

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Staphylococcus aureus* SUŞLARINDA KOLONİ MORFOLOJİSİNE,
PİGMENTASYONA ve AMİNOGLİKOZİD DUYARLILIĞINA ISI
FAKTÖRÜNÜN ETKİSİ**

Cansu SEMİZ

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Programı için Öngördüğü
BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

KOCAELİ-2012

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Staphylococcus aureus* SUŞLARINDA KOLONİ MORFOLOJİSİNE,
PİGMENTASYONA ve AMİNOGLİKOZİD DİRENCİNE İSİ
FAKTÖRÜNÜN ETKİSİ**

Cansu SEMİZ

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Programı için Öngördüğü
BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

DANIŞMAN: DOÇ. DR. ZEKİ YUMUK

KAEK Tarih ve Numarası: 10.01.2012-2012/10
Onay no: 1/11 Proje No: 2012/10

Bu çalışma Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu
(Proje No: 2010/ 84) tarafından desteklenmiştir

KOCAELİ-2012

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(Tez Onay Sayfası)


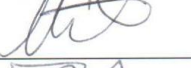
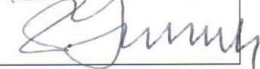
Tez adı: "Staphylococcus aureus suşlarında koloni morfolojisine, pigmentasyona ve aminoglikozid duyarlılığına ısı faktörünün etkisi"

Tez yazarı: Cansu Semiz

Tez savunma tarihi: 15 06.2012

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Zeki Yumuk

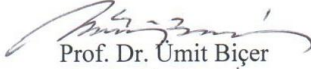
İş bu çalışma Jürimiz tarafından Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Sınavı jüri üyeleri Ünvanı Adı Soyadı		İmzası
Başkan	Prof. Dr. Aynur Yazıcı Karadenizli	
Üye	Prof. Dr. Meltem Ö. Dillioğlugil	
Üye	Doç. Dr. Zeki Yumuk	

ONAY

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

03.07./2012


Prof. Dr. Ümit Biçer
Enstitü Müdürü

ÖZET

Staphylococcus aureus herhangi bir stres ile karşılaştığında, çeşitli adaptasyon mekanizmaları geliştirir. *S.aureus* artan veya azalan ısıya karşı gerekli adaptasyonu sağlayarak, etkili bir şekilde cevap verebilir. *S.aureus*'un bazı fenotipik özellikleri, özellikle aminoglikozid duyarlılıkları, pigment üretmeleri ve koloni morfolojileri soğuk şokuna cevap verirken etkilenmektedir.

Bu çalışmanın amacı, aminoglikozid düzenleyici enzim dışında *S.aureus*'ta aminoglikozid direncine neden olan faktörler arasında ısının rolünü araştırmaktır. Antibiyotik direnciyle pigment varlığı arasındaki ilişkiyi araştırmak bu çalışmanın ikinci, küçük koloni varyantı olan suşlarda soğuk şok proteinlerinin olmaması nedeniyle aminoglikozid direnci ile küçük koloni varyantı arasındaki bağlantı da bu çalışmanın üçüncü amacını oluşturmaktadır. Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı'nda izole edilen 102 MRSA (Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus*) ve 79 MSSA (Metisilin Duyarlı *Staphylococcus aureus*) suşu; mannitol salt agara ekildi ve 37°C'de 20 saat inkübe edildi. *S.aureus* suşları; koloni morfolojileri, Gram boyama özellikleri, katalaz testi ve DNaze test sonuçlarına göre tanımlandı. *S.aureus* suşlarının aminoglikozid duyarlılıkları disk difüzyon testi ile belirlendi. Test edilecek *S.aureus* suşları 15 ml'lik triptik soy sıvı besiyerine inoküle edilerek; 37°C'de 20 saat inkübe edildi. Takriben her suş üç eşit parçaya ayrılarak her biri farklı sıcaklıklarda (15°C, 37°C ve 42°C) 1 saat inkübe edildi. Bu ön işlemin sonrasında *S.aureus* suşlarının aminoglikozid MİK değerleri agar dilüsyon yöntemi ile belirlendi. Farklı sıcaklıklardaki 1 saat inkübasyon sonrası pigment seviyeleri ise metanol ekstraksiyon yöntemi ile belirlendi. *S.aureus* suşları % 5 koyun kanlı agara ekildi ve küçük koloni özelliği gösteren, hemoliz olmayan, pigmentasyonu az ve küçük koloni morfolojisindeki suşlar arandı.

Yapılan soğuk ve sıcak şokunun ardından, *S.aureus* suşlarının aminoglikozid MİK (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu) değerlerinde ufak değişimler gözlemlense de duyarlılık sınırlarında değişim olmadı. *S.aureus* 1 saatlik 42°C'de inkübasyon sonucu daha az pigment ürettiği görüldü. Isının pigment üzerine bir etkisi olduğu görüldü fakat aminoglikozid duyarlılığına etkisi saptanmadı. *S.aureus*'u 1 saatten daha fazla şoka maruz bırakmak gerektiği düşünüldü. Çevresel faktörlerin *S.aureus* üzerindeki etkisi göz ardı edilmemeli ve bu konuda çalışmalar çoğaltılmalıdır.

Anahtar kelimeler: Aminoglikozid, Pigment, *S.aureus*, Soğuk şoku

ABSTRACT

When *S.aureus* encounters stress, it develops some kind of adaptation mechanisms. *S.aureus* can respond effectively by providing required adaptation against of increasing or decreasing heat. Some of the phenotypic characteristics of *S.aureus*, especially susceptibility of aminoglycoside, pigment production and colony morphology are being affected while responding to cold shock.

The purpose of this study is to investigate the role of heat among the factors which causes aminoglycoside resistance except for aminoglycoside modifying enzyme. Second purpose of this study is to investigate the connection between the antibiotic resistance and presence of pigment and in addition to them third purpose is to investigate the connection between aminoglycoside resistance and small colony variant due to lack of cold shock proteins in the small colony variant strains. 102 MRSA and 79 MRSA which are isolated in Kocaeli University Centre Laboratory; mannitol salt agar was inoculated and incubated at 37°C for 20 hours. *S.aureus* was thought that can ferment mannitol. *S.aureus* strains were identified according to gram stain characteristics, colony morphology, catalase test and DNase test result. Aminoglycoside susceptibility of *S.aureus* strains were identified by using disk diffusion method. Cells were inoculated in triptik soy broth and incubated at 37°C for 20 hours. Strain was divided into three parts which are 5 ml and they were incubated at different temperatures 15°C, 37°C, 42°C for 1 hour. After this pretreatment aminoglycosides MIC values of *S.aureus* strains were determined by agar dilution method. Pigment levels after 1 hour incubation at different temperatures were determined by methanol extraction method. *S.aureus* strains were inoculated to % 5 sheep blood agar and strains in small colony morphology were searched which are without hemolysis, show small colonies characteristic and have less pigmentation.

After cold and heat shock, although small changes were observed in the MIC values of aminoglycoside, border of susceptibility did not change. It was observed that incubation of *S.aureus* for 1 hour at 42°C caused less pigment production. Effect of temperature on pigment production was demonstrated but effect of temperature on aminoglycoside susceptibility was not demonstrated.

Effect of environmental factors on *S.aureus* shouldn't be ignored. Investigations about the effect of environmental factors on *S.aureus* should be increased.

Key words: Aminoglycoside, Pigment, *S.aureus*, cold

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda her türlü yardımını ve desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam, Doç. Dr. Zeki Yumuk'a teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimime başladığım andan itibaren ilgisini her zaman gösteren değerli hocam Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Aynur Y. Karadenizli'ye,

Yüksek Lisans eğitimim boyunca eğitimim için yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Doç. Dr. Fethiye Kolaylı, Doç Dr. Sema Özcan Keçeci, Doç Dr. Fatma Budak, Doç. Dr. Gülden Sönmez Tamer ve tez çalışmamda kullandığım suşların temininde bana yardımcı olan Doç. Dr. Devrim Dünder'a;

Tez çalışmamda, polimeraz zincir reaksiyonunda kullanmak için pozitif kontrol teminini sağlayan Ankara Üniversitesi, Veterinerlik Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim görevlisi, Doç. Dr. Barış Sareyyüpoğlu'na;

Tez çalışmalarımın moleküler deney aşamalarında bilgisini benden esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Murat Kasap'a,

Tez çalışmamın moleküler deney aşamasında her türlü yardımı sağlayan; bunun yanında lisans hayatımdan beri benden her türlü bilgisini, desteğini, ilgisini ve sevgisini esirgemeyen, hem çalışma arkadaşım hem ablam çok değerli Arş. Gör. Sinem Torol'a;

Tez çalışmalarım sırasında bana her türlü manevi desteği veren, yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Uzm. Bio. Gözde Yazıcıoğlu'na, ve Uzm. Bio. Sema Kurnaz'a, Uzm. Bio. Begüm Alyürük'e;

Teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Yüksek lisans eğitimime başladığım ilk günden itibaren desteğini, yardımını, ilgi ve sevgisini esirgemeyen nişanlım Emrah Urhan'a,

En çok kahrımı çeken canım anneciğim; Nermin Semiz'e ve canım aileme ayrıca çok teşekkür ederim.

Biyolog Cansu Semiz

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Stafilokokların Sınıflandırılması ve Morfolojik Özellikleri	3
2.2. Stafilokokların Mikrobiyolojik Olarak Tanımlanması	5
2.3. Stafilokokların Klinik Önemi.....	9
2.4. <i>Staphylococcus aureus</i> 'un Hastalık Yapıcı Özellikleri	12
2.5. <i>Staphylococcus aureus</i> 'un Strese Karşı Direnci	18
2.6. Aminoglikozidler.....	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1. Çalışma Grubu.....	23
3.2. Mikrobiyolojik Olarak Tanımlama.....	23
3.3. Pigment Seviyesi Ölçümü	24
3.4. Aminoglikozid Duyarlılık Testleri	24
3.4.1. McFarland Bulanıklık Çözeltilerinin Hazırlanması	25
3.4.2. Disk Difüzyon Testi.....	25
3.4.3. Agar Dilüsyon Metodu	25
3.5. Aminoglikozid Modifiye Edici Enzim Genlerinin Varlığının Saptanması	27
3.5.1. DNA İzolasyonu.....	27
3.5.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR, Polimeraze Chain Reaction)	28

3.5.3.	Agaroz Jel Elektroforezi	29
3.5.4.	Küçük Koloni Varyantın Tespit Edilmesi	30
3.5.5.	İstatistiksel Analiz	30
4.	BULGULAR.....	31
4.1.	Çalışılan <i>Staphylococcus aureus</i> Suşları ve Hasta Bilgisi:.....	31
4.2.	<i>Staphylococcus aureus</i> 'un Pigment Özelliği	33
4.3.	MRSA ve MSSA Suşlarının Aminoglikozid Duyarlılıkları	34
4.4.	Aminoglikozid Modifiye Edici Enzim Genlerinin Varlığı	38
4.5.	Küçük Koloni Varyant Özelliği	44
5.	TARTIŞMA.....	45
6.	SONUÇLAR VE ÖNERİLER	52
	KAYNAKLAR	53
	ÖZGEÇMİŞ	57

SİMGELER VE KISALTMALAR

AAC	Asetiltransferaz
AM	N-acetylmuramyl-L-alanine-amidase
AME	Aminoglikozid Modifiye Edici Enzim
ANT	Nükleotidiltransferaz
APH	Fosfotransferaz
CAMP	Christie, Atkins, Munch, Peterson
CLSI	Clinical and Laboratory Standarts Institute
CRF	Coagulase Reaction Factor
CSP	Cold Shock Protein
EDP	Energy Dependent Phase
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
FAME	Fatty Acid Modifiying Enzyme
GISA	Glikopeptid orta duyarlı <i>Staphylococcus aureus</i>
GL	N-acetylglucosaminidase
GRSA	Glikopeptid dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
IgG	İmmünglobulin G
MHA	Mueller Hinton Agar
MHC	Major Histokompatibilite Kompleks

MİK	Minimum inhibisyon konsantrasyonu
MRSA	Metisilin Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
MSCRAMM	Microbial surface component reacting with adherence matrix molecules
MSSA	Metisilin Duyarlı <i>Staphylococcus aureus</i>
OD	Optik Dansite
PBP	Penisilin bağlayan protein
PBS	Phosphate tampon saline
PCR	Polimeraz Chain Reaction
ROS	Reaktif oksijen türleri
SCCmec	Staphylococcal cassette chromosome mec
SCV	Small Colony Variant
TBE	Tris Borik asit-EDTA
TSST-1	Toksik Şok Sendromu Toksini-1
U	Unit
VISA	Vankomisin orta duyarlı <i>Staphylococcus aureus</i>
VRSA	Vankomisin Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1: Exiprep™ Bacteria Genomic DNA Kiti ve Exiprep™ DNA/RNA İzolasyon Cihazı.....	28
Şekil 4.1. <i>aac(6')/aph(2'')</i> Genini İçeren PCR Ürünü Agaroz Jel Görüntüsü.....	43
Şekil 4.2: <i>aph(3')-IIIa</i> Genini İçeren PCR Ürünü Agaroz Jel Görüntüsü.....	43
Şekil 4.3: Amikasin Antibiyotiği Isı Faktörünün Etkisiyle 43 Numaralı MRSA İzolatının MİK Değerinin Değişmesi.....	44

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Gram Pozitif ve Katalaz Pozitif Kokların Farklı Özellikleri	6
Çizelge 2.2. İnsan ve Hayvanlarda Bulunabilen Başlıca Stafilokok Türleri	8
Çizelge 2.3. <i>S.aureus</i> 'un Neden Olduğu İnfeksiyonlar	11
Çizelge 2.4. <i>S.aureus</i> 'un Önemli Virülans Faktörleri.....	13
Çizelge 2.5. <i>S. aureus</i> 'ta Bulunan Aminoglikozid Modifiye Edici Enzimler ve Hedef Aminoglikozidler	22
Çizelge 3.2. Stok Antibiyotik Konsantrasyonları ve Çalışma Miktarları	26
Çizelge 3.3. PCR Reaksiyonunda Kullanılan Primerler	28
Çizelge 4.1. MRSA Suşlarının İzole Edildiği Örnek Çeşidi ve Örneklerin Gönderildiği Bölümler	31
Çizelge 4.2. MSSA Suşlarının İzole Edildiği Örnek Çeşidi ve Örneklerin Gönderildiği Bölümler	32
Çizelge 4.3. MRSA ve MSSA Suşlarının Direnç Profili	33
Çizelge 4.4. Gruplara Göre Pigment Değerleri	33
Çizelge 4.5. MRSA Suşlarının Amikasin MİK Değerlerinin 15°C, 37°C ve 42°C' ye Göre Dağılımları.....	35
Çizelge 4.6. MRSA Suşlarının Gentamisin MİK Değerlerinin 15°C, 37°C ve 42°C'ye Göre Dağılımları.....	36
Çizelge 4.7. MRSA Suşlarının Netilmisin MİK Değerlerinin 15°C, 37°C ve 42°C'ye Göre Dağılımları.....	36
Çizelge 4.8. MSSA Suşlarının Amikasin MİK Değerlerinin 15°C, 37°C ve 42°C'ye Göre Dağılımları.....	37
Çizelge 4.9. MSSA Suşlarının Gentamisin MİK Değerlerinin 15°C, 37°C ve 42°C'ye Göre Dağılımları.....	37
Çizelge 4.10. MSSA Suşlarının Netilmisin MİK Değerlerinin 15°C, 37°C ve 42°C'ye Göre Dağılımları.....	38
Çizelge 4.11. AME Varlığının Araştırılması İçin Oluşturulan Gruplar	38
Çizelge 4.12. Stafilokokun Fenotipik ve Genotipik Antibiyotik Direnç Profilleri	40
Çizelge 4.13. PCR Yapılan Suşların Aminoglikozidlere Farklı Sıcaklıklardaki MİK Değerleri ve Aminoglikozid Modifiye Edici Enzim Genleri Varlığı.....	41

1. GİRİŞ

Bakteriler, ısı, pH, besin azlığı veya ozmotik basıncın değişmesi gibi çeşitli çevresel faktörlerden dolayı strese maruz kalabilmektedir. Maruz kalınan stres faktörleri nedeniyle birçok bakteri yaşamını yitirebildiği gibi, bazıları da adaptasyon mekanizmaları geliştirerek canlılığını devam ettirebilmektedir. Bu süreçte yaşamayı başaran mikroorganizma yeni özellikler kazanmaktadır. Kazanılan bu özellikler, stres ortamıyla baş etmesini sağlayacak kadar güçlü olduğundan, mikroorganizmanın da virülansına katkıda bulunmaktadır (Ulus ve Tezcan, 2001).

Staphylococcus aureus strese karşılaştığında, çeşitli adaptasyon mekanizmaları geliştirmektedir. Strese karşı *S.aureus*'un cevabı, son zamanların araştırma konularının başında gelmektedir. *S.aureus* normalde en iyi 37°C'de üremektedir, ancak farklı ısılarda da *S.aureus*'un yaşamayı başardığı bilinmektedir; örneğin buzdolabı ısısında yaşamakta ve gıda zehirlenmelerine neden olmaktadır. *S.aureus*, soğuk şoku proteinleri (CSP) üreterek azalan ısıya karşı direnebilmekte ve bazen de bu protein aracılığıyla yeni bir takım özellikler kazanabilmektedir. *S.aureus*, CspA, CspB ve CspC adı verilen soğuk şok proteinleri üretir. En çok eksprese edilen protein ise CspB'dir. *S.aureus*'un maksimum pigment üretimi için soğuk şok proteini olan CspA ya gereksinim duymaktadır. Yapılan çalışmaya göre *cspA* geni negatif suşlarda pigment üretiminin azaldığı görülmüştür. (Katzif et al., 2005).

