekfoliyatif toksin” ya da “epidermolitik” toksin olarak da adlandırılır. Bu toksin ekfoliyatif toksin A ve ekfoliyatif toksin B olmak üzere 2 proteinden oluşur. Et-A'nın yapısal görevi kromozomal olup ısıya dayanıklıdır. Et-B ise plazmid orjinli olup ısıya duyarlıdır. Bu iki protein proteolitik aktiveye sahiptir. Epiderminin mukopolisakkarit matriksinin bozulmasına ve dolayısıyla epiderminin üst katmanların koparak kaybına neden olurlar.

Enterotoksinler, suda eriyen, ısıya dayanıklı antijen yapısındaki maddelerdir. A, B, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, D, E, F olmak üzere 8 çeşit stafilokok enterotoksin saptanmıştır. Bu toksin grubu içinde özellikleri en iyi bilineni ve toksik olanı enterotoksin A olup gıda zehirlenmesine neden olur.

Toksik şok sendromu toksini-1 ateş, birden çok organda işlev bozukluğu ve şoka neden olan bir pirojenik toksin olup enterotoksin F ile hemen hemen aynı yapıya sahiptir (Bilgehan, 1992; Koneman vd.,1997; Serter vd., 1997).

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

*S. aureus*'u diğer stafilokoklardan ayırmada serolojik, antijenik ve patojenik karakterlerin yanı sıra biyokimyasal özelliklerin belirlenmesi de oldukça önemlidir. Aşağıda *S. aureus*'un belirlenmesinde kullanılabilecek bazı önemli biyokimyasal testler verilmiştir.

#### **2.2.3.1. Koagülaz Testi**

Bu test özellikle stafilokoklarda bulunan ve kan plazmasını pıhtılaştırıran koagülaz enzimini ortaya koymak için yapılır. *S. aureus* bu testle pozitif reaksiyon vermesine karşın, *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus* negatif reaksiyon gösterir. Lam ve tüp testi olmak üzere iki farklı şekilde uygulanmaktadır.

Lam testiyle *S. aureus* suşlarında bağlı koagülaz enziminin tespiti yapılır. Bu amaçla *S. aureus* suşları, yüksek tuz konsantrasyonu bazı suşların otoaglutinasyonuna neden olduğu için kanlı agar ya da seçici olmayan nutrient ortamlarda üretilir. Temiz bir lam alınır ve uca yakın kısımlarına birer damla saf su damlatılır. Stafilokok kolonilerinden öze ile alınarak bu iki damlaya karıştırılıp homojen süspansiyonlar elde edilir ve elde edilen bu süspansiyonların birisinin üzerine bir damla plazma, diğerinin üzerine bir damla fizyolojik tuzlu su damlatılır. Koagülaz (+) sonuçlarda 10-30 saniye içinde plazmalı damlada kümeler oluşurken kontrol damlası homojen görünümde kalmaktadır.

Tüp testiyle ekstraselüler bir enzim olan serbest koagülaz araştırılır. Bu testle ideal olarak brain heart infusion broth kültürü kullanılmalıdır. Brain heart kullanılacak ise koloni 1ml steril saf su içerisinde süspansiyon edilerek kullanılabilir. Liyofilize tavşan plazmalı (EDTA'lı) 3 mL steril saf su ile sulandırılıp steril küçük tüplere 0,3 mL

olacak şekilde dağıtılır.ve üzerine 0,1 mL kültür ilave edilip 37°C'de inkübasyona bırakılır. Her saat başı tüpte pıhtılaşma olup olmadığı tüpü yavaşça eğerek kontrol edilir. Tüpte belirgin bir pıhtı oluşumu (%75 pıhtı ) pozitif olarak değerlendirilir (Arda, 2000).

#### **2.2.3.2. Deoksiribonükleaz Testi**

DNA'yı hidrolize eden deoksiribonükleaz enziminin varlığını tespit etmek için yapılır. İçerisinde DNA ile toluidin mavisi bulunduran spesifik besiyerlerine ekilen stafilokoklar 35°C'de 24 saat inkübe edilir. Eğer besiyerinde toluidin mavisi yoksa DNA agar üzerine HCl (1N) üzerine ince bir tabaka halinde yayılır. Pozitif reaksiyonlarda üreme etrafında parlak pembe açık bir saha oluşurken, negatif kültürlerde üreme etrafında opak bir renk vardır (Arda, 2000).

#### **2.2.3.3. Termotabil Endonükleaz Testi**

Bu testle ısı karşısında *S. aureus* tarafından sentezlenen deoksiribonükleaz varlığı ortaya koyulur. Termotabil nükleaz testi koagülaz testi kadar spesifik ancak maviden parlak pembeye renk dönüşümü nedeni ile daha fazla objektif olarak değerlendirilen bir testtir. Bu testle bir lam üzerine 3 mL toluidin mavisi içeren DNA agar katılandıktan sonra 2 mm çaplı kuyucuklar açılır. Bu şekilde açılan kuyucuklara sıvı besiyerinde üretilip 15 dakika sıcak su banyosunda bekletilen bakteri kültüründen 0,01 mL ilave edilip nemli bir ortamda 35°C'de 4 saat inkübe edilir. Bu sürecin sonunda kuyucuk etrafında 1 mm kalınlığında parlak pembe bir halka oluşması pozitif olarak değerlendirilir (Arda, 2000).

#### **2.2.3.4. Katalaz Testi**

Bu test *S. aureus*'ta sentezlenen ve hidrojen peroksidi, su ve oksijene ayrıştıran katalaz enziminin varlığını tespit etmek için yapılır. Katı besiyerinde üretilmiş mikroorganizmada kolonilerinden bir lamın üzerine yeterli miktarda alınıp üzerine %30'luk hidrojen peroksitten bir damla damlatılır. Sıvı besiyerinde üretilmişse

kültürden 5 mL alınarak üzerine %3'lük hidrojen peroksitten 3-4 damla ilave edilir. Hidrojen peroksidin katılmasından sonra kabarcıkların görülmesi veya çıkması pozitif reaksiyon olarak değerlendirilir (Arda, 2000).

#### **2.2.3.5. Üreaz Testi**

Bu test, içinde üre bulunduran spesifik besiyerler kullanılarak *S. aureus*'ta üreyi hidrolize eden üreaz enzimini saptamak amacıyla yapılır. Ürenin hidrolizasyonu ile 2 molekül amonyak ve karbondioksit meydana gelir. Bu testte bakteri uygun besiyerlerine ekildikten sonra 37°C'de 1-5 gün inkübasyona bırakılır. Kültürde amonyak oluşumu nedeniyle pH'ın yükselmesi sonucu besiyerindeki renk değişikliği pozitif reaksiyon ve hiçbir değişikliğin olmaması da negatif olarak değerlendirilir (Arda, 2000).

#### **2.2.3.6. Mannitol Fermantasyonu**

Mannitol Salt Phenol Red Agar 108g/L olacak şekilde distile su içinde ısıtılarak eritilir ve otoklavda 121°C'de 15 dakika süre ile sterilize edilir ve petri kaplarına dökülür. Standart yayma yöntemi ile ekim yapılır ve 35-37°C'de 3 güne kadar inkübe edilir. İnkübasyon süresi sonunda etrafı sarı zon ile çevrili büyük sarı-opak koloniler *S. aureus* olarak sayılır. Mannitol *S. aureus*'un gelişimini desteklerken, aynı zamanda koloni etrafında fenol kırmızısı ile belirlenen sarı zon oluşumunu sağlar (Arda, 2000).

#### **2.2.4. *S. aureus*'un Oluşturduğu İnfeksiyonlar**

*S. aureus*'un oluşturduğu infeksiyonlar arasında haşlanmış deri sendromu, toksik şok sendromu, sistem, organ, deri ve mukoza infeksiyonlarıyla birlikte besin zehirlenmesi sayılabilir.

Haşlanmış deri sendromu *S. aureus*'un eksfoliyatif toksininin neden olduğu bir hastalıktır. Daha çok yeni doğan bebeklerde ve beş yaşın altındaki çocuklarda

görülür. Haşlanmış deri sendromu ağız çevresinde aniden beliren ve 2-3 gün içinde hızla güneş yanığına benzer parlak kırmızı, çevresi belirgin, büyük vezikül tarzında döküntü ile ortaya çıkar. Lokal lezyonu deri kavlaması izler.

Toksik şok sendromu tipik olarak 15-25 yaş arası ve menstruasyon sırasında tampon kullanan genç kadınlarda görülen bir enfeksiyondur. Ani başlayan yüksek ateş şiddetli sulu ishal ve kas ağrılarını takiben hipotansiyon ve ciddi olgularda şok ile karakterize edilen enfeksiyondur. Yaygın kırmızı döküntü ve böbrek yetmezliği gibi bulgularla seyreden hastalık stafilokok kızıl hastalığı olarak kabul edilir.

Sistem ve organ enfeksiyon enfeksiyonları içerisinde stafilokok pnömonileri, akciğer abseleri, periastit, periartrit, bursit, menenjit, sinüzit, idrar yolu enfeksiyonu, prostatit, perinefritik apse yer almaktadır.

Deri ve mukoza enfeksiyonları; abseler, fronkül, sikosiz, karbonkül, panaris, hidroadenit, biefarit, bademciklerin iltihaplanması, farenjitler, peritonsiller apse ve anjinlerdir.

Besin zehirlenmesi *S. aureus* ile kontamine olmuş; pasta, süt, krema, dondurma, et gibi besinlerin yenmesini takip eden 2-6 saat içinde oluşur. Şiddetli mide ağrısı, bulantı ve kusma başlıca yakınmalardır (Bilgehan, 1992; Lowy, 1998; Waldvogel 2000).

Stafilokokların neden olduğu enfeksiyonlar günümüzde önemini hala korumaktadır. *S. aureus*'la oluşan enfeksiyonlarda en önemli sorunların başında, bu bakterilerin antibiyotiklere gösterdiği direnç gelmektedir. *S. aureus* suşlarına yeni geliştirilen antibiyotikler başlangıçta etkili bulunurken, düzensiz antibiyotik kullanımı sonucu bu antibiyotiklere çok kısa zamanda direnç gelişmektedir.

Penisilin başlangıçta stafilokok enfeksiyonlarında başarı ile kullanılmış, ancak daha sonra penisiline karşı dirençli suşlar gelişmiştir. Ayrıca bu antibiyotığın bazı yan etkilerinin tespit edilmesi ile penisilinaza dirençli bir penisilin türevi olan metisilin

kullanıma sunulmuştur. Metisilin kullanımından iki yıl sonra metisiline dirençli *S. aureus* suşları izole edilmiştir (Dündar, 2000).

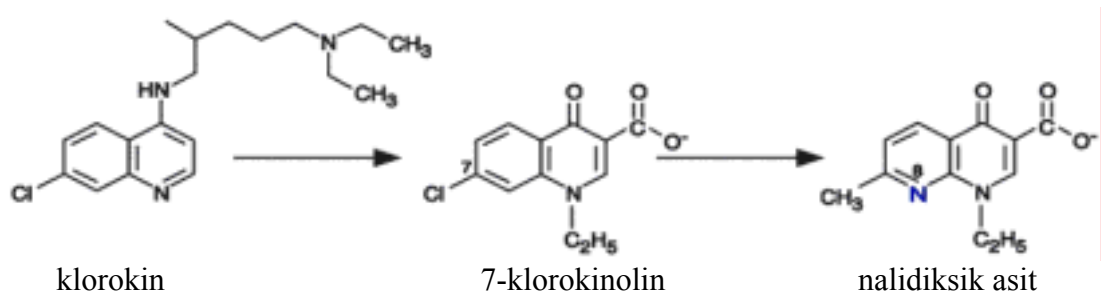
### 2.2.5. Metisiline Dirençli *S. aureus* (MRSA)

Metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) suşları, metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA) suşlarında bulunmayan,  $\beta$ -laktam antibiyotiklere düşük afinite gösteren penisilin bağlayan protein 2a veya 2' (PBP2a) olarak adlandırılan bir protein üretmektedir. Bu protein kromozomal bir gen olan *mecA* geni tarafından kodlanır. PBP2a proteini ve *mecA* genine sahip *S. aureus* suşları metisiline direnç gösterirler ve tüm  $\beta$ -laktam antibiyotiklere dirençlidirler.

Metisiline heterojen direnç gösteren stafilokok suşları eritromisin, klindamisin, tetrasiklin, trimetoprim, sülfonamidler, aminoglikozidler ve kinolonlar gibi  $\beta$ -laktam dışı antibiyotiklere de sıklıkla çoklu direnç göstermektedirler (Dündar, 2000).

### 2.3. Kinolonlar

Kinolonların tarihi; bu grup antibiyotiklerin ilk üyesi olan nalidiksik asidin 1962'de antimalaryal bir antibiyotik olan klorokin saflaştırılması sırasında elde edilen bir ara üründen üretilmesiyle başlar (Şekil 2.2). Nalidiksik asidin proteinlere bağlanmasının yüksek oluşunun bir sonucu olarak serum ve doku kinetiklerinin orta düzeyli olması nedeni ile arzu edilen antibakteriyel aktiviteye ulaşılamamış ve böylece, insanlarda tedavi alanları üriner kanalın Gram negatif infeksiyonları ile sınırlı kalmıştır (Norris vd., 1988; Wentland vd., 1993).



