

I.GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzdeki en önemli sağlık sorunlarından biri toplum ve hastanelerde giderek artan antibiyotik direncidir. *S. aureus* ile oluşan infeksiyonlar hastane dışı ve hastanede kısa sürede antibiyotik direnci geliştirdiği için önemlidir.

S. aureus insanların deri ve mukozalarında bulunabilen ve çeşitli organlarda infeksiyonlar yapabilen piyogen bakterilerdir. Bu mikroorganizma selülit, impetigo, yara infeksiyonları gibi cilt infeksiyonları yanında bakteriyemi, endokardit, toksik şok sendromu gibi sistemik infeksiyonlar oluşturabilir¹.

Nozokomiyal infeksiyonlara yol açabilmesi ve çoklu antibiyotik direnci gelişimi nedeni ile bugün metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) çok ciddi bir problem haline gelmiştir. Metisilin direnci kromozomal (intrensik) ve plazmid'e (kazanılmış) bağlı olarak ortaya çıkabilir. PBP 2a olarak adlandırılan bir proteinin sentezlenmesi ile oluşan kromozomal direnç, *mecA* geninin ekspresyonuna bağlı olarak homojen ve heterojen şekillerde olabilmektedir. Homojen direnç tipine nadiren rastlanır. Heterojen direnç tipinde pH, inkübasyon ısısı, süresi ve besiyeri içeriği gibi çevresel faktörler rol oynar². Özellikle heterojen direnç gösteren MRSA'ların saptanması klinik laboratuvarlarda bir problem oluşturmaktadır. Bu direncin belirlenmesinde sıklıkla disk difüzyon, mikrodilüsyon ve agar dilüsyon yöntemleri kullanılırken, son yıllarda DNA prob ve PZR gibi moleküler yöntemler de kullanılmaktadır³.

Agar dilüsyon, disk difüzyon ve mikrodilüsyon gibi standart mikrobiyolojik metodlarla MRSA suşlarının hassasiyet testlerinin yapılması çeşitli problemlere neden olmaktadır. Bu standart testler, genellikle 72 saat gibi uzun bir süre gerektirmekte ve metisilin direncini hızlı ve doğru bir şekilde ortaya koyamamaktadır. Yapılan çalışmalar metisilin direnci ile mecA geninin varlığı arasında bir korelasyon olduğunu göstermektedir. Bu nedenle hedef DNA bölgesini çoğaltarak, bakterilerin antimikrobiyal direncini hızlı ve basit bir şekilde tespit edebilen PZR metodu direnç tespiti için tercih edilen bir metod haline gelmiştir⁴.

Bu çalışmada; Dışkapı Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi ve Gazi Hastanesi infeksiyon kontrol komitesinden sağlanan stafilocok suşlarında metisilin direnci PZR yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. PZR yöntemi ile MRSA'ların hızlı ve doğru tespiti; hastanede kalış süresini, ölüm oranını ve tedavi maliyetini azaltacaktır. Antibiyotik direncine neden olan MRSA'ların oluşturduğu infeksiyonların önlenmesi için gerekli tedbirlerin alınmasında faydalı olacaktır.

II. GENEL BİLGİLER

II.1.Stafilokokların Genel Özellikleri

Doğada yaygın olarak bulunan stafilokok'lar, ilk kez 1878 yılında Robert Koch tarafından tanımlanmış ve 1881 yılında Alexander Ongston tarafından fare ve kobaylarda hastalık yaptığı gösterilmiştir^{5,6}. *Staphylococcus* Yunanca “üzüm salkımı” anlamına gelen “staphyle” teriminden gelmektedir⁷.

Önemli bir infeksiyon etkeni olan *Staphylococcus* cinsi bakteriler *Micrococcaceae* ailesine aittir. *Micrococcaceae* ailesi 4 genus içerir; *Planococcus*, *Micrococcus*, *Stomatococcus* ve *Staphylococcus*. *Staphylococcus*, *Micrococcaceae* ailesinin klinik açıdan en önemli grubudur^{6,7}.

Patojen stafilokokların patojen olmayan diğer *Micrococcaceae* genusundan ayırımı bazı testlerle yapılmaktadır. Aşağıda özetlenen üç test insanda patojen olan staphylococlarda pozitifdir¹:

- glukozdan anaerop ortamda asit oluşumu
- 200 µg /mL lizostafine duyarlı olmaları
- 0.4 µg /mL eritromisin varlığında gliserolden asit oluşumu.

Stafilokoklar mikroskopik olarak Gram pozitif, 0.5-1.5 µm çapında, yuvarlak, çoğu zaman düzensiz kümeler, bazen de dördü ve kısa zincirler şeklinde görülen, hareketsiz, sporsuz, fakültatif anaerop mikroorganizmalardır⁸. Stafilokoklar bazen 3-4 bakteriden ibaret tetrad ve kısa zincirler şeklinde de bulunabilirler. Bu görünümüleri ile streptekoklara son derece benzeyen stafilokoklar, katalaz testinin pozitif olması ile ayırt edilirler.

Makroskopik olarak hem aerop hem anaerop ortamda kanlı agarda ve diğer selektif olmayan besiyerlerinde hızla ürerler. Çoğu kanlı agarda hemoliz yapar. 24 saat içinde yuvarlak, düzgün, 1-3 µm çapında, hafif konveks koloniler yaparlar. Stafilocokların yirmiden fazla türü olmasına rağmen bunların sadece üç tanesi klinik açıdan önemlidir. Bunlar *S.aureus*, *S.epidermidis*, *S.saprophyticus*'tur^{5,9,10}.

Stafilocoklardan sadece *S.aureus* koagülaz enzimi salgılar ve bu özellik tür ayrımında önemli rol oynar. Klinik önemi olan üç ana türün sınıflandırılmasında koagülaz enzimi oluşturma özelliğinin yanında bazı biyokimyasal testler de yapılmaktadır. Bu testler Tablo 1'de özetlenmiştir^{1,5}.

Tablo 1. Stafilocokların Ayrımı İçin Kullanılan Majör Testler

Testler	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. saprophyticus</i>
Koagülaz	+	-	-
Mannitol fermentasyonu ile asit oluşumu	+	-	+
DNase	+	-	-
Novobiosine direçlilik	-	-	+
Anaerop ortamda üreme	+	+	-
Hemoliz	+	-	-

S. aureus dışındaki diğer stafilocoklar koagülaz üretmedikleri için koagülaz negatif stafilocok (KNS)'lar olarak adlandırılır. Koagülaz enzimi plazmada bulunan protrombini aktive ederek trombin ve fibrin oluşmasına yol

açar. Bu özellikten faydalanılarak insan veya tavşan plazması ile tüpte veya lam üzerinde yapılan koagülaz testleri geliştirilmiştir. Tüpte uygulanan test halen *S. aureus*'un belirlenmesi için en güvenli testdir¹¹.

S. epidermidis

KNS'lar normal deri florasında yaygın olarak bulunurlar. *S. epidermidis* deri ve mukozalarda kolonize olan suşların %65-90'ını oluşturur ve daha çok burun kanatları, deri ve parmak aralarında saptanır^{5,9}.

S. epidermidis normal cilt bütünlüğü bozulduğu zaman konağa girmekte ve virülans şiddetlerine göre konakta çeşitli hastalıklar meydana getirmektedir. Bu hastalıklar arasında damar içi katater infeksiyonları, diyaliz katateri infeksiyonları, osteomyelit ve idrar yolu infeksiyonları sayılabilir¹¹.

S. epidermidis gibi KNS'lar özellikle kalp kapağı gibi prostetik gereçler bulunan hastalarda infeksiyona neden olan önemli bir nozokomiyal patojendirler¹².

Makroskopik olarak *S. epidermidis* kolonileri *S. aureus* kolonilerinden daha küçüktür ve genellikle pigment oluşturmazlar^{5,9,10}.

S. saprophyticus

S. saprophyticus normal cilt florasında, periüretral bölgede ve üretral bölgede bulunur. Ayrıca seksüel olarak aktif olan bayanlarda üriner sistem infeksiyonlarının en yaygın sebebidir. Bu mikroorganizmanın sebep olduğu üriner sistem infeksiyonlarına, erkeklerde bayanlara göre daha az rastlanmaktadır⁹.

S. saprophyticus üriner sistem infeksiyonlarının ortaya çıkmasını kolaylaştıran pek çok protein üretir. Bunlar hemaglutinin, yüzeyel fibriler protein ve üreazdır. Hemaglutinin mikroorganizmanın üroepitelyal hücrelere bağlanmasını kolaylaştırır. Yüzeyel fibriler proteinin de bağlanmada rolü vardır, üreaz ise mesaneye tutunmayı ve invazyonu sağlamaktadır¹.

II.2. *S. aureus*

Yapısal Özellikleri

S. aureus, pigmentli, fakültatif anaerop çoğunlukla aerop üreyen, koagülaz ve beta hemoliz pozitif, mannitol, sükroz, maltoz ve trehaloz'dan asit yapabilen, %10 NaCl'de üreyebilen, alfa toksin yapan, novobiosin'e duyarlı, sporsuz ve hareketsizdir. Lizozim etkisiyle erimez. Doğada her yerde yaygın olarak bulunur. *S. aureus* basit besiyerinde ürese de kanlı besiyerinde daha iyi çoğalır ve koloniler etrafında tam hemoliz meydana getirir. 37 °C'de ve pH 7.4'de iyi ürer. Jeloz besiyerinde yuvarlak kenarlı mat, kabarık, parlak yüzeyli, S tipinde koloniler yapar. *S. aureus* altın sarısı renginde pigment oluşturur. Kolonilere altın sarısı rengini karotenoid pigmentleri vermektedir¹³.

S. aureus ısıya ve kuruluğa dayanıklıdır. Antibiyotik maddelere karşı diğer bakterilere göre daha dayanıklı oldukları gibi hızla kemoterapötiklere karşı direnç kazanarak onlardan etkilenmeyen kökenler haline dönüşürler¹³.

S. aureus antibiyotiklere karşı çoğul direnç gösterse de, dezenfektan ve antiseptiklere duyarlıdır. Örneğin MRSA ile enfekte hastaların yattığı odalar "düşük seviyeli dezinfeksiyon" amacıyla kullanılan kuarterner

amonyum klorür bileşikleri ile etkin bir şekilde dezenfekte edilebilir. Ayrıca MRSA suşları alkol ve iyot bileşikleri gibi antiseptiklere de oldukça duyarlıdır¹³.

Hücre Duvarı Yapısı

Stafilokokların hücre duvarı peptidoglikan, teikoik asit ve protein A olmak üzere üç ana komponentten oluşur. *S. aureus*'un hücre duvarının esas komponenti, hücre duvarı ağırlığının % 50'sini oluşturan peptidoglikan polisakkarit tabakadır^{1,5,9,14}.

Peptidoglikan hücre duvarının esas yapısını oluşturan, hem Gram + hem de Gram – bakterilerde bulunan karmaşık bir makro moleküldür. Yapısının temel taşı, glikan zincirleridir. Glikan zincirleri, N-asetil glukozamin ve N-asetil müramik asit birimlerinin dönüşümlü bir şekilde sıralanmaları ile oluşan disakkarit zincirlerden oluşur. Glikan zincir üzerinde, müramik asidin laktil grubuna bağlı tetrapeptid yapısı bulunmaktadır. Tetrapeptidin üçüncü pozisyonundaki diaminoasit ile diğer tetrapeptidin dördüncü pozisyonundaki D-Alanin arasında çapraz bağlar oluşur¹⁵.

Peptidoglikan tabakadaki çok sayıdaki çapraz bağ, bu bakterilerin hücre duvarlarının çok sağlam bir yapıya sahip olmasını sağlayarak konak dokularında bu bakterilerin canlılıklarını sürdürebilmelerini sağlar⁹.

S. aureus' da çapraz bağlantı oranı yüksektir ve bu özellik bakterilerin lizozim enzimine karşı dirençli olmasını sağlar¹⁵.

Hücre duvarının diğer bir önemli komponenti ise hücre duvarı ağırlığının % 40'ını oluşturan teikoik asittir¹⁶.

Teikoik asit fosfodiester bağları ile bağlı ribitol birimlerinden oluşan suda çözülebilen bir polimerdir. Sadece Gram + bakterilerin hücre duvarında bulunan bu yapı hücre yüzeyine negatif yük vererek çeşitli metal iyonlarının, katyonların lokalizasyonunda ve otolitik enzimlerin aktivasyonunda rol oynar¹⁵. Stafilokokların türe özgü antijenleri teikoik asitlerdir. Ribitol teikoik asit *S. aureus* için özgüdür.

Teikoik asit virülans faktörü olarak birçok özelliğe daha sahiptir. Bunlar arasında inflamasyon hücrelerinin kemotaksisini inhibe etmesi ve antikor üretimini stimüle etmesi sayılabilir.

Pepidoglikan yapının en dışındaki hücre duvarı komponenti protein A'dır ve bu yapı sadece *S. aureus*'da bulunur. Protein A duvarın yaklaşık % 7'sini oluşturur, organizmayı fagositoza karşı korur ve kompleman aktivasyonunu sağlar^{9,11,17}.

S. aureus hücre duvarları protein A aracılığıyla IgG molekülünün Fc bölgesine bağlanabilmektedir¹¹.

Protein A immünglobulinlerin Fc reseptörlerine bağlanarak bakteriyi antikora bağlı fagositozdan korur. Ayrıca hücre dışına salgılanan protein A aynı reseptörlere bağlanarak komplemanın tüketimine neden olur ve komplemana bağlı vücut savunmasından bakteri korunur. Protein A, *S. aureus* infeksiyonlarının patogeneğinde önemli bu fonksiyonu dışında, bazı infeksiyon hastalıklarının tanısı amacıyla in vitro deneylerde kullanılmaktadır. Antikorların Fc kısımları ile bakteriyel protein A birleştiğinden özgül bağlanma bölgeleri olan Fab bölümleri serbest kalır. İncelenen örnekte aranan antijen varsa stafilokoksik

protein A antijen-antikor kompleksi oluşmakta ve aglütinasyon gözle görülür hale gelmektedir. Buna koaglütinasyon deneyleri adı verilir¹⁸.

Protein A virülans faktörü olarak rol oynar. Aynı zamanda immüoglobulinlerle nonspesifik olarak etkileşime girdikleri ve antifagositik özellik gösterdikleri için konakta aşırı duyarlılık tepkimelerine yol açabilmektedir^{9,11}.