Soğuk adaptasyon mekanizmasının önemli bir kısmı stoplazmik hücre zarı seviyesinde gerçekleşmektedir. Sıcaklık, biyolojik hücre zarların kompozisyonu, organizasyonu ve fonksiyonunda çok önemli bir rol oynamaktadır. Soğuk şoku ile hücre zarı, normal işlevini sürdürebilmek için kompozisyon, organizasyon ve fonksiyonunda değişimler meydana getirmektedir. Örneğin; hücre zarı kendi doymamış yağ asit kompozisyonlarını çevresel sıcaklıklardaki değişimlere göre ayarlamaktadır. Hücre zarı yapısındaki değişiklikler özellikle solunum ve taşımada görevli proteinlerin fonksiyonunu etkileyerek meydana gelir. Sıcaklık düştükçe hücre zarı akışkanlığı azalmaktadır ve hücre zarı akışkanlığının değişmesi hücre fonksiyonlarının değişmesine sebep olur. Bu durum, antibiyotiklerin hücre içerisine taşınmasında kullanılan mekanizmaları etkilemekte ve bakterinin antibiyotiğe direnç kazanmasını sağlamaktadır.

S.aureus'un aminoglikozidlere direnci başlıca 2 mekanizmayla meydana gelmektedir: Bunlar hücre zarı geçirgenliğinin azalması ve aminoglikozid düzenleyici enzimlerdir.

Ribozomal proteinleri kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonlar da *S.aureus*'un aminoglikozidlere dirençli olmasını sağlamaktadır ancak çok nadir görülen bir direnç mekanizması olduğu için sınıflandırılmaya çoğu zaman alınmamaktadır. Hücre zarı geçirgenliğinin azalmasının, bakterinin soğuğa maruz kalması sonucu meydana gelen bir direnç mekanizması olabileceği düşünülmektedir. Aminoglikozidlere dirençli olan *S.aureus*'un bazılarında aminoglikozid düzenleyici enzim bulunmaması ve bakterinin dış ortam koşullarında direnç geliştirmesi bu düşüncenin temelini oluşturmaktadır.

Bu çalışmanın amacı, aminoglikozid düzenleyici enzim dışında *S.aureus*'ta aminoglikozid direncine neden olan faktörler arasında ısının rolünü araştırmaktır. *S.aureus* suşlarının bazıları pigment üretmekte bazıları ise diğerlerine göre besiyerlerinde küçük koloniler oluşturmaktadır; pigment üretimi ve küçük koloni varyantının virülans ile bağlantısı olabileceği düşünülmektedir. Pigmenti olmayan suşların soğuk şok proteinlerinde görülen azalma, pigmentin ısı ile ilişkisini gösteren bir kanıt olmasından dolayı, antibiyotik direnciyle pigment varlığı arasındaki ilişkiyi araştırmak bu çalışmanın ikinci amacını oluşturmaktadır. Küçük koloni varyantı olan suşlarda soğuk şok proteinlerinin olmaması, aminoglikozid direnci ile küçük koloni varyantı arasındaki bağlantı da bu çalışmanın üçüncü amacıdır.

Bu çalışmayla birlikte, bakterilerin antibiyotiklere direnç geliştirmesinde yanlış kullanımın dışında çevresel faktörlerin de etkin olabileceğinin gösterilmesi hedeflenmiştir. Bu durumda antibiyotik direnç mekanizmalarının araştırılmasında çevresel faktörlerin de göz önüne alınması gerekecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Stafilocokların Sınıflandırılması Ve Morfolojik Özellikleri

Bergey'in Sistematik Bakteriyoloji kitabının 1986 yılı baskısında belirtildiğine göre, Micrococcaceae ailesinde dört cins bakteri vardır: *Planococcus*, *Micrococcus*, *Stomatococcus* ve *Staphylococcus*. Yapılan genetik çalışmalara (DNA ribozomal RNA hibridizasyonu, 16S ribozomal RNA sekanslaması) ve kemotaksonomik analize (hücre duvar yapısı, hücredeki yağ asitleri) göre bu dört cins bakterinin farklı olduğu ve aynı ailede yer almaması gerektiği gösterilmiştir. Planokok ve stafilocok *Bacillus*/*Lactobacillus*/*Streptococcus* evrimsel gelişim çizgisinde yer almaktadır, ancak mikrokok ve stomatokok miçelsiz aktinomiçe grubunda yer almaktadır. *Bergey*'in Sistematik Bakteriyoloji kitabının 2000 yılı baskısında, stafilocoklar *Firmicutes* Şubesi, 1'nci Genus, 5'nci Aile ("*Staphylococcaceae*"), 1'nci Takım (*Bacillales*), 3'ncü Sınıf "Bacilli" da yer almıştır. Aynı Aile'de *Gamella*, *Macorococcus* ve *Salinicoccus* yer alır (Koneman et al., 2006).

Stafilocoklar ilk defa 1878 yılında Robert Koch tarafından keşfedilmiştir, Pasteur 1880 yılında stafilocokları sıvı besiyerinde üretmeyi başarmıştır. Alexander Ogston, 1881 yılı, üzüm salkımına benzettiği için bu mikroorganizmalara stafilocok adını vermiş (Grekçe; staphyle = üzüm salkımı); insanlarda abselere sebep olduğunu, fare ve kobaylar için stafilocokların patojen olduğunu göstermiştir. 1884'te Rosenbach tarafından hastalık örneklerinden soyutlanmış ve *Staphylococcus* cinsini *aureus* ve *albus* diye iki türe ayırmıştır (Cengiz, 1999). Stafilocoklar bu dönemde çok ağır seyreden, tedavisi güç, ölümcül infeksiyonlara neden olmaktadır. Penisilin bulunmasından sonra stafilocokların neden olduğu infeksiyonların tedavisinde belirgin bir ilerleme sağlanmıştır. Ancak 1944'te ilk önce hastanelerde, daha sonrasında toplumda penisilin dirençli stafilocoklar tespit edilmiştir. Daha sonra penisiline dirençli stafilocoklar yaygınlaşmış ve neredeyse penisilin stafilocokların neden olduğu infeksiyonları tedavi edemez olmuştur. Penisiline dirençli stafilocok infeksiyonlarının tedavisinde kullanılmak üzere 1960'lı yıllarda metisilin adı verilen yeni bir antibiyotik geliştirilmiştir (Lowy, 2003). Metisilin yarılanma ömrü kısa olduğu için klinikte ve laboratuvarında kullanımı çok sınırlı kalmıştır. Bunun yerine penisilinaza dirençli başka penisilinler geliştirilmiştir. Bunlardan oksasilin, daha stabil bir molekül olduğu için laboratuvarında metisilin direncini belirlemek amacıyla kullanılmaya başlanmıştır. Bol miktarda beta laktamaz içeren ve bu nedenle in-vitro testlerde oksasiline

dirençli bulunan (MİK [minimum inhibisyon konsantrasyonu]= 4 µg/ml) suşlara sınırda pozitif suşlar adı verilir. Sınırda pozitif suşlar genelde kullanılan antibiyotiklere duyarlıdır. Penisilin bağlayıcı proteinde değişiklik meydana gelmiş olan suşlarda oksasiline yüksek seviyede direnç vardır ve aynı zamanda diğer birçok antibiyotiğe dirençlidir. Oksasiline dirençli olan bütün stafilokoklar penisilinler, sefolosporinler ve karbopenem antibiyotiklere dirençli olarak bildirilmek zorundadır (CLSI, 2011). Bu gibi olgularda tedavide tercih edilecek antibiyotikler sınırlıdır. Bunlardan en önemlisi vankomisindir. Vankomisine dirençli *S.aureus* ilk defa 2002 yılında bildirilmiştir. Vankomisine duyarlılığı azalmış olan suşlara VISA, vankomisine direnç geliştirmiş suşlara da VRSA adı verilmektedir. Vankomisin dışında diğer glikopeptidler de tedavide kullanılabilirdiği için GISA (glikopeptid orta duyarlı *S.aureus*) veya GRSA (glikopeptid dirençli *S.aureus*) kısaltmalar da tercih edilebilmektedir

Stafilokokların hücre duvarı tipik olarak Gram pozitif bakterilerin hücre duvarı özelliklerini taşımaktadır. Elektron mikroskopunda 20-40 nm kalınlığında, homojen bir yapı olarak görülür. Peptidoglikan 3 glikan zinciri tekrarlayan N-asetilmuramik asit ve N-asetilglikozamin moleküllerinden oluşmaktadır. N-asetilmuramik asitten dallanan tetrapeptidler pentaglisin köprüleriyle bağlanır. Stafilokoklarda amidaz, glukozamin ve endopeptidaz adı verilen üç adet hidrolaz enzimi vardır, hidrolazlar peptidoglikana bağlı halde bulunur. Hücre duvarında çapraz bağlanmayı penisilin bağlayıcı proteinler (PBP) olan transpeptidazlar katalizler. Stafilokoklarda dört adet PBP vardır ve bunlar *Escherichia coli*'de bulunan PBP'lerden farklı fonksiyon görmektedir. Beta-laktamlara maruz kalan bir stafilokokta, PBP1 hücrenin yaşaması açısından en önemli fonksiyonu görür. PBP4 sekonder çapraz bağlanmadan sorumludur. PBP-2a stafilokoklarda metisilin direncinin oluşmasından sorumludur. Stafilokok peptidoglikanlarının diğer bir özelliği muramik asitlerinin ko asetilasyonudur. Bu özelliği sayesinde stafilokokların hücre duvarı lizozimin tahrip edici özelliğinden çok az etkilenir. Stafilokok hücrelerinin ağırlığının, % 50 kadarını teikoik asit oluşturur. Teikoik asit muramik asite fosfodiester bağı ile bağlanmış polimerlerdir. Bu polimerler ribitol fosfat ünitelerinin oluşturduğu uzun zincirlerdir. Teikoik asitte bulunan ester bağı içeren D-alanin ribitol fosfat ünitesi ile yer değiştirmesi otolitik enzim aktivitelerini arttırmaktadır. *S.aureus*'ta üç farklı otolitik enzim vardır: N-asetil glikoz aminidaz, N-asetil muramidaz ve endopeptidaz. Bu otolitik enzimler bakterinin bölünmesi ve sonra da ayrılması için gereklidir. Stafilokokların iki adet hücre duvarı litik enzimi vardır: AM (N-acetylmuramyl-L-alanine-amidase) ve GL (N-acetylglucosaminidase). Bu enzimler kümelenmeyi engelleyici fonksiyon görür. Koklar

bölündükten sonra streptokokta olduğu gibi çift ve zincir oluşturabilir. Diğer koklarda (örn: *Pedicoccus*) bölünmeden sonra dört hücre bir düzlemde bir arada bulunur. Stafilokokların bu tariflere tam olarak uymadığı düşünülmektedir. Çünkü stafilokok hücrelerinin bölünmesi üreme koşullarından etkilenmektedir. Örneğin spermin varlığında bakteri hücrelerinin çapı gittikçe artar. Triton-X 100 bakteri hücrelerinin enine doğru büyümesine neden olur. Stafilokokların ayrışmasında etkili olan kimyasal koşullar tam olarak bilinmemekle birlikte teikoik asit benzeri materyalin, lipoteikoik asitin, bu sistemle ilişkisi olduğu düşünülmektedir. Stafilokokların bölünmesi kendine özgü bir özellik taşır. Koşullar zor dahi olsa stafilokok geliştirmiş olduğu bir sistem aracılığıyla bölünen yeni hücrelerin birbirinden ayrılmasını sağlamaktadır. Koşullara göre litik veya mekanik mekanizmalardan biri devreye girer. Stafilokoklar hızlı üreme gösterdiklerinde hücrelerin birbirinden ayrılmasını litik tip mekanizma sağlar. Diğer koşullarda murozom aracılığıyla hücreler mekanik olarak birbirinden ayrılır. Bölündükten sonra hücreler birbirinden ayrılmasının engellenmesi durumunda ‘psödomultiselüler bakteri’ oluşmaktadır. Hücrelerin ayrışmasını engelleyen koşullar arasında antibiyotikler, çok çeşitli elektrolitler, iki değerlikli kationlar, hücre duvarının otolizisinin engellenmesi ve genetik manipülasyon yer alır. Yapılan çalışmalarda düşük doz kloramfenikolün psödomultiselüler stafilokokların oluşmasına yol açtığı görülmüştür. Ortamdan kloramfenikol temizlendiğinde veya psödomultiselüler stafilokok temiz bir ortama aktarıldığında bu durumun ortadan kalktığı gösterilmiştir. Bu da hücre ayrılması inhibisyonunun geri dönüşümlü bir işlem olduğunu göstermektedir (Giesbrecht et al., 1998).

2.2. Stafilokokların Mikrobiyolojik Olarak Tanımlanması

Stafilokoklar % 5 koyun kanlı ve çikolatamsı agarda ürer. Mac Conkey agarda ise üremez. Thioglikat ve Brain Heart Infusion gibi sıvı besiyerlerinde kolay üremektedir. Stafilokokları klinik materyallerden izole edebilmek için selektif besiyerleri kullanılabilir. Bu amaç için en sık mannitol salt agar kullanılmaktadır. Mannitol salt agarın içerisinde yüksek konsantrasyonda tuz (% 10), mannitol, pH indikatörü olarak fenol kırmızısı vardır. *S.aureus* yüksek tuz konsantrasyonunda üreyebilmektedir. Mannitolü fermente edebildiğinden mannitol salt agarda etrafı sarı bir halo ile çevrili koloniler oluşturur. Bakterinin % 5 koyun kanlı ve çikolatamsı agarda gözle görülür bir koloni oluşturabilmeleri için 35°C’de 18-20 saat inkübe edilmesi gerekir. Mannitol salt agar ve diğer selektif besiyerlerinde gözle görülür bir koloninin oluşabilmesi için en az 48-72 saat gerekmektedir. *S.aureus* % 5 koyun kanlı agarda orta/büyük, kenarları düz, hafif kabarık

bir koloni oluşturmaktadır. Kolonilerin bir kısmında kremi sarı pigment görülür. Bazıları beta hemoliz oluşturur. *S.epidermidis* küçük/ orta grimsi beyaz koloni oluşturur, birçoğu hemoliz yapmaz, biyofilm oluşturan suşlar çok yapışkan olduğu için agarın yüzeyinden ayırmak zor olur. *S. saprophyticus* büyük koloni yapar, koloniler genellikle beyaz olur nadiren de olsa bazıları sarı veya turuncu görülebilir. *S.aureus* dışında örneğin *S. saprophyticus* mannitolu fermente edebildiğinden mannitol salt agarda *S.aureus*'a benzer bir görüntü oluşturabilir. Buna dikkat edilmesi gerekmektedir (Bailey and Scott's, 2002). Stafilkokların diğer Gram pozitif koklardan ayırt edilmesinde kullanılan laboratuvar testleri Çizelge 2.1'de (Bailey&Scott's, 2002) özetlenmiştir. Psödokatalaz reaksiyonu katalaz pozitif gibi bir görüntüye neden olduğundan dikkat edilmesi gerekir. Çizelge 2.1'e, *Aerococcus*, *Enterococcus* ve *Rothia* gibi bakteriler psödokatalaz reaksiyonu oluşturduğundan eklenmiştir. Gram pozitif, katalaz (veya psödokatalaz) pozitif ve kok olan bir bakterinin tanımlanması için ek bazı testlerin yapılması gerekmektedir: oksijen konsantrasyonu, 0,04 U (Unit) Basitrasin'e ve Furozolidon'e direnç, mikrodaz (modifiye oksidaz) testi ile sitokrom c'nin varlığının belirlenmesi. Rutin sonuç veren klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında, yukarıda bahsedilen testler genellikle yapılmamaktadır, bunun yerine, kültürde stafilkoka benzer bir koloni görüldüğünde Gram boyama işleminden sonra, ilk katalaz testi yapılmaktadır. Gram pozitif ve katalaz pozitif olan suşa ikinci olarak koagülaz testi yapılarak kısa sürede sonuç verilmesi tercih edilebilir (Bailey&Scott's, 2002).

Çizelge 2.1. Gram pozitif ve katalaz pozitif kokların farklı özellikleri

Organizma	Katalaz	Mikrodaz (modifiye oksidaz)	Oksijen ile ilişkisi	Basitrasin (0,04 U) ^a	Furazolidon (100 µg) ^a	Lizostafin (200µg/ml)
<i>Staphylococcus</i>	+ ^b	- ^c	FA	R	S	S
<i>Micrococcus</i>	+	+	A ^d	S	R	R ^e
<i>Rothia</i>	±	-	FA	R veya S	R veya S	R
<i>Aerococcus</i>	- ^f	-	FA ^g	S	S	R
<i>Enterococcus</i>	- ^f	-	FA	R	S	R

+ ,suşların ≥90'ı pozitif; ±, suşların ≥90'ı zayıf pozitif; -, suşların ≥90'ı negatif; A, zorunlu anaerob; FA, fakültatif anaerob veya mikroaerofilik; R, dirençli; S, duyarlı.