Şekil 2.2. Klorokinden nalidiksik asidin sentezlenmesi



Daha sonraki 10 yıl içinde sentezlenen oksolinik asit, sinoksasin, pipedemik asit gibi antibiyotikler dar spektrumları, toksisite ve hızlı direnç gelişimi klinikte yaygın olarak kullanımlarına engel olmuştur. 1980'li yıllarda kinolon çekirdeğinin özellikle C6 pozisyonuna flor atomu, C7 pozisyonuna ise piperazin halkasının ilavesi ile siprofloksasin, norfloksasin, enoksasin, pefloksasin ve ofloksasin gibi daha geniş etki spektrumuna sahip kinolonlar elde edilmiştir (Appelbaum ve Hunter, 2000).

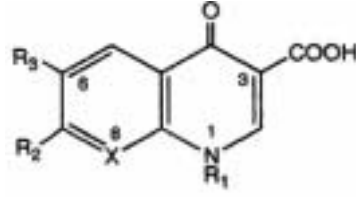
Son yıllarda Gram pozitif aktivite, anaerobik aktivite, atipik mikroorganizmalara etkinlik ve daha iyi farmakokinetik özelliklere sahip yeni kinolonlar geliştirilmiştir. Sparfloksasin, tosufloksasin, gatifloksasin, moksifloksasin, pazufloksasin üçüncü kuşak olarak anılırken en son olarak trovafloksasin, klinafloksasin, grepafloksasin geliştirilmiş ve bunlara da dördüncü kuşak kinolonlar denilmiştir.

Kinolonlar günümüzde çeşitleri hızla artan antibiyotikler olmakla birlikte aynı hızla da kullanımdan kaldırılan bir grup görünümündedirler. Örneğin travofloksasin Haziran 1999'dan sonra karaciğer toksisitesi nedeniyle çok kısıtlı bir endikasyona çekilmiş ve grepafloksasin Ekim 1999'da kardiyovasküler ölümlerle ilişkili bulunarak piyasadan kaldırılmıştır. Bu gelişmeler ışığında ruhsat aşamasında olan klinofloksasin ve sparfloksasin geri çekilmişlerdir. Bu dinamik süreç henüz devam etmektedir (Aygün, 2002).

### **2.3.1. Kimyasal Yapı**

Kinolonlarda nafridon çekirdek ve kinolon çekirdek olmak üzere iki tip halka yapısı vardır. Nalidiksik asitte olduğu gibi nafridon çekirdeğinin C1 ve C8 pozisyonlarında nitrojen bulunurken kinolon çekirdeğinin yalnızca C1 pozisyonunda nitrojen bulunur. Tüm kinolonların C3 pozisyonunda karboksil grubu ve C4 pozisyonunda çift bağlı oksijen atomu yer alır (Şekil 2.3) .

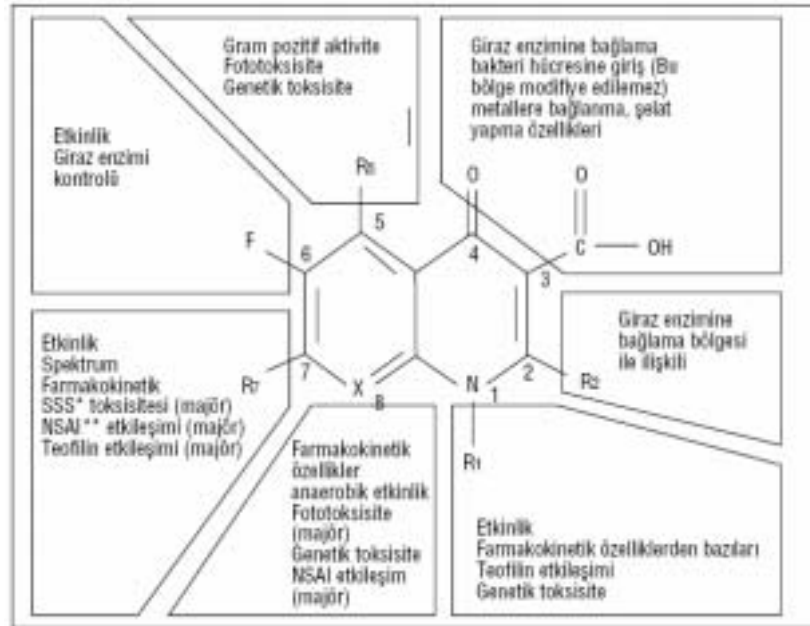
Nalidiksik asit, pipedimik asit, enoksasin, tosufloksasin, gemifloksasin ve trovafloksasin nafridon çekirdeğe sahipken kinik kullanıma yeni giren kinolonların büyük çoğunluğu kinolon çekirdeğe sahiptir (Appelbaum ve Hunter, 2000).



Şekil 2.3. Kinolon ve naftiridon çekirdeğinin yapısı. X=N ise naftiridon çekirdek, X=CH ise kinolon çekirdek

Esas olarak C1 pozisyonundaki ve C7 pozisyonundaki piperazin halkası üzerindeki substituentler değiştirilmek suretiyle bir çok kinolon türü üretilmiştir. Yeni sentezlenen kinolonların C6 pozisyonunda flor atomu vardır ve bunlar florokinolonlar olarak adlandırılırlar.

Kinolon/naftiridon halkası pek çok noktasında yeni bağlantılarla yeni ve farklı özellikler kazanmaya elverişli bir yapıdadır. Kinolonlar arasındaki antibakteriyel etkinlik ve farmakokinetik farklılıklar kimyasal yapılarındaki değişikliklerden kaynaklanır. Şekil 2.4’de moleküler yapıdaki her bir modifikasyonla meydana gelen farklı antimikrobiyal ve farmakolojik aktivitelerle birlikte kinolonların yan etkileri belirtilmiştir. Kimyasal yapıda oluşturulan değişikliklerle daha potent ve geniş antibakteriyel spektruma sahip kinolonlar sentezlenmiştir (Childs, 2000).

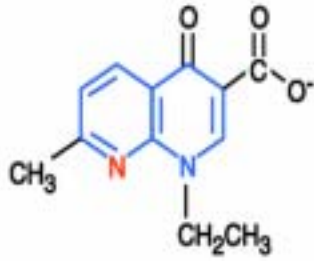


Şekil 2.4. Kinolon halkası (Childs, 2000’den değiştirilerek alınmıştır)

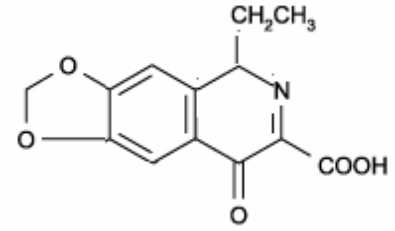
### 2.3.2. Antimikrobiyal Etki

Kinolonlar sentez edildikleri sıraya ve antimikrobiyal etkilerine göre dört kuşağa ayrılırlar.

Birinci kuşak kinolonların sistemik etkileri zayıf ve etki spektrumları dardır. Bunlar arasında kinolon grubu antibiyotiklerin ilk üyesi olan nalidiksik asitle birlikte oksolinik asit, pipedemik asit ve sinoksasin yer alır. Nalidiksik asit ve pipemidik asit nafridon çekirdeğe, oksolinik asit ve sinoksasin ise kinolon çekirdeğe sahiptir (Şekil 2.5). Nalidiksik asid dışındaki birinci kuşak kinolonların bugün kullanım alanı yoktur.



Nalidiksik asit



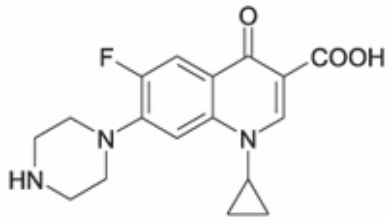
Oksolinik asit

Şekil 2.5. Nalidiksik asit ve oksolinik asidin kimyasal yapıları

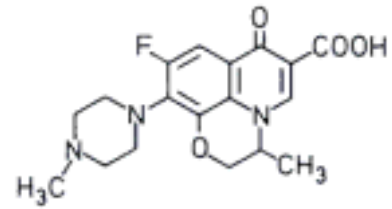
Norfloksasin, siprofloksasin, pefloksasin, ofloksasin, lomefloksasin, enoksasin ve fleroksasin gibi ikinci kuşak kinolonların hepsinin C6 pozisyonunda flor atomu vardır ve bunlar florokinolonlar olarak da adlandırılırlar. C6 pozisyonunda flor atomu bulunması Gram pozitif bakterilere karşı etkinlik sağlar (Şekil 2.6).

İkinci kuşak kinolonlar esas olarak C7 pozisyonundaki piperazin halkasının ve C1 pozisyonun üzerinde bulunan substituentler değiştirilmek suretiyle üretilmiştir. C7 pozisyonundaki piperazin halkası ve C1 pozisyonundaki siklopropil Gram negatif bakterilere karşı etkinlik sağlar. Ofloksasin ve bunun L-izomeri levofloksasin 1,8 siklo bileşikler olup trisiklik benzoksazin çekirdeğinin C7 pozisyonunda N-metil piperazin halkasına sahiptirler (Ambrose ve Owens, 2000; Appelbaum ve Hunter, 2000)

İkinci kuşak kinolonlar daha geniş spektrumlu olup Gram negatif çomaklar dışında, stafilkoklara, *Haemophilus* ve *Moraxella* türlerine, atipik pnömoni etkenlerine (*Mycoplasma*, *Legionella*, *Chlamydia* türleri), genital infeksiyon etkenlerine (*Mycoplasma*, *Ureoplasma*, *Chlamydia*, *Neisseria* türleri), *Mycobacterium tuberculosis* ve *Brucella* gibi pek çok bakteriye etkindir. Bu grupta en çok klinik deneyim olan kinolonlar; siprofloksasin ve ofloksasindir. Pefloksasin ve ofloksasin beyin omurilik sıvısına (BOS) geçişi en iyi olan kinolonlardır. Siprofloksasin *P. aeruginosa*'ya en etkili kinolondur. *M. tuberculosis*'e en etkili kinolon ise ofloksasindir. İkinci kuşak kinolonların streptokoklara, enterokoklara ve anaerob bakterilere karşı etkinlikleri ise oldukça düşüktür (Reece ve Bettss, 1996; Cunha, 2000; Moellering vd., 2000).



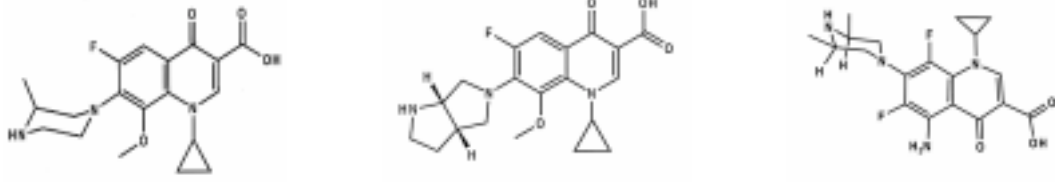
Siprofloksasin



Ofloksasin

Şekil 2.6. Siprofloksasin ve ofloksasinin kimyasal yapıları

Levofloksasin, sparfloksasin, gatifloksasin, moksifloksasin, tosufloksasin ve pozufloksasin gibi üçüncü kuşak kinolonlarda ise N1 pozisyonunda siklopropil varlığı ve C5 pozisyonunda amino grubunun bulunmasıyla yalnız Gram negatif etkinlik değil, Gram pozitif etkinlik de arttırılmıştır. Sparfloksasin piperazin halkasında 2cis-oriented metil grubuna sahiptir (Şekil 2.7). Bu cis-dimetil oluşum ile *in vivo* antimikrobiyal potent, özellikle Gram pozitif bakterilere etkinliği artmıştır. Moksifloksasin ve gatifloksasinin C8 pozisyonunda metoksi yan zinciri, C7 pozisyonunda lipofilik azabisiklo modifikasyonu ile Gram pozitif bakterilere etkinlik artmıştır. Moksifloksasin, gatifloksasinin, levofloksasin ve sparfloksasinin hem piperidin halkasının hem de piperazin halkasının alkil olması çözünürlüğü ve Gram pozitif bakterilere etkinliği artırır ve antibiyotiklerin yarı ömürlerini uzatabilir.



Gatifloksasin

Moksifloksasin

Sparfloksasin

Şekil 2.7. Gatifloksasin, moksifloksasin ve sparfloksasinin kimyasal yapıları

Daha yeni olarak geliştirilen travofloksasin, klinafloksasin, grepafloksasin, temafloksasin ve gemifloksasin gibi dördüncü kuşak kinolonlara Gram negatif ve Gram pozitif etkinliklerle birlikte anaerobik etkinlik kazandırılmıştır (Şekil 2.8). Klinafloksasin C7 pozisyonunda prolidin halkasına sahip olması bunun Gram pozitif bakterilere etkinliğini arttırmaktadır (Appelbaum ve Hunter, 2000; Childs, 2000; Oliphant ve Green, 2002.).