Enzim ve Toksinler

İnsanlardaki stafilokok infeksiyonlarında özellikle patojen olarak *S. aureus* yer almaktadır. *S. aureus*'un patojenitesi yapısal özelliklerine ve ekstraselüler ürünlerine bağlıdır. *S. aureus*'un ürettiği enzim ve toksinler patojenitede önemli rol oynamaktadır^{13,19}.

Stafilokoklar çeşitli hastalandırıcı etkinlikleri olan birçok toksin ve enzim üretirler.

Stafilokoksik Toksinler

1. Sitolitik Toksinler:

Stafilokokların çoğu ekstraselüler protein yapısında, bir takım sitolitik toksinler üretirler. Bunlardan en iyi tanımlananları hemolizinler ve lökosidindir^{9,11}.

A. Hemolizinler:

Antijen ayrımları dışında hemolizinler çeşitli hayvan eritrositleri üzerinde hemolitik etki yapıp yapmamalarına, hemoliz için gerekli ısı derecesi ve zamana, toksitite derecelerine bağlı olarak ayrımlar gösterirler⁶.

Alfa toksin (α -hemolizin):

En güçlü membran hasar proteini budur. Duyarlı hücre membranlarına bağlanır. Hücre membranları üzerinde litik etkiye sahiptir.

İnsan makrofajları ve plateletleri bu toksinden zarar görürken monositler zarar görmezler. Bu toksin stafilokoklarda tek virülans faktörü olmamasına rağmen, infeksiyon bölgesinde doku hasarını arttırdığı için patojenite açısından önemlidir⁹.

Eritrosit, lökosit, hepatosit, platelet ve fibroblast gibi bir çok hücreye karşı sitotoksiktir. Hemolitik, dermonekrotik ve öldürücü etkileri vardır^{1,9,20}.

Beta toksin (β -hemolizin):

S. aureus klinik izolatlarının % 20'sinden daha azı bu hemolizi yapar²¹.

Bu toksinin en önemli özelliği sıcak-soğuk lizis yapabilme yeteneğine sahip olmasıdır. Örneğin, bu hemolizinin eritrositler üzerindeki etkisi

soğukla artar. Isıya dayanıksız bir toksin olup eritrosit, fibroblast ve lökosit gibi çeşitli hücrelere toksik etki gösterir^{1,9}.

Gama toksin (γ -hemolizin):

İnsan eritrositleri üzerinde orta derecede etkili olan iki komponentli bir hemolizindir²¹. Yani; birbirini sinerjistik olarak etkileyen iki protein komponentinden oluşur.

Belirgin hemolitik aktivitesi vardır, ancak etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir^{1,9,20}.

İnsanlarda stafilokokların sebep olduğu kemik hastalıklarında, bu toksinin muhtemel etkisi sonucu spesifik antikor seviyesinin arttığı tespit edilmiştir⁹.

Delta toksin (δ -hemolizin):

Nispeten ısıya dayanıklı yüzey aktif bir toksin olup bazı *S. aureus* suşlarında bulunur. Hücre membranının bütünlüğünü bozar ve aynı zamanda adenilat siklazı aktive ederek cAMP salınımına neden olur. Bu enzimatik aktivite Stafilokoksik Toksik Şok Sendromu(TŞS)'nda ve stafilokokal besin zehirlenmesinde görülen diyarenin patogenezinde rol oynar¹¹.

B. Lökosidin:

Bir ekzotoksindir. Bu toksin birbirlerini sinerjik olarak etkileyen iki bileşene (S ve F) sahiptir. Toksin aktivitesi için bu alt birimlerin her ikisi de gereklidir¹¹.

Fagositik hücreler üzerinde litik etki gösterir. Tek doz enjeksiyonuyla geri dönüşümlü lökopeni oluşur ve 60 dakika içinde membranlara hasar verici etkisi mikroskopik olarak görülebilir hale gelir²¹.

2. Eksfoliyatif Toksin:

Antijenik ve biyokimyasal olarak eksfoliyatif toksin A ve B olarak ikiye ayrılır^{1,9}.

Bu iki protein molekülü biyokimyasal ve immünolojik olarak farklı olmasına rağmen benzer biyolojik aktiviteye sahiptir. ET-B ısıya dayanıklıdır ve yapısal geni kromozomaldır. ET-A ise ısıya duyarlı ve plazmid orijinlidir¹¹. Eksfoliyatif toksin epiderminin stratum granulosum katmanını ayırır ve Stafilocokal Haşlanmış Deri Sendromu(SSSS)'ndan sorumludur²⁶. Bu hastalık genellikle yeni doğanlarda ve çocuklarda görülür⁹. Derinin epidermidis tabakasının granüler katındaki hücreleri parçalayıcı etkisi vardır, fakat primer olarak hücre ölümüne neden olmaz¹¹.

3. Toksik Şok Sendromu Toksini (TŞST-1):

Önceleri pirojenik ekzotoksin C ve enterotosin F olarak bilinen toksin şimdi "TŞST-1" olarak bilinmektedir. TŞST-1 sistemik olarak salınır ve toksik şok sendromuna neden olur. Toksik şok sendromu; ateş, eritroderma, kusma, diyare, böbrek yetmezliği ve hipertansiyon gibi klinik belirtileriyle bir multisistem rahatsızlık olup adet kanamalarında tampon kullanan ve vajinal *S. aureus* taşıyıcısı olan kadınlarda sık rastlanmaktadır^{1,20}.

T lenfosit poliferasyonunu ve monositlerden IL-1 salınımını uyarır. Bu toksin *S. aureus* suşlarının pek çoğu tarafından salgılanır. Son zamanlarda KNS'lara bağlı TŞS bildirilmiştir.

4. Enterotoksin:

S. aureus suşlarının yaklaşık üçte biri enterotoksin üretir. Serolojik olarak A, B, C, C2, D ve E olmak üzere altı gruba ayrılır. Bu toksinlerin besinlerle alınımı, gastrointestinal bulgularla seyreden besin zehirlenmesi tablosuna sebep olur^{1,9}.

Stafilokoksik Enzimler

Katalaz:

Tüm stafilokoklar katalaz enzimi salgılar. Bu enzim fagositik hücreler tarafından stafilokokların yutulmasından sonra oluşturulan toksik hidrojen peroksit'i su ve oksijene dönüşümünü katalizler. Böylece bakteri fagositoz sonrası da yaşamını sürdürür^{1,11}.

Koagülaz:

S. aureus tarafından üretilen bir plazma pıhtılaşma proteinidir. *S. aureus* suşlarında iki tip koagülaz bulunur. Bunlar serbest koagülaz ve bağlı koagülaz (clumping factor)'dır. Serbest koagülaz plazmada "coagulase-reaction factor (CRF)" ile birleşerek trombine benzer yapıdaki stafilotrombini oluşturur. Stafilotrombin de fibrinojeni fibrine dönüştürmeyi katalizler. Bağlı koagülaz ise hücre duvarında bulunur ve doğrudan fibrinojene bağlanarak fibrine dönüştürebilir. Ayrıca stafilokokların kümeleşmesine neden olur. Böylece bakteri

hücrenin etrafı fibrinle sarılır. Fibrinden oluşan bu zırh bakteriyi fagositoza karşı dirençli hale getirir^{7,18,22}.

Koagülaz üretimi ile patojenite arasında bir korelasyon varsa da, koagülazın direk olarak patojen olduğunun kesin kanıtı yoktur^{1,9}.

Hyaluronidaz:

S. aureus suşlarının % 90'ı hyaluronidaz salgılar. Hyaluronidaz antijenik özelliğe sahip bir enzimdir. Bu enzim konak bağ dokusu matriksinde bulunan hyaluronik asiti parçalayarak mikroorganizmanın kolayca yayılmasını sağlar^{1,9,11}.

Lipaz:

S. aureus suşların çoğu, KNS'ların % 30'dan fazlası lipaz üretir. Bu enzimler lipitleri hidrolize ederler. Stafilocokların deri ve derialtı dokulara girmesine yol açarlar^{9,11}.

Stafilokinaz (Fibrinolizin):

Fibrin ağının eritilmesine ve infeksiyonun dokulara yayılmasına sebep olur. Stafilocoklar tarafından ortama salınan kinazlar, plazmada bulunan plazminojeni aktive ederek plazmin oluşturur. Fibrinolitik etki bu madde aracılığı ile oluşur ve fibrini parçalayarak organizmanın yayılmasına yardımcı olur. Bu enzimin yapımı bir faj genomunun yönetimindedir^{9,11}.

Deoksiribonükleaz (DNase):

DNase, DNA'yı hidrolize eder. Çoğu koagülaz pozitif stafilokoklar tarafından oluşturulur. Bu enzimin varlığını test için % 0.2 DNA içeren besiyerlerine ekilen stafilokokların üredikleri bölgelerde DNA'yı lize etmeleri ve sonuçta bu bölgeye HCl damlatılarak presipitasyonun gözlenmesiyle test edilir⁶.

Beta laktamaz (penisilinaz):

Stafilokoklar salgıladıkları bu madde ile penisilin grubu antibiyotiklerdeki beta-laktam halkasının hidroksil grubunu parçalayarak etkisizleştirir. Bu sayede penisilin ve sefalosporinler gibi antibiyotiklere dirençli hale gelirler. Genetik taşınma plazmid ve transpozonlarla sağlanır^{7,15}.

Slime:

Bazı KNS'lar tarafından salgılanan ve % 40'ı karbonhidrat, % 27'si protein yapısında olan bir maddedir^{23,24}. Bu madde stafilokokların katater ve diğer sentetik maddelere kolayca yapışmasını ve orada kolonize olmalarını sağlar. Bu madde hücrel immün yanıtı baskılar, opsonizasyonu, nötrofil kemotaksisini ve nötrofil fagositozunu inhibe eder^{11,25}.

***S. aureus*'un Patogenezi**

Klinik örneklerden izole edilen infeksiyon etkeni stafilokoklar arasında birinci sırayı *S. aureus* almaktadır¹⁹.

S. aureus gerek toksinleri aracılığı ile gerekse invazyon ve sistemik yayılım ile çeşitli infeksiyonlara yol açar. Tablo 2'de *S. aureus*'un neden olduğu infeksiyonlar özetlenmiştir^{1,9,26}.

Tablo 2. *S. aureus*'un Neden Olduğu İnfeksiyonlar

Toksinlere bağlı ortaya çıkan infeksiyonlar:
Toksik şok sendromu
Haşlanmış deri sendromu
Besin zehirlenmesi
İnvazyon ve sistemik yayılım sonucu ortaya çıkan infeksiyonlar
Deri ve yumuşak doku infeksiyonları
Follifülit, impedigo
Fronkül, karbonkül
Süpüratif hidrogenit
Mastit
Yara infeksiyonları
Sellülit, lenfanjit
Bakteriyemi
Endokardit, perikardit
Santral sinir sistemi infeksiyonları
Menenjit, subdural ampiyem
Beyin apsesi, epidural apse
Süpüratif intrakraniyal flebit
Akciğer ve plevra infeksiyonları
Pnömoni
Akciğer apsesi
Plevral ampiyem
Kas ve iskelet sistemi infeksiyonları
Septik artrit, septikbursit
Protez eklem infeksiyonları
Osteomyelit
Piyomiyozit
Üriner sistem infeksiyonları
Yabancı cisim infeksiyonları

II.2.1. *S. aureus*'un İdentifikasyonu

Koloni Tiplendirimi:

S. aureus kolonileri, kanlı agarda 24 saat inkübasyon sonunda genellikle sarı-turuncu, düzgün kenarlı, yuvarlak, kremi ve hafif konveks koloniler oluştururlar. Bazı *S. aureus* kolonileri kanlı agarda beta-hemoliz zonu oluşturabilir¹¹. Oluşan bu koloniler stafilokok ön tanısı ile diğer tanı işlemlerine tutulurlar.

Gram Boyama:

Temiz bir lam üzerinde bir damla serum fizyolojik ile öze yardımıyla alınan stafilokok kolonileri süspanse edilir. hava da kurutulan preparat ateşten üç kez geçirilerek tespit edilir. Daha sonra kristal viyole (2 dakika), lügol eriyiği (2 dakika)'nde tutulur, % 96'lık etil alkol ile yıkanır ve son olarak sulu fuksin'de 30 saniye bekletilerek boyama tamamlanır. Boyalı preparatların üzerine immersiyon yağı damlatılarak ışık mikroskopunun x100'lük objektifinde incelenir. Gram pozitif üzüm salkımına benzer görüntüde kümelenmiş koklar stafilokok olarak tanımlanır^{6,11}.

Katalaz Testi:

Hidrojen peroksiti, su ve oksijene ayrıştırmaya yarayan katalaz enziminin varlığının tespiti için yapılır. Bir lama öze yardımıyla alınan koloniler üzerine % 30'luk hidrojen peroksit damlatılır. Kabarcıkların gözlenmesi pozitif sonuç olarak değerlendirilir.

Bu test, gram pozitif koklar olan Streptokoklar ile Stafilokok suşlarının birbirinden ayrımını sağlar. *S. aureus* suşlarının da katalaz ürettiği bilinmektedir. Bu test uygulanarak *S. aureus* suşlarının tespiti yapılır²⁷.

Mannitol Fermantasyonu:

S. aureus' lar yüksek tuz konsantrasyonlarında üreyebildiklerinden ve mannitolü fermente edebildiklerinden identifikasyonunda mannitol-salt agar seçici besiyeri olarak kullanılmaktadır¹¹.

%1 mannitol, % 7.5 NaCl, fenol kırmızısı ve peptonlar içeren mannitol-salt agar'a ekimi yapıldıktan 18-24 saat sonra üreyen bakterilerin yüksek tuz konsantrasyonuna toleranslı olduğu, besiyerinin normalde parlak kırmızı olan renginin sarıya dönmesi durumunda ise mannitolün bakteri tarafından fermente edildiği kabul edilir⁶.

İzole kolonilerin etrafındaki sarı bölge, mannitolün fermantasyonu sonucunda asit üretiminin olduğunu gösterir. Bu özellik *S. aureus* suşlarının tespitini sağlar.