^a basitrasin için duyarlılık ≥10 mm; furazolidon için duyarlılık ≥15 mm.

^b *S.aureus* subsp. *anaerobius* ve *S.saccharolyticus* katalaz negatif ve zorunlu anaerob.

^c *S. sciuri*, *Micrococcus caseolyticus*, *S.lentus* ve *S.vitulus* mikrodaz pozitif.

^d *Kocuria (Micrococcus) kristinae* fakültatif anaerob.

^e *Micrococcus*, *Arthrobacter (Micrococcus) agilis* ve *Kocuria* suşlarının bazıları lizostafine duyarlı

^f bazı suşlar yalancı katalaz reaksiyonu gösterebilir.

^g bazı suşlar anaerobik olarak üreyemeyebilir.

Stafilokokların kesin tanısı için Çizelge 2.1'de gösterilen testlerin yapılması önerilmektedir. Mikrodaz testi için kullanılan mikrodaz diski ticari olarak satılmaktadır. Kısaca, bakteri 18-24 saat kültürü yapıldıktan sonra mikrodaz diskin üzerinde sürülerek işlem başlatılır. Mikrokok türlerinde mikrodaz testi pozitifdir, bu nedenle diskin üzerinde, bakterinin sürüldüğü yer iki dakika içerisinde maviye döner. Furazolidon ve Basitrasin testleri için, mikrodaz testindeki gibi diskler kullanılmaktadır. Basitrasin içeren 0,04 U'lık diskleri ve 100 µg'lık furozolodin içeren diskler ticari olarak satılmaktadır. Kısaca, daha önceden % 5 koyun kanlı agar yapılmış ekimin üzerine bu diskler yerleştirilip 24 saat inkübasyondan sonra sonuçlar değerlendirilmektedir (Bailey and Scott's, 2002).

Stafilokok olarak identifiye edilen bir suşun, *S.aureus* açısından değerlendirmesi için koagülaz testi yapılır. Koagülaz enzimi olan *S.aureus*, plazma fibronejenine bağlanır ve plazmanın pıhtılaşmasına sebep olan reaksiyonu aktive eder. Bakterilerde iki tip koagülaz bulunmaktadır: bağlı ve serbest koagülaz. Bağlı koagülazın (clumping factor) belirlenmesi için hızlı lam testi yapılır; plazma ile bakteri lam üzerinde karıştırıldığında pıhtılaşma görülmesi testin pozitif olduğunu göstermektedir. *S.aureus* suşlarının geneli (% 85-90) clumping faktor üretir. Suşların % 10-15 kadarında lam koagülaz testi negatif sonuç verebilir. *S.aureus* olduğundan şüphe edilen bir suş bağlı koagülaz negatif ise serbest koagülaz varlığı açısından araştırılmalıdır. Ayrıca, *S.lugdunensis* ve *S.schleiferi* lam koagülaz testi pozitif olabildiğinden serbest koagülaz testi yapılmalıdır (Dündar V. ve Dündar D., 2008). Serbest koagülaz testine tüp koagülaz testi adı da verilir; plazma bulunan bir tüpe bir miktar bakteri inoküle edilir ve 35°C'de 1-4 saat inkübe edildikten sonra enzim varlığında tüpte pıhtılaşma görülmesi, sonucun pozitif olduğunu gösterir. Bazı suşlarda fibrolizin vardır bu nedenle inkübasyondan 4 saat sonra var olan pıhtıları fibrolizin çözebilir. Sonuçların 4 saatten sonra okunması yanlış değerlendirilmesi bakımından önemlidir. Bazı bakteriler sitratı kullanılabildiğinden sitrat içeren plazma yerine EDTA (etilen daimin tetra asetik asit) içeren plazma kullanılması yanlış pozitifliğin önlemek açısından önemlidir. Stafilokokların hızlı tanısında kullanılan; lateks aglütinasyon yöntemiyle clumping factor ve protein A, pasif hemaglütinasyon testi ile clumping factor tespit edilmesi gibi bazı ticari testler vardır. Bu testler çok iyi sonuç vermediğinden artık kullanılmamaktadır. Ticari olarak satılan, DNA problarla *S.aureus*'un moleküler tanımlanması yapılabilmektedir (Bailey and Scott's, 2002).

Çizelge 2.2. İnsan ve hayvanlarda bulunabilen başlıca stafilokok türleri

Staphylococcus	Açıklama
<i>S.aureus</i>	Dış çevrede ve yetişkinlerin % 20-40'ının ön burun bölgelerinde bulunur. Diğer kolonizasyon bölgeleri deri kıvrımları, perine, aksilla ve vajinadır. <i>S.aureus</i> normal insan mikroflorasının bir parçasını oluşturmasına rağmen, uygun şartlar altında önemli fırsatçı infeksiyonlara sebep olmaktadır (Koneman et al., 2006).
<i>S.epidermidis</i>	Normal insan florasında; deri ve mukoz yüzeylerde bulunur (Bailey& Scott, 2002).
<i>S.saprophyticus</i>	Genitoüriner sistemin mukozasında ve derinin normal florasını oluşturur (Bailey& Scott, 2002).
<i>S.haemolyticus</i>	İnsan normal deri florasında bulunur, doğada da yaygındır. Bazı ciddi infeksiyonlara neden olur (Koneman et al., 2006).
<i>S.warneri</i>	Normal insan florasında bulunan stafilokokların % 1 ini oluşturur. Katatere bağlı bakteremi yapar. Lipaz ve fosfolipaz aktivitesi olan enzim sahiptir (Koneman et al., 2006).
<i>S. hominis</i>	İnsan derisinde bulunur. Bağışıklığı düşük hastalarda katatere bağlı sepsise neden olur (Koneman et al., 2006).
<i>S.simulans</i>	Sağlıklı kadınların derisinde ve üretrasında bulunur. Bazı infeksiyonlara yol açtığı gözlenmiştir. Fozoziti önleyen kapsülü vardır (Koneman et al., 2006).
<i>S.lugdunensis</i>	İnsanlar inguinal bölgesinde kolonize olur. Başlıca pelvik bölgesinde meydana gelen abselere yol açar. Alfa ve sigma hemolizin lipaz ve esteraz gibi virulans faktörlere sahiptir (Koneman et al., 2006).
<i>S.schleiferi</i>	İnsanda bazı hastalıklara sebep olur. Köpeklerde eksternal otite neden olur. Glikokoliks, lipaz, esteraz ve hemolizin gibi bir takım virulans faktörlere sahiptir (Koneman et al., 2006).
<i>S.capitis</i>	İnsan normal florasında özellikle saçlı deride, kıl diplerinde bulunur. Endokardite neden olabilir. Neotanal yoğun bakım ünitesinde yatan hastalardan heteroresistan vankomisine dirençli suşlar elde edilmiştir (Koneman et al., 2006).
<i>S.auricularis</i>	İnsan dış kulak yolunda bulunur ve infeksiyona çok nadir neden olmaktadır (Koneman et al., 2006).
<i>S.pasteuri</i>	İnsan ve hayvan klinik örneklerinden ve gıdalardan izole edilmiştir. İnfeksiyonla bir bağlantısı henüz gösterilememiştir (Koneman et al., 2006).
<i>S.caprae</i>	Keçi sütünde özellikle bulunur. Yakın zamanda dermatiti olan bir hastadan izole edilmiştir. Diğer bazı infeksiyonlara da neden olduğu bilinmektedir. Biofilm yapar (Koneman et al., 2006).
<i>S.cohnii</i>	İnsandan ve hayvandan izole edilmiştir. Normal florada bulunur. Yenidoğan sepsisi ve menenjitine sebep olduğu bildirilmiştir (Koneman et al., 2006).
<i>S.xylosus</i>	İnsan ve hayvanların üriner sistemlerinde infeksiyona neden olduğu bildirilmiştir. İmmün yetmezliği olan hastalarda da çeşitli infeksiyonlara neden olmaktadır (Koneman et al., 2006).
<i>S.saccharolyticus</i>	İnsan mukozasında bulunmuştur. İki olguda endokardite neden olduğu gösterilmiştir (Koneman et al., 2006).

2.3. Stafilokokların Klinik Önemi

Stafilokoklar, Gram pozitif koklardır; hareketsiz, sporsuz ve katalaz pozitifdir. Sıvı besiyerinde, tek hücre, çift hücre, tetrat veya kısa zincir yapabilir. Fakat genel olarak üzüm salkımı görünümündedir. *S.aureus subsp. anaerobius* ve *S.saccharolyticus* dışındakiler fakültatif anaerobtur. Bu iki tür anaerob olarak ürer ve fakültatif türlerden ayrı olarak genellikle katalaz negatiftir. Stafilokoklar insan ve hayvan derisinde ve mukoza hücre zarında bulunur. *S.capitis* primer olarak insan derisinin normal florasında ve kafa derisindeki sebasöz bezlerde, *S.aureularis* ise primer olarak dış kulak yolunda bulunur. Bazı türler sadece hayvanlarda bulunur. Stafilokoklar insanlara hayvanlarla yakın temas sonucu geçmektedir. Stafilokoklar arasında koagülaz pozitif olan tek tür *S.aureus*'tur. Bunun dışında koagülaz negatif olan *S.epidermidis* ve *S.saprophyticus* da insandan sıklıkla enfeksiyona neden olmaktadır. Çizelge 2.2'de insan ve hayvanda bulunan başlıca stafilokok türleri özetlenmiştir. Bu tablonun dışında *S.intermedius*, *S.hyicus* ve *S.sciuri* gibi sadece hayvanda bulunan stafilokok türleri de vardır (Koneman et al., 2006).

S.aureus, stafilokoklar arasındaki en önemli insan patojenidir. *S.aureus*, yetişkinlerin % 20-40 kadarında burun deliklerinin ön kısmında bulunur. Diğer kolonize olduğu yerler arasında deri kıvrımları, perine, aksilla ve vajina vardır. *S.aureus* normal insan florasının bir parçası olmasına rağmen bazı koşullarda ciddi hastalıklara neden olabilen fırsatçı bir enfeksiyon ajanı özelliği kazanmaktadır.

S.aureus'un fırsatçı enfeksiyon oluşturmaya yol açan faktörler:

- Konjenital (örn; Wiskott-Aldrich sendromu, Down sendromu, Job sendromu, Chediak-Higashi sendromu) veya kazanılmış (örn; Diabetes mellitus ve romatoid artrit) lökosit kemotaksis defekti
- Konjenital veya kazanılmış hipogamaglobulinemi veya kompleman eksikliği (özellikle C3 ve C5) hastalıklarına bağlı olarak opsonizasyon defektinin meydana gelmesi
- Fagositozdan sonra bakterinin hücre içerisinde öldürme mekanizmalarında problem olması. Bu problemin kaynağı peroksidaz ve süperoksidaz enzimlerinin vakuolde bulunmamasından kaynaklanmaktadır (örn; kronik granümatöz hastalık, lenfoblastik lösemi)
- Deri yaralanmaları (yanık, cerrahi insüzyon, egzema)
- Yabancı cisim varlığı (sütür, intravenöz, katater, protez)

- Virüs gibi diğer ajanlarla infeksiyon (örn; Influenza)
- Kansere, alkolizm ve kalp hastalığı gibi kronik altta yatan bir hastalığın varlığı
- Tedavi veya koruma için kullanılan antibiyotikler (Koneman et al., 2006).

S.aureus, fırsatçı infeksiyon dışında gerçek infeksiyona da neden olmaktadır. Yumuşak doku infeksiyonları gibi basit deri infeksiyonlarından; endokardit, menenjit, haşlanmış deri sendromu, toksik şok sendromu, stafilokokal besin zehirlenmesi gibi hayatı tehdit edici ciddi infeksiyonlara kadar çok çeşitli hastalıklara sebep olmaktadır (Mandell et al., 2005). Çizelge 2.3'de *S.aureus*'un neden olduğu infeksiyonlar özetlenmiştir.

Çizelge 2.3. *S.aureus*'un neden olduğu infeksiyonlar

İnfeksiyon	Açıklama	Kaynak
Folikülit	Sistemik belirti vermeyen ağrılı, küçük, hiperemi ile karakterize saçlı deride lokalize infeksiyonlardır.	(Mandell et al., 2005)
Fronkül ve Karbonkül	Fronkül, ağrılı, sert ve ortası nekrozlu bazen püy de içeren derinin alt tabakalarını tutan lezyonlardır. Karbonkül ise subkütan dokuyu da içine alan daha derin lezyonlardır. Birkaç lezyon bir araya gelerek subkütan sinüs yollarını oluşturabilir. Karbonkülde sistemik belirti görülebilir.	(Mandell et al., 2005)
İmpetigo	Daha çok çocuklarda görülen yüzeysel infeksiyondur. Yüz gibi açık yerlerde daha çok görülür. İmpetigonun % 80-90 kadarından <i>S.aureus</i> sorumludur. Geri kalan kısmını ise beta hemolitik streptokoklar yapmaktadır. Her iki mikroorganizmanın neden olduğu impetigo klinik olarak ayırt edilemez.	(Dündar V. ve Dündar D., 2008)
Mastit	Çocuğunu emziren kadınların memelerinde meydana gelen bir infeksiyondur. Tedavisinde drenaj ve uzun süre antibiyotik kullanılır.	(Dündar V. ve Dündar D., 2008)
Yara infeksiyonu	Stafilokokların neden olduğu yara infeksiyonlarının çoğu cerrahi sonrası gelişmektedir. Yabancı cisim varlığı semptomların artmasına neden olur. Bazı koşullarda debritleme yapılması gerekir.	(Dündar V. ve Dündar D., 2008)
Bakteriyemi ve endokardit	Bakteriyemi, başka bir infeksiyona (abse, ülser, yanık, pnömoni) sekonder veya katater gibi bazı cisimlerle kan akımına direkt olarak katılması sonucu meydana gelir. Stafilokokal endokardit, tipik olarak akut seyirlidir ve çok sayıda periferik septik emboli, kalp kapak hasarı, miyokardit, septik ve kardiyojenik şok ile karakterizedir. En çok mitral kapağı tutar fakat aort tutulumunda prognoz daha kötüdür.	(Koneman et al., 2007; Mandell et al., 2005)
Menenjit	Genellikle lokal travma yaratan cerrahi girişim veya yaralanma sonucu stafilokokun bulaşmasıyla meydana gelir. Genellikle altında immün yetmezlik veya başka bir hastalık vardır.	(Koneman et al., 2007)
Perikardit	Delici göğüs yaralanmaları sonucu meydana gelebilir. Ayrıca stafilokok kan hematojen yolla perikardı enfekte edebilir. Endokarditin bir komplikasyonu olarak da görülebilir.	(Koneman et al., 2007)
Pulmoner infeksiyon	Aspirasyon veya hematojen yayılma sonucu meydana gelir. Aspirasyon pnömonisi yaşlılarda influenza pnömonisinin bir komplikasyonu olarak daha çok görülür.	(Koneman et al., 2007)

Çizelge 2.3. (devam) *S.aureus*'un neden olduğu infeksiyonlar

İnfeksiyon	Açıklama	Kaynak
Osteomyelit/Septik artrit	Lokal infeksiyonun bir sonucu oluşabilir. Hematojen osteomyelit de görülebilir. Septik Artrit, puberte öncesi çocuklarda daha sık görülür.	(Koneman et al., 2007)
Stafilokokal gıda zehirlenmesi	Isıya dirençli enterotoksin yapan <i>S.aureus</i> suşu ile kontamine gıdaların tüketilmesi sonucu meydana gelir. Patates salatası, kremalı tatlılar, et, dondurma ve konserve yiyecekler gibi gıdalar bulaşmaya yol açar. Kontamine eller ile temas sonucu stafilokok bulaşır, çoğalır ve toksin üretir. Gıda yendikten 2 ile 6 saat sonra bulantı, kusma, karın ağrısı ve diyare ile başlar. Ateş ve nörolojik belirtiler yoktur. Antibiyotik tedavisi gerekli değildir.	(Koneman et al., 2007; Dündar V. ve Dündar D., 2008)
Stafilokokal haşlanmış deri sendromu	Stafilokokların eksfoliyatif toksinine bağlı olarak ortaya çıkar. Vücudun önemli bir bölümünde bül oluşur. Bu büller daha sonra soyulur. Yeni doğan ve infantlarda daha sık görülür. Ciddi sıvı ve elektolit kaybı ile sepsis gelişebilir. Toksin antijeniktir ve oluşan antikor koruyucudur.	(Koneman et al., 2007; Mandell et al., 2005)
Stafilokokal toksik şok sendromu	Miyalji, ateş, kusma ve ishal gibi çok çeşitli belirtilere sebep olur. Emici tampon kullanan kadınlarda daha sık görülmektedir. Tampon kullanmayan kadın ve erkeklerde de abse, osteomyelit, influenza sonra pnömoni gibi hastalıkların komplikasyonu olarak meydana gelebilir.	(Koneman et al., 2007)

2.4. *Staphylococcus aureus*'un Hastalık Yapıcı Özellikleri

S.aureus virülansı en yüksek olan stafilokok türüdür. Ancak infeksiyonun meydana gelmesi, mikroorganizmanın virülansı ile konak savunma sisteminin oluşturacakları ilişkiye bağlıdır. *S.aureus*'un birçok virulan faktörü vardır bu nedenle virülans özelliği multifaktöriyeldir (Duval, 2010). Kapsül, protein A, peptidoglikan tabakası, teikoik asit gibi hücre duvarında bulunan maddeler, oluşturdukları enzimler ve toksinler patojenitesinde etkili olup, virülans faktörü olarak rol oynamaktadır.