Grepafloksasin

Gemifloksasin

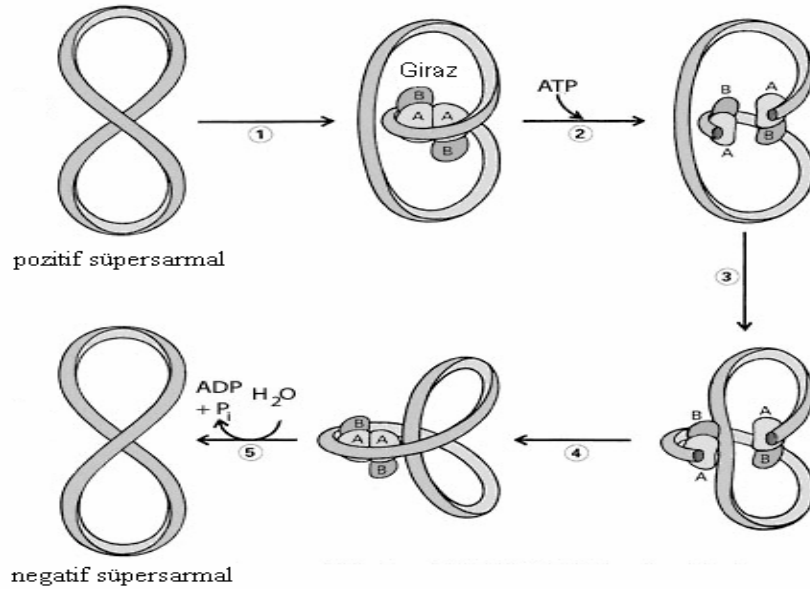
Şekil 2.8. Grepafloksasin ve gemifloksasinin kimyasal yapıları

### 2.3.3. Etki Mekanizması

Kinolonlar antimikrobiyal etkilerini bakterilerin DNA replikasyonunda rol alan DNA giraz ve topoizomeraz IV enzimlerini inhibe ederek gerçekleştirir ki bu enzimler yapısal olarak birbirlerine benzemektedirler. Her iki enzim de tetramerik yapıda olup, DNA giraz iki GyrA ve iki GyrB alt ünitesinden ve topoizomeraz IV ise iki ParC ve iki ParE alt ünitesinden meydana gelir. DNA giraz ve topoizomeraz IV enzimleri oldukça uzun bir molekül olan bakteri DNA'sında çok yönde negatif süpersarmallar oluşturarak, birkaç mikrometre olan bakteri içine sığdırılmasını

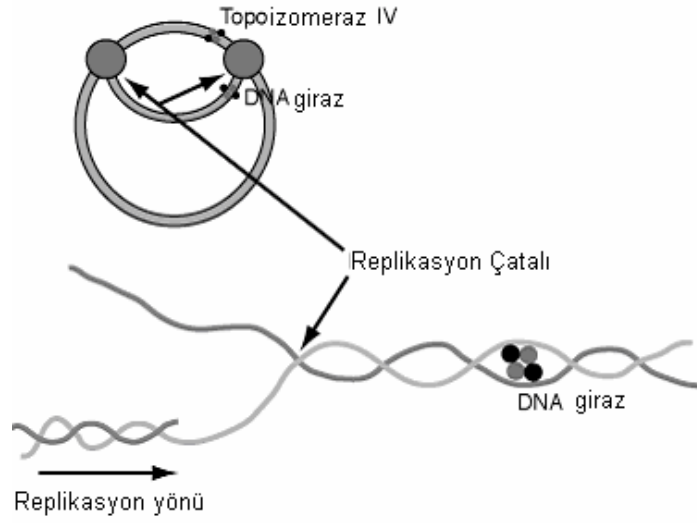
sağlarlar (Hooper ve Wolfson, 1993; Dougherty vd., 2001; Ince vd., 2003; Limoncu vd., 2003)

Süpersarmal yapıdaki DNA'nın replikasyonu ve transkripsiyonu mekanik olarak mümkün değildir. Bu iki olayın başlaması ve sürdürülmesi için DNA süpersarmalının yerel olarak açılması ve DNA zincirlerinin birbirinden ayrılması gerekir. Ancak ayrılan zincirler özel bir işleme tabi tutulmazlarsa ayrılma noktasının önünde aşırı pozitif süpersarmallaşma olur. Bu durumun önlenmesi için DNA giraz enzimi replikasyon çatalının ilerisinde yer alarak DNA sarmalini oluşturan iplikçiklerin her ikisinin belli bir noktasından kesip iplikçiklere negatif süpersarmallaşma sağladıktan sonra iplikçikleri yeniden birleştirir (Şekil 2.9 ve Şekil 2.10)



Şekil 2.9. Bakteriyel DNA'da negatif süpersarmalın oluşumu ([www.epfl.ch/.../course\\_files/stasiak](http://www.epfl.ch/.../course_files/stasiak))

Topoizomeraz IV enzimi ise replikasyon çatalının gerisinde yer alarak DNA süpersarmalının ilerlemesini sağlar (Şekil 2.10). Bu enzim aynı zamanda bakterilerin bölünmesi sırasında yeni oluşan bakterilere DNA'nın bölüştürülmesini sağlar (Bearden ve Danziger, 2001; Jones, 2002).



Şekil 2.10. Topoizomerazlar ve DNA replikasyonu (Bearden ve Danziger, 2001)

Bakteri tipine bağlı olarak bu enzimler, antimikrobiyal etkinin primer veya sekonder hedefini oluştururlar. *E. coli* gibi Gram negatif bakterilerde, kinolonlar daha yoğun olarak DNA giraz'ı inhibe ederken, *S. aureus* gibi Gram pozitif organizmalar için ana hedefin topoizomeraz IV olduğu yakın zamanda ortaya konmuştur (Hooper ve Wolfson, 1993; Shen vd.,1993; Morais vd., 1997; Pickerill vd., 2000).

### 2.3.4. Direnç Mekanizmaları

Kinolonlara karşı oluşan direnç kromozomal kaynaklı olup önceden bildirilen plazmid kaynaklı dirençler doğrulanmamıştır. Başlıca direnç mekanizmaları hedef enzimde değişiklik ve antibiyotiğin hücre içine girişinin azaltılmasıdır (Hooper, 2001; Oh ve Edlund, 2003).

#### 2.3.4.1. Hedef Enzimde Değişiklik

Tüm bakteri türlerinde kinolonlara karşı esas direnç mekanizması DNA giraz ve topoizomeraz IV enzimlerini kodlayan genlerdeki yapısal değişikliklerdir. Bu değişiklikler özellikle her enzimin alt ünitelerindeki KDBB olarak da adlandırılan “kinolon direnç belirleyici bölge”de spontan mutasyonlarla meydana gelmektedir. Spontan kromozomal mutasyon sıklığı  $10^{-6}$ - $10^{-9}$ 'dur. KDBB'de mutasyonlarla

meydana gelen aminoasit değişiklikleri kinolonların enzim-DNA kompleksine olan afinitesini azaltırlar. *gyrA* ve *parC* genlerindeki mutasyonlar, kinolonların DNA giraz ve topoizomeraz IV enzimlerinde bağlandığı hedef bölgelerde değişikliklere yol açarak kinolonların bağlanmasını azaltmaktadır. Böylece kinolonların bakterilere etkinliği azalırken, antibiyotiğe direnç ve bakteriyel minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) artış göstermektedir (Bearden ve Danziger, 2001; Hooper, 2002; Jones, 2002).

Gram negatif bakterilerde DNA giraz tüm kinolonların primer hedefiyken, Gram pozitif bakterilerde ise antibakteriyel etkinin tarzını kinolonun kimyasal yapısı belirlediğinden primer hedef DNA giraz veya topoizomeraz IV olarak değişebilmektedir. Bu durum primer hedefin bakteri türleri kadar kinolonun yapısına da bağlı olduğunu göstermektedir. Örneğın bazı Gram pozitif bakterilerde sparfloksasinin başlıca hedefi DNA giraz'dır (Schmitz vd., 1999; Roychoudhury vd., 2001).

*gyrA* genindeki mutasyonlar tüm kinolonlara karşı yüksek düzeyde direnç gelişimine neden olmaktadır. Bu durum *E. coli*, *P. aeruginosa*, *H. influenzae*, *C. freundii* ve *S. marcescens*'te tanımlanmıştır. *gyrB* genindeki mutasyonla oluşan direnç tüm kinolonlara karşı gelişmeyebilir; bu tip direnç *E. coli* ve *P. aeruginosa*'da gözlenmiştir.

*parC* genindeki mutasyonlar ise daha çok *S. aureus* ve *S.pneumoniae*'de tanımlanmıştır. *parE* genindeki mutasyonların kinolon direncine bağlı olmadığı düşünülmektedir (Dougherty vd., 2001; Jones, 2002).

#### **2.3.4.2. Antibiyotiğın Hücre İçine Girişinin Azaltılması**

##### **2.3.4.2.1. Membran Permeabilitesinde Azalma**

DNA giraz ve topoizomeraz IV enzimleri bakteriyel hücrenin sitoplazmasına yerleşmişlerdir. Kinolonların sitoplazmadaki bu hedeflerine ulaşması için bakteri



hücresine penetre olmaları zorunludur. Gram negatif bakterilerde kinolonların hücre içine girmesi, dış membrandaki porinler aracılığı ile olur. Gram negatif bakterilerin dış membran porin proteinlerinde değişikliğe yol açan mutasyonlar kinolonların dış membrandan girişini azaltarak hedef enzimlere daha az miktarda antibiyotiğin ulaşmasına yol açar. Dış membran porin proteinlerinde (OmpF) oluşan mutasyonlar yalnızca Gram negatif bakterilerde gözlenmiş olup kinolonlara karşı artmış MİK değerleri saptanmıştır. Nalidiksik asit ve diğer kinolonlara bu mekanizma ile gelişen direnç *P. aeruginosa* ve *Serratia marcescens*'te bildirilmiştir. Bu tip direnç kinolonların yanı sıra  $\beta$ -laktamlar, tetrasiklinler ve kloramfenikol gibi diğer antibiyotikler için de geçerlidir (Tanır ve Göl, 1999; Yüce, 2001; Hogan ve Kolter, 2002).

#### **2.3.4.2.2. Aktif Pompalama ile Antibiyotiğin Dışarı Atılması**

Antibiyotiğin hücre dışına atılmasını sağlayan aktif pompa sistemlerinin varlığı yaklaşık olarak 20 yıl önce tetrasiklinler için belirlenmiştir. Kromozomal mutasyon sonucu değişik dışarı pompalama sistemleri ile de kinolonlara karşı direnç gelişimi söz konusudur. Kinolonların aktif pompalama sistemi ile dışarı atılması *S.aureus* (NorA), *Enterobacteriaceae* (MarA), *Pseudomonas* ve *Campylobacter* gibi bakterilerde gözlenmiştir. Kinolonlar enerjiye bağımlı bir aktif pompalama sistemi ile hızla dışarıya atılırlar ve hücre içinde birikemezler. Aktif pompalama sisteminin kinolon direncinin yanı sıra, kloramfenikol,  $\beta$ -laktamlar antibiyotikler ve setrimid, benzalkonyum klorür gibi deterjanlara dirence de yol açtığı bildirilmektedir. Pompalama sistemlerinden bir kısmı çoklu antibiyotik direnci sağlarken, sadece kinolonlara direnç sağlayanları da vardır (Yüce, 2001; Hogan ve Kolter, 2002).

#### **2.3.5. Farmakokinetik Özellikler**

Kinolonlar biyoyararlanımları oldukça iyi olan, suda çok iyi çözünen lipofilik bileşiklerdir. Ağız yoluyla alındıklarında gastrointestinal sistemden absorpsiyonları son derece iyidir. Biyoyararlanımı en yüksek olan oflaksasin oral yolla alındığında

tamamen absorbe olurken; siprofloksasinin % 70'i, norfloksasinin ise % 40-50'si emilir.

Kinolonlar oral yoldan alındıktan 1-2 saat sonra plazmada en yüksek konsantrasyonlarına ulaşırlar. Siprofloksasin ve ofloksasin en hızlı, enoksasin ise en yavaş absorbe edilen kinolonlardır. Besinle birlikte alınimleri absorpsiyon hızlarını azaltır, fakat biyoyararlanımlarını değiştirmez. Sukralfat veya antasitlerle birlikte alındıklarında bu maddeler kinolonların biyoyararlanımlarını azaltırlar. Birlikte kullanılacaklarsa bu maddeler kinolonlardan 2-4 saat önce ya da en az iki saat sonra alınmalıdır.

Kinolonların plazma proteinlerine bağlanma oranları düşük olmasına rağmen, dağılım hacimlerinin yüksekliği ve dokulara iyi penetrasyonları nedeniyle eliminasyon yarı ömürleri oldukça uzundur. Bu durum günde tek doz veya iki kez kullanımlarına izin verir. Kinolonların eliminasyon yolları da farklıdır. Norfloksasin, siprofloksasin, enoksasin, fleroksasin, lomefloksasin hem renal hem de hepatik yolla elimine edilirken, ofloksasin daha çok renal, pefloksasin de daha çok hepatik yolla elimine edilir. Kinolonların bazı metabolitleri karaciğerde sitokrom p-450 sistemini etkileyerek kafein ve teofilin demetilasyonunu azaltabilir (Pickerill vd., 2000; Leblebicioğlu, 2001).

Tüm kinolonlar gerek küçük moleküllü olmaları, gerekse plazma proteinlerine bağlanma oranlarının düşük olması nedeniyle serumda, fagositik hücrelerde, doku ve vücut sıvılarında oldukça yüksek konsantrasyonlara ulaşırlar. Akciğer, karaciğer, kalp, kemik, prostat, idrar, balgam ve dokuda ulaştıkları konsantrasyonlar çok iyi olup tükürük, gözyaşı salgısı, nazal mukoza ve bronş epiteline geçişleri de oldukça iyidir. Ancak BOS'a geçişleri inflamasyon varlığında bile yeterli değildir. En iyi BOS düzeyi sağlayan kinolonlar pefloksasin ve ofloksasindir.

Böbrek, idrar, prostat, akciğerler, bronş mukozası gibi dokularda, granülosit ve makrofaj içinde, serum konsantrasyonlarından daha yüksek konsantrasyonlara ulaşırlar. Prostat salgısı, bronş sekresyonları, tükürük ve ejakulat gibi vücut sıvılarında

diğer birçok antibiyotiğe göre yüksek oranda bulunmalarına rağmen, serum düzeylerinden daha düşük konsantrasyonlarda bulunurlar (Oliphant ve Green, 2002).