Koagülaz Testi:

S. aureus suşlarını diğer stafilokoklardan ayırmada kullanılan bir testtir. İki farklı şekilde uygulanmaktadır.

A. Bağlı Koagülaz Testi (Lam Deneyi):

Bağlı koagülaz (clumping) enzimi bir yüzey proteindir ve hücre duvarına bağlı bulunur. Bağlı koagülazın tespiti için yapılan bu testte lam üzerine bir damla serum fizyolojik içinde katı besiyerinden alınarak süt görünümünde bir

süspansiyon oluşturulur. Bu stafilokok süspansiyonu üzerine sulandırılmış plazma damlatılır. 5-10 saniye içinde pıhtılardan ibaret kümelerin oluşması bu testin pozitif olduğunu gösterir.

Negatif sonuçların alınması durumunda ilave olarak tüp yöntemi de mutlaka uygulanmalıdır. Özellikle metisiline dirençli suşlarda, lam deneyi ile koagülazın negatif olarak bulunabileceği ifade edilmektedir^{1,28}.

B. Serbest Koagülaz Testi (Tüp Deneyi):

Serbest koagülaz, sentezlenip hücre dışına salınan bir proteindir. Plazma içindeki CRF ile etkileşerek fibrinojenin fibrine dönüşmesini sağlar. Bir tüp içerisine sulandırılmış 1ml EDTA'lı tavşan veya insan plazmasına, 1ml stafilokokların taze buyyon kültürü ilave edilir. 37°C'de inkübasyona bırakılır. Belirli aralıklarla kontrol edilerek (3. 6. ve 24. saatlerde) pıhtılaşma olup olmadığına bakılır. Pıhtılaşma olması sonucun pozitif olduğunu gösterir.

Tüpte uygulanan test halen *S. aureus*'un belirlenmesi için en güvenli testtir^{7,18,22}.

Polymxin Duyarlılığı Deneyi:

Koagülaz pozitif Stafilokokların polymixin'in belirli konsantrasyonlarına karşı dirençli buna karşın stafilokokların diğer türlerinin duyarlı olması temeline dayanır. Denenecek bakterinin 10⁵ hücre içeren süspansiyon veya buyyon kültürlerinden polymixinli stafilokok (P-8) plak besiyeri yüzeyine çizgi ekimi yapılır. 35°C 'de inkübe edilir. *S. aureus* 24 saatte üreme gösterdiği halde diğer stafilokoklar, mikrokoklar ve gram negatif bakterilerin çoğunun üremesi önlenir⁶.

Moleküler Metotlar:

Epidemiyolojik araştırmalar için MRSA suşları arasında antibiyotip, bakteriyofaj tiplendirilmesi, kapsül tiplendirilmesi gibi fenotipik ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), “pulsed field” jel elektroforezi (PFGE), kromozomal DNA restriksiyon analizi gibi genotipik farkları esas alan testler yapılmaktadır^{26,29}.

Flogenic – Cromogenic Metot:

RapiDEC Stph isimli bir kit, *S. aureus*, *S. saprophyticus*, *S. epidermidis*'i 2 saat gibi kısa bir sürede tespit edebilmektedir. Bu kit mikroorganizmalardaki, floresan koagülaz substratının tespitine dayanır¹¹.

II.2.2. *S. aureus*'larda Mikrobiyal Direnç

Stafilokoklardaki metisilin direnci ciddi bir problemdir ve bu direnç 3 şekilde olmaktadır:

İntrinsik (kromozomal) Metisilin Direnci = yeni bir penisilin bağlayıcı protein (PBP 2a) sentezi nedeni ile oluşan direnç:

Bakteriyel hücre duvarının sentezi sırasında peptidoglikan ağın birleşmesinde terminal çapraz bağlanma reaksiyonunu katalizleyen membrana bağlı enzimlerdir. Görevleri bakteri için yaşamsaldır. Beta-laktam antibiyotikler bu proteinlere bağlanarak bakteri hücre duvarı sentezini inhibe ederler³⁰.

En sık rastlanılan direnç, stafilokokların yeni bir PBP kazanmaları ile oluşan dirençtir. MRSA suşlarında MSSA'lardan farklı olarak ek bir PBP vardır ve “PBP 2a” olarak adlandırılmaktadır^{31,32}.

PBP 2a'nın beta-laktam antibiyotiklere afinitesi diğer PBP'lerden daha düşüktür. PBP 2a, 2kb'lık DNA segmentine lokalize bir gen olan “*mec A*” geni tarafından kodlanmaktadır. Bazen bu gen indüklenebilir ve transdüksiyon ile dirençli suşlardan duyarlı suşlara aktarılabilir³³.

Bakteride metisilin direncinin ortaya çıkabilmesi için *mec A* geninin eksprese olması gerekir. Ancak bu ekspresyon her bakteride aynı şekilde olmamaktadır. Bu nedenle *mec A* geni taşıdığı halde metisiline değişik düzeylerde dirençli ve hatta duyarlı stafilokoklar olabilmektedir³⁴. Bu nedenle *mec A* geninin ortaya çıkmasını kontrol eden başka bazı genlerde (*fem A*, *fem B*, *mec R*) direnç gelişiminde etkili olabilmektedir³⁵.

Kromozomal olarak *mec A* geni tarafından kodlanan ve PBP 2a olarak isimlendirilen bu penisilin bağlayan proteinin sağladığı bu direnç sadece metisiline değil, tüm beta-laktam antibiyotiklere karşı direnci ifade etmektedir. Bu tür direnç homojen ya da heterojen (heterorezistans) olmaktadır³⁶.

A. Homojen Direnç:

Bakteri kolonisini oluşturan tüm bakteriler *mec A* geni taşırlar ve hepsinde *mec A* geni fonksiyoneldir. Yüksek düzeyde dirence sebep olurlar. Direnç ortam pH'sı, ısı, tuz konsantrasyonu, inkübasyon süresi gibi çevresel faktörlerle ilişkili değildir³⁴.

Ancak klinik izolatların çok az bir kısmında metisiline bu tür direnç saptanır. Homojen direncin standart test koşullarında gösterilmesi kolaydır³⁶.

B. Heterojen Direnç:

Belirli bir MRSA suşuna ait bir bakteri popülasyonunda, hem duyarlı hem de dirençli bakterilerin bir arada bulunması olarak tanımlanmaktadır. Heterojen direnç gösteren bakteri popülasyonunda dirençli bakteri oranı değişken olup, genellikle çok az sayıda bakteri (10^4 - 10^7 “colony forming unit”(cfu)’de 1 cfu) metisiline dirençli fenotip göstermektedir³⁷.

mec A geni taşımasına rağmen bakterilerde homojen direnç görülmemesi, mec A geninin fonksiyonunu kontrol ettiğine inanılan fem A, fem X veya mec R, mec I gibi kontrol genlerinden birinin ya da birkaçının mec A geninin ekspresyonunu inhibe etmesinden dolayıdır.

Borderline Metisilin Direnci = aşırı beta-laktamaz üretimi nedeni ile meydana gelen direnç:

S. aureus’lardaki borderline metisilin direnci bakterinin aşırı beta-laktamaz salgılamasıyla ortaya çıkmaktadır. Beta-laktamaz enzimi salgılanması esas olarak penisilin direncine neden olur, metisilin bu enzime dayanıklıdır, ancak 1984’de Tornsberry ve arkadaşları *S. aureus*’larda metisiline direnç gelişiminde bir diğer mekanizma olarak aşırı beta-laktamaz üretimini göstermişlerdir³⁸. Antistafilokokkal penisilinler aslında stafilokokların salgıladıkları penisilazın hidrolitik etkisine dirençlidir, fakat bazı suşların aşırı penisilaz salgılayarak metisilin ve oksasilini yavaşça fakat anlamlı ölçüde parçaladığı gösterilmiştir^{34,38}. Bu suşlar metisiline sınırda direnç gösterdikleri için bunlara BORSA (borderline resistant *S. aureus*) denmiştir^{34,39}.

Intermediate Metisilin Direnci = beta-laktamaz antibiyotiklere ilgisi azalmış olan modifiye PBP 'lerin üretimi nedeni ile meydana gelen direnç:

Bu tip dirençli suşlara MODSA (modified resistant *S. aureus*) denmektedir. Son yıllarda beta-laktamaz negatif olup, mec A geni taşımadıkları halde metisiline dirençli stafilokoklar tespit edilmiştir. Çok az sayıdaki bu tür izolatlar incelendiğinde, bu bakterilerin mevcut PBP'lerinin beta-laktam antibiyotiklere düşük afinite gösterdikleri saptanmıştır³⁴.

Tüm bu mekanizmalar arasında PBP 2a sentezi, en sık gözlenen metisiline direnç mekanizmasıdır. Diğer iki mekanizma düşük düzeyde bir metisilin direncine yol açar ve tedavi bakımından bir sorun oluşturmaz. Çünkü beta-laktam antibiyotiklerle tedavisi mümkündür. Oysa intrinsik MRSA infeksiyonlarının tedavisi için hali hazırda seçilecek antibiyotikler glikopeptitler'dir. Bu nedenle metisilin direncinin doğru olarak tanımlanması ve düşük düzeyde dirençli olan suşların intrinsik olarak dirençli suşlardan ayırt edilmesi son derece önemlidir⁴⁰.

II.2.3. MRSA İnfeksiyonlarında Antimikrobiyal Tedavi

1940'lı yılların başlarında penisilin G stafilokok infeksiyonlarında başarı ile kullanılmış, ancak bu yılların sonunda penisilin G dirençli suşlar, özellikle hastane infeksiyonlarından izole edilmeye başlanmıştır. Penisilin G günümüzde, *S. aureus* suşlarının çoğunun beta-laktamaz yapmaları nedeni ile stafilokokal infeksiyonların tedavisinde kullanılamaz duruma gelmiştir. *S. aureus* suşlarının tümü 1951'de eritromisine duyarlı iken, 6 ay kadar sonra bu antibiyotiklere karşıda direnç gelişmiştir. MRSA suşlarının çoğu, başta diğer beta-

laktam antibiyotikler olmak üzere, aminoglikozidlere ve tetrasikline de dirençlidir²⁸.

MRSA infeksiyonlarında suşların birçok antibiyotiğe dirençli olması nedeni ile 1958 yılında kullanıma sunulan fakat yan etkileri nedeni ile uzun süre pek rağbet görmemiş ilk glikopeptit antibiyotik olan vankomisin ve daha sonra geliştirilen bir diğer glikopeptit antibiyotik teikoplanin, günümüzde çok sık kullanılmaktadır. Birkaç yıl öncesine kadar *S. aureus* suşlarında vankomisine ve teikoplanine dirençli suş saptanmamıştır. Ancak 1996'da Japonya'dan, bunu takiben A.B.D.'nden glikopeptitlere duyarlılığı azalmış suşlar bildirilmeye başlanmıştır. Henüz ülkemizde glikopeptitlere duyarlılığı azalmış *S. aureus* suşu bildirilmemiştir⁴¹.

İlk olarak 1996 yılında Hiramatsu ve ark Japonya'da vankomisine orta düzeyde dirençli (MİK:8µg/mL) bir *S. aureus* suşuna bağlı sternal postoperatif yara infeksiyonu bildirmişlerdir⁴². Takiben 1997 yılında A.B.D.'nden MRSA suşlarında vankomisine duyarlılık azalması ve MİK değerlerinde yükselme bildirilmiştir⁴³.

MRSA infeksiyonlarının tedavisinde vankomisinin, rifampisin, novobiosin, aminoglikozidler veya fusidik asit gibi antibiyotikler ile kombinasyonu kullanılabilir. Tek başına vankomisin kullanılarak yeterli sonucun alınmadığı hastalarda rifampisinle kombine tedavisi başarılı bulunmuş. Vankomisin ve aminoglikozid kombinasyonlarının ise birçok MRSA suşuna karşı sinerjistik etkisinin olduğu gösterilmiştir²⁶.

Günümüzde MRSA infeksiyonlarında kullanılan başlıca antibiyotikler ve genel özellikleri şöyledir:

Vankomisin:

Vankomisin moleküler ağırlığı yaklaşık 1450 dalton olan kompleks, çözünebilir, trisiklik bir glikopeptiddir. Klinikte en sık kullanılan glikopeptid antibiyotiktir. Vankomisin ilk kez 1956 yılında Borneo adasında bulunan *Streptomyces orientalis*'ten izole edilen dar spektrumlu bakterisidal bir antibiyotiktir. İzolasyonundan çok kısa bir süre sonra 1956 yılında pürifiye edilerek klinik kullanıma girmiştir. İlk yıllarda kullanılan preparatların saf olmaması ve yan etkilerin sıklığı nedeniyle metisilin kullanıma girdikten sonra önemini yitirmiş, ancak ilk kez 1961'de metisiline dirençli bir *S. aureus* izolatının bildirilmesi ve 1982 yılından beri giderek artan MRSA infeksiyonlarının ortaya çıkmasıyla birlikte yeniden önem kazanmıştır⁴⁴.

Etki Mekanizması

Vankomisin, gram pozitif bakterilerin hücre duvarı sentezini, peptidoglikan polimerlerinin D-alanil-D-alanin prekürsörlerine bağlanarak ve dolayısıyla transglikozilaz ve transpeptidaz enzimlerinin hedeflerini bozarak inhibe eder. Ayrıca RNA sentezini bozabilir ve stoplazmik membran permeabilitelerini değiştirerek protoplastlara zarar verebilir. Hedef organizmalara hızlıca ve sıkıca bağlanarak çoğalmakta olan bakteriler üzerinde bakterisidal etki gösterir⁴⁴.

Vankomisin MRSA infeksiyonlarının tedavisinde altın standarttır. Hızlı verilirse hipotansiyon, makülopapüler döküntü ile karakterize “red man” sendromu olarak adlandırılan tablo ortaya çıkar⁴⁵.

Teikoplanin:

Teikoplanin *Actinoplanes teichomyceticus*'un fermentasyon ürününden elde edilen glikopeptit bir antibiyotiktir. Vankomisine benzer şekilde, bakteri hücre duvarında peptidoglikan sentezi sırasında pentapeptid yan zincirlerinde bulunan D-alanil-D-alanin dipeptidi ile birleşerek peptidoglikan sentezini inhibe eder.

Yarı ömrü uzundur, günde tek doz verilmesi bir avantajdır. En sık görülen yan etkisi enjeksiyon yerinde ağrı ve makülopapüler döküntüdür. Nefrotoksik ve ototoksik etkileri nadir görülür^{31,45}.

Rifampisin:

Streptomyces mediterranei'den elde edilen rifampisin semisentetik bir türevidir.