Çizelge 2.4. *S.aureus*'un önemli virülans faktörleri

Virülans faktörleri	Açıklama	Kaynak
Kapsül	<i>S.aureus</i> suşlarının % 90'ından fazlası polisakkarit kapsül üretir. Polisakkarit kapsül üretmesine göre <i>S.aureus</i> 11 serotipi tanımlanmıştır. En çok kapsül tip 1 ve 2 yapar. Bu tipler kültürde mukoid görüntü oluşturur. Tip 5 ve 8 suşların yaklaşık % 75'inde bulunur. Birçok metisiline dirençli <i>S.aureus</i> tip 5 kapsül yapısındadır. Kapsül antifagositik özellik kazandırır ve prostetik aletlere yapışmasını sağlar.	(Mandell et al., 2005)
Hücre duvarı	<i>S.aureus</i> hücre duvarının ana bileşenleri peptidoglikan ve teikoik asittir. Peptidoglikan, N-asetil glukozamin ve N-asetil muramik asit polimerlerinin çapraz bağlanmasıyla oluşur. Teikoik asit ise ribitol fosfat polimerlerinden oluşur ve bakterinin mukozal yüzeylere yapışmasını sağlar. Bu yapılar kompleman aktivasyonunu sağlar, monositlerden interlökin-1 salınımına neden olarak polimorfonükleer lökositlerin kemotaksisini engeller, opsonik antikorların yapımını stimüle eder ve abse oluşumuna neden olur. Hücre duvarındaki peptidoglikan, β laktam ve glikopeptid gibi antibiyotiklerin hedefidir. Ancak peptidoglikan tabakasında gelişen modifikasyonlar stafilokokların bu antibiyotiklere karşı direnç oluşturmada rol alır.	(Koneman et al., 2006).
Yüzey proteinleri	Protein A, elastin bağlayan proteinler, kollajen bağlayan proteinler, fibronektin bağlayan proteinler, fibrinojen bağlayan proteinler ve "clumping factor", kimyasal yapıları ve hücre duvarı yerleşimleri birbirlerine benzeyen stafilokok yüzey proteinleridir. Hepsi "microbial surface component reacting with adherence matrix molecules" (MSCRAMM) olarak adlandırılır. Yüzey proteinleri stafilokokların konak dokuda kolonize olmasında önemlidir.	(Foster and Höök, 1998)
Protein A	<i>S.aureus</i> 'un yüzeyinde peptidoglikana bağlı olarak bulunur. Purifiye protein A moleküler ağırlığı 42 kDa ağırlığındadır. Protein A'nın en önemli özelliği, IgG3 (İmmünglobulin G3) dışındaki tüm IgG'lerin Fc reseptörleri ile birleşebilmesidir. Bu özelliği ile opsonizasyonu ve nötrofillerin fagositoz etkinliğini engeller. Kompleman aktivasyonunu sağlar ve gecikmiş tip hipersentitive reaksiyonlarında rol alır. Protein A immunojeniktir. <i>S.aureus</i> 'un ciddi infeksiyonlarında protein A'ya karşı antikor oluşur. <i>S.aureus</i> 'larda bulunan protein A, koaglutinasyon testi ile vücut sıvılarında antijen tespitini sağlar ve diğer organizmaların (streptokok gibi) tanısında yardımcı olur.	(Koneman et al., 2006)

Çizelge 2.4. (Devam): *S.aureus*'un önemli virülans faktörleri

V.faktörleri	Açıklama	Kaynak
Katalaz	Toksik olan hidrojen peroksiti su ve oksijene parçalayan enzimdir. Tüm stafilokoklarda bulunur. Bakteri katalaz sayesinde fagositler içinde toksik oksijen radikalleri tarafından öldürülmeye direnç kazanır.	(Koneman et al., 2006).
Koagülaz	Koagülaz hücre dışına salınan veya hücre yüzeyine bağlı şekilde bulunabilen bir proteindir. Serbest koagülaz ve bağlı koagülaz (kümeleştirici faktör) hem immunojenik olarak hem de etki mekanizmaları yönünden farklıdır. Plazmayı pıhtılaştırma mekanizmaları farklı enzimatik mekanizmalar ile olmaktadır. Serbest koagülaz protein yapısındadır ve enzimlerle inaktive olur. Bu enzim hücreden salınarak plazmadaki Coagulase Reaction Factor (CRF) ile reaksiyona girer. Fibrinojenin fibrine dönüşmesini sağlar. Kümeleştirici faktör ise hücreye bağlıdır. Doğrudan fibrinojen ile ilişkiye girerek fibrin oluşturup, plazmayı pıhtılaştırır. Fibrinojenin fibrine dönüşmesi ile hücre yüzeyinde fibrin birikir. Oluşan fibrin pıhtı bakteriyi fagositoza karşı korumakta rol alır. <i>S.aureus</i> plazmayı pıhtılaştırırken diğer stafilokoklarda böyle bir reaksiyon saptanmaz.	(Koneman et al., 2006), Cengiz, 1999).
Fibrinolizin	İnfeksiyonun dokulara yayılmasında ve fibrin tabakasının erimesinde etkilidir	(Koneman et al., 2006).
Hyaluronidaz	Dokularda mukopolisakkaritleri hidroliz eder. Bakterinin komşu dokulara yayılmasını sağlar Yayılma faktörü olarak da bilinen bu enzim antijenik özelliğe sahiptir ve özgül antikorları ile nötralize olur.	(Koneman et al., 2006).
Lipaz	Kronik fronkül, karbonkül ve bül gibi infeksiyonların oluşmasına sebep olan <i>S.aureus</i> suşlarında bulunur. Deri ve deri altı dokulara organizmanın yayılmasına yardım eder <i>S.aureus</i> suşlarının meydana getirdiği değişik lipaz enzimleri vardır; gliserol ester hidrolaz, PI-fosfolipaz C, FAME (Fatty Acid Modifying Enzyme) lipazlar arasındadır.	(Koneman et al., 2006).
Fosfoester diazitol	Dissemine intravasküler koagülasyon ve adult respiratuar distress sendromundan izole edilen suşlarda tanımlanmıştır	(Koneman et al., 2006).
Nükleaz	<i>S.aureus</i> suşlarında bulunan ısıya dirençli fosfodiesterazdır. Ekzonükleaz ve endonükleaz aktivitesi vardır.	(Koneman et al., 2006).

Çizelge 2.4 (Devam): *S.aureus*'un önemli virülans faktörleri

V.faktörleri	Açıklama	Kaynak
Sitolitik toksinler	<p><i>S.aureus</i>'un dört farklı hemolitik aktivitesi vardır.</p> <p><u>Alfa toksin:</u> <i>S.aureus</i> suşlarının ana hemolizini oluşturur. 33 kDa ağırlığında bir proteindir. Tavşan eritrositleri üzerinde hemolitik aktivitesi vardır. İnsan trombositleri ve makrofajları ile doku kültürleri üzerine hemolitik etkinliği vardır. <i>S.aureus</i> infeksiyonlarının patogeneğinde önemlidir.</p> <p><u>Beta toksin:</u> Sfingomyelinaz üreten toksindir. Moleküler ağırlığı 35 kDa olan bir proteindir. Antijenik özelliğe sahiptir. Etkisini en iyi koyun, daha az olarak da insan ve tavşan eritrositlerini eriterek gösterir. Grup B streptokokların hemolitik aktivitesi ile sinerjik etki gösterir ve bu grup B streptokok tanısında CAMP (Christie, Atkins, Munch, Peterson) testi olarak kullanılır.</p> <p><u>Gama toksin:</u> <i>S.aureus</i>'un % 97'sinde, koagülaz negatif stafilokokların % 50-70'inde bulunur. Moleküler ağırlığı 32 ile 35 kDa arasında olan üç gama hemoliz proteini vardır. Bu toksin tavşan, insan ve koyun eritrositlerini hemoliz eder.</p> <p><u>Delta toksin:</u> Molekül ağırlığı 103 kDa olup, eritrosit, lökosit, makrofaj, lenfosit ve trombositleri hasara uğratan bir proteindir. Bu hemolizinden alfa ve delta toksin koagülaz pozitif ve insanda hastalık yapan stafilokok suşları tarafından yoğun şekilde üretilir.</p>	(Koneman et al., 2006; Cengiz, 1999).
Eksfoliyatif toksin	Stafilokokların veziküler ve eksfoliyatif deri lezyonlarından sorumludur. Ekzotoksin niteliğindedir. A ve B olmak üzere 2 tipi bulunmuştur. A tipi kromozomal, B tipi plazmidde bağlı genlerce oluşturulur. Benzer biyolojik aktiviteleri vardır. Bu proteinler proteolitik aktivite gösterirler ve epidermiste bulunan mukopolisakkaridleri tahrip eder. Böylece intraepitelyal dağılıma meydana gelir. 'Haşlanmış Deri Sendromu'na sebep olur. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemi ile eksfoliyatif toksin geni saptanmıştır.	(Koneman et al., 2006).
Enterotoksin	Isıya dirençli, tek zincirli ve polipeptid yapıdadır. Enterotoksin A, B, C, D, E, H, I olmak üzere 7 tipi vardır. A ve D besin zehirlenmelerinde. B ise hastane infeksiyonlarında sık karşılaşılan toksindir	(Koneman et al., 2006).
Panton valentine lökositini	Elektroforetik olarak birbirinden ayrı F (Fast: Hızlı) ve S (Slow: Yavaş) olarak iki protein komponentinden oluşur. Lökositin, lökositleri tahrip eder ve fagositozu engeller.	(Koneman et al., 2006; Cengiz, 1999).

Çizelge 2.4 (Devam): *S.aureus*'un önemli virülans faktörleri

V.faktörleri	Açıklama	Kaynak
Toksik şok sendromu toksin 1	Toksik Şok Sendromu Toksini-1'in (TSST-1) üç önemli özelliği vardır. Pirojenik olması, süperantijen özelliği taşıması ve çok küçük miktarlarda öldürücü etki göstermesi başlıca özellikleridir. Süperantijen, toksine antijenik spesifite olmadan T hücre uyarılmasını sağlar. Süperantijenlerin MHC (Major Histokompatibilite Kompleksleri) üzerindeki antijen bağlanma olduğunda sunulmasına veya işlenmesine gerek yoktur. Süperantijenlerin önemi, çok sayıda T hücrelerini birden uyarabilmeleri ve septik şok benzeri klinik bulgulara yol açabilmeleridir.	(Koneman et al., 2006)

Pigmentli stafilokokların pigmentsiz olanlardan daha patojen olduğu konusu tartışmalıdır. Bununla beraber, patojen suşların çoğu pigment oluşturmaktadır. Pigmentli suşlar defalarca pasaj yapıldıktan sonra pigmentsiz hale dönebilir. Yapılan bir çalışmada, suşlar arasında pigment geninin aktarıldığı, pigmentsiz penisiline dirençli, streptomisine duyarlı bir suş ile sarı pigmenti olan penisiline duyarlı streptomisine dirençli bir suş aynı ortamda sıvı besiyerinde inkübe edildiğinde, aylar süren bir seri pasajdan sonra pigmentsiz suşların pigment kazandığı gösterilmiştir. Bu çalışmada stafilokok suşlarının pigmentlerini kaybedebilecekleri gibi pigment yapma özelliği kazanabilecekleri sonucuna varılmıştır. Bazı faktörlerin pigment üretimini etkilediği ancak hangi koşullarda bakterinin virülansına katkıda bulunduğu henüz netleşmediği yine aynı çalışmada belirtilmektedir (Barber, 1955). *S.aureus*'un pigment üretimi uygun olmayan koşullarda bakterinin canlı kalabilmesi ile ilişkilendirilmektedir (Katzif et al., 2005). Stafilokok kolonilerinde pigment 37°C'de 24 saat inkübasyondan sonra görülmektedir ancak inkübasyondan sonra kültürler oda sıcaklığında bekletildiğinde pigmentlerin arttığı görülmektedir (Wieland et al., 1994). Oda ısısında bekleyen kültürlerde; pigment artışı, uygun olmayan koşullarda bakterinin direncini arttırmaya katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir. Doğadan stafilokok suşlarının turuncu ve sarı pigmentli oldukları gözlenmektedir. Bu pigmentlerin karotenoid yapıda olduğu düşünülmektedir. Ancak kimyasal yapısı henüz tam olarak ortaya çıkarılamamıştır. Pigment ekstraktlarının elektronik absorpsiyon spektrumunda zeaksantin (beta, beta-karoten-3,3'-diol) ve zeaksantin esterleri olduğu gösterilmiştir. Bazı pigmentlerde ise zeaksantin yanında gama karoten, rubiksantin ve rubiksantin esterlerinin varlığı ortaya çıkartılmıştır. Phytoene, delta karoten ve fitofuluenol gibi benzeri bileşiklerin bulunduğu stafilokok pigmentleri de vardır. Stafilokokların pigment

yapılarına ışık tutan bir çalışmada, doğal karotenin yapısında C₄₀ zincirinin olduğu, *S.aureus* pigmentinden izole edilen 'phytoene' da C₃₀ zinciri bulunduğu; çalışılan suşlarda ise C₃₀ zincirinin bulunduğunu belirtilmiştir. Aynı çalışmada stafiloksantin saflaştırılmasının zor olduğu, glikolipit yapıda olduğunu, doğada bulunan stafilokok suşlarında bulunduğu belirtilmiştir (Marshall and Wilmoth, 1981). Yapılan başka bir çalışmada sarı pigmentli *S.aureus*'ların pigmentsiz suşlara göre doğal bağışıklık sisteminin öldürme mekanizmasından daha iyi kaçtığı savunulmaktadır. (Liu et al., 2005). Birçok araştırmacı yaptığı çalışmayla buna benzer tezler ortaya koymaktadır. Yapılan başka bir çalışmada CspA'nın (cold shock protein A) pigment üretimini düzenlediği gösterilmiştir. CspA pigment üretimini SigB'ye bağımlı bir mekanizma ile düzenlediği gösterilmektedir (Katzif et al., 2005).

Küçük koloni varyantı (SCV) yıllar öncesinde tanımlanmış stafilokokların alt popülasyonlarıdır. Bu varyantlar özellikle kistik fibrozis gibi kronik hastalıklarda tedaviye rağmen uzun süren infeksiyonlara neden olmaktadır. Osteomiyelitte de, infeksiyonun özelliğine bağlı olarak, küçük koloni varyant özelliği gösteren stafilokoklar etken olabilmektedir. SCV'ler yavaş üremektedir. *S.aureus* suşlarından 10 kat daha küçük koloni oluştururlar (Proctor et al., 1998). Aminoglikozidlere yüksek direnç gösterirler. Rutin kanlı agarda hemolizsiz, pigmentsiz koloniler meydana getirirler (Proctor et al., 1995). Ayrıca koagülaz üretimleri azdır ve mannitolü fermente etmezler. SCV izolatları hemin ve menadiona ihtiyaç duyarlar. Bu atipik karakterin elektron transport sistemindeki bir eksiklikten meydana geldiği düşünölmektedir. Yavaş ürediklerinden, atipik koloni morfolojisi meydana getirdiklerinden ve alışılmadık biyokimyasal aktivitelerinden dolayı, tanıda sorunlar yaşamaktadır. SCV özelliğine sahip stafilokokların hücre içersinde yaşamayı tercih etmeleri bağışıklık sisteminden kolaylıkla kaçmalarını sağlamaktadır. Bu mekanizma içersinde SCV'lerin normal koloniye sahip olan stafilokoklardan farklı olarak daha az alfa toksin üretmeleri de yer almaktadır. Alfa toksin hücreleri parçalama özelliğine sahiptir, hücre içersinde yaşamayı seven SCV'ler buldukları hücrenin uzun ömürlü olmasını isterler. Bu nedenle alfa toksin salgılamaz ya da hücreye zarar vermeyecek şekilde daha az salgırlar (Balwit et al., 1994). *S.aureus*'un neden olduğu infeksiyonların karakterine uygun bir klinik tablo olmasına rağmen tedaviye direnç varsa ve tedavi süresi uzamışsa, uygun antibiyotik tedavisine yanıt vermiyorsa SCV'den şüphelenilmelidir. Laboratuvar inkübasyonun 48 saate kadar uzatılması konusunda uyarılmalıdır.