### 2.3.6. Klinik Kullanımları

Kinolonlar; oral kullanım ve yüksek biyoyararlanım oranları başta olmak üzere çok iyi farmakokinetik özellikleri, geniş antibakteriyel etki alanları, mükemmel doku penetrasyonları, nispeten düşük ve önemsiz yan etki profilleri nedeniyle çok değişik infeksiyonların tedavisinde başarı ile kullanılan seçkin antibiyotikler arasındadır. Kinolonların başlıca klinik kullanım alanları; üriner sistem infeksiyonları, bakteriyel prostatitler, cinsel ilişki ile bulaşan infeksiyonlar gastrointestinal infeksiyonlar, solunum yolu infeksiyonları, kemik ve eklem infeksiyonlarıdır.

Kinolonların oral kullanımdan sonra idrarda çok yüksek yoğunluklara ulaşabilmeleri ve bu düzeylerini birçok üropatojen için bakterisidal konsantrasyonlarda uzun süre devam ettirebilmeleri nedeniyle her tip üriner sistem infeksiyonun tedavisinde başarıyla kullanılan antibiyotiklerdir. Bu tür infeksiyonlarda norfloksasin, siprofloksasin ve ofloksasin kullanılmaktadır.

Kinolonlar prostat dokusunda çok yüksek konsantrasyonlara ulaşabilme özellikleri nedeniyle akut ve kronik bakteriyel prostatitlerin tedavisinde çok etkilidirler. Siprofloksasin, ofloksasin ve norfloksasin akut prostatitlerde en az 4 hafta süre ile uygulandığında %90'ın üzerinde başarı oranına ulaşılır. Kronik prostatitlerde tedavi süresi 16 haftaya kadar uzatılabilir.

Tüm kinolonlar *N. gonorrhoeae* ve *Haemophilus ducreyi* gibi cinsel ilişki ile bulaşan patojenlere mükemmel etkinlik gösterirler. Siprofloksasin, ofloksasin ve norfloksasin gonore tedavisinde %100'e yakın oranlarda etkilidir. *H. ducreyi*'nin neden olduğu yumuşak şankr'ın tedavisinde siprofloksasin çok etkilidir.

Kinolonlar; *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Vibrio*, *Yersinia* cinsleri ve *E. coli* dahil bir çok enterik patojene karşı çok iyi etkinlik gösterirler. Bu patojenlerde

özellikle kotrimoksazol, ampisilin, kloramfenikol ve tetrasiklin direncinin günümüzde oldukça yüksek olduğu göz önüne alınırsa kinolonların bakteriyel gastrointestinal sistem infeksiyonlarının ampirik tedavisinde ilk seçenek antibiyotiklerdir.

Daha önce de belirtildiği gibi siprofloksasin, ofloksasin gibi ikinci kuşak florokinolonların başta pnömokoklar ve streptokoklar olmak üzere Gram pozitif bakterilere etkinliklerinin iyi olmayışı nedeniyle bu kinolonların solunum yolu infeksiyonlarında kullanımları önerilmemektedir. Ancak son yıllarda klinik kullanıma girmeye başlayan Gram pozitif ve dolayısıyla pnömokoklara etkinliği artmış yeni kinolonlar *S. pneumoniae*, *H. influenzae* ve *M. catarrhalis*'e mükemmel etkinlikleri nedeniyle solunum yolu infeksiyonlarında başarı ile kullanılmaya başlanmıştır.

Kinolonların kemik dokuda çok yüksek konsantrasyonlara ulaşabilmeleri nedeniyle Gram negatif bakterilerin neden olduğu osteomyelitlerin tedavisinde oldukça başarılı sonuçlar alınmaktadır. Osteomyelit tedavisinde üzerinde en çok çalışılan ve tercih edilmesi gereken kinolon siprofloksasindir. Kronik osteomyelitlerde rifampisinle kombine kullanılmasının başarı oranını yükselttiği bildirilmektedir (Leblebicioğlu, 2001; Oliphant ve Green, 2002).

#### **2.4. *Staphylococcus aureus*'ta Kinolon Direnci**

Hedef enzimlerdeki değişiklikler ve aktif pompalama mekanizmaları metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA) ve metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA)'ta kinolon direncine neden olur.

*S. aureus* için en yaygın direnç mekanizması DNA giraz ve topoizomeraz IV enzimlerindeki değişikliklerdir. *S. aureus*'ta topoizomeraz IV enzimin alt üniteleri *grlA* (*parC*) ve *grlB* (*parE*) genleriyle kodlanır (Couzinet vd., 2005)

*S. aureus*'ta kinolonların primer hedefi topoizomeraz IV'dir. *S. aureus*'ta özellikle birbirleriyle homolog olan *parC* ve *gyrA* genlerinin "kinolon direnç belirleyici bölge"de oluşan mutasyonlar direnç gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Mutasyonlar çoğunlukla *parC*'de Ser80Phe, Glu84Lys ve *gyrA*'da ise Ser84eu ve Glu88Lys aminoasit kodonlarında meydana gelmektedir. Bu güne kadar DNA giraz ve topoizomeraz IV enzimlerinin B alt ünitelerini olan *gyrB* ve *grlB* genlerinin kinolon direnciyle doğrudan ilişkileri gösterilememiştir (Schmitz vd., 1999; Sierra vd., 2002).

*S. aureus*'taki aktif pompalama mekanizmasıyla meydana gelen direnç *norA* geninin ekspresyonunun artmasına bağlıdır. *norA* geni kinolon direncinden sorumlu aktif pompalama mekanizması olan membran proteini NorA'yı kodlar. NorA aktif pompalama sistemiyle ekspresyonun artması putative promotor bölgedeki bir mutasyondan ileri gelir. Aynı zamanda *norA* yapısal genin kendisindeki bir mutasyon da dirence katkıda bulunabilir. *S. aureus*'ta NorA aktif pompalama sistemiyle kinolonlar elektrokimyasal proton gradientiyle hızla dışarı atılırlar ve hücre içinde birikemezler. NorA aktif pompalama sistemin ekspresyonunun artmasından kaynaklanan direnç düşük seviyeli olup topoizomeraz mutasyonlarıyla aynı ya da farklı zamanlarda meydana gelebilir.

Norfloksasin, siprofloksasin ve ofloksasin gibi hidrofilik kinolonlar bu pompalama sistemiyle etkin bir biçimde dışarıya atılırken sparfloksasin, trovafloksasin ve moksifloksasin gibi yeni hidrofobik kinolonların NorA'dan etkilenmediği düşünülmektedir. *S. aureus*'ta hidrofilik kinolonlar aktif pompalama sisteminden değişik düzeylerde etkilenirler. Örneğin, *S. aureus*'ta NorA aktif pompalama sisteminin yüksek düzeyde ifade edilmesiyle norfloksasinin MİK değerinde 32 kat, siprofloksasinde yalnızca 8 kat ve ofloksasinde ise 4 kat artış olduğu bildirilmektedir (Bearden ve Danziger, 2001; Dougherty vd., 2001; Kaatz vd., 2002).

*S. aureus*'ta kinolon direnci siprofloksasinin kullanıma girmesinden sonra ortaya çıkmıştır ve özellikle son yıllarda metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) suşlarında kinolon direncinde hızlı bir artış söz konusudur.

*S. aureus*'ta düşük seviyeli direnç nokta mutasyonlarla, yüksek seviyeli direnç ise kombine direnç mekanizmalarıyla kazanılabilmektedir. Kombine direnç mekanizmalarına bir çok örnek verilebilir. Örneğin *parC*'nin iki farklı segmentinde aynı anda meydana gelen değişiklikler MİK değerlerinin yükselmesine neden olmaktadır. Hem DNA giraz hem de topoizomeraz IV'deki kombine değişiklikler direncin düzeyini arttırmaktadır. Ayrıca, *norA* ve *gyrA* genlerinde aynı anda meydana gelen ikili mutasyonlar bakteriyel duyarlılığın azalmasına neden olmaktadır (Bearden ve Danziger, 2001).

### 3. MATERYAL ve METOT

#### 3.1. Kullanılan Sarf Malzemeler

- Agaroza (Sigma)
- Agar (Merck)
- Borik Asit (Sigma)
- Bromofenol mavisi ( %0.25 J.T.Baker)
- DNA jel ekstraksiyon kiti (Biogen)
- DNA Markır (100-1500 bç) (Takara)
- EDTA (Idranal,III)
- Etidyum Bromür (Sigma E-7637)
- Fikol (Sigma)
- Gatifloksasin Disk (Oxoid)
- Gatifloksasin E-testi (AB Biodisk)
- Mueller Hinton Broth (LabM)
- Mueller Hinton Agar (LabM)
- Siprofloksasin Disk (Oxoid)
- Siprofloksasin E-testi (AB Biodisk)
- Sükroz (Sigma)
- Trisbase (Merck)
- Triptik Soy Broth (Merck)

#### 3.2. PZR Bileşenleri

- PZR tamponu (Takara)
- dNTP karışımı (dATP,dCTP,dGTP,dTTP) (Takara)
- MgCl<sub>2</sub> (Takara)
- Taq Polimeraz (Biogen)
- *gyrA* Forward primeri (Biogen)
- *gyrA* Reverse primeri (Biogen)
- *parC* Forward primeri (Biogen)
- *parC* Reverse primeri (Biogen)

### 3.3. Kullanılan Cihazlar

- Buzdolabı (Beko)
- Çalkalamalı İnkübatör (GallenKamp, 240v models)
- Derin Dondurucu - 20° (Arçelik)
- Elektroforez tankı (Biolab Minicell<sup>®</sup>Primo EC320 Electrophoretic Gel System)
- Etüv (Wtcbinder)
- Güç kaynağı (Bio-Rad Power PAC 300)
- Jel görüntüleme Sistemi (Biolab UV Tech, Heidolp Potamax 120 Instruments)
- Mc Farland (Bio Mérieux Lefrance)
- Mini santrifüj (Minispinplus Eppendorf)
- Soğutmalı Santrifüj (Hettich Universal 32)
- Steril Kabin CV-100
- Termocycler (Techne Genius)
- UV Görüntüleme Sistemi (BioRad UV Transilluminator 2000)
- Vorteks (Velp Scientifica)

### 3.4. *S. aureus* Suşlarının Toplanması

Isparta Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastane'sinin değişik klinik örneklerinden toplanan suşlardan 22 adet MRSA suşu ve 2 adet kontrol MSSA suşu ile birlikte toplam 24 *S. aureus* suşu bu çalışmada kullanılmıştır.

### 3.5. *S. aureus* Suşlarının Üretimi ve Saklanması

Çalışmada kullanılacak suşlar uzun süreli saklama amacıyla Triptik Soy broth besiyerine ekilerek 37°C'de 24 saat üretildikten sonra kültür ortamına %1 oranında Gliserin eklenerek steril tüplere dağıtılmış ve -80°C'de muhafaza edilmiştir. -80°C'de saklanan bakteriler antibiyotik duyarlılık testleri ve PZR çalışmaları için önce %5 insan kanlı agar ekilmiş ve 37°C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra kanlı



agarda üreyen bakteriler yatık Triptik Soy agar tüplerine ekilerek 37°C’de 24-48 saat inkübe edilmiş ve +4°C’de saklanmıştır.

### **3.6. Antibiyotik Duyarlılık Testleri**

#### **3.6.1. Katı Besiyerinin Hazırlanması**

Çalışmaya alınan suşların siprofloksasin ve gatifloksasin duyarlılıkları National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) standartlarına uygun olarak disk difüzyon ve E-testi yöntemleriyle belirlenmiştir. Bu amaçla Mueller Hinton agar besiyeri hazırlanıp 121°C’de 15 dakika otoklavda sterilize edildikten sonra petrilere dökülmüş ve oda sıcaklığında katılaşması beklenmiştir. Kontaminasyon kontrolü için petriler 37°C’lik etüvde bir gece inkübe edilmiş ve hiç bakteri üremesi olmayan petriler antibiyotik duyarlılık testlerinde kullanılmıştır.

#### **3.6.2. Duyarlılık Testleri İçin Bakteri Süspansiyonunun Hazırlanması**

Duyarlılık testleri için yatık Triptik Soy agarda üretilmiş *S. aureus* suşları Mueller Hinton broth besiyerine ekilerek 37°C’de 4-6 saat inkübe edilerek bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır. Bakteri süspansiyonu 0.5 Mc-Farland bulanıklık standardına ( $10^8$  bakteri/mL) uygun olacak şekilde steril serum fizyolojikle seyreltildikten sonra kullanılmıştır.

#### **3.6.3. *S. aureus* Suşlarında Antibiyotik Duyarlılık Testleri**

Bir antibiyotiğin antimikrobik aktivitesinin saptanması için uygulanan *in vitro* işlemlere genel olarak “duyarlılık testleri” adı verilmektedir. Rutin laboratuvarlarda uygulanan testlerle genellikle antibiyotiklerin inhibitör (bakteriyostatik) aktivitesi değerlendirilir. Disk difüzyon ve E-testi bu amaçla uygulanan en yaygın iki yöntemdir.

### 3.6.3.1. Disk Difüzyon Yöntemi

Disk difüzyon yönteminde belirli miktarlarda antibiyotik emdirilmiş kağıt diskler test edilecek mikroorganizmasından hazırlanan standart süspansiyonun yayıldığı agar yüzeyine yerleştirilir. Böylece diskteki antibiyotik agar içerisine yayılır ve bakteriye etkili olduğu düzeylerde üremeyi engeller.