RNA polimerazın inhibisyonuyla protein sentezini engelleyerek etki gösterir. Oral biyoyararlanımı iyidir ve hücre içi penetrasyonu yüksektir.

Rifampisin tedavi amacı ile tek antibiyotik olarak kullanıldığında, RNA polimerazın β alt ünitesindeki nokta mutasyon sebebi ile mikroorganizmalarda yüksek seviyede direnç ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Bu nedenle klinik deneyimler rifampisin diğer bir antistafilokokal ajan ile kombine kullanılması yönündedir. Ciddi MRSA infeksiyonlarında tedaviye rifampisin eklenmesi

lökositlere, seröz boşluklara ve diğer kapalı boşluklara geçişinin iyi olması nedeniyle etkili bulunmuştur⁴⁶.

Fusidik Asit:

Protein sentezini inhibe ederek işlev gösteren bir ajandır. İlk olarak Danimarka'da geliştirilen fusidik asit, 1962 yılında Avrupa'da, 1998 yılında ise Türkiye'de kullanıma girmiştir. Penisilin ve metisiline dirençli stafilokok infeksiyonlarında glikopeptid antibiyotiklere oral kullanım kolaylığı ve maliyet açısından alternatif oluşturabilecek bir antibiyotiktir⁴⁷.

Oral biyoyararlanımı ve doku penetrasyonu yüksektir. Tedavi esnasında direnç gelişebileceğinden beta-laktam bir ajan ile kombine kullanılmalıdır⁴⁶.

Novobiosin ve Coumermisin:

Bu antibiyotikler DNA girazın β alt ünitesini inhibe ederek etki gösterirler. Oral olarak kullanılan formları mevcuttur. Tedavi amaçlı olarak tek başlarına kullanılmaktadırlar³².

Mupirosin:

Mupirosin *Pseudomonas fluorescens*'in fermentasyonu ile elde edilen doğal bir antibiyotiktir. İzolösil-tRNA sentetazı inhibe ederek stafilokokları inhibe eder. Sadece topikal uygulama için formları mevcuttur. Aynı zamanda mupirosin nazal MRSA taşıyıcılığının eradikasyonu için önemlidir⁴⁸.

Fosmomisin:

Beta-laktamlarla kombine olarak ya da tek başına MRSA'lara karşı kullanılabilen antibiyotiklerden biridir³².

Linezolid ve Eperozolidin:

Linezolid ve eperozolidin üyeleri oldukları oksazolidinon grubunun antimikrobiyal özellikleri, antidepresan ilaçlar olan monoamin oksidaz inhibitörlerinin araştırmaları esnasında fark edilmiş ve daha sonra antibiyotik olarak geliştirilmişlerdir⁴⁹.

Protein sentezini başlangıç kompleksinin oluşmasından önceki basamakta inhibe ederler. Bu nedenle de bu antibiyotiklerin etki mekanizması diğer sentez inhibitörlerinden farklıdır. Oral ve IV olarak uygulamada kullanılabilecek formları geliştirilmektedir³².

Metisilin Direnç Mekanizması

Bakterilerde onlara şeklini veren, uzamasını sağlayan ve sonunda bölünmeyi gerçekleştiren enzim yapısındaki proteinlere penisilin binding protein (PBP) denir. Bunlar sitoplazmik membran üzerinde bulunurlar ve beta-laktam antibiyotiklerin bağlanıp etki gösterdikleri yerlerdir⁵⁰.

Bu proteinlerin transpeptidasyon ve karboksipeptidasyon fonksiyonları, beta-laktam türevi antibiyotiklerce inhibe edilir⁵¹.

Metisiline dirençli *S. aureus* suşlarının çoğu başta diğer beta-laktam antibiyotikler olmak üzere, aminoglikozitlere ve tetrasikline de dirençli olmaktadır. Beta-laktam antibiyotikler bakteri hücre duvarında yer alan PBP'leri

inhibe ederek etkilerini göstermektedir. Metisiline duyarlı ve dirençli stafilokoklar arasındaki temel fark PBP'lerdedir. Metisilin direnci PBP 2a denen proteinin varlığına bağlıdır. Bu protein duyarlı suşlarda bulunmamaktadır. Direncin nedeni kromozomal DNA üzerinde "mec" olarak adlandırılan PBP 2a'yı kodlayan gen bölgesinin bulunmasıdır⁵².

mecA geni stafilokoklarda Staphylococcal Chromosome Cassette mec (SCCmec) olarak adlandırılan kromozomal DNA bölgesinde bulunur. SCCmec bölgesinin büyüklüğü 21-67 kb civarındadır. Yani tüm *S. aureus* genomunun %1-2'sini oluşturur. Stafilokok türleri arasında iyi muhafaza edilen *mecA* geni, *S. aureus* suşlarında metisiline direnci sağlayan yaklaşık 76 kDa'luk PBP 2a proteinini kodlar⁵⁰.

Metisiline dirençli hücrelerde bulunan ve beta-laktam antibiyotiklere düşük afinite gösteren PBP 2a, hücre duvarının transpeptidasyonunu devam ettirerek bakteri hücrelerinin antibiyotiklerden zarar görmesini engeller³².

Stafilokokal kromozom üzerine bitişik 2 gen bulunur. Bunlar *mecI* ve *mecRI*'dir. *mecI* ve *mecRI*'in *mecA* promotorlarının hemen üst kısmında lokalize olmuş regülatör genler tarafından ayrı olarak transkripsiyonu yapılır. Bunlar stafilokokların beta-laktamaz regülatör elementleri olan *blaI* ve *blaRI* ile moleküler organizasyon, yapı, fonksiyon ve regülasyon mekanizması açısından benzerdir. *blaI* beta-laktamaz gen transkripsiyonunu repress eden ve DNA'ya bağlanan bir proteindir. *blaRI* ise beta-laktam antibiyotikler varlığında beta-

laktamaz geninin transkripsiyonuna yol açan signal-transducing PBP'dir. *mecI* ve *mecRI* *mecA* için analog regülatör görevini yerine getirirler³².

mecRI geni membran bağlı sinyal transdüksiyon proteinini kodlarken, *mecI* ise transkripsiyonel regülatörü kodlar. *mecI*, *mecA*'nın transkripsiyonunu iyi bir şekilde regüle eder. Beta-laktamların pek çoğu *mecRI*'ı yeterli şekilde aktive edemez. Ancak *mecI* ve *mecA*'nın promotör ve operatör bölgelerindeki mutasyon ve delesyonlar represörü inaktive eder ve PBP2a ekspresyonu sürekli olarak meydana gelir⁵¹.

II.2.4. Metisilin Direncinin Saptanması

Özellikle MRSA suşları, infekte hastalar ya da bu suşlarla kolonize olan hastane personeli aracılığı ile kolaylıkla yayılarak tedavisi güç infeksiyonlara neden olmaktadır. Bu nedenle klinik örneklerde MRSA suşlarının saptanması önem taşımaktadır³⁷.

MRSA ve metisiline dirençli KNS'ların tanısında ideal yöntem, *mecA* geninin veya PBP 2a proteininin doğrudan saptanmasıdır. Ancak bu yöntemler her klinik laboratuvarında uygulanabilir yöntemler değildir. Oksasilinin metisiline göre daha stabil bir antibiyotik olması nedeni ile klinik laboratuvarlarda oksasilin kullanılarak CLSI önerilerine göre uygulanan disk difüzyon, agar tarama ve agar dilüsyon yöntemleri ile bu suşların saptanmasına çalışılır⁵³.

MRSA'nın laboratuvarlarda belirlenmesi için en sık kullanılan metotlar aşağıda verilmiştir:

Disk Difüzyon Metodu (Kirby-Bauer Metodu):

Disk difüzyon yönteminde, 0.5 Mc Farland standardına göre 1×10^8 cfu/ml konsantrasyonda hazırlanan bakteri süspansiyonu %4 NaCl içeren ve pH 7.2 olan Mueller Hinton agara yayılır. 1 µg oksasilin içeren diskler yerleştirilerek 35°C'de 24 saat inkübe edilir. İnhibisyon zon çapı 10 mm ve altında olanlar dirençli, 11-12 mm olanlar orta duyarlı, 13 mm ve üstü olanlar duyarlı olarak yorumlanır⁵⁴.

Kirby-Bauer testi CLSI tarafından modifiye edilerek, disk difüzyon hassasiyeti testi adıyla standart bir test olarak kabul edilmiştir⁵⁴.

CLSI önerilerine göre, stafilokok suşlarının penisilin ve oksasilin duyarlılıklarının saptanması ile tüm beta-laktam ajanlar için yorum yapılabilmesi sağlanmaktadır. Bu nedenle bunlar dışındaki beta-laktam ajanların duyarlılık testlerinde yer almasına gerek yoktur:

1. Eğer izolat penisiline duyarlı ise, tüm penisilin türevlerine, sefemlere, karbapenemlere duyarlıdır.
2. İzolat penisiline dirençli, oksasiline duyarlı ise, beta-laktamaz varlığı düşünülür. Bu tip suşlar, penisilin-G, ampisilin, amoksisilin, azlosilin, karbenisilin, mezlosilin, piparasilin, tikarsiline dirençli, penisilinaza dirençli penisilinler, beta-laktam inhibitörlü beta-laktam kombinasyonları, sefemler ve karbapenemlere duyarlıdır. Nitrosefin hidrolizi gibi direk beta-laktamaz test uygulaması ile de beta-laktamaz üretimi ve yukarıda sayılan ajanlara direnç saptanabilir.

3. İzolat oksasiline dirençli ise tüm beta-laktamlara dirençlidir. Bu tip suşlar in vitro olarak sefemlere, beta-laktam/beta-laktamaz inhibitör kombinasyonlarına, imipeneme duyarlı olarak görülebilir. Ancak bu ajanlarla klinik tedavi sonuçları başarısız olduğu için tüm beta-laktam ajanlara dirençli olarak rapor edilmelidir.

- Disk difüzyonda direnç değerlendirilirken disk etrafındaki silik veya tek koloni şeklindeki üremeler de dikkate alınır.
- Test sonucu orta düzeyde ise sadece *S. aureus* suşları için oksasilin-tuz agar tarama testi uygulanır. Bu test KNS için önerilmemektedir.
- Metisiline dirençli suşların birçoğu diğer beta-laktamlar, aminoglikozidler, makrolidler, klindamisin, tetrasiklin gibi ajanlara da dirençlidir. Bu nedenle, stafilokoklarda çoğul dirençlilik saptanması metisilin direncini düşündürmektedir.
- *mecA* geni içermeyen, ancak oksasilin MİK değeri 2-8 mg/L olan suşlar BORSA olarak değerlendirilmektedir. BORSA suşlarının daha çok laboratuvar şartlarına bağlı olarak gözlenen bir fenotip olduğuna ilişkin bulgular mevcuttur ve bu fenotipin klinik tedavi açısından önemi de kesin değildir⁵⁵.

Agar Tarama Metodu (Screen Testi):

Agar tarama yönteminde %4 NaCl ve 6 µg/ml oksasilin içeren Muller Hinton agar besiyerine 0.5 McFarland standartlarına göre 1×10^8 cfu/ml

konsantrasyonda hazırlanan bakteri süspansiyonundan spot inokülasyon yapılır. 35°C'de 24 saat inkübasyondan sonra, bir tek koloni üremesi metisilin direncinin göstergesi olarak kabul edilir⁵⁴.

Bu testin hassasiyeti MRSA'ların tespiti için %100, KNS'lar için yaklaşık %95'dir³².

Dilüsyon Testleri:

Broth mikrodilüsyon testinde, %2 NaCl eklenmiş Mueller Hinton broth içine 5×10^5 cfu/ml konsantrasyonda inokülasyon yapılır. Mikropleyitin tüm çukurlarına 50 µl Mueller Hinton broth dağıtılarak belirli konsantrasyonda hazırlanmış oksasilin stok çözeltisinden 50 µl eklenir ve ikişer kat azalan dilüsyonları yapılır. Her çukura 50 µl 5×10^5 cfu/ml olacak şekilde ayarlanmış bakteri süspansiyonundan konularak üstleri kapatılır ve 35°C'de 24 saat inkübe edilir. Ayrıca her pleytte antibiyotik içermeyen bakteri kontrolü ve besiyeri kontrolü hazırlanır. Oksasilin MİK değeri 2 µg/ml ve altı olarak bulunan suşlar duyarlı, 4 µg/ml ve üstü olarak bulunan suşlar dirençli olarak yorumlanır⁵⁴.

Uygun şartlar altında yapıldığı takdirde dirençli suşlar broth mikrodilüsyon metoduyla %95 oranında tespit edilebilir. Yine bu metot CLSI tarafından tavsiye edilen ve en yaygın kullanılan metottur³².

Epsilometre Testi (E-test):

Yayılmı temelinde dayanan ancak diskler yerine plastik stripler üzerinde bulunan antimikrobiyal ajanın MİK değerinin saptanabildiği bir duyarlılık yöntemidir. Stripin bir tarafında ilaç, belirli ve sürekli bir konsantrasyon

değişimi olacak şekilde ve kurutulmuş olarak bulunur. Diğer yüzünde de antimikrobiyal ajanın stripin ucundan olan uzaklığa karşılık gelen konsantrasyonları bir cetvel gibi sıralanmıştır. Standart bakteri inokulumu, katı ve test için uygun besiyeri yüzeyine yayıldıktan sonra stripler yerleştirilir. İnkübasyon süresi sonunda elips şeklindeki inhibisyon alanının stripi kestiği konsantrasyon MİK değeri olarak belirlenir. E-test stripleri -20°C’de saklanır. Kullanımdan 30 dakika önce çıkarılıp oda sıcaklığına ulaşması sağlanır⁹.

Otomatize Sistemler:

Antimikrobiyal hassasiyet testleri gerçekleştirebilen yarı otomatize pek çok ticari sistem mevcuttur. Bu alanda en büyük pazar Vitek (Bio Merieux Hazelwood, MO) ve MicroScan (Dade International, Sacramento, CA)’a aittir. Vitek cihazları, bilgisayar kontrollü olarak plastik kartlarda büyüme analizi yaparak MİK seviyesini hesaplar. MicroScan ürünleri ise geleneksel MİK metodlarını kullanarak MİK seviyesini hesaplar¹¹.

PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu):

Eskiden metisiline dirençli suşların sadece hastane orjinli olduğu ve MRSA’nın tiplendirilmesinin çok kullanışlı olmadığı düşünülmekteydi. Bakteriyofajların tiplendirilmesi çok uzun yıllar temel tiplendirme yöntemi olarak kullanıldı ve tüm MRSA’ların faj ile tiplendirilemediği anlaşıldı. Günümüzde ise DNA tiplendirme metotları tüm suşları tiplendirebilmesi ve nispeten daha kolay uygulanabilirlikleri nedeni ile daha çok tercih edilmektedir. DNA analizi, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ya da DNA fragmanlarının elektroforetik

olarak ayırımı ile yapılabilir. Bu temele dayalı testler birbiri ile ilgisiz olan suşları ayırt edebilir⁵⁶.

Kary Mullis'in buluşu olan ve kendisine Nobel ödülü kazandıran , nükleik asitlerin in vitro olarak çoğaltılmasını sağlayan bir yöntemdir⁵⁷.

PZR bir çeşit in vitro klonlamadır. PZR, DNA'nın iki zincirinin yüksek ısı ile birbirinden ayrılmasını (denatürasyon), daha sonra sentetik oligonükleotitlerin hedef DNA'ya bağlanmasını (hibridizasyon), sonra zincirin uzamasını (polimerizasyon) ve bu siklusların belirli sayıda tekrarlanmasına dayanır. Bu teknikle, bir DNA hedefini 10^6 - 10^{12} arasında çoğaltmak mümkündür⁵⁸.

Son yıllarda özellikle kültürü yapılamayan veya zor olan ve uzun süren organizmaların teşhisinde PZR yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Hastalardan alınan hemen her türlü klinik materyalde, kültürü ve serolojisi yapılamayanlar dahil, kullanılabilir⁵⁹.

PZR, MRSA'ların tespitinde büyük önem taşımaktadır. Çünkü borderline direncine sahip suşlarda direnç fenotipinin saptanmasında fenotipik metotlar yetersiz kalmaktadır¹¹.

Metisilin direncinin en yaygın mekanizması *mecA* geninin bulunmasıdır. *mecA* geni yeni bir penisilin bağlayan protein olan PBP 2a veya PBP2'yi üretmekte ve beta-laktam antibiyotiklerin bu proteine bağlanma affinitesinin düşük olması dirence neden olmaktadır. MRSA suşlarında gözlenen heterozistan dirençlikte tek bir izolattan oluşan bakteri popülasyonu içinde metisiline direnç seviyesinde büyük farklılıklar vardır. Bakterilerin büyük

çoğunluğu düşük seviyede direnç gösterirken, az bir kısmı (1/100.000) yüksek derecede dirence sahip olmakta ve bunlar tedavide başarısızlığa yol açmaktadır. Heterorezistan suşların klasik laboratuvar yöntemleriyle gösterilmesi mümkün olmamaktadır. Dirençten sorumlu olan *mecA* geni PZR yöntemi ile gösterilerek, MRSA suşları, klasik yöntemlere göre daha duyarlı ve kısa sürede saptanabilmektedir⁶⁰.

II. 3. Hastane İnfeksiyonları

Herhangi bir nedenle hastaneye başvuran hastalarda, burada yattığı zaman süreci içinde, hastanedeyken meydana gelen (bulaşan veya gelişen) veya hastanede gelişmesine rağmen taburcu olduktan sonra ortaya çıkabilen infeksiyonlara hastane İnfeksiyonu denir.

Bu infeksiyonlar “Nozokomiyal İnfeksiyonlar” olarak da bilinmektedir. Hastane infeksiyonlarına sebep olan mikroorganizmaların büyük bir kısmı hastane ortamında yoğun antibiyotik kullanımına bağlı olarak antibiyotiklerin çoğuna dirençlidir.

Hastane infeksiyonları genellikle hasta hastaneye yattıktan 48–72 saat sonra veya taburcu olduktan sonraki 10 gün içinde gelişir. Bu infeksiyonlar, hastanelerde bu amaca yönelik olarak alınan önlemlerin etkinliğine, hasta servislerinin niteliğine, hastaların durumuna ve ortamda bulunan mikropların nitelik ve virülanslarına göre tek tek olgular halinde veya küçük-büyük salgınlar şeklinde meydana gelebilirler.

Hastane infeksiyonları;

Tedavideki güçlük sebebi ile hastanedeki kalış süresinin uzamasına,

Tedavi giderlerinin artmasına,

İş gücü kaybı ile ekonomik problemlere,

Yüksek ölüm oranına ve sekonder sebeplerle ölümlere,

Mikroorganizmaların hastalar aracılığı ile hastane dışına taşınmalarına ve daha

ciddi genel sağlık problemlerinin ortaya çıkmasına neden olurlar

Bu enfeksiyonlar sıklık sırasına göre şöyle sıralanabilir^{61,62}.

1. Hastane kökenli üriner sistem enfeksiyonları

2. Hastane kökenli pnömoni

3. Cerrahi alan enfeksiyonu

4. Damar içi kateterin yol açtığı enfeksiyonlar.

Bu dört enfeksiyon tüm hastane enfeksiyonlarının %80'ini oluşturur.

Üriner Sistem Hastane İnfeksiyonları

Nozokomiyal enfeksiyonlar arasında birinci sıradadır (%40).

İnfeksiyonun başlıca nedeni ürolojik araç (sonda, kateter, sistoskop v.b.) kullanımınıdır.

En sık görülen etken *E. coli*'dir. Sonda veya kateterin tipi, konulma şekli, kullanım süresi, aletin bakımı enfeksiyon gelişimini etkiler. Özellikle kullanım süresinin uzun olması yüksek bir enfeksiyon riski yaratır. İdrar yolu enfeksiyonlarını azaltmak için aletler steril olmalı ve uygulamada aseptik tekniğe özen gösterilmeli, alet bakımı iyi yapılmalı ve kullanım süresi en aza indirilmelidir. Hastaneye yatan hastaların %10'una sonda takıldığı göz önüne alınırsa enfeksiyon sıklığının nedeni anlaşılmış olur⁶³.

Hastane Kökenli Pnömoni

Hastane kökenli pnömoni, pnömoni etkeni bir mikroorganizma için inkübasyon döneminde olmayan bir hastada, hastaneye yatırıldıktan 48 saat sonra gelişen pnömoni olarak tanımlanır.

Nozokomiyal üriner sistem infeksiyonlarından sonra ikinci sıklıkta, yoğun bakım ünitelerinde ise birinci sırada görülür.

S. aureus en sık rastlanan Gram pozitif etkidir. Nozokomiyal pnömoni gelişiminde rol oynayan risk faktörleri; yaşlılık, altta yatan kronik akciğer hastalığı, entübasyon- trakeostomi-mekanik ventilasyon, bilinç bulanıklığı, göğüs cerrahisi, hastanede uzun süre yatma, yoğun bakımda yatma, geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı ve immunosupresyondur⁶³.

Önlemek için steril solunum araç-gereç ve solüsyonları, bakımları, el temizliği ve hasta bakımında eldiven kullanımı, havanın temizlenmesi önem taşır.

Cerrahi Alan İnfeksiyonları

Tüm nozokomiyal infeksiyonlar içinde üçüncü sırayı alır. En önemli kaynak sağlık personelinin elleridir. En sık rastlanan etken *S. aureus* 'dur. Cerrahide infeksiyonu önlemek için çok tedbir alınması gerekir. Hatta cerrahi için yapılan tüm hazırlıklar bu amaca yöneliktir (sterilizasyon, paketlenme, depolama, özel giyim, havalandırma, cerrahi trafik ve yıllarca süren eğitim gibi). Cerrahi yaraların temiz, temiz-kontamine, kontamine ve kirli-infekte olması yara infeksiyonu gelişmesinde önemli kriterlerdir.

Cerrahi alan infeksiyonları; cilt ve cilt altını tutan yüzeysel infeksiyonlar, fasya ve kasları tutan derin infeksiyonlar ve organ boşluğu infeksiyonları olmak üzere üç grupta toplanmaktadır.

Bakteriyemiler

Bakteriyemi, bakterinin kana geçmesi ve yayılması demektir. En önemli etken %60 oranında stafilokoklardır.

Damara takılan her türlü alet yerinde kaldığı sürece bakteriyemi riskini artırır. Korumak için kullanılan aletler steril olmalı (mümkünse disposibl), aseptik teknikle uygulanmalı, uygun alet ve yer seçimi yapılmalı, kullanım süresi zorunlu olmadıkça 48-78 saati geçmemelidir.

Yoğun bakım ünitelerinde bu infeksiyon riski yapılan girişimlere bağlı olarak diğer birimlerden daha fazladır. Kateterin, tipi, takıldığı yer, takılış şekli ve bakımı infeksiyon da etkili olan unsurlardır⁶³.

III. MATERYAL VE YÖNTEM

III.1. Materyal

Araç ve Gereçler:

1. Değişik ebatlarda cam deney tüpleri
2. Ependorf tüpler
3. Balon joje
4. Platin öze (yuvarlak uçlu- iğne uçlu)
5. Otomatik pipet
6. Otoklav (Nüve OT 4060)
7. Pastör fırını (Heraeus)
8. Su banyosu (Schwabach)
9. Derin dondurucu (Uğur)
10. Etüv (Nüve)
11. Hassas terazi (Denver)
12. DNA Thermal Cyclers (Prismus Peqlab- Almanya)
13. Elektroforez tankı (CSL-İngiltere)
14. Agaroz jel görüntüleme cihazı
15. Laminar flow (Biolab)

Besi Yerleri:

1. Brain Heart İnfusion (OXOID)
2. Mueller- Hinton Agar (OXOID)
3. Blood Agar (OXOID)

Solüsyonlar ve Kimyasal Maddeler:**DNA İzolasyonu**

0.1 mM Tris- HCl (PH 7) (Merck)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Reaksiyon Tamponu (10X) (Hotstart Bioran- Almanya)

%50 Gliserol (v/v)

100 mM KCl

20 mM Tris- HCl (PH 8)

0.1 mM DTT

%0.5 Tween 20

%0.5 Nonidet p 40

100 mM Tris- HCl (Ph 8.3)

500 mM KCl

15 mM MgCl₂

%0.01 (w/v) Jelatin

Taq DNA Polimeraz (5 ünite/ml) (Hotstart Bioran- Almanya)

10 mM dNTP Karışımı (10X)(Larova- Almanya)

Her bir deoksiribonükleotid'den (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

Primerler (Metis Biyoteknoloji)

25 mM MgCl₂

Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz (Serva- Almanya)

%1'lik = 1 g Agaroz (çoğaltılan ürünlerin ve DNA varlığının tespiti için)

100 ml 0.5 x TBE

TBE Tamponu

90 mM Tris-base

90 mM Borik asit

2 mM Na-EDTA

Yükleme Tamponu

%0.25 Brom fenol blue

%40 (w/v) Sukroz

10. Etidyum bromür

10 mg Etidyum bromür

1 ml Distile su

Klinik Örnekler

Sağlık Bakanlığı Dışkapı Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarlarından sağlanan örnekler ve Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi hastane infeksiyon kontrol komitesi tarafından hastane infeksiyonu etkeni olarak belirlenen örnekler çalışılmıştır.

1. grupta; Sağlık Bakanlığı Dışkapı Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesinden Temmuz 2005- Aralık 2006 tarihleri arasında çeşitli klinik örneklerden izole edilen 1117 stafilokok suşu içerisinde, koagülaz pozitif olanlar arasından disk difüzyon yöntemi ile metisiline dirençli oldukları tespit edilen 20 MRSA suşu alındı.

2. grupta; Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi hastane infeksiyonu kontrol komitesi tarafından hastane infeksiyonu etkeni olarak belirlenen 12 MRSA suşu incelendi.
3. grupta; Sağlık Bakanlığı Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nden Eylül 2005-Aralık 2006 tarihleri arasında çeşitli klinik örneklerden izole edilen 542 stafilokok suşu içinden disk difüzyon yöntemi ile metisiline dirençli olan 60 MRSA suşu incelemeye alındı.

III. 2. YÖNTEM

Klinik Örneklerden *S. aureus* Suşlarının İzolasyonu

***S. aureus* Suşlarının Toplanması**

Sağlık Bakanlığı Dışkapı Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nden 20 MRSA suşu çalışmada kullanıldı. 20 suştan 17'sinin hastane infeksiyon kontrol komitesi tarafından hastane kaynaklı olduğu tespit edildi.

Sağlık Bakanlığı Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nden bu çalışmada kullanılmak üzere 60 MRSA suşu toplandı.

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi hastanesinden alınan 14 suştan 12 tanesi bu çalışmada kullanıldı. 3 ayrı hastaneden toplam 92 MRSA suşu çalışmada kullanıldı.

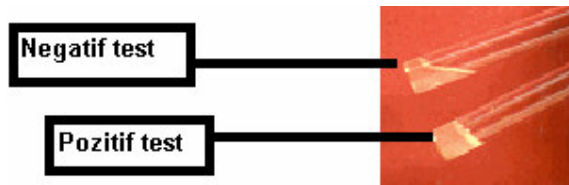
***S. aureus* Suşlarının Üretim ve Depolanması**

Araştırma kapsamında toplanan stafilokok bakterileri Blood agar besiyeri kullanılarak üretildi. 35°C'de 24 saat üremeleri sağlandı. İnkübasyon süresi sonunda Blood agar besi yerinde üreyen *S. aureus* kolonileri için koagülaz deneyi yapıldı.



Şekil 1-. Kanlı agar besiyerinde üremiş *S. aureus* kolonileri

Koagülaz deneyi için; steril cam tüplere 2ml insan plazması konuldu. İğne öze yardımı ile alınan koloniler plazma içinde ezilerek homojenize edildi. 37°C'de inkübasyona bırakıldı. 4., 6., ve 18. saatler de kontrol edildi ve sonuçta plazmayı koagüle eden suşlar ayrıldı.



Şekil 2- Tüpte koagülaz deneyi sonuçları

Ayrılan suşların disk difüzyon yöntemi ile oksasilin (OX) hassasiyetleri tespit edildi. Oksasilin dirençli suşlar MRSA olarak adlandırıldı..

Besiyerleri ve Solüsyonların Hazırlanması

Uzun süreli saklamak için Brain Heart İnfüzyon besiyeri kullanıldı. Hazırlanan besiyerine %5 gliserol ilave edildi ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. Steril edilen besiyerinden 100'er µl steril ependorflara aktarıldı. Daha sonra +4°C'de günlük kullanım amacıyla saklandı.