2.5. *Staphylococcus aureus*'un Strese Karşı Direnci

Bakterilerin rahat üreyebilmeleri için sıcaklık, oksijen gibi bazı fiziksel koşulların uygun olması gerekmektedir. Bu koşulların en önemlilerinden biri ısı faktörüdür. Bakteriler üremek için ihtiyaç duyduğu optimum ısı isteklerine göre üç grupta toplanmaktadır: bazı bakteriler psikrofil, yani soğuğu sever; en iyi üreme gösterdikleri ısı aralığı -5 ile 15°C aralığıdır. Psikrofil bakteriler bu özelliklerinden dolayı daha çok kutuplarda bulunmaktadır. Toprakta ve insan vücudunda yaşayan bakterilerin çoğu mezofiliktir (en iyi üredikleri ısı aralığı 25-45°C'dir). Kaplıcalarda daha çok termofil yani ısıyı seven bakteriler bulunmaktadır. Ayrıca hipertermofil bakteriler de vardır. En iyi üreme gösterdikleri ısı aralığı 70-110°C arasındadır. Bir bakteri uyum sağladığı ısı dışında bir ısıya maruz bırakılırsa strese girmektedir. Bu süreçte bakteri örneğin yeni bir protein salgılayabilmekte veya hücre duvar yapısında bir takım değişikliklere gidebilmektedir (Ulus ve Tezcan, 2001). Benzer şekilde atmosfer koşulları da bakterinin ihtiyaçlarına uygun olmalıdır. Örneğin zorunlu anaerob olan bir bakterinin aerob koşullarda üremesi donanımına uygun olmadığı için mümkün olmaz. Bunun yanında fakültatif anaerob bakteriler hem oksijenli hem de oksijensiz koşullarda üremesini sürdürmektedir. Bakterilerin üremesini etkileyen diğer faktörler arasında pH, ozmoz, besin molekülleri, hidrojen kaynağı, mineraller, su, vitamin gibi üreme faktörleri yer almaktadır. Evrim sürecinde bakteri ortam koşullarına uyum sağlama yeteneğini geliştirmiş ve yeni koşullarla karşılaştığında bununla baş edebilme yollarını aramaktadır. Kısa veya uzun sürebilen bu baş edebilme süreci sonunda bakteri yeni özellikler kazanarak ortama uyum sağlayabilir. Aksine uyum sağlayamadığı koşullarda da yok olmaktadır.

S.aureus'un virülans özellikleri multifaktöriyeldir. Kapsül, protein A, peptidoglikan tabakası, teikoik asit gibi hücre duvarında bulunan maddeler, oluşturdukları enzimler ve toksinler patojenitesinde etkili olup, virülans faktörü olarak rol oynamaktadır. Ayrıca, ekstraselüler toksin, konak hücre ile iletişimi sağlayan yüzey yapıları, konak bağışıklık sistemine karşı direnç, virülans genlerinin ekspresyonunu kontrol eden düzenleyici mekanizma ve metabolik yapı gibi faktörler de virülansa katkı sağlamaktadır. Koşulların yaratmış olduğu strese karşı, *S.aureus* uyum sağlayabilmek için bu özelliklerini kullanmaktadır. *S.aureus*'un strese karşı vermiş olduğu tepkinin özellikleri birçok araştırmamanın konusu olmuştur. Örneğin yüksek ısıda bakterinin varlığını devam ettirebilmesi stresle baş edebilme yeteneğine bağlıdır. *S.aureus* soğuğa karşı direncini soğuk şok proteinleri (CSP) aracılığıyla sağlamaktadır. Soğuk şok cevabı örneğin *S.aureus*'un buzdolabında yaşamasına ve dolaylı yoldan gıda zehirlenmesine yol

açmaktadır. *E.coli* ve *B.subtilis* gibi bakterilerde de *csp* geni vardır. CSP'ler genellikle soğğun meydana getirdiği stres karşısında salgılanmaktadır. CSP'lerin her birinin rolü tam olarak anlaşılmamışsa da *E.coli*'deki bazı CSP'lerin soğuk şokunda oluşan sekonder yapıların meydana gelmesini engelleyen RNA şaperon gibi etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Soğuk şok proteinlerini araştıran bir çalışmada *S.aureus* suşlarında *cspA* geninin soğuk şoku karşısında indüklendiği ve pigment oluşumunun azaldığı gösterilmiştir (Duval et al., 2010). Aynı zamanda bu mekanizmanın bakterinin insan lizozomal katepsin G'sine ait katyonik antimikrobiyal peptidlere direnci arttırdığı gösterilmiştir (Katzif et al., 2003). *cspA* geninin olmadığı *S.aureus* suşlarında stafiloksantin gibi pigmentlerin üretiminin azalması pigmentin araştırılmasında yeni bakış açısı kazandıracak bir yol olmuştur; stafiloksantin stafilokokları nötrofillerin öldürme mekanizmasını yok ettiği gösterilmiştir (Liu et al., 2005). *cspB* geni *S.aureus*'un en önemli soğuk şok genidir. *cspB* geni hemin biyosentezi için gerekli olan *hemB* geni ile etkileşmektedir. Küçük koloni varyant özelliği ile *hemB* geninde meydana gelen mutasyon arasında bir ilişki tespit edilmiştir. *cspB* geninin yok edildiği *S.aureus* suşlarının birçok özelliğinin SCV'ye benzediği gösterilmiştir ve bu özellikler geri kazanılabilir özelliklerdir. Soğğa karşı direnç sağlayan genin olmadığı bir suşun başka birtakım özellikler (pigmentin azalması, aminoglikozidlere direnç, virülans faktörlerinin azalması) kazandığı sonucu ortaya çıkmaktadır. *S.aureus* suşlarının soğukta üretildiğinde *cspB* geninin aktiflendiği, *cspB* geni olmayan suşların ise 15°C'nin altında üremelerinin azaldığı *cspB*'nin bakterinin fenotipik özelliğinde rol oynadığı sonucuna varılmıştır (Duval et al., 2010). Bütün bu çalışmalar incelendiğinde çevresel faktörlerin bakteri üzerinde aminoglikozidlere direnç gibi bir takım değişikliklere yol açtığı görülmektedir.

2.6. Aminoglikozidler

Aminoglikozidler *Streptomyces* ve *Micromonospora* cinsi toprak bakterilerinden (Actinomycetes) elde edilen doğal ya da yarı sentetik antibiyotiklerdir.

Aminoglikozidler kimyasal yapılarına göre beş aileye ayrılır: (Willke, 2002).

1. Streptomisin ailesi; streptomisin
2. Kanamisin ailesi; kanamisin A, kanamisin B, amikasin, tobramisin, dibekasin
3. Gentamisin ailesi; gentamisin C1, gentamisin C1a, gentamisin C2, sisomisin, nedimisin, isepamisin
4. Neomisin ailesi; neomisin, paromomisin
5. Spektinomisin ailesi; spektinomisin

Aminoglikozidlerin etki mekanizması, hücrenin dış yüzeyi ile antibiyotiğin iyonik bir etkileşime girmesiyle başlamaktadır. Bu olay elektrostatik ve hızlı bir olay olup pasif olarak, enerji harcamadan gerçekleşmektedir. Gram negatif bakterilerin hücre duvarında bulunana lipopolisakkaridlere, fosfolipidlerin polar başlarına ve dış hücre zarı proteinlerine bağlanmak için Mg^{+2} ve Ca^{+2} iyonlarıyla yarışır. Aminoglikozidlerin hücre duvarına bağlanması, hücre duvarının geçirgenlik fonksiyonunu bozar (Gilbert, 2000). Aminoglikozidler bu özellikleri sayesinde bakteriyosidal olarak etki göstermektedir (Willke, 2002). Aminoglikozidlerin, hücre duvarına bağlanması pasif olarak gerçekleşirken, hücrenin içine taşınması aktif transport mekanizmasıyla gerçekleşmektedir, aktif transport için enerji harcanması gerekmektedir. Aktif transport iki enerji kademesinden oluşmaktadır. Enerjiye bağımlı faz I'i (Energy Dependent Phase I, EDP-1); divalen katyonlar (örneğin, Ca^{++} ve Mg^{++}), hiperozmolarite, düşük pH, anaerob ortam inhibe etmektedir. Apselerin anaerobik ve idrarın hiperosmolar ortamında veya ortamın asidik olması durumunda, aminoglikozidlerin etkisi azalır (Willke, 2002). Aminoglikozidler hücre duvarını geçtikten sonra, ribozomlara bağlanarak protein sentezini inhibe ederler. EPP-1'in gerçekleşmesi EDP-2'yi hızlandırır. EDP-2, aynı zamanda progressif bir hücre zarı bozulmasını tetikler ki ilk önce küçük iyonlar daha sonra büyük moleküller bakteri dışına sızar, bu da aminoglikozidlerin letal etkisini açıklayabilir (Gilbert, 2000; Willke, 2002). Aminoglikozidler, 30S ribozomlarında 16S A bölgesine geri dönüşümsüz olarak bağlanırlar. Streptomisin sadece 30S alt birimine bağlandığı halde, diğerleri ilave olarak 50S alt birimine de bağlanırlar (Kayaalp, 1991). Burada mRNA'nın kodon ve tRNA'nın antikodonlarının yanlış okunmasına neden olurlar (Gilbert, 2000; Willke, 2002; Kayaalp, 1991).

Aminoglikozidlere direnç; ribozomal direnç, permeabilite direnci, aminoglikozidleri modifiye edici enzimlere bağlı olarak gelişen direnç olmak üzere üç mekanizma ile olmaktadır. Bunlar içinde en yaygın ve önemli olanı aminoglikozid modifiye edici enzim varlığında gelişen dirençtir (Willke, 2003).

Ribozomal Direnç: Aminoglikozidlerin ribozomal proteinleri kodlayan genlerdeki tek basamaklı mutasyonlara bağlı olarak aminoglikozidlerin bu bölgelere bağlanamaması sonucu gerçekleşir. Bu direnç sıklıkla aminoglikozide karşıdır. (Yamazhan, 2007).

Permeabilite direnci: Aerop gram negatif basillerde ve stafilokoklarda mutasyon sonucu hücre zarı geçirgenliğinde azalma olduğu gösterilmiştir. Bu şekilde direnç gelişen bakterilerde aminoglikozidlerin bakteri hücresi içine girmesi güçleşir. Bu güçlük tüm

aminoglikozidler için söz konusudur. Endişe verici olmakla birlikte yaygın bir direnç mekanizması değildir (Gilbert, 2000; Willke, 2003).

Bakteri aminoglikozidlere direnç geliştirmek için en sık aminoglikozid modifiye edici enzimleri (AME) kullanmaktadır. *S.aureus*'larda aminoglikozid direnci aminoglikozid modifiye edici enzimi kodlayan genin plazmid (Mu50 veya jH1 ve JH9) veya transpozonlarla (TW20 içinde TN4001) edinilmesi sonucu kazanılmaktadır. AME'ler, substratlarına göre isimlendirilmektedir: Bunlar aminoglikozid molekülündeki amino grubunu asetile eden asetiltransferazlar (AAC), aminoglikozid molekülündeki hidroksil grubunu adenile eden nükleotidil transferazlar (ANT veya AAD) ve aminoglikozid molekülündeki hidroksil grubunu fosforile eden fosfotransferazlar (APH) olmak üzere üç çeşittir.

Asetiltransferazlar dört gruba ayrılmaktadır: AAC(1), AAC(3), AAC(2') ve AAC(6'). AAC (6'), klinik olarak önemli birçok aminoglikozidi modifiye edebilen geniş spektrumlu bir enzimdir. AAC (6')'yi eksprese eden gen, genellikle *aph(2'')* geni ile birlikte bulunur ve *aac(6')-aph(2'')* bifonksiyonel gen grubu AAC(6')/APH(2'') enzim grubunu eksprese eder (Vakulenko and Mobashery, 2003). AAC(6')/APH(2'') enzimi ilk olarak 1986'da *Enterococcus faecalis*'te ve 1987'de *S.aureus*'ta tespit edilmiştir (Zhang et al., 2009). *aac(6')-aph(2'')* geni Tn4001 transpozonu üzerinde kodlanır (Schmitz et al., 1999) ve 56 kDa moleküler ağırlığındadır (Zhang et al., 2009). AAC(6')/APH(2'') enzimi gentamisin, tobramisin, netilmisin, amikasin ve kanamisin de içinde olduğu streptomisin dışında tüm aminoglikozidlere direnç geliştirmektedir (Vakulenko and Mobashery, 2003).

Fosfotransferazlar (APH) aminoglikozidlerin, hidroksil gruplarını fosforile etmektedir. APH yedi gruba ayrılmaktadır: APH(3'), APH(2'), APH(3'), APH(4), APH(7'), APH(6) ve APH(9). APH(3') antibiyotiklerin hidroksil gruplarını 3 pozisyonunda modifiye eden enzimlerdir. APH(3'), APH(3')-I'den APH(3')-VII'e kadar APH(3')'ün yedi farklı tipi vardır. APH(3')-III fosfotransferaz genleri aslında *S.aureus* ve *Streptococcus faecalis*'ten izole edilmiştir. Sonra bu gen Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler arasında antibiyotik direnç geni transfer etmede örnek olan *Campylobacter coli*'de identifiye edilmiştir. APH(3')-III kanamisin, butirosin, paromomisin, lividomisin ve ribostamisine direnç üretir (Vakulenko and Mobashery, 2003).

Nükleotidiltransferazlar (ANT) beş gruba ayrılmaktadır: ANT(2''), ANT(3''), ANT(4'), ANT(6) ve ANT(9). ANT(4')-Ia amikasin, tobramisin, dibekasin, isepamisin ve kanamisine direnç üretir. ANT(4')-IIa amikasin, tobramisin, isepamisin ve kanamisine

direnç üretir. *ant(4')-Ia* geni *S.aureus'* ta bulunan Son zamanlarda bu gen *S.aureus'*tan büyük konjugatif plazmidi üzerinde tespit edilmiştir (Vakulenko and Mobashery, 2003).

AME'lerin, bakterilerdeki dirençlilikten sorumlu olmaları zamana ve coğrafi bölgeye göre değişmekte, hatta hastaneler arasında bile farklılıklar göstermektedir. (Willke, 2003).

Çizelge 2.5. *S.aureus'*ta bulunan aminoglikozid modifiye edici enzimler ve hedef aminoglikozidler (Shaw et al., 1993)

ENZİM	GENLER	HEDEF AMİNOGLİKOZİDLER	AÇIKLAMA
AAC(6')/APH(2'')	<i>aac(6')/aph(2'')</i>	Gentamisin, Tobramisin, Amikasin	Gram pozitif bakterilerde yaygındır. (stafilokoklar ve enterokoklar)
APH(3')-IIIa	<i>aph(3')-IIIa</i>	Tobramisin, Amikasin	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>
ANT(4')-Ia	<i>ant(4')-Ia</i>	Kanamisin, Paromisin, Neomisin, Amikasin, GentamisinB	En sık <i>S.aureus</i> ve <i>Enterococcus faecalis'</i> te görülür.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışması Eylül 2010-Eylül 2011 tarihleri arasında Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Mikrobiyoloji Laboratuvarında gerçekleştirildi.

3.1. Çalışma Grubu

Çalışmada Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'ne başvuran yatan ve ayaktan hastalara ait suşlardan kullanıldı. Yatan hasta suşları 2008–2010 tarihleri arasında Merkez Laboratuvarında bulunan stoklanmış suşlardan ve ayaktan hastaya ait suşlar ise 2010–2011 yılları arasında polikliniğe başvurup kültür için Merkez Laboratuvarına gönderilen ve *S.aureus* olarak tanımlanan suşlar arasından seçildi. Çalışmada bias oluşturmayacak verileri sağlamak için sürenin kısıtlı olması nedeniyle, suşların toplanmasında sayı tercih edildi.

3.2. Mikrobiyolojik olarak tanımlama

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nda -80°C 'de saklanan suşlar Mannitol Salt agar ekildi. Mannitol salt agar ticari (Merck KGaA, Almanya) olarak hazır toz besiyerinden hazırlandı; besiyerinden 104 g alınıp, 1000 ml distile su içerisinde eritildi, otoklavda 121°C 'de 15 dakika steril edildi. Hazırlanan besiyeri tek kullanımlık petri kaplarına 4 mm yükseklikte olacak şekilde döküldü. Mannitolü fermente eden sarı renkli koloniler oluşturan suşların *S.aureus* olabileceği düşünüldü. Bu kolonilerden Gram boyası yapıldı. Gram boyaması için ilk olarak; lam üzerine bir damla serum fizyolojik damlatılarak öze yardımıyla alınan bakterinin iyice homojenize olması sağlandı. Preparat kurutulduktan sonra 3 kere alevden geçirilerek tespit edildi. Hazırlanan preparat kristal viole ile 2 dakika boyandı. Yıkandıktan sonra 2 dakika lugol ile muamele edildi. Bu işlemi takriben 3:7 oranında hazırlanmış olan aseton/alkol ile renksizleştirme işlemi yapıldı. En son safranin ile 1 dakika zıt boyandı. (Koneman et al., 2006). Boyama sonucunda Gram pozitif kok olarak saptanan tüm bakterilere aynı gün katalaz testi yapıldı. Koloni % 3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2) ile süspanse edildi. Oksijen (O_2) üretimi sonucu hava kabarcığının oluşması durumunda test pozitif olarak kabul edildi (Koneman et al., 2006). Hava kabarcığı oluşan koloniler stafilokok olarak düşünüldü. Katalaz pozitif olan suşların DNaze aktivitesine bakıldı. DNaze testi için hazır toz DNaze besiyeri (Merck KGaA, Almanya) kullanıldı. Besiyerinden 42 g alınıp 1000 ml distile su içerisinde eritildi.