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. Petriler steril kabinde 20 dakikayı geçmeyecek şekilde kurutuldu. Besiyeri yüzeyine steril pensle siprofloksasin ve gatifloksasin antibiyotiklerini içeren diskler yerleştirildikten sonra petriler 35°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda disklerin çevresinde bakterilerin test edilen antibiyotiklere duyarlılık derecesini ifade eden bakterilerin üremediği dairesel alanın çapı ölçülerek duyarlı, orta duyarlı ve dirençli suşlar NCCLS'nin kriterlerine göre belirlendi (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Disk difüzyonunda siprofloksasin ve gatifloksasin sınır değerleri

Antibiyotik	Duyarlı	Orta Duyarlı	Dirençli
	Disk Çapı		
Siprofloksasin (5µg)	≥ 21 mm	16-20 mm	≤ 15 mm
Gatifloksasin (5µg)	≥ 18 mm	15-17 mm	≤ 14 mm

### 3.6.3.2. E-Testi Yöntemi

Yine disk difüzyon yöntemine dayanan ancak diskler yerine belirli ve sürekli artan konsantrasyon değişimi olacak şekilde antibiyotik içeren plastik şeritlerin kullanıldığı bir yöntemdir. Disk difüzyon yönteminde suşların test edilen antibiyotik için yalnızca duyarlı ya da dirençli oluşları belirlenirken, E-testi ile minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) değerleri de belirlenebilmektedir.

E-testinde disk difüzyon yönteminde olduğu gibi 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. Petrilere steril kabinde 20 dakika kadar kurutulduktan sonra besiyeri yüzeyine steril pensle siprofloksasin ve gatifloksasin 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 (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. E-testinde siprofloksasin ve gatifloksasin sınır değerleri

Antibiyotik	Duyarlı	Orta Duyarlı	Dirençli
	E-Testi		
Siprofloksasin	$\leq 1 \mu\text{g/mL}$	$2 \mu\text{g/mL}$	$\geq 4 \mu\text{g/mL}$
Gatifloksasin	$\leq 2 \mu\text{g/mL}$	$4 \mu\text{g/mL}$	$\geq 8 \mu\text{g/mL}$

### 3.7. PZR Yöntemi ile *gyrA* ve *parC* Genlerinin Çoğaltılması

#### 3.7.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), dizisi bilinen bir DNA bölgesinin *in vitro* olarak çoğaltılmasını sağlayan ve DNA molekülünün milyonlarca kopyasının elde edildiği bir tekniktir.

Çalışmamızda PZR yöntemi ile her bir *S. aureus* suşunun *gyrA* ve *parC* genlerinin KDBB'leri spesifik primerler kullanılarak ve her bir gen için ayrı PZR reaksiyonu hazırlanmak suretiyle çoğaltıldı. *gyrA* ve *parC* genlerinin KDBB'sinin çoğaltılması için gerekli spesifik primerlerinin dizilimi aşağıdaki gibidir:

*gyrA* Primer F (5' ATG GCT GAA TTA CCT CAA TC 3')

Primer R (5' GTG TGA TTT TAG TCA TAC GC 3')

*parC* Primer F (5' CAG TCG GTG ATG TTA TTG GT 3')

Primer R (5' CCT TGA ATA ATA CCA CCA GT 3')

### 3.7.2. Örneklerin Hazırlanması

Her *S. aureus* suşu için steril eppendorf tüplere 50 µL steril saf su koyuldu. Steril kürdanla her örnekten 2-3 koloni alınıp saf su içinde tamamen çözünmesi sağlandı. Tüpler vortekslenip suda yarım saat kaynatıldıktan sonra oda sıcaklığında soğuması için bekletildi ve 14.000 rpm'de 2 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonrası süpernatantın 3µL'si DNA kaynağı olarak kullanıldı.

### 3.7.3. PZR Koşulları

*gyrA* ve *parC* genlerinin KDBB'leri yukarıda belirtilen spesifik primerler kullanılarak ve her bir gen için ayrı reaksiyon hazırlanarak PZR ile çoğaltıldı.

Çizelge 3.3. *gyrA* ve *parC* genleri için PZR koşulları

PZR Tamponu	6 µL
MgCl <sub>2</sub>	3 µL
dNTP karışımı	4 µL
Primer F	1 µL
Primer R	1 µL
Taq polimeraz enzimi	0.5 µL
Kalıp DNA	3 µL
Steril saf su	31.5 µL
Toplam hacim	50 µL

PZR aşamasında DNA'nın çift sarmal yapısını bozup tek bir zincir haline getirmek (denatürasyon) için 95°C, primerlerin hedef bölgeye tutunması için 55°C, primerlere nükleotid eklenerek komplementer DNA'nın polimerizasyonu için 72°C sıcaklık gerekmekte ve bu üç farklı sıcaklığın ardı ardına uygulanmasından oluşan döngünün 30 kez tekrarlanması thermal cyler adı verilen cihazla sağlanabilmektedir. Bu amaçla *gyrA* ve *parC* PZR döngüleri şu şekilde hazırlanmıştır:

<b>Denatürasyon</b>	: 95°C 6 dakika	
<b>Taq polimeraz ilavesi</b>	: 85°C 2 dakika	
<b>Primer bağlanması</b>	: 55°C 45 saniye	<b>1 DÖNGÜ</b>
<b>Polimerizasyon</b>	: 72°C 1 dakika	
<b>Denatürasyon</b>	: 95°C 45 saniye	
<b>Primer bağlanması</b>	: 55°C 45 saniye	<b>30 DÖNGÜ</b>
<b>Polimerizasyon</b>	: 72°C 1 dakika	
<b>Polimerizasyon</b>	: 72°C 5 dakika	<b>1 DÖNGÜ</b>

PZR sonunda oluşması beklenen 398 bp'lik *gyrA* ve 468 bp'lik *parC* KDBB'lerinin varlığı agaroz jel elektroforezinde incelenmiştir.

### 3.8. Agaroz Jel Elektroforez İncelemeleri

Agaroz jel elektroforezi biyomoleküllerin sahip oldukları net elektrik yüklerinin bu moleküllerin bir elektriksel alan içindeki hareketlerini etkileme prensibine dayanmaktadır. Böylece moleküller büyüklüklerine göre ayrılabilir. Böylece moleküller büyüklüklerine göre ayrılabilir.

Çalışmamızda *gyrA* ve *parC* genlerinin PZR sonucunda oluşan ürünleri %1'lik agaroz jelde incelendi. Bu amaçla 0.25 g agaroz tartılıp 25 mL 1XTBE içersinde kaynatılarak tamamen çözülmesi sağlandı. Bu sırada jel dökme tablasının kenarları otoklav bandı ile sarılarak bir kalıp oluşturuldu ve PZR ürünlerinin yükleneceği kuyucukları oluşturmak için tablaya tarak yerleştirildi. Oda sıcaklığına kadar soğutulan agaroz çözeltisi tablaya döküldü. Jel polimerleştikten sonra tarak ve otoklav bandı çıkartıldı ve içersinde 250 mL 1XTBE tampon bulunan elektroforez tankının içersine yerleştirildi. 5 µL PZR ürünü için 2 µL jel yükleme tamponu eklenip yavaşça kuyuya yüklendi. PZR ürünlerinin büyüklüklerini belirlemek için jelin ilk kuyusuna 100-1500 bp'lik markır yüklendi. Jel elektroforez tankı güç kaynağına bağlandı ve 1 saat süreyle 100 Volt şiddetinde akım uygulandı.

**10X TBE Tamponu;**

TrisBase	5.4 g
EDTA	4.65 g
Borik Asit	27.5 g
Distile su	500 mL

**Jel Yükleme Tamponu;**

Fikol	% 25
Bromofenolmavisi	% 0.25
Sükroz	% 8
Distile su	100 mL

Agaroz jel içindeki PZR ürünlerini görünür hale getirmek için floresan özellikteki etidyum bromür stok çözeltisinden 2-3 µL alınıp yaklaşık 500 mL saf su içerisinde iyice karıştırıldı. Agaroz jel bu solusyon içinde 10 dakika bekletildikten sonra PZR ürünleri jel görüntüleme sisteminde incelendi.

**Etidyum Bromür Stok Çözeltisi;**

Etidyum bromür, agaroz jelde yürütülmüş örneklerin görüntülenmesi için kullanılmıştır. Etidyum bromür stok çözeltisi 10mg/mL konsantrasyonda hazırlanmış ve karanlıkta saklanmıştır.

**3.9. PZR Ürünlerinin Jelden İzolasyonu**

Jel görüntüleme sistemiyle *gyrA* ve *parC* genlerinin varlığı belirlendikten sonra PZR ürünleri DNA jel ekstraksiyon kit (Biobasic) protokolüne uygun olarak jelden izole edildi.

Bu amaçla 2.5 g agaroz tartılıp 250 mL 1XTBE içersinde çözülerek %1'lik kalın jel hazırlandı ve 45 µL PZR ürünü için 5µL jel yükleme tamponu eklenip karışım jele yüklendi. Jel elektroforez tankı güç kaynağına bağlandı ve 1.5 saat süreyle 100 Volt şiddetinde akım uygulandı. Jel etidyum bromürle boyandıktan sonra PZR ürünlerine ait bantlar jelden kesilip 1.5 mL'lik eppendorf tüplere koyuldu ve jelden izole edilmek üzere +4°C'de saklandı.

PZR ürünlerini jelden izole etmek için aşağıdaki protokol uygulandı:

1- Her örneğe 100 mg jel ağırlığı için 400 µL Binding Solution II eklendi ve agarozun tamamen çözünmesi için ara sıra karıştırılarak 50-60°C'de 10 dakika inkübe edildi.

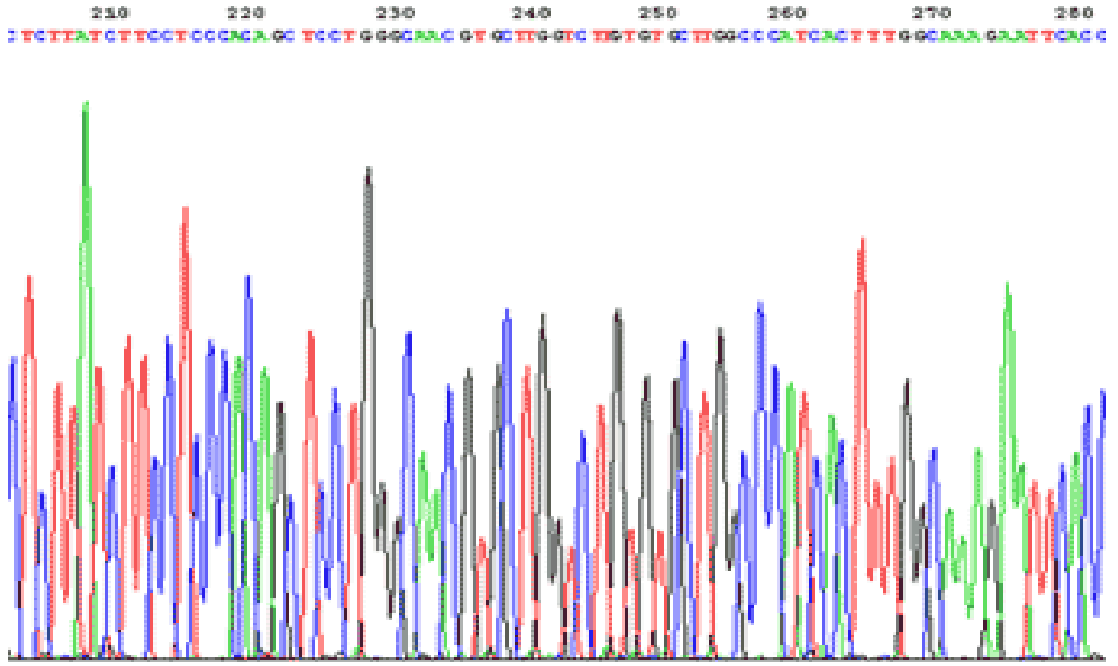
- 2- Örnekler UNIQ-10 kolona aktarıldıktan sonra 2 dakika inkübe edildi. Örnekler 8.000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi ve kolonun altındaki tüpte toplanan sıvı döküldü.
- 3- Her kolona 500 µL Binding Solution II eklenip 8.000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi ve kolonun altındaki tüpte toplanan sıvı döküldü.
- 4- 500 µL Wash Solution eklenip 8.000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi ve kolonun altındaki tüpte toplanan sıvı döküldü.
- 5- Dördüncü aşama tekrarlanıp 12.000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi. Böylece Wash Solution tamamen uzaklaştırıldı.
- 6- Kolon temiz 1.5 mL'lik eppendorf tüpe yerleştirildi ve kolonun tam merkezine 30 µL Elution Buffer eklenip oda sıcaklığında 2 dakika beklendi. 12.000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendikten sonra eppendorf tüpte biriken saf haldeki PZR ürünü DNA dizi analizi için -20°C'de saklandı.

### 3.10. DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi, DNA örneklerindeki baz dizilerinin sırasını ortaya çıkarmak için kullanılan bir genetik şifre çözme yöntemidir. Baz dizilerinin belirlenmesinde iki temel teknik geliştirilmiştir. Bunlar Maxam-Gilbert kimyasal degradasyon (yıkım) yöntemi ile Sanger'in dideoksi enzimatik yöntemidir. Her iki yöntemde de dizi analizi yapılacak DNA'nın hazırlanması, reaksiyonlar ve yüksek voltaj jel elektroforezi olmak üzere üç ana aşama bulunmaktadır.

*gyrA* ve *parC* genlerinin DNA dizi analizi İontek Firması tarafından otomatik DNA dizi analizi cihazıyla yaptırılmıştır. Otomatik DNA dizi analizi, Sanger tarafından geliştirilen enzimatik sentez yöntemi gelişmiş bir kapiller sisteme uyarlanmıştır. Boya terminasyon işaretleme adı verilen bir metod kullanılarak farklı bazlarda (A, G, T, C) sonlanan DNA sentez ürünlerine floresan işaretli boyalar iliştilir.