Hassasiyet testleri için Mueller Hinton besiyeri kullanıldı. Talimatına uygun olarak hazırlanan ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilen besiyeri steril petrilere 4 mm kalınlığında döküldü. Katılaşması için bir süre oda sıcaklığında bekletildi. Gerektiğinde kullanılmak üzere +4°C'de muhafaza edildi.

Bakteri üretimi ve -40°C'de bekleyen stokların canlandırılması için Blood Agar besiyeri kullanıldı. Talimatına uygun olarak hazırlanan ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilen besiyeri bir süre oda sıcaklığında bekletilerek %5-10 insan kanı ilave edildi. Steril petrilere dökülürken alevden geçirilerek kontaminasyon riski azaltıldı. Oda sıcaklığında katılaşması için bekletildi. Daha sonra kullanılmak üzere +4°C'de muhafaza edildi.

Çalışma süresince kullanılan tüm besi yerleri saf su kullanılarak hazırlandı.

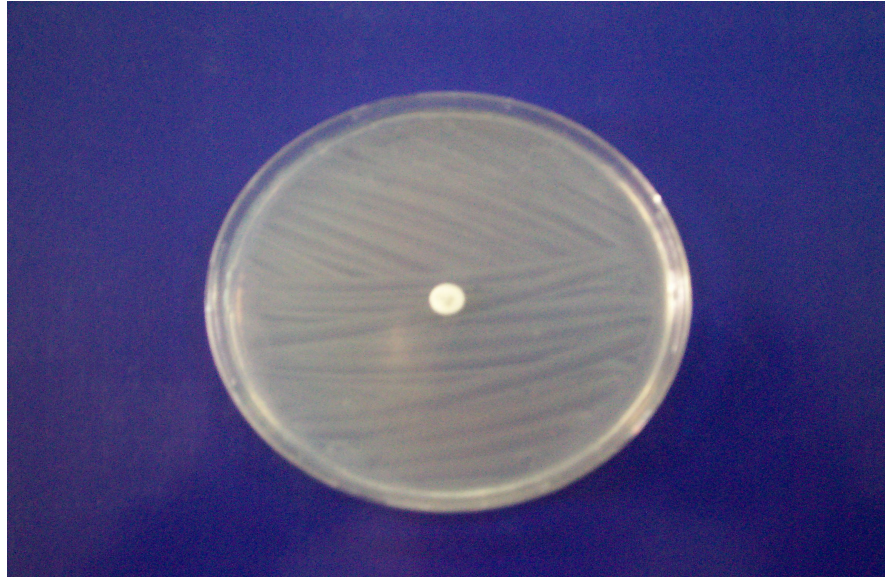
Tablo.3: Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

Besi yeri	Gram/litre
Brain Heart İnfüzyon	37 g
Mueller Hinton Agar	38 g
Blood Agar	40 g

***S. aureus* Suşları İçin Hassasiyet Testi (Disk Difüzyon Metodu)**

Disk difüzyon testi CLSI standartlarına göre uygulanmıştır⁵⁹. Mc Farland 0.5 bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonu, eküvyonla Mueller Hinton Agar plaklarının yüzeyine yayıldı.

Her biri 1 µg antibiyotik içeren oksasilin antibiyotik diskleri (Oxoid), steril pens ile besiyeri yüzeyine yerleştirildi. Petriler ters çevrildi ve 35°C’de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Oksasilin diski etrafında ≤10 mm çapında inhibisyon zonu oluşturan suşlar MRSA olarak değerlendirildi.



Şekil 3- *S. aureus*'un oksasilin direncini gösteren disk difüzyon testi.

DNA İzolasyonu

MRSA izolatlarının Blood Agar besi yerine ekimleri yapıldı. 37°C’de 24 saat etüvde inkübe edildi. Bakteri kültürlerinden DNA izolasyonu kaynatma yöntemiyle yapıldı⁶⁴. Bakteri kültüründen 3-5 koloni alınarak üzerine 100 µl 0,1 mM Tris pH 7.0 çözeltisi eklendi. Su banyosunda 100 °C’de 10 dakika bekletilerek DNA izolasyonu yapıldı.

İzole edilen DNA'ların varlığı % 1'lik agaroz jel elektroforezi kullanılarak gösterildi.

İzole Edilen DNA'ların Agaroz Jel Elektroforezinde Gösterilmesi

İzole edilen DNA'ların varlığı %1'lik agaroz jel elektroforezi kullanılarak gösterildi.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu

***mecA* Geninin Çoğaltılmasında Kullanılan Primerler:**

mecA geninin tespiti için kullanılan primerlerle 310-bç uzunluğundaki ürün elde edildi⁶⁵.

mec A geni primerlerinin dizisi:

mecA1 5'-GTA GAA ATG ACT GAA CGT CCG ATA A

mecA2 5'-CCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTA A

DNA Çoğaltılması:

MRSA DNA'sının 4 µl'si PZR için kalıp olarak kullanıldı. PZR tepkimesi toplam 25 µl'lik hacimlerde yapıldı. 25 µl' lik reaksiyon karışımı; 2.5 µl tampon, 1.25 µl MgCl₂, 0.2 µl dNTP, her bir primerden 1.5 µl, taq DNA polimeraz enziminden 0.5 µl ve 13.55 µl distile su olacak şekilde hazırlandı.

Amplifikasyon, DNA Isı Döngü (Thermal Cycler) cihazında gerçekleştirildi.

Amplifikasyon :

Başlangıç denatürasyonu	94 °C	4 dakika	
Denatürasyon aşaması	94 °C	45 saniye	} 30 Döngü
Primerlerin yapışması(annealing) aşaması	55 °C	45 saniye	
Sentez (Uzama) aşaması	72 °C	60 saniye	
	72 °C	2 dakika	

PZR çalışmalarında; duyarlı *S. aureus*, negatif kontrol ve pozitif kontrol olarak *S. aureus* ATCC 95047 kullanılmıştır.

Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Belirlenmesi

Amplifiye ürünlerin değerlendirilmesi; etidyum bromür içeren %1'lik agaroz jel elektroforezi ile yapıldı. Agaroz jel elektroforezi için 10 µl' lik PZR ürünü 5 µl yükleme solüsyonu kullanıldı. Çoğaltılan ürünlerin değerlendirilmesi, u.v. ışığında (tranluminatör) yapıldı ve fotoğrafları çekildi.

IV. BULGULAR

Çalışmada Kullanılan Bakteriler:

Sağlık Bakanlığı Dışkapı Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarlarından sağlanan örnekler ve Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi hastane infeksiyonu kontrol komitesi tarafından hastane infeksiyonu etkeni olarak belirlenen örneklerde disk difüzyon yöntemi ile MRSA oldukları tespit edilen toplam 92 suş çalışmaya alınmıştır. Bu suşlardan 29'unun hastane infeksiyon kontrol komitesi tarafından hastane kaynaklı olduğu tespit edilmiştir. Toplanan 92 suşun izole edildiği materyallere göre dağılımı Tablo 4'de verilmiştir.

Tablo 4- Poliklinik Hastaları, Yatan Hastalar ve Hastane İnfeksiyonlarındaki MRSA Suşlarının İzole Edildiği Materyallerin Dağılımı.

Materyal cinsi	Sayı	Yüzde (%)
Yara-abse	34	% 37
Trakeal aspirat	29	% 32
Kan	13	% 14
İdrar	9	% 10
Katater	2	% 2
Göbek sürüntüsü	1	% 1
Burun sürüntüsü	1	% 1
Balgam	1	% 1
Operasyonda alınan sıvı (intreop mayi)	1	% 1
Bronkoalveoler lavaj (BAL)	1	% 1
TOPLAM	92	100

MRSA izole edilen materyallerin çoğunu yara-abse ve trakeal aspirat oluşturmaktadır. Bunu takip eden sıklıkta MRSA'ya kan, idrar, katater, göbek ve burun sürüntüsü, balgam, operasyon sıvısı(intreop mayi) ve BAL gibi materyallerde rastlanmıştır.

1. ve 2. gruba ait toplanan örneklerin çoğunluğu trakeal aspirat ve kan oluşturmaktadır.

Tablo 5– Hastane İnfeksiyonlarındaki MRSA Suşlarının İzole Edildiği Materyallerin Dağılımı.

	1. Grup	2. Grup	%
Trakeal aspirat	8	6	48.3
Kan	5	3	27.5
Yara	2	1	10.3
İdrar	2	-	6.9
Katater	-	1	3.5
BAL	-	1	3.5
TOPLAM	17	12	100

Klinik örneklerden elde edilen 92 MRSA suşunun 21'i poliklinik hastalarından, 71'i yatan hastalardan izole edilmiştir. Poliklinik ve yatan hastaların servislere göre dağılımı aşağıda verilmiştir.

Tablo 6- Sağlık Bakanlığı Dışkapı Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nden Toplanan Örneklerin Servislere Göre Dağılımı.

Klinik adı	Hasta sayısı
Yeni doğan servisi	6
İntaniye servisi	4
Büyük çocuk servisi	4
Süt çocuğu servisi	4
Poliklinik	2
TOPLAM	20

Tablo 7- Sağlık Bakanlığı Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nden Toplanan Örneklerin Servislere Göre Dağılımı.

Klinik adı	Hasta sayısı
Poliklinik	19
Nöroşirürji	12
Ortopedi	8
Cerrahi	6
Acil yoğun bakım	3
Reanimasyon	3
Dahiliye	3
Acil dahiliye	2
Fizik tedavi ve rehabilitasyon	2
Koroner	1
Dermatoloji	1
TOPLAM	60

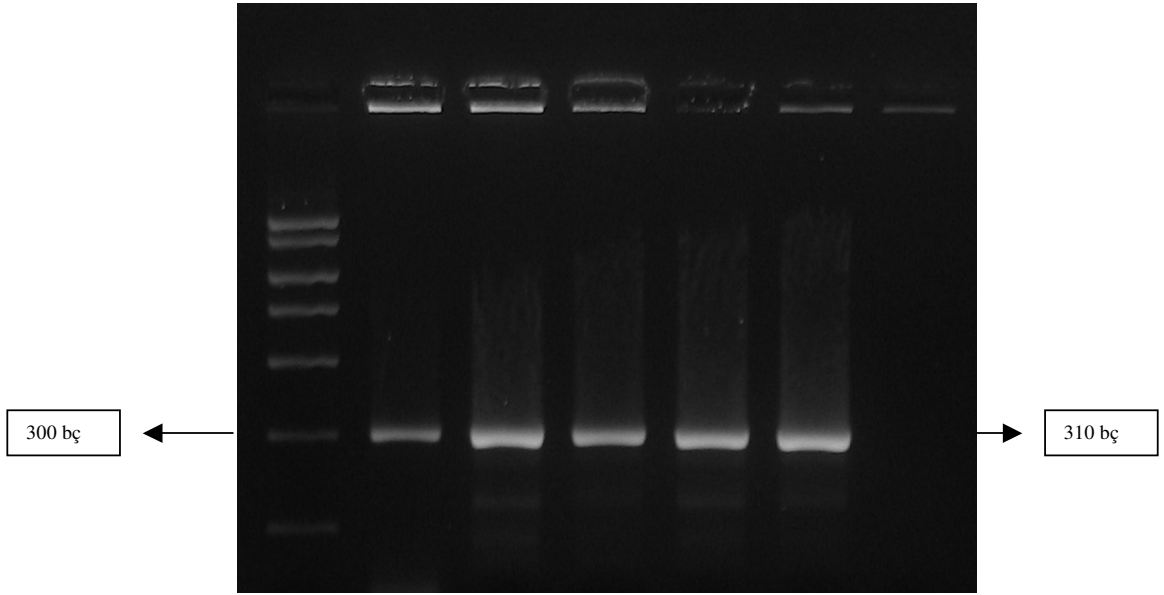
Tablo 8- Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İnfeksiyon Kontrol Komitesinden Alınan Örneklerin Servislere Göre Dağılımı.

Klinik adı	Hasta sayısı
Göğüs yoğun bakım	5
Genel cerrahi yoğun bakım	2
Nöroloji yoğun bakım	2
İnfeksiyon	1
Anestezi yoğun bakım	1
Dahiliye yoğun bakım	1
TOPLAM	12

PZR Sonuçları:

Klinik örneklerden izole edilen MRSA'larda bulunan *mecA* direnç geninin olup olmadığı PZR yöntemiyle belirlendi. *mecA* genini taşıyan *S. aureus* suşları MRSA olarak değerlendirildi. Çoğaltılan ürünlerin değerlendirilmesi %1'lik agaroz jel elektroforezinde yapıldı.

Agaroz jel elektroforezinde; *S. aureus* suşlarında; 310 baz çiftlik bölgede bir bantın gözlenmesi *mecA*(+), 310 baz çiftlik bölgede bir bantın gözlenmemesi *mecA*(-) olarak belirlendi.



Şekil 3- PZR Ürünlerinin AgaroZ Jeldeki Görüntüsü. 1- 100 bç marker

2- *S. aureus* ATCC (95047) suşu 3- 4-5-6- *mecA*(+) suşlar 7- *mecA*(-) suş

92 MRSA suşunun 71'inde *mecA* geni saptanmıştır. *mecA* (+) saptanan suşların dağılımı aşağıda belirtilmiştir.

Tablo 9- 1., 2. ve 3. Graplarda İzole Edilen MRSA Suşlarının PZR Sonuçları

<i>mecA</i> pozitif	PZR
1. grup	15
2. grup	9
3. grup	47
TOPLAM	71

mecA(+) olduğu saptanan yatan hasta ve poliklinik hastalarının PZR sonuçları

tablo 10’da gösterilmiştir.

Tablo 10- Servis ve Poliklinik Hastalarının PZR Sonuçları.

		1. grup	2.grup	3.grup	TOPLAM
<i>mecA</i> (+)	Poliklinik	–	–	15	15 (%21.1)
	Servis	15	9	32	56 (%78.9)
	TOPLAM	15	9	47	71

Tablo 11- *mecA* Pozitif Suşların Servislere Göre Dağılımı

Servis Adı	Yüzde (%)
Nöroşirürji	12 (%21.4)
Yoğun bakım	11 (%19.6)
Ortopedi	8 (%14.2)
Cerrahi	6 (%10.7)
Diğer	19 (%33.9)
TOPLAM	56

V. TARTIŞMA

Hem toplum kaynaklı hem de nozokomiyal infeksiyonlarda MRSA ile sık karşılaşılmaktadır. Antibakteriyel ajanlara karşı direnç gelişmesi infeksiyonların tedavisini gün geçtikçe zorlaştırmaktadır.