121°C’de 15 dakika otoklavda steril edildi. Tek kullanımlık petri kaplarına 4 mm yükseklikte olacak şekilde döküldü. DNaze besiyerine çizilen koloniler 18-24 saat 35°C’de normal atmosfer koşullarında inkübe edildi. Üreyen kolonilere 1N HCl döküldü. Koloniler DNaze enzimi varlığında etraflarında şeffaf bir zon meydana geldi. Bu bakteriler DNaze pozitif olarak değerlendirildi. DNaze enzimi olmayan kolonilerin etrafından nükleik asitlerin 1N HCl ile presipite olmasından bulanıklık meydana geldi. Bu bakteriler de DNaze negatif olarak kabul edildi. Kontrol suş olarak *S.aureus* 29213 kullanıldı (Koneman et al., 2006). 1N HCl 97,2 ml distile suya 2,8 ml HCl ilavesiyle hazırlandı (Bilgehan, 2004).

3.3. Pigment Seviyesi Ölçümü

Pigment ölçümü metanol ekstraksiyon yöntemiyle yapıldı (Morikawa et al., 2001). *S.aureus* suşları taze kültürden alınarak, 15 ml triptik soy broth içeren tüplere ekilerek 37°C’de 20 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, üreme olan sıvı besiyerinden 5’er mililitre alınarak 3 tüpe ayrıldı. Birinci tüp 15°C’de, ikinci tüp 37°C’de ve üçüncü tüp 42°C’de 1 saat inkübe edildi (Duval et al., 2010). İnkübasyonun ardından bakteri konsantrasyonu $1,5 \times 10^8$ CFU/ml (McFarland 0,5) olacak şekilde 850 µl’lik süspansiyon hazırlandı. Süspansiyon 10.000g’de 1 dakika santrifüj edildi. Her birine eşit miktarda fosfat tampon (PBS) eklenerek yıkandı. Tekrar 10.000g’de 1 dakika santrifüj edildi. Pelet 200 µl metanol ile tekrar süspanse edilerek 55°C’ye getirilen su banyosunda 3 dakika inkübe edildi. Süspansiyon 15.000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. Bu işlemden sonra süpernetant ayrıldı. Peletin üzerine tekrar 200 µl metanol eklenerek süspanse edildi. 15.000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi. Süpernetant ayrıldı. Tamamı 1 ml olacak şekilde süpernetantın üzerine metanol eklendi. Hazırlanan süspansiyon spektrofotometre cihazında (Schimadzu UV1601, Japonya) 465 nm dalga boyunda ölçüldü ve absorbans değeri not edildi (Morikawa et al., 2001). Farklı ısılarda verdikleri pigmentasyon seviyeleri birbirleri ile karşılaştırmalı olarak değerlendirildi.

3.4. Aminoglikozid Duyarlılık Testleri

Çalışmada kullanılan suşların aminoglikozid duyarlılıklarına, CLSI (Clinical and Laboratory Standarts Institute) M02 M07 önerileri dikkate alınarak, Kirby-Bauer ve Agar Dülüsyon yöntemleri kullanılarak Muller Hinton agarda bakıldı.

3.4.1. McFarland Bulanıklık Çözeltilerinin Hazırlanması

Sıvı kültürlerde mikroorganizma sayısının artışına bağlı olarak bulanıklık artmaktadır. Bulanıklık ise optik dansite (OD) veya absorbans olarak, bir spektrofotometre ile ölçülür. Bunun için BaCl₂ (baryum klorür) ve H₂SO₄ (sülfürik asit) karıştırılarak 0,5-1-2 McFarland bulanıklık standartları hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltiler yardımıyla, bilinen miktardaki bakteri bulanıklığına eşit bulanıklık oluşturdu (Isenberg, 2004)

3.4.2. Disk Difüzyon Testi

Bakterilerin aminoglikozid duyarlılıkları Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) M02 M07 önerileri dikkate alınarak Mueller Hinton Agarda (MHA) bakıldı (CLSI, 2011). Kısaca, Mueller Hinton hazır toz besiyerinden (Merck KGaA, Almanya) 38 g alınarak 1000 ml distile suda eritildi ve 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edildi. Hazırlanan besiyeri tek kullanımlık 90 mm çapındaki petri kaplarına 4 mm yükseklikte olacak şekilde döküldü. CLSI kriterlerine göre besiyerinde herhangi bir katyon ayarı yapılmadı.

Bakteriler taze kültürlerinden alınarak triptik soy buyyon içinde 0,5 McFarland bulanıklığına eş değer bulanıklıkta süspanse edildi. Besiyerinin yüzeyine eküvyon ile ekim yapıldı. 10 µg'lık gentamisin, 30 µg'lık amikasin, 30 µg'lık netilmisin içeren antibiyotik diskleri (Oxoid, UK) steril pens yardımıyla besiyeri üzerine yerleştirildi. Petriler 37°C'de 16-18 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda her bakteri suşu için inhibisyon zon çapı milimetrik cetvel ile ölçüldü. Test sonuçları, CLSI'nın kriterlerine göre suşlar duyarlı, orta duyarlı ve dirençli olarak değerlendirildi. Kontrol suş olarak *S.aureus* ATCC 25923 kullanıldı.

S.aureus için gentamisin duyarlılık sınırları; ≥ 15 mm ise duyarlı, 13-14 mm ise orta duyarlı, ≤ 12 mm ise dirençli kabul edildi. Amikasin duyarlılık sınırları; ≥ 17 mm ise duyarlı, 15-16 mm ise orta duyarlı, ≤ 14 ise dirençli olarak kabul edildi. Netilmisin duyarlılık sınırları; ≥ 15 mm ise duyarlı, 13-14 mm ise orta duyarlı, ≤ 12 mm ise dirençli olarak kabul edildi (CLSI, 2011).

3.4.3. Agar Dilüsyon Metodu

Agar Dilüsyon metodu CLSI M02 M07 önerilerine göre Mueller Hinton agarda yapıldı (CLSI, 2011). Çalışmamızda 1 ml 20 mg Genta ampul (gentamisin, İ.E Ulugay, Türkiye), 2 ml 500 mg lık Amikozit ampul (amikasin, Zentiva, Türkiye) ve 1,5 ml 150 mg Netromycine (netilmisin, Eczacıbaşı, Türkiye) kullanıldı. CLSI'da çalışmada kullanılacak her bir antibiyotik için verilen duyarlılık sınırlarına bakıldı ve 128 µg/ml ve 0,25 µg/ml

konsantrasyon aralığındaki MİK değerleri üç antibiyotiğin de duyarlılık sınırlarını içine alacak aralık olarak belirlendi. Her bir antibiyotik için 1 ml’inde 128 µg antibiyotik olacak şekilde (Çizelge 3.2.), sıcaklığı su banyosunda 45-50°C’ye getirilmiş steril 40 ml agar besiyerine antibiyotikler eklendi. Agar ve antibiyotik çözelti iyice karıştırıldı, karışım düz bir yüzeyde döküldü. Agar yüzeyinde köpük oluşmamasına, ayrıca kısmi katılma olmaması için besiyerinin plaklara mümkün olduğunca çabuk dökülmesine dikkat edildi. Hazırlanan antibiyotikli besiyerinin yarısı agar derinliği 3-4 mm olacak şekilde yaklaşık 20 ml, 90 mm çapındaki petri kaplarına döküldü. Mililitresinde 128 µg antibiyotik olan 20 ml agar besiyerinin üzerine 20 ml antibiyotiksiz agar besiyeri ilavesi ile antibiyotik konsantrasyonu yarı yarıya dilüe edildi. Bu şekilde en düşük antibiyotik konsantrasyonu 0,25 µg/ml olacak şekilde seriler hazırlandı. Test edilecek *S.aureus* suşları 15 ml’lik triptik soy broth besiyerine inoküle edilerek 37°C’de 20 saat inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonrasında üremiş olan kültürler 5’er ml’lik üç eşit parçaya ayrılarak tüplere aktarıldı. 5’er ml’lik kültürler biri 15°C’de, biri 37°C’de diğeri ise 42°C’de 1 saat inkübe edildi (Duval et al., 2010).

Çizelge 3.2. Stok antibiyotik konsantrasyonları ve çalışma miktarları

Antibiyotik	Stok konsantrasyonu	Çalışma başlangıç konsantrasyon	40 ml besiyeri için stoktan kullanılan miktar
Gentamisin	20 mg/ml	128 µg/ml	256 µl
Amikasin	250 mg/ml	128 µg/ml	20,5 µl
Netilmisin	100 mg/ml	128 µg/ml	51,2 µl

Agar dilüsyonda istenen son inokulum 5-8 mm çapında bir alan içerisinde her damlatma için 10^4 CFU’dur. Bu nedenle kültürlerden ilk önce 0,5 McFarland bulanıklığına eşdeğer süspansiyon hazırlandı. Sonrasında bu süspansiyon steril buyyon içinde 1:10 oranında sulandırılarak 10^7 CFU/ml’lik konsantrasyon elde edildi. Ayarlanmış (10^7 CFU/ml) bakteri süspansiyonları içeren tüpler sıra ile spora dizildi. İyice karıştırılmış her süspansiyondan alınan bir miktar, replikatörün inokulum parçasına denk gelen kuyucuğa kondu. Agar plakları inokulum noktalarının yönünü gösterecek şekilde işaretlendi. Agar yüzeyine inokulum için 3 mm çapında iğneleri olan 2 µl damlatabilen replikatör kullanıldı. Replikatörün sterilitesini test etmek için antibiyotiksiz agar besiyerine replikatör ekim yapılıp gibi değdirildi. Replikatör yardımıyla her süspansiyondan 2 µl antibiyotikli agar plağının yüzeyine inoküle edildi. Böylelikle agar yüzeyindeki bakteri sayısı ortalama 10^4 CFU/ml oldu. Üreme kontrolü için içinde antibiyotik olmayan agar besiyerine inoküle

edildi. İnoküle edilen plaklar 35°C'de 18–24 saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında *S.aureus* suşlarının MİK değerleri belirlendi (CLSI, 2006).

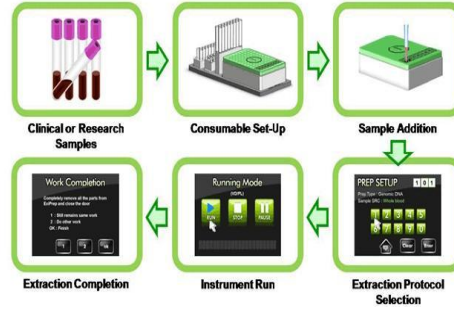
S.aureus suşlarının gentamisin, amikasin ve netilmisin MİK değerlerine bakıldı. Kontrol suş olarak *S.aureus* 29213 kullanıldı. Gentamisin için MİK sınırı; ≤ 4 µg/ml ise duyarlı, 8 µg/ml ise orta duyarlı, ≥ 16 ise dirençli kabul edildi. Amikasin için MİK değeri; ≤ 16 µg/ml ise duyarlı, 32 µg/ml ise orta duyarlı, ≥ 64 ise dirençli kabul edildi. Netilmisin için MİK değeri; ≤ 8 µg/ml ise duyarlı, 16 µg/ml ise orta duyarlı, ≥ 32 ise dirençli kabul edildi (CLSI, 2011).

3.5. Aminoglikozid Modifiye Edici Enzim Genlerinin Varlığının Saptanması

Isı değişikliğinin, aminoglikozid direncine etkisi enzim düzeyinde moleküler yöntemlerle araştırıldı. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, eldeki imkanlar ölçüsünde, toplam 30 suşta 3 AME enzimi bakacak şekilde grupların oluşturulması düşünüldü.

3.5.1. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için Bioneer marka ExiPrep™ DNA/RNA izolasyon cihazı ve üretici firmanın önerdiği ExiPrep™ Bacteria Genomic DNA kiti (Şekil 3.1) kullanıldı. PCR yapılacak suşlar, 24 saatlik taze Muller Hinton agar (MHA) kültür plağından 200 µl 1X TE (Tris EDTA) içine 1×10^6 bakteri/ml olacak şekilde alınarak süspansiyon edildi. Süspansiyona 20 µl lizozim (50 mg/ml, Sigma, Almanya) ve 5 µl lizostafin (Sigma, Almanya) eklendi. Isıtıcı blokta (Fine PCR Cool block ALB6400, Kore) 37°C'de 1 saat inkübe edildi ve 13000 rpm'de (Eppendorf centrifuge 5804R) 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant pipetle uzaklaştırıldı ve peletin üstüne 200 µl resüspansiyon tampon (ExiPrep™ Genomic DNA kiti) eklendi. Karışım iyice vortekslendi (Fisher Scientific FB15013 Topmix). Hazırlanan karışımdan 200 µl alınıp kit içinden çıkan tampon kartuşunda örnek yükleme kuyucuklarına sırayla konuldu. Cihazın programından DNA izolasyonu için Gram pozitif bakteriler seçeneği seçilerek, DNA izolasyon cihazı çalıştırıldı. *S.aureus* DNA'sı izole edildi.



Şekil 3.1: ExiPrep™ Bacteria Genomic DNA kiti ve ExiPrep™ DNA/RNA izolasyon cihazı

3.5.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR, Polimeraze Chain Reaction)

Aminoglikozid modifiye edici enzim genlerinin varlığı klasik PCR yöntemiyle tespit edildi. Çalışmada pozitif kontrol olarak Gata Haydarpaşa Eğitim Hastanesi'nde 2006 yılında yapılmış çalışmadan elde edilen *aac(6')-aph(2'')* ve *aph(3')-IIIa* genlerine sahip bakteri DNA'sı kullanıldı (Ardıç, 2006). PCR karışımı tek reaksiyon için toplam 25 µl olarak hazırlandı. PCR reaksiyonunu kurmak için kullanılan primerler gen bankasından alınan diziler kullanılarak Vector NTI (Invitrogen, ABD) programı ile dizayn edildi (Çizelge 3.3).

PCR için ilk olarak DNA konsantrasyonu ve saflığı Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, ABD) cihazında ölçüldü. Cihaz başlangıçta 2 µl milipor su ile kalibre edildi. Ölçüme başlamadan DNA'nın çözüldüğü solüsyon ile cihaz sıfıra ayarlandı ve 2 µl DNA örneği ile ölçüm yapıldı. Cihaz otomatik olarak 260/280 nanometrede yaptığı ölçüm değerlerini, DNA konsantrasyonunu hesapladı ve 260/280 değeri 1,8 civarında olanlar ideal temiz DNA olarak kabul edildi

Çizelge 3.3: PCR reaksiyonunda kullanılan primerler

Primer Adı (Gen)	Primer	Primer dizisi (5'-3')	Primer uzunluk	Amplikon uzunluğu (bp)
<i>aac(6')/aph(2'')</i>	Forward	ATGATACCAGTTCATTTGGGTTTATAGC	28	496
	Reverse	TCTTCCCAAGGCTCTGTATAATGTTT	26	
<i>aph(3')-IIIa</i>	Forward	GATAAACCCAGCGAACCATTTG	22	323
	Reverse	GGTTATTGTCCTGGGTTTCAAGC	23	
<i>ant(4')-Ia</i>	Forward	TCCAACCTTAACAACCAATCCAAATC	25	348
	Reverse	CATTAATGCTAAACCCAGAGCTACTCAT	28	

PCR karışımı tek reaksiyon için toplam 25 µl olarak hazırlandı. PCR karışımı 0,2 µM (0,5 µl) her bir primer, 1 X (2,5 µl) Taq DNA polimeraz reaksiyon tamponu, 1,5 mM (1,5 µl) MgCl₂, her biri 0,25 mM (2,5 µl) olan dNTP karışımı, 2,5 U (0,5 µl) Tag DNA polimeraz, 100 ng (1 µl) genomik DNA içermektedir. 16 µl milipor su ilavesi ile 25 µl'ye tamamlandı.

PCR için örnekler 94°C'de 5 dakika ön denatürasyona tabi tutuldu. Sırasıyla 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 55°C'de 60 saniye yapışma ve 72°C'de 60 saniye uzama işlemi ile 35 amplifikasyon döngüsü gerçekleştirildi (Techne TC-312). Son uzama işlemi 72°C'de 20 dakika yapılarak PCR sonlandırıldı.