Elektroforez, örnekler bir kapillerden geçirilirken uygulanır. Floresan işaretli boyaları uyarmak için bir lazer, boyaların yaydığı ışığı toplamak içinse bir CCD kamera kullanılır. Böylece, lazer uyarımının ardından dört boya tarafından yayılan farklı dalga boylarındaki ışık tek kulvarda ayırılabilir. Floresan miktarlarının ölçülmesi ve yorumlanmasının ardından DNA örneğindeki baz dizisi saptanır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. DNA örneğindeki baz dizisinin saptanması (www.iontek.com.tr)



#### 4. BULGULAR

Çalışmaya alınan 22 adet MRSA ve 2 adet kontrol MSSA suşların kinolon duyarlılıkları siprofloksasin ve gatifloksasin antibiyotikleriyle NCCLS önerileri doğrultusunda disk difüzyon ve E-testi yöntemleri ile araştırılmıştır. Kinolon duyarlılık testleri yapılan suşlardaki *gyrA* ve *parC* genlerinin KDBB'leri PZR metodu ile çoğaltıldıktan sonra bu bölgelerde mutasyon olup olmadığı DNA dizi analiziyle belirlenmiştir.

##### 4.1. Disk Difüzyon Bulguları

Çalışmaya alınan suşların kinolon duyarlılıkları 5µg siprofloksasin ve gatifloksasin diskleri kullanılarak ve NCCLS standartlarına uygun olarak disk difüzyon yöntemiyle belirlenmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Siprofloksasine dirençli ve gatifloksasine hassas *S. aureus* suşu  
(CI: siprofloksasin GA: gatifloksasin)

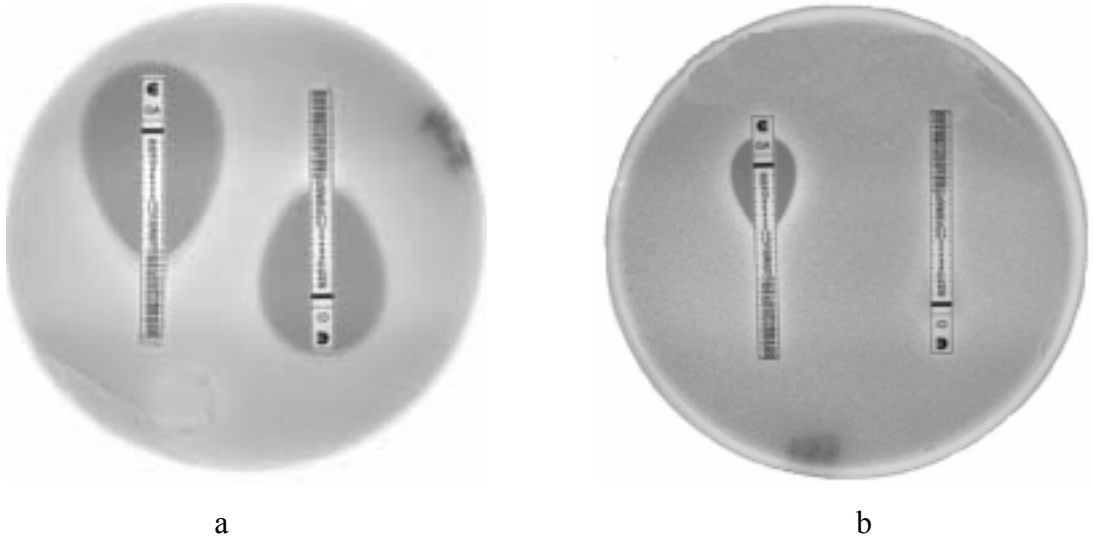
Uygulanan disk difüzyon metoduna göre 2 MSSA suşu da siprofloksasine hassas ve 22 MRSA suşunun tamamı ise siprofloksasine dirençli bulunmuştur. MSSA suşları gatifloksasine de hassas olup, MRSA suşlarından 6'sı gatifloksasine orta duyarlılıkta ve 16'sı dirençli bulunmuştur (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Disk difüzyonunda antibiyotik duyarlılık oranları (D: dirençli, H: hassas, I: orta duyarlı)

Suş No	Siprofloksasin (mm)	Gatifloksasin (mm)
<b>MSSA</b>		
1	27 H	28 H
2	25 H	26 H
<b>MRSA</b>		
3	7 D	15 I
4	0 D	16 I
5	8 D	15 I
6	0 D	14 D
7	0 D	14 D
8	8 D	16 I
9	0 D	15 I
10	0 D	15 I
11	0 D	11 D
12	0 D	12 D
13	0 D	14 D
14	0 D	12 D
15	0 D	14 D
16	0 D	13 D
17	0 D	14 D
18	0 D	11 D
19	0 D	11 D
20	0 D	10 D
21	0 D	13 D
22	0 D	9 D
23	0 D	11 D
24	0 D	9 D

#### 4.2. E-Testi Bulguları

Çalışmaya alınan suşların kinolon duyarlılıkları siprofloksasin ve gatifloksasin E-testleri kullanılarak ve NCCLS kriterlerine uygun olarak MİK değerleri belirlenmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. E-testinde direnç ve duyarlılığın tespiti (a. Siprofloksasine ve gatifloksasine hassas *S. aureus* suşu CI: siprofloksasin (0.25 µg/mL), GA: gatifloksasin (0.094 µg/mL), b. Siprofloksasine dirençli, gatifloksasine hassas *S. aureus* suşu CI: siprofloksasin (>32 µg/mL), GA: gatifloksasin (2 µg/mL) )

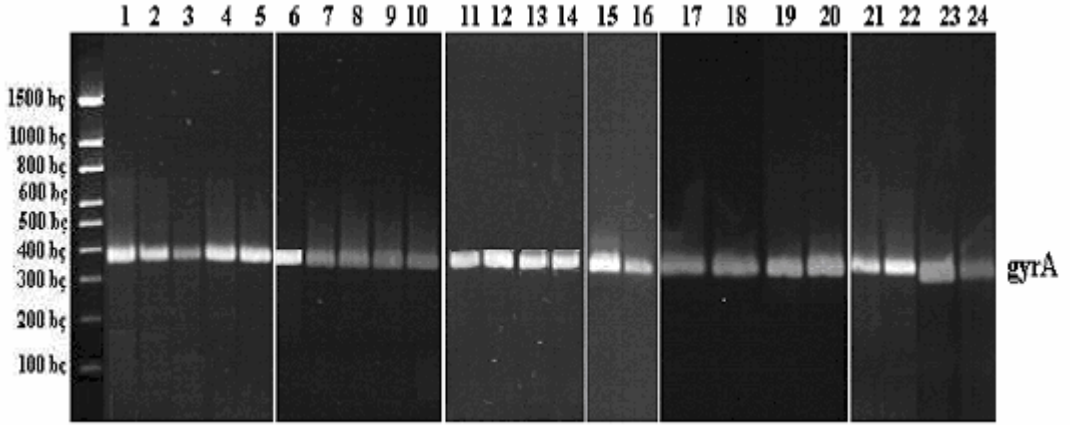
E-testine göre MSSA suşlarının her ikisi de siprofloksasine ve gatifloksasine hassas olup, MRSA suşlarının hepsi siprofloksasine dirençli iken, gatifloksasine olan duyarlılıkları değişkenlik göstermektedir. 9 MRSA suşu gatifloksasine hassas, 12'si orta duyarlılıkta ve 1 suş ise dirençli bulunmuştur (Çizelge 4.2)

Çizelge 4.2. E-testinde antibiyotik duyarlılık oranları (D: dirençli, H: hassas, I: orta duyarlı)

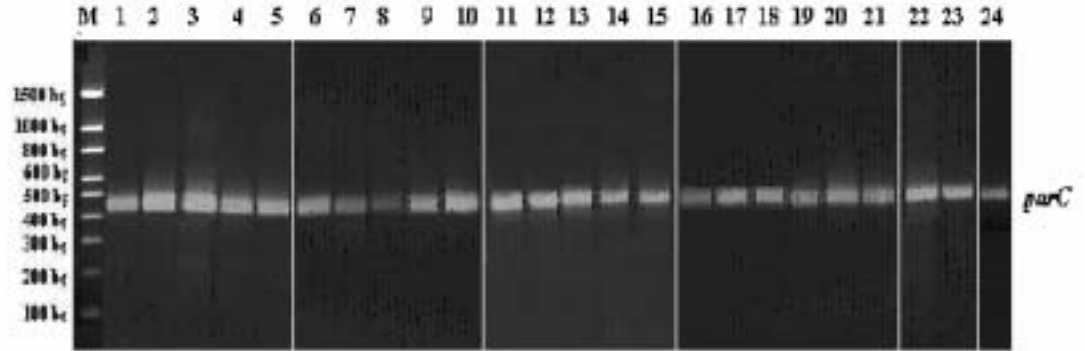
Suş No	Siprofloksasin MİK (µg/mL)	Gatifloksasin MİK (µg/mL)
<b>MSSA</b>		
1	0.125 H	0.047 H
2	0.25 H	0.094 H
<b>MRSA</b>		
3	6 D	1.5 H
4	8 D	1.5 H
5	12 D	1.5 H
6	12 D	2.5 I
7	12 D	3 I
8	16 D	2 H
9	16 D	2.5 I
10	24 D	2 H
11	>32 D	2 H
12	>32 D	2 H
13	>32 D	2 H
14	>32 D	2 H
15	>32 D	3 I
16	>32 D	3 I
17	>32 D	3 I
18	>32 D	4 I
19	>32 D	4 I
20	>32 D	4 I
21	>32 D	4 I
22	>32 D	5 I
23	>32 D	6 I
24	>32 D	8 D

### 4.3. PZR Bulguları

Bu çalışmada 398 bç'lik *gyrA* ve 468 bç'lik *parC* genlerinin KDBB'leri PZR metodu ile çoğaltıldıktan sonra bu bölgelerin varlığı %1'lik agaroz jel elektroforezinde incelenmiştir (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4).



Şekil 4.3. *gyrA* genine ait PZR ürünlerinin agaroz jelde görüntüsü



Şekil 4.4. *parC* genine ait PZR ürünlerinin agaroz jelde görüntüsü

#### 4.4. DNA Dizi Analizi Bulguları

Jel görüntüleme sistemiyle *gyrA* ve *parC* genlerinin varlığı belirlenip PZR ürünleri DNA jel ekstraksiyon kit protokolüne uygun olarak jelden izole edildikten sonra bu genlerin KDBB'lerinde mutasyon olup olmadığı DNA dizi analiziyle belirlenmiştir. Bu amaçla otomatik DNA dizi belirleyici kullanılmıştır. *gyrA* ve *parC* genlerinin DNA dizi analiz sonuçlarının daha önceki mevcut sekanslara ne derece homoloji gösterdiği “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) veri tabanında “BLAST ” algoritmi kullanılarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.5).

<b><i>gyrA</i></b>				
Query	366	MAELPQSRINERNITSEMRESFLDYAMSVIVARALPDVRDGLKPVHRRILYGLNEQGMP	187	
Sbjct	1	MAELPQSRINERNITSEMRESFLDYAMSVIVARALPDVRDGLKPVHRRILYGLNEQGMP	60	
Query	186	DKSYKKSARIVGDVDMGKYHPHGD <u>L</u> SIYEAMVRMAQDFSYRYPLVDG	49	
Sbjct	61	DKSYKKSARIVGDVDMGKYHPHGD <u>S</u> SIYEAMVRMAQDFSYRYPLVDG	106	
<b><i>parC</i></b>				
Query	438	SVGDVIGQYHPHGD <u>F</u> SVYEAMVRLSQDWKLRHVLIEMHGNNGSIDNDPPAAMRYTEAKLS	259	
Sbjct	66	TVGDVIGQYHPHGD <u>S</u> SVYEAMVRLSQDWKLRHVLIEMHGNNGSIDNDPPAAMRYTEAKLS	125	
Query	258	LLAEELLRDINKETVSFIPNYDDTTLEPMVLPFRFPNLLVNGSTGISAGYATDIPPHNLA	79	
Sbjct	126	LLAEELLRDINKETVSFIPNYDDTTLEPMVLPFRFPNLLVNGSTGISAGYATDIPPHNLA	185	
Query	78	EVIQATLKYIDNPDITVNQLMK	13	
Sbjct	186	EVIQATLKYIDNPDITVNQLMK	207	

Şekil 4.5. 6 nolu MRSA suşunda dizi analizi sonuçlarına göre mutasyon tespiti (Query: örnek aminoasit dizisi, Sbjct: referans aminoasit dizisi, *gyrA* geninde Ser84Leu, *parC* geninde Ser80Phe mutasyonu)

Dizi analizi yapılan 24 *S. aureus* suşunun *gyrA* ve *parC* geninde bulunan mutasyonlar Çizelge 4.3’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. Suşların *gyrA* ve *parC* aminoasit değişiklikleri ile siprofloksasin ve gatifloksasin MİK değerleri (D: dirençli, H: hassas, I: orta duyarlı)