Metisiline dirençli *S. aureus* suşları tedavisi zor olan çeşitli infeksiyonlara neden olmaktadır. Ayrıca kolay yayılmaları, hastane personeli ve hastalarda kolonize olmalarından dolayı kontrol edilmesi güçleşmektedir.

Özellikle *S. aureus* çeşitli organlarda infeksiyonlar yapması ve hastane infeksiyonu oluşturması nedeniyle önemli patojenler arasında yer almaktadır^{66,67}. *S. aureus* metisilin, nafsilin ve oksasilin gibi penisilinaza dirençli penisilinlere karşı direnç oluşturmaktadır. Bunların içinde en önemlisi metisiline karşı oluşan dirençtir⁶⁸. MRSA kromozomal *mecA* geninin kodladığı penisilin bağlayan proteini (PBP 2a) oluşturur. PBP 2a beta-laktam antibiyotik için düşük bağlanma affinitesi olan bir proteindir. MRSA suşları beta-laktam halkası taşımayan antibiyotiklere karşı da çoklu direnç oluşturabilir³².

Penisilinlere duyarlılığı azalmış *S. aureus* suşları 3 grupta toplanır^{69,70}. *S. aureus* suşlarında metisilin direncinden başka direnç oluşumu PBP'lerde oluşacak nokta mutasyonu, PBP'lerin veya beta-laktamaz enziminin fazla miktarda üretilmesi de antibakteriyel ajanlara karşı direnç oluşturan etmenler arasındadır.

Ayrıca dirençli *S. aureus* suşlarında metisilin direncini oluşturan genin ekspirasyonu düzenleyici genlerin varlığı, inkübasyon ısısı ve süresi gibi çevresel faktörlerin etkisiyle değişmektedir^{33,71}. Bu nedenlerle metisilin direncinin

değişken (heterojen) özelliği, disk diffüzyon gibi duyarlılık testlerinin güvenilirliğini kısıtlamaktadır.

Bu çalışmada *mecA* genini hızlı ve güvenilir olarak belirleyebilen PZR yöntemi kullanılmıştır. Sağlık Bakanlığı Dışkapı Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarlarından sağlanan örnekler ve Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi hastane infeksiyonu kontrol komitesi tarafından hastane infeksiyonu etkeni olarak belirlenen toplam 92 klinik örneğin izolatları kullanılmıştır. 92 örnekten 71'inde *mecA* geni saptanmıştır (Tablo. 9).

PZR yöntemiyle *mecA* geni saptanamayan örneklerdeki direncin PBP veya beta laktamaz enziminin aşırı üretimi sonucu (borderline oxacilline resistant *S. aureus*) veya PBP'lerde oluşacak nokta mutasyonu nedeniyle olduğunu düşünmekteyiz. Çünkü BORSA suşları genetik olarak MRSA suşlarından farklıdır ve klinik önemleri henüz anlaşılammıştır. Yapılan bir çalışmada *mecA* geni olmayan örneklerde oksasilin MİK değeri 2-8 mg/L olan suşların BORSA olduğu bildirilmiştir⁷⁰. Diğer bir çalışma ise PZR yöntemi ile disk diffüzyon ve oksasilin agar dilüsyon testlerini karşılaştırmışlardır. Oksasilin agar dilüsyon testi ile metisiline dirençli oldukları saptanan örneklerin PZR'la *mecA* geni içermediklerini göstermişler ve bu izolatların yüksek miktarda beta-laktamaz oluşturarak direnç geliştirdiklerini belirtmişlerdir⁷². *mecA* geni taşımayan metisiline dirençli olan stafilokoklarda PBP'lerde oluşan bir yapısal değişiklik sonucu direnç gelişebileceği açıklanmıştır⁷³.

S. aureus insanların deri ve mukozalarında bulunabilen piyogen bakterilerdendir. Selülit, impetigo, yara infeksiyonları, bakteriyemi, endokardit, toksik şok sendromu gibi infeksiyonlar oluşturmaktadır¹. Hastane infeksiyonu etkeni olarak sıklıkla saptanan patojenlerdendir⁷⁴.

Çalışmamızda *S. aureus*'un hastane infeksiyonu etkeni olarak belirlenen örneklerin çoğunluğu trakeal aspirat (%48.3) materyalidir. %27.5 oranında olan kan örnekleri ise ikinci sıklıkta incelenen örnekler arasındadır (Tablo 5)

Çalışmadaki toplam MRSA suşlarının izole edildiği materyallerin çoğunluğunu yara (%37) ve % 32 oranında olan trakeal aspirat oluşturmaktadır (Tablo 4)

PZR ile *mecA* geninin belirlendiği poliklinik hastalarının %21'inde ve servis hastalarının %79'unda *mecA* geni tespit edilmiştir. (Tablo 10).

Yaptığımız çalışmada, yoğun bakımda yatan hastalarda % 19.6, cerrahi servisinde yatan hastalarda %10.7 gibi yüksek bir oranda *mecA* pozitifliği saptandı (Tablo 11). Avrupa'da tüm hastane infeksiyonlarına yönelik bir prevalans çalışmasında MRSA etkenlerinin çoğunun yoğun bakım üniteleri ve cerrahi ünitelerden geldiği gösterilmiştir⁷⁵.

Punar ve arkadaşları yaptıkları çalışmada ortopedi ve travmatoloji kliniğinde hastane infeksiyonu etkenlerini araştırmışlar ve etkenler arasında %33 oranında MRSA belirlemiştir⁷⁶. Çalışmamızda *mecA* pozitif suşlar arasında ortopedi ve travmatoloji servislerinden gelen örneklerin oranı %14.2 olarak belirlendi (Tablo 11).

1994 yılında *S. aureus* izolatlarındaki metisilin direnci İskandinav ülkelerinde %0.1'den az iken, İspanya ve İtalya'da %30'dan fazladır⁷⁵. Son yıllarda yapılan çalışmalara göre Yunanistan'da metisiline dirençli *S. aureus*'ların %62.5-67, İtalya'da %34.4, Fransa'da %33.6 oranında olduğu bildirilmiştir⁴¹.

Ülkemizde dirençle ilgili yapılan çalışmalar, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, acinetobacter türleri, stafilokoklar ve enterokoklarda antimikrobiyal direnç sıklığının arttığını ve dirence neden olan çeşitli enzimlerin ortaya çıktığını göstermektedir⁷⁷. Çeşitli çalışmalarda *S. aureus* suşlarında saptanan metisilin direnci; Ankara'da %21, %29, İstanbul'da %33 ve Konya'da %26 olarak bulunmuştur^{78,79,80,81}.

Metisiline dirençli *S. aureus* suşlarının çabuk ve doğru tanımlanması, infeksiyonların tedavisinin kısa sürede yapılabilmesi için diğer duyarlılık testlerine göre duyarlı ve özgün olan PZR tekniğinin kullanılması önemlidir. Bu tekniğin kullanılması sayesinde stafilokoklarda metisilin direnci hızlı ve doğru belirlenecek ve gereksiz antibiyotik kullanımı ortadan kalkacaktır. Klinik materyallerin toplandığı üç farklı hastane dışında diğer hastanelerden de MRSA örneklerinin PCR yöntemi ile incelenmesi direnç gelişiminin önlenmesine yardımcı olacaktır.

VI. SONUÇ

Metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) nozokomiyal infeksiyonlara yol açabilmesi ve çoklu antibiyotik direnci gelişimi nedeniyle günümüzde önemli problemler yaratmaktadır. Metisiline direnç kromozomal ve plazmidlere bağlı olarak ortaya çıkabilmektedir. Metisiline karşı direnç oluşumunda etkili olan *mecA* geni *S. aureus* suşlarında çok yaygın olarak bulunmaktadır. Klinik örneklerden izole edilen metisiline duyarlılıkları oksasilin disk diffüzyon ile belirlenen toplam 92 MRSA suşunda *mecA* genini belirlemek için PZR yöntemi kullanılmıştır. 92 örnekten 71'inde *mecA* geni tespit edilmiştir.

Stafilokoklarda metisilin direncinin PZR yöntemiyle erken ve doğru tanımlanması, infeksiyonların kısa sürede tedavi edilmesi, pahalı ve zararlı ilaçların gereksiz kullanımı ve infeksiyon kontrol önlemlerinin zamanında alınması için önemlidir.

VII. ÖZET

S. aureus gerek toplum gerekse hastane kökenli infeksiyonlarda sık rastlanan etkenlerden biridir. Günümüzde MRSA görülme sıklığı çok artmıştır. Ülkelere, bölgelere, hastanelere ve aynı hastanedeki farklı servislere göre ük farklılıklar görülmektedir. *S. aureus*'larda metisilin direncinden sorumlu birden çok mekanizma bulunmaktadır. Metisilin direncinin tespitinde geleneksel yöntemler ve moleküler yöntemlerin birarada kullanılması daha uygundur.

Bu çalışmada, *S. aureus*'larda metisilin direncini belirlemek için disk diffüzyon ve PZR yöntemleri kullanıldı.

Sağlık Bakanlığı Dışkapı Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarlarından sağlanan örnekler ve Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi hastane infeksiyonu kontrol komitesi tarafından hastane infeksiyonu etkeni olarak belirlenen toplam 92 örnek çalışıldı.

Toplanan klinik örneklerin disk diffüzyon yöntemi ile metisiline duyarlılıkları belirlendi. Kaynatma yöntemi kullanılarak *S. aureus* suşlarından DNA elde edildi. *mecA* geni PZR yöntemi kullanılarak çoğaltıldı.

Çalışmada kullanılan 92 MRSA suşunun 71'inde PZR yöntemiyle *mecA* geni saptandı.

PZR yöntemini kullanarak diğer hastanelerdeki direnç dağılımının incelenmesi infeksiyonların önlenmesinde faydalı olacaktır.

VIII. SUMMARY

S. aureus is one of the most encountered agent in which the infections originated in hospitals and also in society. Nowadays, frequency of MRSA is increased and it shows diversity, according to countries, districts, hospitals and also departments in the hospitals. There are several mechanisms in *S. aureus* that is responsible of methicillin-resistance. It is convenient using traditional and molecular methods in determination of methicillin-resistance.

In this study, disk diffusion and PCR methods are used in detection of methicillin-resistant *S. aureus*.

The samples provided from microbiology laboratory of the Ministry of Health, Dışkapı Education and Research Hospital of Children Diseases, Dışkapı Yıldırım Beyazıt Education and Research Hospital, and totally 92 samples are studied which are determined by hospital infections control committee Faculty of Medicine, Gazi University.

The sensitivity of methicillin of the collected clinical samples, is detected by disc diffusion method. The DNA is provided from *S. aureus* strains by boiling method. The gene *mecA* is amplified by using PCR method.

The gene *mecA* is detected by PCR method in 71 of 92 MRSA strains which is used in the study.

Using PCR method, determination of distribution of methicillin-resistance at the other hospitals can be beneficial for prevention of infections.

X. KAYNAKLAR

1. WALDVOGEN, F.A., Staphylococcus aureus (Including Staphylococcal Toxic Shock), In: MANDEL, G.L., BENNETT, J.E., DOLIN, R. Ed. : Principles and Practice of Infectious Disease, New York, (1999).
2. CHEMBERS, H.F.: Detection of Methicillin Resistant Staphylococci. *Infec Dis Clin North Ame*, 7:425, (1993).
3. RICHARD, P., MEYRA, M., CARPATIER, E., THABAUT, A., DRUGEON, H. : Comparison of Phenotypic Methods and DNA Hybridization for Dedection of Methicillin Resistant Staphylococcus aureus. *J Clin Microbiol*. 32:613, (1994).
4. SAKOULAS, G., GOLD, H.S, VENKATARAMAN, L., DEGIROLAMI, P.C., ELIOPOULOS, G.M., QIAN, Q.: Methicillin Resistant Staphylococcus aureus : Comparison of Susceptibility Testing Methods and Analysis of mecA-Positive Susceptible Strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 3946-3951, (2001).
5. ÜNAL, S., AKHAN, S., Stafilokok İnfeksiyonları. In: TOPÇU, A.W., SÖYLETİR, G., DOĞANAY, M. Ed.: İnfeksiyon Hastalıkları Kitabı. Birinci baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, 773-781, İstanbul, (1996).

6. BİLGEHAN, H.: Klinik Mikrobiyoloji, Özel Bakteriyoloji Ve Bakteri İnfeksiyonları, 184-204, İzmir, (1990).
7. MURRAY, P.R., ROSENTHAL, K.S., KOBAYASHI, G.S., PFALLER, M.A.: Staphylococcus and Related Organisms, Medical Microbiology, Mosby, 175-188, (1998).
8. HARTSTEIN, A.L., SEBASTIAN, T.J., STRAUSBAUGH, L. J.: Methicillin Resistant Staphylococcus aureus, MAYHALL, C.G., Ed.: Hospital Epidemiology and Infection Control, New York, (2004).
9. JOKLIK, W.K., WILLETT, H.P., AMOS, D.B., WILFET, C.M.: Zinsser Microbiology. Twentieth Edition, Appleton and Lange, 401-416, (1992).
10. KLOSS, W.E., SCHLEIFER, K.H. Staphylococcus, In: SNEATH, P.H., MAIR, N.S., SHARPE, M.E., HOLT, J.G. Ed. : Bergey's Manuel of Systematic Bacteriology Volume: II. Williams-Wilkins, Baltimore, 1013-1035, (1986).
11. KONEMAN, E.W., ALLEN, S.D., JANDA, W.M., SCHRECKENBERGER, P.C., WINN, W.C. Ed. : Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Fifty Edition, Lippincott Company, 539-576, Philadelphia, (1997).