3.5.3. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel elektroforezinde 3 farklı büyüklükte PCR ürünü tespit edildi (496 bp, 348 bp, 323 bp). Elektroforez için % 1 agaroz içeren jel yapıldı. Agaroz jel 40 ml 0,5X TBE (Tris Borik asit-EDTA) içine 0,4 g agaroz (Prona Basica le Agarose, E.U) eklendi ve karışım mikrodalga fırında agaroz tamamen eriyene kadar ısıtıldı. Mikrodalgadan çıkarılıp soğuması için biraz bekletildikten sonra sıvı haldeki jelin içerisine 10 mg/ml stok etidyum bromürden 1 µl eklenerek elektroforez tankına döküldü. Yaklaşık 30-40 dakika sonra % 1'lik jelin üzerini kaplayacak şekilde 0,5 X TBE [108 g Trisma Base, 55 g Borik asit, 40 ml 0,5 M EDTA [pH 8,0] distile su ile 1000 ml'ye ayarlanarak otoklavlanır. Hazırlanan 10X TBE stok solüsyonu oda ısısında muhafaza edilir. 10X TBE stok solüsyonundan 25 ml alınıp üzeri 450 ml distile su ile tamamlanarak 0,5X TBE hazırlanır] ilave edilerek tarakları çıkarıldı. Birinci kuyucuğa 5 µl moleküler ağırlık belirteci (GeneRuler, Fermentas 1000 bp DNA ladder, USA) yüklendi. Sonraki kuyucuklara 6 X DNA yükleme boyası (Fermentas, USA) ile homojen bir şekilde karıştırılan 7 µl PCR ürünü yüklendi. Tankın kapağı kapatılarak elektrotlar bağlandı ve elektroforez 0,5X TBE

tamponu içerisinde, 8 V/ cm'de ile 20–30 dakikada tamamlandı. DNA görüntüleme cihazı ile görüntü bilgisayar ortamına aktarıldı. Oluşan DNA bantları moleküler ağırlık belirtecinin bantları ile karşılaştırılarak değerlendirildi. *aac(6')/aph(2'')* geni 496 bp, *aph(3')-IIIa* geni 323 bp' e denk gelenler pozitif olarak değerlendirildi.

3.5.4. Küçük Koloni Varyantın Tespit Edilmesi

Suşlar % 5 koyun kanlı agara ekildi. Küçük koloni varyantının yavaş üreme özelliğinden dolayı 37°C'de 48-72 saat inkübe edildi. Üreyen suşlar, koloni büyüklükleri, hemolizleri ve pigmentleri açısından değerlendirildi.

3.5.5. İstatistiksel Analiz

Bu tez çalışmasında SPSS Statistics 13.0 yazılımı kullanıldı. Antibiyotik duyarlılıkları istatistiksel hesaplamada Wilcoxon testi ve ki-kare testi kullanıldı. Pigmentasyon seviyelerinde istatistiksel hesaplamada Student-T testi yapıldı. Yapılan analizlerde $p < 0,05$ ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Çalışılan *Staphylococcus aureus* Suşları ve Hasta Bilgisi:

Bu çalışmada, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'ne başvuran, yatan ve ayaktan takip edilen hastalara ait suşlar kullanıldı. Yatan hasta suşları 2008-2010 tarihleri arasında Merkez Laboratuvarı'nda bulunan saklanmış suşlardan, ayaktan hastaya ait suşlar ise 2010-2011 yılları arasında polikliniğe başvurup kültür için Merkez Laboratuvarına gönderilen ve *S.aureus* olarak tanımlanan suşlardan seçildi. Çalışma için bias oluşturmayacak verileri sağlayabilmek amacıyla suşların toplanmasında sürenin kısıtlı olması nedeniyle sayı tercih edildi.

Çizelge 4.1. MRSA suşlarının izole edildiği örnek çeşidi ve örneklerin gönderildiği bölümler

Bölümler	Örnek Sayıları					
	Yara	Trakeal Aspirat	Balgam	İdrar	Katater	Mayi
Cerrahi Bilimler						
Ortopedi ve Travmatoloji	27	-	-	-	-	-
Genel Cerrahi	1	2	1	-	4	-
Kalp ve Damar Cerrahisi	4	-	-	-	1	1
Kulak Burun Boğaz Hastalıkları	1	-	-	-	-	-
Beyin ve Sinir Cerrahisi	2	3	-	-	-	-
Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi	1	-	-	-	-	-
Üroloji	1	-	-	1	-	-
Acil Tıp	1	-	-	2	-	-
Dâhili Bilimler						
Nefroloji	6	-	1	-	-	-
Deri ve Zührevi Hastalıklar	2	-	1	-	-	-
Hematoloji	2	-	1	1	-	-
Pediyatri	-	1	-	-	1	-
Nöroloji	1	-	-	-	2	-
Göğüs Hastalıkları	-	1	1	-	-	-
Endokrin Hastalıkları	-	-	-	1	-	-
Kardiyoloji	1	1	-	-	-	-
Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji	1	-	-	-	-	-
Yoğun Bakım	1	2	1	-	-	-
TOPLAM	52	10	6	5	8	1

Çalışılan 102 MRSA suşunun % 80'ine ait klinik bilgilere ulaşıldı. Bilgilerine ulaşılan örneklerin % 56,09'u cerrahi bölümlerden, geri kalan % 43,01'i ise cerrahi dışındaki çeşitli bölümlerden (Nefroloji, Deri ve Zührevi Hastalıklar, Hematoloji, Pediatri Nöroloji, Göğüs, Acil Tıp, Endokrin, Kardiyoloji, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji) gelen örnekler oluşturmaktadır. Kırk altı cerrahi örnek ise % 56,5'i Ortopedi, % 17,4'ü Genel Cerrahi, % 13'ü Kalp ve Damar Cerrahisi, geri kalan % 13,1'i ise Üroloji, Beyin ve Sinir Cerrahisi, Kulak Burun Boğaz Hastalıkları, Plastik, Rekonstruktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dallarından gelen örneklerdir. (Çizelge 4.1). MRSA suşlarının % 34,1'ini kadın, % 65,9'unu erkek hastalardır.

Çizelge 4.2: MSSA suşlarının izole edildiği örnek çeşidi ve örneklerin gönderildiği bölümler

Bölümler	Örnek Sayıları					
	Yara	Trakeal Aspirat	Balgam	İdrar	Katater	Derin doku
Cerrahi Bilimler						
Ortopedi ve Travmatoloji	12	-	-	-	-	-
Genel Cerrahi	2	-	-	-	-	-
Kalp ve Damar Cerrahisi	3	-	-	-	-	-
Kulak Burun Boğaz Hastalıklar	1	-	2	-	-	-
Beyin ve Sinir Cerrahisi	2	-	-	-	-	1
Üroloji	-	-	-	1	-	-
Kadın Hastalıkları ve Doğum	2	-	-	-	-	-
Çocuk Cerrahisi	1	-	-	-	-	-
Dâhili Bilimler						
Nefroloji	2	-	3	-	-	-
Deri ve Zührevi Hastalıklar	8	-	-	-	-	-
Hematoloji	2	-	-	-	-	-
Nöroloji	-	-	-	1	-	-
Yoğun Bakım	1	-	1	-	-	-
Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	1	-	-	4	-	-
Onkoloji	6	1	-	-	-	-
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	3	3	-	-	-	-
TOPLAM	46	4	6	6	-	1

Çalışılan 79 MSSA suşunun ise % 79,5'ine ait klinik bilgilere ulaşıldı. Bilgilerine ulaşılan örneklerin % 67,1'i cerrahi bölümlerden, geri kalan % 32,9'u ise cerrahi dışında kalan çeşitli bölümlerden (Nefroloji, Deri ve Zührevi Hastalıklar, Hematoloji, Nöroloji, Yoğun Bakım, Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon, Onkoloji ve Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları)

gelen örnekler oluşturmaktadır (Çizelge 4.2). MSSA suşlarının % 52,4'ü kadın, % 47,6'sı ise erkek hastalar oluşturmaktadır.

Kocaeli Üniversitesi Hastanesi'nin sisteminden MRSA suşlarının 77, MSSA suşlarının 56 tanesine ait antibiyogram bilgisine ulaşılabildi. Çizelge 4.3.'te suşların antibiyotiklere duyarlılıkları gösterilmektedir. MRSA ve MSSA suşlarının % 100'ü vankomisine duyarlı bulundu. MRSA suşlarının % 100'e yakını, MSSA suşlarının ise % 85,7'si penisiline dirençli bulundu. Gentamisine olan direncin MRSA suşlarında, MSSA suşlarına göre daha yüksek olduğu gözlemlendi.

Çizelge 4.3: MRSA ve MSSA suşlarının direnç profili

Antibiyotik	MRSA			MSSA		
	Sayı (n:77)			Sayı (n:56)		
	Duyarlı	Orta duyarlı	Dirençli	Duyarlı	Orta duyarlı	Dirençli
Gentamisin	14	–	63	55	–	1
Tetrasiklin	4	–	71	47	–	9
Vankomisin	77	–	–	56	–	0
Eritromisin	30	1	46	49	–	7
Rifampin	10	–	67	53	–	3
Siproflaksasin	4	4	69	48	5	3
Klindamisin	50	1	26	53	–	3
Fosfomisin	24	–	53	55	–	1
Fusidik asit	75	2	–	51	3	2
Linezolid	76	–	1	55	–	1
Trimetoprima/sulfametoksazol	76	–	1	55	–	1
Penisilin G	1	–	76	8	–	48
Moksifloksasin	11	–	66	53	–	3

4.2. *Staphylococcus aureus*'un Pigment Özelliği

Suşların pigment seviyeleri, metanol ekstraksiyon yöntemiyle pigment izolasyonu yapılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü saptandı. Tablo 4.4'te pigmentlerin OD değerleri gösterilmektedir.

Çizelge 4.4: Gruplara göre pigment değerleri

GRUP	OD, ORTALAMA ± SD		
	15°C	37°C	42°C
MRSA (n:102)	0,008±0,009	0,010±0,012	0,007±0,007
MSSA (n:79)	0,011±0,021	0,011±0,020	0,009±0,006
MRSA+MSSA (n:181)	0,009±0,016	0,010±0,016	0,008±0,007

Isı faktörü göz önüne alınarak pigmentasyon OD değerleri Student -T testi ile karşılaştırıldığında *S.aureus* suşlarının 15°C /37°C ve 15°C/42°C arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$). Buna karşın 37°C/42°C arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p<0,05$). MRSA ve MSSA grupları arasında 15°C, 37°C ve 42°C'de pigmentasyon açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$).

4.3. MRSA ve MSSA Suşlarının Aminoglikozid Duyarlılıkları

S.aureus suşlarının netilmisin, amikasin ve gentamisin MİK değerleri agar dilüsyon yöntemi kullanılarak belirlendi. Sonuçların doğrulanması amacıyla aynı antibiyotikler disk difüzyon yöntemi kullanılarak test edildi.

Çizelge 4.5.'te MRSA suşlarının 15°C, 37°C ve 42°C inkübasyon ısılarından elde edilen amikasin MİK değerlerinin dağılımları gösterilmektedir. Amikasin MİK değerleri dikkate alındığında 15°C ile 37°C arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0,05$). Ancak bu fark 37°C ile 42°C arasında anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$). Amikasin MİK değeri 32 µg/ml'den küçük olanlar duyarlı, 32µg/ml veya üzerinde olanlar ise CLSI standardına göre dirençli kabul edildi. Suşların amikasine olan duyarlılığı göz önüne alınarak farklı ısı değerlerindeki sonuçlar karşılaştırıldığında aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0,05$).

Çizelge 4.6.'da MRSA suşlarının 15°C, 37°C ve 42°C inkübasyon ısılarından elde edilen gentamisin MİK değerlerinin dağılımları gösterilmektedir. Gentamisin MİK değerleri dikkate alındığında 15°C ile 37°C ve 37°C ile 42°C arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$). Gentamisin MİK değeri 8 µg/ml'den küçük olanlar duyarlı, 8 µg/ml veya üzerinde olanlar ise CLSI standardına göre dirençli kabul edildi. Suşların gentamisine olan duyarlılığı göz önüne alınarak farklı ısı değerlerindeki sonuçlar karşılaştırıldığında aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p<0,05$).

Çizelge 4.7.'de MRSA suşlarının 15°C, 37°C ve 42°C inkübasyon ısılarından elde edilen netilmisin MİK değerlerinin dağılımları gösterilmektedir. Netilmisin MİK değerleri dikkate alındığında 15°C ile 37°C ve 37°C ile 42°C arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$). Netilmisin MİK değeri 16 µg/ml'den küçük olanlar duyarlı, 16 µg/ml veya üzerinde olanlar ise CLSI standardına göre dirençli kabul edildi. Suşların netilmisine olan duyarlılığı göz önüne alınarak farklı ısı değerlerindeki sonuçlar karşılaştırıldığında aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0,05$).

Çizelge 4.8.'de MSSA suşlarının 15°C, 37°C ve 42°C inkübasyon ısılarından elde edilen amikasin MİK değerlerinin dağılımları gösterilmektedir Amikasin MİK değerleri dikkate alındığında 15°C ile 37°C ve 37°C ile 42°C arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (p>0,05). Amikasin MİK değeri 32 µg/ml'den küçük olanlar duyarlı, 32 µg/ml veya üzerinde olanlar ise CLSI standardına göre dirençli kabul edildi. Suşların amikasinine olan duyarlılığı göz önüne alınarak farklı ısı değerlerindeki sonuçlar karşılaştırıldığında aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü(p<0,05).

Çizelge 4.9.'da MSSA suşlarının 15°C, 37°C ve 42°C inkübasyon ısılarından elde edilen gentamisin MİK değerlerinin dağılımları gösterilmektedir Gentamisin MİK değerleri dikkate alındığında 15°C ile 37°C ve 37°C ile 42°C arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (p>0,05). Gentamisin MİK değeri 8 µg/ml'den küçük olanlar duyarlı, 8 µg/ml veya üzerinde olanlar ise CLSI standardına göre dirençli kabul edildi. Suşların gentamisine olan duyarlılığı göz önüne alınarak farklı ısı değerlerindeki sonuçlar karşılaştırıldığında aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (p<0,05).

Çizelge 4.10.'da MSSA suşlarının 15°C, 37°C ve 42°C inkübasyon ısılarından elde edilen netilmisin MİK değerlerinin dağılımları gösterilmektedir Suşların netilmisine olan duyarlılığı göz önüne alınarak farklı ısı değerlerindeki sonuçların birbirinden farklı çıkmadığı ve MSSA suşlarının % 100'ünün netilmisine duyarlı olduğu görüldü.

Çizelge 4.5: MRSA suşlarının Amikasin MİK değerlerinin 15°C, 37°C ve 42°C' ye göre dağılımları

MİK*	Sayı (%)		
	15°C **	37°C **	42°C
<0,25	0	0	0
0,5	9 (8,8)	8 (7,8)	8 (7,8)
1	6 (5,9)	7 (6,9)	6 (5,9)
2	5 (4,9)	5 (4,9)	1 (1)
4	1 (1)	1 (1)	5 (4,9)
8	0	0	0
16	9 (8,8)	8 (7,8)	4 (3,9)
32	27 (26,5)	24 (23,5)	28 (27,5)
64	38 (37,3)	36 (35,3)	36 (35,3)
128	3 (2,9)	8 (7,8)	10 (9,8)
>128	4 (3,9)	5 (4,9)	3 (2,9)
TOPLAM	102 (100)	102 (100)	102 (100)

* Amikasin için MİK değeri; ≤16 µg/ml ise duyarlı, 32 µg/ml ise orta duyarlı, ≥64 ise dirençli

** 15°C ile 37°C arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0,05).

Çizelge 4.6: MRSA suşlarının Gentamisin MİK değerlerinin 15°C, 37°C ve 42°C'ye göre dağılımları

MİK*	Sayı (%)		
	15°C	37°C	42°C
<0,25	10 (9,8)	12 (11,8)	8 (7,8)
0,5	2 (2,0)	0	4 (3,9)
1	0	0	0
2	2 (2,0)	1 (1,0)	1 (1,0)
4	2 (2,0)	2 (2,0)	3 (2,9)
8	1 (1,0)	2 (2,0)	1 (1,0)
16	0	0	0
32	1 (1,0)	1 (1,0)	1 (1,0)
64	6 (5,9)	5 (4,9)	3 (2,9)
128	46 (45,1)	35 (34,3)	41 (40,2)
>128	32 (31,4)	44 (43,1)	40 (39,2)
TOPLAM	102 (100)	102 (100)	102 (100)

* Gentamisin için MİK sınırı; ≤4 µg/ml ise duyarlı, 8 µg/ml ise orta duyarlı, ≥16 ise dirençli

Çizelge 4.7: MRSA suşlarının Netilmisin MİK değerlerinin 15°C, 37°C ve 42°C'ye göre dağılımları

MİK*	Sayı (%)		
	15°C	37°C	42°C
<0,25	14 (13,7)	14 (13,7)	14 (13,7)
0,5	7 (6,9)	6 (5,9)	6 (5,9)
1	2 (2,0)	3 (2,9)	4 (3,9)
2	13 (12,7)	11 (10,8)	7 (6,9)
4	28 (27,5)	24 (23,5)	28 (27,5)
8	31 (30,4)	35 (34,3)	25 (24,5)
16	3 (2,9)	5 (4,9)	14 (13,7)
32	3 (2,9)	3 (2,9)	3 (2,9)
64	0	0	1 (1,0)
128	1 (1,0)	1 (1,0)	1 (1,0)
>128	0	0	0
TOPLAM	102 (100)	102 (100)	102 (100)

* Netilmisin için MİK değeri; ≤8 µg/ml ise duyarlı, 16 µg/ml ise orta duyarlı, ≥32 ise dirençli

Çizelge 4.8: MSSA suşlarının Amikasin MİK değerlerinin 15°C, 37°C ve 42°C'ye göre dağılımları