Suş No	Siprofloksasin MİK (µg/mL)	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	Gatifloksasin MİK (µg/mL)
		Aminoasit değişikliği	Aminoasit değişikliği	
<b>MSSA</b>				
1	0.125 H	yok	yok	0.047 H
2	0.25 H	yok	yok	0.094 H
<b>MRSA</b>				
3	6 D	Ser84Leu	Ser80Phe	1.5 H
4	8 D	Ser84Leu	Ser80Phe	1.5 H
5	12 D	Ser84Leu	Ser80Phe	1.5 H
6	12 D	Ser84Leu	Ser80Phe	2.5 I
7	12 D	Ser84Leu	Ser80Phe	3 I
8	16 D	Ser84Leu	Ser80Phe	2 H
9	16 D	Ser84Leu	Ser80Phe	2.5 I
10	24 D	Ser84Leu	Ser80Phe	2 H
11	>32 D	Ser84Leu	Ser80Phe	2 H
12	>32 D	Ser84Leu	Ser80Phe	2 H
13	>32 D	Ser84Leu	Ser80Phe	2 H
14	>32 D	Ser84Leu	Ser80Phe	2 H
15	>32 D	Ser84Leu	Ser80Phe	3 I
16	>32 D	Ser84Leu	Ser80Phe	3 I
17	>32 D	Ser84Leu	Ser80Phe	3 I
18	>32 D	Ser84Leu	Ser80Phe	4 I
19	>32 D	Ser84Leu	Ser80Phe	4 I
20	>32 D	Ser84Leu	Ser80Phe	4 I
21	>32 D	Ser84Leu	Ser80Phe	4 I
22	>32 D	Ser84Leu	Ser80Phe	5 I
23	>32 D	Ser84Leu	Ser80Phe	6 I
24	>32 D	Ser84Leu	Ser80Phe	8 D

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

*S. aureus* çok çeşitli infeksiyonlara neden olabilen, özellikle hastane infeksiyonu etkenleri arasında ilk sıralarda yer alan patojenitesi yüksek bir mikroorganizmadır. *S. aureus* ile oluşan hem hastane dışı hem de hastanede gelişen infeksiyonlar, etkenin antibiyotiklere kısa sürede direnç geliştirebilmesi sebebiyle büyük bir önem taşımaktadır. *S. aureus* infeksiyonlarının tedavisinde en önemli sorunun penisilin bağlayan proteinlerdeki değişikliklere bağlı olarak ortaya çıkan metisilin direncidir. 1960 yılında penisilinaza dayanıklı semisentetik penisilin olan metisilin kullanıma girmesi ile birlikte bir yıl içinde metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) suşları Avrupa'da saptanmaya başlanmıştır. MRSA 1980'li yıllardan sonra tüm dünyada hastane infeksiyonu etkenleri arasında önemli bir sorun olarak ortaya çıkmıştır (Dündar, 2000).

MRSA'ların sebep olduğu hastane infeksiyonlarına dünyanın tüm ülkelerinde sıklıkla rastlanmaktadır. Antibakteriyel tedavi alanındaki hızlı gelişmelere rağmen bu bakterilerin etken olduğu infeksiyonların tedavisinde karşılaşılan güçlükler, infeksiyonun önemini artırmaktadır. MRSA suşları epidemiyolojik farklılıklar göstermesine rağmen tüm ülkelerde dirençlilik özellikleri açısından benzerlikler görülmektedir.

MRSA suşları  $\beta$ -laktam antibiyotiklere dirençli olup ayrıca eritromisin, klindamisin, tetrasiklin, trimetoprim, sülfonamidler ve aminoglikozidler gibi  $\beta$ -laktam dışı antibiyotiklere de sıklıkla çoklu direnç göstermektedirler. Kinolonlar başlangıçta MRSA'lara etkili bulunurken, düzensiz kullanımları sonucu bu antibiyotiklere de çok kısa zamanda direnç geliştiği gözlenmiştir.

Siprofloksasin, son yıllarda MRSA infeksiyonlarının tedavisinde yaygın olarak kullanılan ikinci kuşak bir kinolondur. Ancak siprofloksasinin yaygın kullanım sonucu birçok ülkede bu antibiyotiğe hızlı bir şekilde direnç artışı (%49-76) olduğu rapor edilmiştir. Atlanta VA Medikal Merkezi'nde yapılan bir çalışmada araştırmacılar MRSA suşlarının %79'nun siprofloksasine direnç geliştirdiklerini ve bir kinolona



karşı direnç gelişen MRSA'larda diğer kinolonlara da çapraz direnç geliştiğini tespit etmişlerdir (Yüce, 2001; Almer vd., 2002).

Kinolonlar bakterilerde DNA metabolizmasına katılan iki enzim olan DNA giraz ve topoizomeraz IV'ü inhibe ederler. Bakteri tipine bağlı olarak bu enzimler, antimikrobiyal etkinin primer veya sekonder hedefini oluştururlar. *E. coli* gibi Gam negatif bakterilerde kinolonların primer hedefi DNA giraz iken, *S. aureus* gibi Gam pozitif bakterilerde topoizomeraz IV'dür. DNA giraz ve topoizomeraz IV, her biri iki alt üniteden oluşan birbirine çok benzer protein yapısına sahip olup ana fonksiyonları farklıdır.

*S. aureus*'ta kinolon gubu antibiyotiklere karşı direnç gelişiminde, DNA giraz enziminin A alt ünitesini kodlayan *gyrA* ve topoizomeraz IV enziminin A alt ünitesini kodlayan *parC* genlerinde meydana gelen mutasyonlar önemli rol oynamaktadır. Mutasyonlar genellikle *gyrA* ve *parC* genlerinin “kinolon direnç belirleyici bölge” olarak adlandırılan KDBB'lerinde meydana gelir (Hooper ve Wolfson, 1993; Takahashi vd., 1998; Ferrero vd., 1995).

Kinolon direncinde ilk basamak mutasyonlar çoğunlukla antibiyotiğin primer hedef enziminde görülen aminoasit değişiklikleriyle ortaya çıkmaktadır. Yüksek seviyeli direnç gelişiminde ise primer hedef enzimindeki mutasyonlara ek olarak sekonder hedef enzimde görülen mutasyonlar rol almaktadır. Çeşitli kinolon gubu antibiyotiklere dirençli *S. aureus* suşlarında yapılan çalışmalarda özellikle topoizomeraz IV enziminin *parC* alt ünitesinde yalnızca tek bir amino asit değişikliğinin bile direnç gelişimine yol açtığı gözlenmiştir. *S. aureus*'ta yüksek seviyeli dirence *parC* ve *gyrA* genlerinde meydana gelen mutasyonlarla birlikte NorA aktif pompalama sistemi de katkıda bulunmaktadır (Tanaka vd., 1997; Schmitz vd., 1999; Roychoudhury vd., 2001).

Bu çalışmada klinik örneklerden izole edilen metisilin dirençli 22 *S. aureus* ve metisilin duyarlı 2 *S. aureus* olmak üzere toplam 24 stafilokok suşu çalışmaya alınmıştır. MSSA suşları kontrol amacıyla kullanılmıştır. Suşların siprofloksasin ve gatifloksasin antibiyotiklerine duyarlılıkları NCCLS standartlarına uygun olarak

yapılan disk difüzyon testi ve E-testi ile belirlenmiştir. Disk difüzyon testine göre MRSA suşlarının tümü siprofloksasine dirençli bulunurken, MRSA suşlarının 6'sı gatifloksasine orta duyarlılıkta ve 16'sı dirençli tespit edilmiştir. E-testine göre ise MRSA suşlarının hepsi siprofloksasine dirençli olup, MRSA suşlarının 9'u gatifloksasine hassas, 12'si orta duyarlılıkta ve 1'i dirençli bulunmuştur. Her iki yöntemde MSSA suşlarının siprofloksasin ve gatifloksasin antibiyotiklerine hassas olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma sonuçları siprofloksasine dirençli MRSA'larda antibiyogram sonuçları dikkate alınmak kaydı ile üçüncü kuşak bir kinolon olan gatifloksasinin halen etkili bir antibiyotik olarak kullanılabilceğini ortaya koymaktadır. Jones ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda stafilokoklara karşı gatifloksasinin siprofloksasinden 2-16 kat, Ince ve Hooper ise 2-4 kat daha aktif olduğunu tespit etmişlerdir (Jones vd., 1998; Jones vd., 1999; Ince ve Hooper, 2001).

Çalışmamızda disk difüzyon yönteminde gatifloksasine orta duyarlılıkta bulunan 5 suşun E-testi yönteminde hassas, 11 dirençli suşun orta duyarlılıkta ve 4 dirençli suşun ise hassas olduğu görülmüştür. Sadece iki suşta her iki yöntemde de aynı sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre E-testi yönteminin disk difüzyon yöntemine göre daha güvenilir olduğu görülmektedir. Disk difüzyon yöntemi halen tüm dünyada rutin laboratuvarlarda en çok kullanılan yöntemdir. E-testi yöntemi ise yeni antibiyotiklerin etkinliklerinin araştırılması ve penisiline dirençli pnömokokların belirlenmesi gibi özel durumlarda yapılan bir yöntemdir. Rutin laboratuvarlarda disk difüzyon yönteminin yaygın olarak kullanılması kinolonların hatalı olarak kullanımları yanında direnç sorununu da gündeme getirebilmektedir. Direnç sorununu aşmak için yeni geliştirilen ve kullanıma giren kinolonlar ise büyük bir ekonomik yükü beraberlerinde getirmektedir. Bunları göz önüne aldığımızda bir infeksiyon karşısında etkili kinolon seçimi için E-testi yönteminin tercih edilmesinin daha avantajlı olduğu görülmektedir.

*S. aureus* suşlarının kinolon direncini ortaya koymak için *gyrA* ve *parC* genlerinin KDBB'leri spesifik primerler kullanılarak ve her bir gen için ayrı PZR reaksiyonu hazırlanmak suretiyle çoğaltılmıştır. Daha sonra her bir *S. aureus* suşunda *gyrA* ve *parC* genlerinde baz değişikliği olup olmadığı DNA dizi analizi ile belirlenmiştir.

Çalışma sonunda *gyrA* ve *parC* genlerinin KDBB'lerinde baz değişiklikleri ile disk difüzyon ve E-testi yöntemleriyle elde edilen veriler karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

*gyrA* ve *parC* genlerinin KDBB'lerindeki mutasyonlar çoğunlukla *parC*'de Ser80Phe, Glu84Lys ve *gyrA*'da Ser84Leu, Glu88Lys mutasyonları meydana gelmektedir. Mutasyon görülen suşların MİK değerleri 4-32 µg/mL arasında değiştiği gözlemlenmiştir (Fitzgibbon vd., 1998; Schmitz vd., 1999; Tanaka vd., 2000; Linde vd., 2001; Ince ve Hooper, 2001; Almer vd., 2002; M'Zali vd., 2002; Sierra vd., 2002).

*parC*'de Ser80Phe ve Glu84Lys mutasyonlarına ek olarak Ince ve Hooper yaptıkları bir çalışmada *parC*'de Ala176Thr, Schmitz ve Sierra adlı araştırmacıların çalışma grupları Ala116Glu mutasyonu tespit etmişlerdir. *gyrA*'da Ser84Leu ve Glu88Lys mutasyonlarına ek olarak Sierra ve arkadaşları Ser85Pro, M'Zali ve çalışma grubu Ser112Pro mutasyonları tespit etmişlerdir (Schmitz vd., 1999; Ince ve Hooper, 2001; Sierra vd., 2002; M'Zali vd., 2002).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda *gyrA* ve *parC* genlerindeki bu mutasyonlarla birlikte *parC*'de yeni mutasyonlar bildirilmiştir. Horii ve çalışma grubu *parC* geninin Asp79Val, Couzinet ve arkadaşları Ser81Pro mutasyonlarını ortaya koymuşlardır (Horii vd., 2003; Couzinet vd., 2005).

Çalışmamızda 24 suшта *gyrA* ve *parC* genlerinin DNA dizi analizi gerçekleştirilmiş, beklendiği üzere 1 ve 2 nolu kontrol (MSSA) suşlarında mutasyon görülmemiştir. Siprofloksasine dirençli suşların hepsinde (22) hem *gyrA* hem de *parC* genlerinde birer aminoasit değişikliği saptanmıştır. Bu bilgi, kinolon direnç gelişiminin her iki genin (*gyrA* ve *parC*) birden mutasyonundan kaynaklandığı görüşünü desteklemektedir. Bu çalışmada tespit edilen *gyrA*'da Ser84Leu ve *parC*'de Ser80Phe mutasyonları literatürde en yaygın olduğu ifade edilen mutasyonlarla uyum göstermektedir (Ferrero vd., 1995; Yamagishi vd., 1996; Almer vd., 2002).

Öte yandan MRSA suşlarında gatifloksasine direnç gelişiminde bu mutasyonların yeterli olmadığı görülmektedir.

Kinolon direncinde ilk basamak mutasyonlar çoğunlukla antibiyotiğin primer hedef enziminde görülen aminoasit değişiklikleriyle ortaya çıkmaktadır. Yüksek düzeyde direnç gelişiminde, primer hedef enzimde görülen aminoasit değişiklikleri yanında sekonder hedefteki aminoasit değişiklikleri önemli rol oynamaktadır. *S. aureus*'ta kinolonların primer hedefi topoizomerez IV enziminin *parC* alt ünitesi olup, sekonder hedef DNA giraz enziminin *gyrA* alt ünitesidir. Çalışmamızda siprofloksasine dirençli MRSA suşlarında *parC* geninde ve *gyrA* geninde birer mutasyon tespit edilmiştir.