12. CHOEN, F.L., TARTASKY, D.: Microbial resistance to Drug Therapy. Am J Infect Control, 25: 51-64, (1996).
13. <http://www.gata.edu.tr/infkom/MRSA.pdf>
14. MATTSSON, E., ROLLOF, J., VERHOEF, J., VAN DIJK, H., FLEER, A. : Serum-induced Potentiation of Tumor Necrosis Factor Alpha Production by Human Monocytes in Response to Staphylococcal Peptidoglycan. Infect Immun, 62, (1994).
15. WILKONSON, B.J.: Biology, The Staphylococci in Human Disease, New York, (1997).
16. SRISKANDAN, S., COHEN, J.: Gram-positive Sepsis, Mechanisms and Differences from Gram-negative Sepsis, Infect Dis Clin North Am 13:397-412, (1999)
17. GREENBERG, D.P., BAYER, A.S., TURNER, D., WARD, J.I.: Antibody responses to Protein A with Staphylococcus aureus Bacteremia and Endocarditis. J Clin Microbiol 28:458-462, (1990).
18. TÜNGER, A., ÇAVUŞOĞLU, C., KORKMAZ, M.: Mikrobiyoloji, Asya Tıp Yayıncılık, 41-51, İzmir, (2003).

19. TILTON, R.C., HOWARD, B.J., KLAAS, J. Ed. : Clinical and Pathogenic Microbiology, Washington, (1987).
20. DİNGES, M.M., ORWIN, P.M., SCHLİEVERT, P.M. : Exotoxins of Staphylococcus aureus, Clin Microbiol Rev, 13: 16-34, (2000).
21. WAGNER, G.E., KINGSBURY, D.T. Ed.: John Wiley and Sons. : Staphylococci, Streptococci and Gram-positive Cocci, 81-86, (1990)
22. DÜNDAR, V., DÜNDAR, D.Ö.: Stafilokok İnfeksiyonları, İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, Nobel Tıp Kitabevleri, 1507-1516, (2002).
23. AYGEN, B., SEHMEN, E., SÜMERKAN, B., DOĞANAY, M. : Koagülaz Negatif Stafilokoklarda Slime Yapımı ve Aderans, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 26: 67-70, (1996).
24. QUIE, P.G., BELANI, K.K.: Coagulase-negative Staphylococcal Adherence and Persistence, J Infect Dis, 156: 543-547, (1991).
25. NOBLE, M.A., GRANT,S.K., HAJEN,E. : Characterization of a Neutrophil-inhibitory Factor from Clinically Significant Staphylococcus epidermidis, J Infect Dis, 161: 1153-1169, (1990).

26. AYGEN, B., Stafilokok İnfeksiyonlarında Klinik ve Tanı, 8. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, Kongre Kitabı, 331-338, Antalya, (1997).
27. ARDA, M. : Temel Mikrobiyoloji, 284-314, (2000).
28. CENGİZ, A.T., Staphylococcus, USTAÇELEBİ, Ş.: Temel ve Klinik Mikrobiyoloji kitabından, Güneş Kitabevi, 339-346, Ankara, (1999).
29. ÇETİNKAYA, Ş.Y.: Metisilin Dirençli Staphylococcus aureus İnfeksiyonlarının Epidemiyolojisi ve Kontrolü, Hastane İnfeksiyonları Dergisi, 4: 205-217, (2000).
30. CHAMBERS, H.F., SACHDEVO, M.: Binding Affinity for Penicilin Binding Protein 2a Corralates with in vivo Activity of beta-lactam Antibiotics Against Methicillin Resistant Staphylococcus aureus, J. Antimicrob, Chemother, 30: 821-821, (1992).
31. TURNIDGE, J., GRAYSON, M.L.: Optimum treatment of Staphylococcal Infections, 353-366, (1993).

32. CHAMBERS, H.F.: Methicillin Resistance Staphylococci, Molecular and Biochemical Basis and Clinical Implications, *Cin Microbiol Rew*, 781-791, (1997).
33. MARANAN, M.C., MOERIA, B., BOYLE-VAVRA, S., DAUM, R.S.: Antimicrobial Resistance in Staphylococci, *Infect Dis Clin North Am*, 11: 813-849, (1997).
34. ÜNAL, S.: Stafilokoklarda Metisilin Direnç Mekanizmaları ve Metisilin Direnç Tespit Yöntemleri, *Flora İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Dergisi*, 1: 14-17, (1996).
35. GEORGOPAPADAKOU, N.H.: Penicilin Binding Proteins and Bacterial Resistance to Beta-lactam Antimicrob Agents *Chemother*, 37: 2045-2053, (1993).
36. JACOBY, G.A., ARCHER, G.L.: New Mechanisms of Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents, *N. Eng J. Med*, 324: 601-612, (1991).
37. TUNÇKANAT, F., ÖZALP, M., ARIKAN, S., ÖZKUYUMCU, C., GÜNALP, A.: Metisiline Dirençli *S taphylococcus aureus* Suşlarının İzolasyonunda “Oxacillin-Mannitol- Salt Agar” Besiyerinin Kullanılması, *Mikrobiyoloji Bülteni* 28:2, 93-98, (1994).

38. MCDUGAL, L., THORNSBERRY, C.: The Role of Beta-lactamase in Staphylococcal Resistance to Penicillinase Resistant Penicilins and Cephalosporins, *J. Clin. Microbial*, 23: 832-839, (1986).
39. WILLKE, A.: Stafilokoklarda Metisilin Direnç Mekanizmaları ve Belirlenmesi, *Aknem Dergisi*, 6: 288-291, (1992)
40. KRABİBER, N., KARAHAN, M : Staphylococcus aureus Suşlarında Metisilin Direncinin Saptanmasında Agar Tarama ve Disk Difüzyon Yöntemlerinin Karşılaştırılması, *Mikrobiyoloji Bülteni*, 29:20-25, (1995).
41. GÜRLER, N.: Hastanede Sorun Olan Mikroorganizmalar: Gram Pozitif Koklar, 3. Sterilizasyon ve Dezinfeksiyon Kongresi, (2003).
42. HIRAMITSU, K., HANAĞI, H., İNO, T., YABUTA, K., OGURI, T., TENOVER, F.C. : Methicillin Resistant Staphylococcus aureus Clinical Strain with Reduced Vancomycin Susceptibility, *J. Antimicrob Chemother*, 40:135-146, (1997).
43. Centers for Disease Control, Staphylococcus aureus with Reduced Susceptibility Vancomycin-United States, *MMWR*, 46:765-766, (1997).

44. ARMAN,D., TOPÇU,A.W., SÖYLETİR,G., DOĞANAY, M. : Vankomisin ve Diğer Glikopeptid Antibiyotikler, İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, Nobel Tıp Kitabevleri, 252-257, İstanbul, (2002).
45. ÇETİNKAYA, Y., ÜNAL, S.: Glikopeptid Antibiyotikler: Vankomisin ve Teikoplanin, Flora İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Dergisi, 3: 1-14, (1997).
46. GRANINGER, W., WENISCH, C., HASENHUNDL, M., : Update in Staphylococcal Infections, Treatment of Staphylococcal Infections, Curr Opin Infect Dis, 8: 20-28, (1995).
47. TOPÇU, A.W., SÖYLETİR,G., DOĞANAY, M.: Fusidik Asit, İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, Nobel Tıp Kitabevleri, 267-264, İstanbul, (2002).
48. ROTH, E.P., MARTIN, F.C., VILLAR, J., MENDEZ-ALAVEREZ, S. : Multipleks PCR for Simultaneous Identification of Staphylococcus aureus and Detection of Methicillin and Mupirocin Resistance, Journal of Clinical Mikrobiology, 39:4047-4041, (2001).
49. LEBLEBİCİOĞLU, H., USLUER, G., ULUSOY, S.: Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler, Bilimsel Tıp Yayınevi, 365-373, Ankara, (2003).

50. DOMANSKI, T.L., JONGE, B.L.M., BAYLES, K.W. : Transcription Analysis of the *Staphylococcus aureus* Gene Encoding Penicilin-Binding Protein, *Jornal of Bacteriology*, 179: 2651-2657, (1997).
51. STAPLETON, P.D., TAYLOR, P.W.: Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*: Mechaism and Modulation, *Science Progress*, 57-72, (2002).
52. WITTE, W.: Antibiotic Resistance in Gram-positive Bacteria, *Epidemiological. J. Antimicrob Chemother*, 44: 1-9, (1999).
53. DÜNDAR, V.: Metisiline Dirençli Stafilokok İnfeksiyonları, *Klimik Dergisi*, 13:26-27, (2000).
54. CLSI, Villanova Pa, (1993).
55. GÜLAY, Z. : Antibiyotik Testlerinin Yorumu, *Toraks Derisi*, 3: 75-88, (2002).
56. AYLIFFE, G.A.J.: Recommendations fort he Control of Methicillic-resistant *Staphylococcus aureus*, Report no:96, (1996).
57. MULLIS, K.B., FALOONA, F.A. : Specific synthesis of DNA in vitro Via Polymerase Catalyzed Chain Reaction, *Methods Enzymol*, 155:335-350, (1987).
58. AKAR, N.: *Klinik Moleküler Patoloji'ye Giriş*, Ankara, (1995).

59. ATABEY, N., AÇIKBAŞ, İ., SAKIZLI, M.: Sitomegalovirus DNA'sının PZR ile Gösterilmesi, Mikrobiyoloji Bülteni, 30:79-85, (1996).
60. DURMAZ, R.: Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji, 79-81, Malatya, (2001).
61. JOHANSON, W.G., DEVER, L.L. : Nosocomial pneumonia. Intensive Care Med, 29: 23-29, (2003).
62. BEDÜK, Y.: Nozokomiyal üriner sistem infeksiyonları, Klimik Dergisi, 13: 19-20, (2000).
63. DOĞANAY, M., ÜNAL, S.: Hastane Enfeksiyonları, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara,(2003).
64. ABBASOĞLU, U., ÖZÇELİK, B., ÖZKAN, S., ÜLKÜER, M.K., KAYNAK, F.: Farmasötik Mikrobiyoloji Uygulama Kitabı, Ankara. (2005).
65. JONAS, D., SPECK, M., DASCHNER, F.D., GRUNDMANN, H. : Rapid PCR-Based Identification of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus from Screening Swabs, J Clin Microbiol, 40:5, 1821-1823, (2002).

66. ARCHER, G.L.: Staphylococcus aureus; a well armed pathogen. Clin. Infect Dis., 26:1179-81, (1998).
67. MOELLERING, R.C., Jr. Problems with antimicrobial resistance in Gram positive cocci. Clin Infect Dis., 26:1177-8, (1998).
68. HENZE, U.U., BERGER-BACHI, B.: Penicilin binding protein 4 overproduction increases beta laktam resistance in *S. aureus*. Antimicrob Agents Chemother, 40:2121-5, (1996).
69. PETERSSON, A.C., KAMME, C.: Miörner H. Disk with high oxacillin content discriminates between methicillin-resistant and borderline methicillin – susceptible *S. aureus* strains in disk diffusion assays using a low salt concentration, J Clin Microbiol, 37:2047-50, (1999).
70. SONG, M., WACHI, M., DOI, M., ISHIMO, F., MATSOHASHI, M.: Evolution of an inducible penicillin-target protein in methicillin resistant *S. aureus* by gene fusion. FEMS Lett, 221:167-70, (1987).
71. RYFFEL, C., KAYSER, H.F., BERGER-BACHI, B. : Correlation between regulation *mecA* transcription and expression of methicillin resistance in staphylococci. Antimicrob Agents Chemother, 36:25-31, (1992).

72. EROĞLU, C., PEKBAY, A., DUYAR, E., GÜNAYDIN, M., ESEN, Ş., SÜNBLÜ, M., LEBLECİOĞLU, H.: Stafilokoklarda metisilin direncinin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve oksasilin agar tarama yöntemi ile araştırılması., *İnfeksiyon Dergisi*,15(1):79-82, (2001).

73. PRASAD, K.N., KUMAR, R., TIWARI, D.P., MISHRA, K.K., AYYAGARI, A. : Comparison of various conventional methods with polymerase chain reaction assay for detecting methicillin resistant & susceptible *Staphylococcus aureus* strains. *Indian J Med Res*,198-202, (2000).

74. BALOWS, A., HAUSLER, W.J., HERRMANN, K.L, ISENBERG, H.D., SHADOMY, H.J. Ed. : *Manuel of Clinical Microbiology*, Washington, (1991).

75. VOSS, A., MILATOVIĆ, D., WALLRAUCH-SCHWARZ, C.,ROSDAHL, V.T., BRANEY, I. : Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, *Eur J. Clin Microbiol Infect Dis.*, 13: 50-5, (1994).

76. PUNAR, M., ÖZSÜT, H., ERAKSOY, H., DİLMENER, M., ÇALANGU, S., *Ortopedi ve Travmatoloji Kliniğindeki Nozokomiyal İnfeksiyon Etkenleri ve Antibiyotiklere Duyarlılıkları*, *Acta Orthop Traumatol Turc*, 29: 291-3, (1995).

77. LEBLEBİCİOĞLU, H., ÜNAL, S. : The Organization of Hospital Infection Control in Turkey. J Hosp Infect., (2002).

78. KOCAGÜZ, S., ÇETİNKAYA, Y., UZUN, Ö., AKOVA, M., HASÇELİK, G., ÜNAL, S. : Hastane İnfeksiyonlarında İzole edilmiş Stafilokok ve Enterekok Suşlarının Çeşitli Antibiyotiklere in-vitro Duyarlılıkları, Flora, 4:284 (1997).

79. ARMAN, D., Stafilokoklarda Direnç Sorunu, X. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, Adana Kongre Kitabı, 90, (2001).

80. ÖZTÜRK, R., MİDİLLİ, K., ERGİN, S., AYGÜN, G.: Cerrahpaşa Tıp Fakültesinde Yatan Hastalardan İzole Edilen Stafilokokların Antimikrobik Maddelere Duyarlılığı, Ankem Dergisi 10(1): 48-51, (1996).

81. FINDIK, D., BAYSAL, B., KALOĞLU, G.: Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen S. aureus suşlarının Metisilin ve Vankomisin Direncinin Araştırılması, Ankam Dergisi, 10(2):84, (1996).

ÖZGEÇMİŞ

1976 yılında Ankara'da doğdum. İlkokul, ortaokul ve lise eğitimimi Ankara'da tamamladım. Ankara Üniversitesi Sağlık Hizmetleri M.Y.O.'nu 1996 yılında bitirdim. Erciyes Üniversitesi Yozgat Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden 2000 yılında mezun oldum. 2004 yılında Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladım. 2002-2005 yılları arasında SSK Polatlı Hayrettin Erkmen Hastanesinde görev yaptım. Halen Sağlık Bakanlığı Dışkapı Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde görev yapmaktayım.