*S. aureus*'ta bazı kinolonlar enerjiye bağımlı bir aktif pompalama sistemi ile hızla dışarıya atılırlar ve hücre içinde birikemezler. *S. aureus*'taki aktif pompalama mekanizmasıyla meydana gelen direnç *norA* geninin ekspresyonunun artmasına bağlıdır. *norA* geni kinolon direncinden sorumlu aktif pompalama mekanizması olan membran proteini NorA'yı kodlar. Siprofloksasin gibi hidrofilik kinolonlar bu pompalama sistemiyle etkin bir biçimde dışarıya atılırken gatifloksasin gibi yeni hidrofobik kinolonlar NorA'dan etkilenmediği belirtilmektedir. Bu durumun, hidrofilik kinolonlarda MİK değerlerinin artmasına neden olurken hidrofobik kinolonların MİK değerlerini çok fazla etkilemeyeceği görüşü hakimdir.

Bu nedenle siprofloksasin MİK değerlerinin yüksek bulunmasında aktif pompalama gibi mekanizmaların etkisi olabileceği göz önünde tutulmalıdır. Çalışmamızda elde edilen bulgular bu görüşü destekler niteliktedir: 22 suştan 14'ünün (11-24 nolu suşlar) siprofloksasin MİK değerlerinin son derece yüksek olduğu (>32 µg/mL) gözlenmiştir.

Bu tür mekanizmaların ve direnç gelişimine etkisinin detaylı olarak araştırılması kinolon direncinin daha iyi anlaşılmasına ve buna bağlı olarak MRSA infeksiyonlarının önlenmesine katkıda bulunacaktır.

**KAYNAKLAR**

Arda, M., 2000. Temel Mikrobiyoloji, 294-314.

Almer, L.S., Shortridge, V.D., Nilius, A.M., Beyer, J.M., Soni, N.B., Bui, M.H., Stone, G.G., Flamm, R.K., 2002. Antimicrobial Susceptibility and Molecular Characterization of Community Acquired Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 43, 225-232.

Ambrose, P.G., Owens, R.C., 2000. New Antibiotics in Pulmonary and Critical Care Medicine. Semin Respir Crit Care Med 21(1), 19-32.

Appelbaum, P.C., Hunter, P.A., 2000. The Fluoroquinolone Antibacterials: Past, Present and Future Perspectives. International Journal of Antimicrobial Agents, 16, 5-15.

Aygün, G., 2002. Antibiyotikler II. İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Erişkinlerde Toplumdan Edinilmiş İnfeksiyonlar Sempozyum Dizisi, 31, 39-54.

Baron, E.J., Peterson, L.R., Finegold, S.M., 1994. *Micrococcaceae: Staphylococci, Micrococci, and Stomatococci*. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology, 321-330.

Bearden, D.T., Danziger, L.H., 2001. Mechanism of Action of and Resistance to Quinolones. The Section of Infectious Diseases Pharmacotherapy, 21(10), 224-232.

Bilgehan, H., 1992. Klinik Mikrobiyolojik Tanı, 488-458.

Bilgehan, H., 1994. Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri İnfeksiyonları, 188-210.

Brook, G.F., Butel, J.S., Ornston, L.N., 1995. The *Staphylococci*. Jawetz, Melnick, Adelberg's Medical Microbiology, 186-191.

- Childs, S.J., 2000. Safety of The Fluoroquinolone Antibiotics: Focus on Molecular Structure, *Infections in Urology*, 13(1), 3-10.
- Couzinet, S., Yugueros, J., Barras, C., Visomblin, N., Francois, P., Lacroix, B., Vernet, G., Lew, D., Troesch, A., Schrenzel, J., Jay, C., 2005. Evaluation of a High-Density Oligonucleotide Array for Characterization of *glA*, *glB*, *gyrA* and *gyrB* mutations in Fluoroquinolone Resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal of Microbiological Methods*, 60, 275-279.
- Cunha, B.A., 2000. Antibiotic Resistance. *Antibiotic Therapy, Part I. Medical Clinics of North America*, 84,1407-1429.
- Dougherty, T.M., Beaulieu, D., Barrett, J.F., 2001. New quinolones and the impact on resistance. *DDT*, 6, 529-536.
- Dündar V., 2000. Metisiline Dirençli Stafilokok İnfeksiyonları. *Klinik Dergisi* 13, 26-27.
- Ferrero, L.B., Cameron, B., Crouzet, J., 1995. Analysis of *gyrA* and *glA* mutations in a stepwise-selected ciprofloxacin-resistant mutant of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39, 1554-1558.
- Fitzgibbon, J.E., John, J.F., Delucia, J.L., Dubin, D.T., 1998. Topoisomerase Mutations in Trovafloxacin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(8), 2122-2124.
- Hogan, D., Kolter, R., 2002. Why are bacteria refractory to antimicrobials? *Current Opinion in Microbiology*, 5, 472-477.
- Hooper, D.C., Wolfson J.S., 1993. Mechanism of Quinolone Action and Bacterial Killing. *Quinolone Antimicrobial Agents*, 53-75.
- Hooper, D.C., 2001. Emerging Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance. *Emerg. Infect. Dis.*, 7(2), 337-341.
- Hooper, D.C., 2002. Fluoroquinolone resistance among Gram-positive cocci. *Lancet Infectious Diseases*, 2, 530-538.

- Horii, T., Suzuki, Y., Monji, A., Morita, M., Muramitsu, H., Kondo, Y., Doi, M., Takeshita, A., Kanno, T., Maekawa, M., 2003. Detection of mutations in Quinolone Resistance-Determining Regions in Levofloxacin and Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*: Effects of The Mutations on Fluoroquinolone MICs. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 46, 139-145.
- Ince, D., Hooper, D.C., 2001. Mechanisms and Frequency of Resistance to Gatifloxacin in Comparison to AM-1121 and Ciprofloxacin in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(10), 2755-2764.
- Ince, D., Zhang, X., Silver, L.C., Hooper, D.C., 2003. Topoisomerase targeting with and resistance to gemifloxacin in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(1), 274-282.
- Joklik, W.K., Willet, H.P., Amos, D.B., Wilfert, C.M., 1992. *Zinsser Microbiology*, 401-406.
- Jones, R.N., Beach, M.L., Pfaller, M.A., Doern, G.V., 1998. Antimicrobial Activity of Gatifloxacin Tested against 1676 Strains of Ciprofloxacin Resistant Gram Positive Cocci Isolated from Patient Infections in North and South America. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 32, 247-252.
- Jones, R.N., Kugler, K.C., Erwin, M.E., Biedenbach, D.J., Beach, M.L., Pfaller, M.A., and Quality Control Study Group, 1999. Gatifloxacin (AM-1155, CG 5501) Susceptibility Testing Interpretive Criteria and Quality Control Guidelines for Dilution and Disk (5µg) Diffusion Methods. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 33, 247-253.
- Jones, R.N., 2002. Microbiology of newer fluoroquinolones: focus on respiratory pathogens. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 44, 213-220.
- Kaatz, G.W., Moudgal, V.V., Seo, S.M., 2002. Identification and characterization of a novel efflux-related multidrug resistance phenotype in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50, 833-838.
- Koneman, W.E., Allen, S.D., Janda, W.M., 1997. *The Gram-Positive Cocci: Staphylococci and Related Organisms*. *Diagnostic Microbiology*, 539-576.

- Leblebicioğlu, H., 2001. Kinolonlar. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Dönem 4 Ders Notları.
- Limoncu, M.H., Ermertcan, S., Çetin, Ç.B., Cosar, G., Dinç, G., 2003. Emergence of phenotypic resistance to ciprofloxacin and levofloxacin in methicillin resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* strains. International Journal of Antimicrobial Agents, 21, 420-424.
- Linde, H.J., Schmidt, M., Fuchs, E., Reischl, U., Niller, H.H., Lehn, N., 2001. *In vitro* Activities of Six Quinolones and Mechanisms of Resistance in *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative *Staphylococci*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 45(5), 1553-1557.
- Lowy, F.D., 1998. *S. aureus* Infections N.Eng J Med, 520-531.
- Moellering, R.C., Mandell, G.L., Bennett, J.E., Dolin, R., 2000. Principles and Practice of Infectious Diseases. Churchill Livingstone, Philadelphia, 223-235.
- Morais Cabral, J.H., Jackson, A.P., Smith, C.V., Shikotra, N., Maxwell, A., Liddington, R.C., 1997. Crystal structure of the breakage-reunion domain of DNA gyrase. Nature Vol 388 (28), 903 - 906.
- M'Zali, F.H., Ambler, J.E., Taylor, C.F., Hawkey, P.M., 2002. Examination of Single and Multiple Mutations Involved in Resistance to Quinolones in *Staphylococcus aureus* by Combination of PCR and Denaturing High-Performance Liquid Chromatography (DHPLC). Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 50, 649-655.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), 1999. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Ninth Informational Supplement. Supplemental tables M100-S9. Wayne, PA: National Committee for Laboratory Standards.
- Norris, S., Mandell, G.L., 1988. The Quinolones: History and Overview, in Andriole: The quinolones. Academic Press Inc, 1-22.
- Oh, H., Edlund, C., 2003. Mechanism of Quinolone Resistance in Anaerobic Bacteria. Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 9, 512-517.



- Oliphant, C.M., Green, G.M., 2002. Quinolones: A Comprehensive Review. *American Family Physician*, 65, 455-464.
- Öğütman, R., 1992. *Staphylococci* and Their Diseases. *Medical Microbiology*, 54-58.
- Pickerill, K.E., Paladino, J.A., Schentag, J.J., 2000. Comparison of the Fluoroquinolones Based on Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Parameters. *Pharmacotherapy Publications*, 20(4), 417-428.
- Reece, R.E., Betts, R.F., 1996. Antibiotic Use. A Practical Approach to Infectious Diseases, 1059-1389.
- Roychoudhury, S., Catrenich, C.E., McIntosh, E.J., McKeever, H.D., Makin, K.M., Koenigs, P.M., Ledoussal, B., 2001. Quinolone Resistance in *Staphylococci*: Activities of New Nonfluorinated Quinolones against Molecular Targets in Whole Cells and Clinical Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(4), 1115-1120.
- Ruiz, J., Sierra, J.M., Jimenez De Anta, M.T., Vila, J., 2001. Characterization of Sparfloxacin-Resistant Mutants of *Staphylococcus aureus* Obtained *in vitro*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 118, 107-112.
- Schmitz, F-J., Fluit, Ad C., Brisse, S., Verhoef, J., Köhrer, K., Milatovic, D., 1999. Molecular Epidemiology of Quinolone Resistance and Comparative *in vitro* Activities of New Quinolones against European *Staphylococcus aureus* Isolates. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 26, 281-287.
- Serter, D., Dereli, D., Ertem, E., 1997. Gram Olumlu Koklar: Stafilokoklar ve Streptokoklar. *Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları*, 101-105.
- Shen, L.L., Hooper, D.C., Wolfson, J.S., 1993. Quinolone-DNA interaction, Quinolone Antimicrobial Agents. *American Society for Microbiology* 2, 77-95.
- Sierra, J.M., Marco, F., Ruiz, J., Jimenez De Anta, M.T., Vila, J., 2002. Correlation Between the Activity of Different Fluoroquinolones and the Presence of Mechanisms of Quinolone Resistance in Epidemiologically Related and Unrelated Strains of Methicillin-Susceptible and Resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 8, 781-790.

- Takahashi, H., Kikuchi, T., Shoji, S., Fujimura, S., Lutfor, A.B., Tokue, Y., Nukiwa, T., Watanabe, A., 1998. Characterization of *gyrA*, *gyrB*, *grlA* and *grlB* Mutations in Fluoroquinolone-Resistant Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 41, 49-57.
- Tanaka, M., Onodera, Y., Uchida, Y., Sato, K., Hayakawa, I., 1997. Inhibitory Activities of Quinolones against DNA Gyrase and Topoisomerase IV Purified from *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(11), 2362-2366.
- Tanaka, M., Wang, T., Onodera, Y., Uchida, Y., Sato, K., 2000. Mechanism of Quinolone Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal Infect Chemoter*, 6(3), 131-139.
- Tanır, G., Göl, N., 1999. Antibiyotik Direnci. *Klinik Dergisi*, 12(2), 47-54.
- Yamagishi, J., Kojima, T., Oyamada, Y., Fujimoto, K., Hattori, H., Nakamura, S., Inoue, M., 1996. Alterations in the DNA topoisomerase IV *grlA* gene responsible for quinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40 (5), 1157-1163.
- Yıldız, O., Aygen, B., 2002. Stafilokokların Antibiyotik Duyarlılıkları ve Direnç Sorunu. *İnfeksiyon Hastalıkları Serisi*, 5, 128-136.
- Yüce, A., 2001. Antimikrobik İlaçlara Direnç Kazanma Mekanizmaları. *Klinik Dergisi*, 14(2), 41-46.
- Waldvogel, F.A., 2000. Gam-positive cocci-*Staphylococcus aureus*. *Mandell, Douglas and Bennet's Principles and Practice of Infectious Diseases*, 2069-2098.
- Wentland, M.P., Leshner, G.Y., Hooper, D.C., Wolfson, J.S., 1993. Quinolone Antimicrobial Agents, *American Society for Microbiology*, 18-19.
- [www.epfl.ch/.../course\\_files/stasiak](http://www.epfl.ch/.../course_files/stasiak)
- [www.iontek.com.tr](http://www.iontek.com.tr)
- [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)
- [www.unpisi.it/images/stafilococco](http://www.unpisi.it/images/stafilococco)

**ÖZGEÇMİŞ**

Adı Soyadı : Hatice AKDAŞ  
Doğum yeri : Afyon  
Doğum Yılı : 23.04.1980  
Medeni Hali : Bekar

**Eğitim ve Akademik Durumu**

Lise :1994-1998 Afyon Anadolu Öğretmen Lisesi  
Lisans :1998-2002 Süleyman Demirel Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi  
Biyoloji Bölümü  
Yabancı Dil : İngilizce