MİK*	Sayı (%)		
	15°C	37°C	42°C
<0,25	26 (32,9)	25 (31,6)	26 (32,9)
0,5	9 (11,4)	3 (3,8)	6 (7,6)
1	27 (34,2)	36 (45,6)	32 (40,5)
2	13 (16,5)	11 (13,9)	8 (10,1)
4	1(1,3)	2 (2,5)	2 (2,5)
8	0	0	1 (1,3)
16	0	0	1 (1,3)
32	2 (2,5)	2 (2,5)	2 (2,5)
64	1 (1,3)	0	1 (1,3)
128	0	0	0
>128	0	0	0
TOPLAM	79 (100)	79 (100)	79 (100)

(* Amikasin için MİK değeri; ≤16 µg/ml ise duyarlı, 32 µg/ml ise orta duyarlı, ≥64 ise dirençli)

Çizelge 4.9: MSSA suşlarının Gentamisin MİK değerlerinin 15°C, 37°C ve 42°C'ye göre dağılımları

MİK*	Sayı (%)		
	15°C	37°C	42°C
<0,25	73 (92,4)	73 (92,4)	65 (82,3)
0,5	3 (3,8)	4 (5,1)	9 (11,4)
1	0	0	1 (1,3)
2	0	0	0
4	1(1,3)	0	0
8	0	0	0
16	0	0	1 (1,3)
32	0	0	1 (1,3)
64	0	0	0
128	2 (2,5)	2 (2,5)	2 (2,5)
>128	0	0	0
TOPLAM	79 (100)	79 (100)	79 (100)

* Gentamisin için MİK sınırı; ≤4 µg/ml ise duyarlı, 8 µg/ml ise orta duyarlı, ≥16 ise dirençli

Çizelge 4.10: MSSA suşlarının Netilmisin MİK değerlerinin 15°C, 37°C ve 42°C'ye göre dağılımları

MİK*	Sayı (%)		
	15°C	37°C	42°C
<0,25	77 (97,5)	77 (97,5)	77 (97,5)
0,5	0	0	0
1	2 (2,5)	2 (2,5)	2 (2,5)
2	0	0	0
4	0	0	0
8	0	0	0
16	0	0	0
32	0	0	0
64	0	0	0
128	0	0	0
>128	0	0	0
TOPLAM	79 (100)	79 (100)	79 (100)

* Netilmisin için MİK değeri; ≤8 µg/ml ise duyarlı, 16 µg/ml ise orta duyarlı, ≥32 ise dirençli

4.4. Aminoglikozid Modifiye Edici Enzim Genlerinin Varlığı

Isı farkından etkilenen, MİK değeri değişen *S.aureus* suşları ve MİK değeri değişmeyen *S.aureus* suşları olmak üzere Çizelge 4.11.'de gösterildiği gibi iki ana grup oluşturuldu. Bu gruplar gentamisin dirençli, amikasin dirençli, netilmisin duyarlı; gentamisin dirençli, amikasin duyarlı, netilmisin duyarlı; gentamisin dirençli, amikasin dirençli, netilmisin dirençli olan bakteriler seçilerek 3 alt gruba ayrıldı. Gruplar, MSSA suşlarında aminoglikozid direnci saptanmadığından gruplara dahil edilmedi.

Çizelge 4.11. AME varlığının araştırılması için oluşturulan gruplar

GRUPLAR		Metisilin Dirençli <i>S.aureus</i> (Sayı)	
		MİK değeri değişen	MİK değeri değişmeyen
1nci Grup	Gentamisin dirençli, amikasin dirençli, netilmisin duyarlı	17	11
2nci Grup	Gentamisin dirençli, amikasin duyarlı, netilmisin duyarlı	4	3
3ncü Grup	Gentamisin dirençli, amikasin dirençli, netilmisin dirençli	1	2
TOPLAM		22	16

Aminoglikozid modifiye edici enzim genlerinin varlığı klasik PCR yöntemiyle saptandı. Metod kısmında belirtilen kriterlere uygun olarak, toplam 38 suşta gen varlığı araştırıldı (Çizelge 4.11). PCR yapılan 38 MRSA suşunun 35 tanesinde (% 89,8) *aac(6')/aph(2'')* [496 bp] geni pozitif olarak bulundu (Şekil 4.1, Çizelge 4.12). *aac(6')/aph(2'')* geni negatif 4 MRSA suşunun duyarlılık test sonuçlarında gentamisine dirençli olduğu görüldü. *aph(3')-IIIa* [323 bp] geni suşların sadece 1 (% 2,6) tanesinde pozitif olarak bulundu (Şekil 4.2). *ant(4')-Ia* [348 bp] geni suşların hepsinde negatif bulundu. Fakat Ardıç ve ark.'nın çalışmalarında kullandığı pozitif kontrol denemelere rağmen çalıştırılmadığı için değerlendirilmedi.

Çizelge 4.13.'de sırasıyla amikasin, gentamisin ve netilmisin antibiyotiklerinin farklı sıcaklıklardaki MİK değerleri ve PCR sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.12. Stafilokokun fenotipik olarak disk difüzyon ve genotipik olarak PCR ile belirlenen antibiyotik direnç profilleri

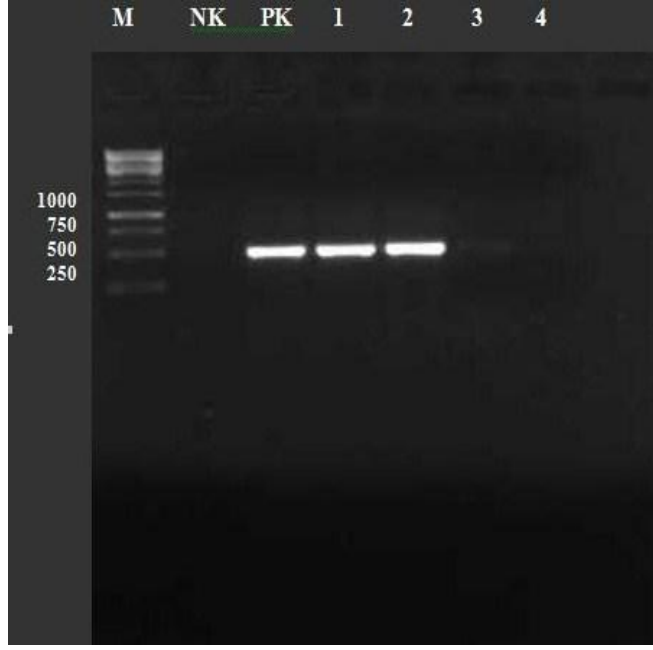
İZOLAT NO	AMİKASİN	GENTAMİSİN	NETİLMİSİN	<i>aac(6')/aph(2'')</i>	<i>aph(3')-IIIa</i>
5	Dirençli	Dirençli	Duyarlı	+	-
8	Dirençli	Dirençli	Duyarlı	+	-
33	Dirençli	Dirençli	Duyarlı	+	+
34	Dirençli	Dirençli	Dirençli	+	-
43	Dirençli	Dirençli	Duyarlı	+	-
44	Dirençli	Dirençli	Duyarlı	+	-
48	Dirençli	Dirençli	Duyarlı	+	-
65	Duyarlı	Dirençli	Duyarlı	+	-
67	Dirençli	Dirençli	Duyarlı	+	-
71	Dirençli	Dirençli	Duyarlı	+	-
74	Duyarlı	Dirençli	Duyarlı	+	-
80	Duyarlı	Dirençli	Duyarlı	+	-
83	Dirençli	Dirençli	Duyarlı	-	-
85	Dirençli	Dirençli	Duyarlı	+	-
87	Dirençli	Dirençli	Duyarlı	+	-
93	Duyarlı	Dirençli	Duyarlı	+	-
97	Dirençli	Dirençli	Duyarlı	+	-
98	Dirençli	Dirençli	Dirençli	+	-
99	Dirençli	Dirençli	Dirençli	+	-
100	Dirençli	Dirençli	Duyarlı	+	-
106	Dirençli	Dirençli	Duyarlı	+	-
108	Dirençli	Dirençli	Duyarlı	+	-
110	Dirençli	Dirençli	Duyarlı	+	-
116	Dirençli	Dirençli	Duyarlı	-	-
118	Duyarlı	Dirençli	Duyarlı	+	-
119	Dirençli	Dirençli	Duyarlı	+	-
121	Dirençli	Dirençli	Duyarlı	+	-
125	Dirençli	Dirençli	Duyarlı	+	-
126	Dirençli	Dirençli	Duyarlı	+	-
129	Duyarlı	Dirençli	Duyarlı	+	-
130	Dirençli	Dirençli	Duyarlı	+	-
131	Dirençli	Dirençli	Duyarlı	+	-
133	Dirençli	Dirençli	Duyarlı	+	-
134	Dirençli	Dirençli	Duyarlı	+	-
135	Dirençli	Dirençli	Duyarlı	+	-
138	Dirençli	Dirençli	Duyarlı	+	-
139	Dirençli	Dirençli	Duyarlı	+	-
140	Duyarlı	Dirençli	Duyarlı	-	-

Çizelge 4.13. PCR yapılan suşların aminoglikozidlere farklı sıcaklıklardaki MİK değerleri ve aminoglikozid modifiye edici enzim genleri varlığı

NO	MİK (µg/ml)									AME GENLERİ	
	AMİKASİN			GENTAMİSİN			NETİLMİSİN			<i>aac(6')/aph(2'')</i>	<i>aph(3')-IIIa</i>
	15°C	37°C	42°C	15°C	37°C	42°C	15°C	37°C	42°C		
5	64	64	64	128	128	128	4	4	4	+	-
8	64	64	64	>128	>128	>128	8	8	8	+	-
48	64	64	64	128	128	128	8	8	8	+	-
67	64	64	64	128	128	128	8	8	8	+	-
71	128	128	128	>128	>128	>128	8	8	8	+	-
87	64	64	64	128	128	128	8	8	8	+	-
106	64	64	64	128	128	128	8	8	8	+	-
116	64	64	64	>128	>128	>128	4	4	4	-	-
121	64	64	64	>128	>128	>128	8	8	8	+	-
131	64	64	64	128	128	128	4	4	4	-	-
138	64	64	64	128	128	128	2	2	2	+	-
74	16	16	16	64	128	128	2	2	2	+	-
129	16	16	16	128	128	128	2	2	2	+	-
140	16	16	16	64	64	64	1	1	1	-	-
34	>128	>128	128	32	32	32	32	32	32	+	-
98	32	32	32	128	128	128	4	8	8	+	-
43	32	64	64	64	64	128	2	8	8	+	-
44	64	128	64	128	128	>128	8	8	16	+	-
83	64	64	128	128	>128	>128	8	8	16	-	-
97	32	32	32	128	128	128	8	8	4	+	-

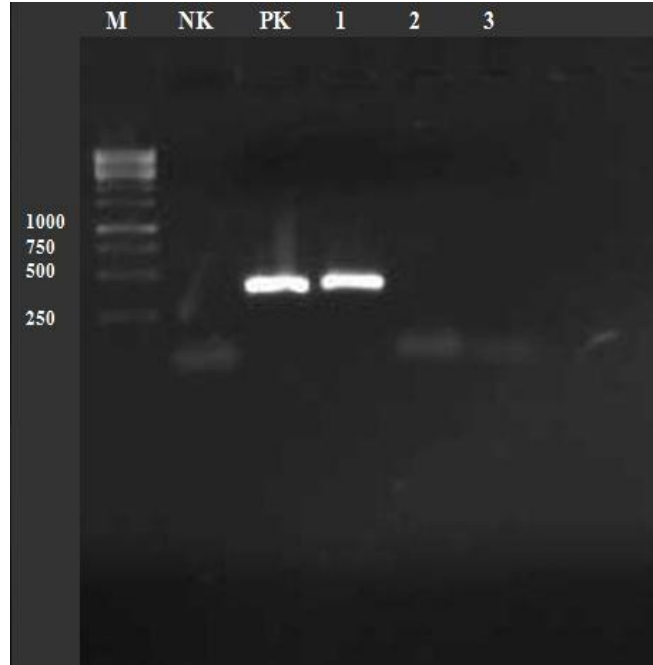
Çizelge 4.13 (devam): PCR yapılan suşların aminoglikozidlere farklı sıcaklıklardaki MİK değerleri ve aminoglikozid modifiye edici enzim genleri varlığı

NO	MİK (µg/ml)									AME GENLERİ AMİKASİN	
	AMİKASİN			GENTAMİSİN			NETİLMİSİN			<i>aac(6')/aph(2'')</i>	<i>aph(3')-IIIa</i>
	15°C	37°C	42°C	15°C	37°C	42°C	15°C	37°C	42°C		
135	32	64	32	128	>128	128	8	8	8	+	-
139	32	64	32	>128	64	64	2	2	2	+	-
134	32	64	64	>128	>128	>128	4	8	8	+	-
33	64	128	128	>128	>128	>128	16	8	8	+	+
85	32	64	64	128	>128	>128	4	4	4	+	-
130	64	64	32	128	>128	128	4	8	4	+	-
100	64	128	128	128	>128	128	4	8	8	+	-
110	64	64	64	128	128	>128	8	4	4	+	-
108	64	64	64	128	128	128	4	8	8	+	-
119	64	64	64	128	128	>128	4	8	8	+	-
65	32	16	32	>128	>128	>128	2	8	4	+	-
80	32	16	32	128	>128	>128	2	4	4	+	-
93	16	16	32	128	>128	>128	2	2	4	+	-
118	32	16	32	128	128	128	4	2	4	+	-
18	64	>128	>128	64	>128	>128	128	128	128	+	-
99	>128	>128	128	>128	>128	128	16	16	32	+	-
125	64	64	32	>128	128	>128	4	8	4	+	-
126	32	64	32	128	>128	128	8	4	8	+	-
133	64	64	32	>128	>128	>128	8	4	8	+	-



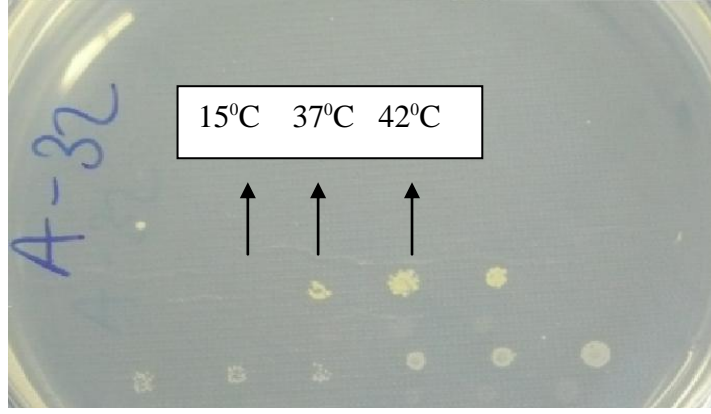
Şekil 4.1. *aac(6')/aph(2'')* genini içeren PCR ürünü agaroz jel görüntüsü.

M: DNA belirteci (1000bp DNA ladder, Fermentas, USA); PK: Pozitif Kontrol (496bp); NK: Negatif Kontrol; 1, 2: *aac(6')/aph(2'')* pozitif suşlar; 3,4: *aac(6')/aph(2'')* negatif suşlar



Şekil 4.2: *aph(3')-IIIa* genini içeren PCR ürünü agaroz jel görüntüsü.

M: DNA belirteci (1000bp DNA ladder, Fermentas, USA). PK: Pozitif Kontrol (323 bp). NK: Negatif Kontrol. 1: *aph(3')-IIIa* pozitif suş; 2,3: *aph(3')-IIIa* negatif suşlar



A



B

Şekil 4.3: Amikasin antibiyotiği ısı faktörünün etkisiyle 43 numaralı MRSA izolatının MİK değerinin değişmesi. A: 32µg/ml amikasin içeren Mueller Hinton Agar besiyeri. B: 64 µg/ml amikasin içeren Mueller Hinton Agar besiyeri.

Isının etkisiyle amikasin MİK değeri değişen 43 numaralı MRSA suşunun agar dilüsyon sonucu Şekil 4.3'te gösterildiği gibidir. Bu suşun 15°C'de MİK değeri 32 µg/ml iken 37°C'de MİK değeri 64 µg/ml olmuştur.

4.5. Küçük Koloni Varyant Özelliği

Suşlar % 5 koyun kanlı agara ekilerek 37°C'de 48-72 saat inkübe edildi. Fakat küçük koloni özelliği gösteren suşa rastlanmadı

5. TARTIŞMA

S.aureus herhangi bir stresle karşılaştığında, çeşitli adaptasyon mekanizmaları geliştirmektedir. *S.aureus* en iyi 37°C'de üremektedir fakat *S.aureus* geniş ısı aralığında canlılığını devam ettirebilmektedir. Azalan ısıya karşı *S.aureus*'un cevabını araştıran bir çalışmada; ısının etkisiyle *S.aureus*'un aminoglikozid direncinde ve pigmentasyonunda değişiklikler meydana geldiği bildirilmiştir. Azalan ısıya adapta olabilmek için eksprese edilen ve soğuk şok proteinleri olarak isimlendirilen CSP'lerin antibiyotik direnciyle olan ilişkisinin dışında bakteriye bir takım özellikler kazandırdığı savunulmuştur. Bu çalışmada, *S.aureus* suşlarının soğukla indüklenebilen en önemli geninin *cspB* geni olduğu, *cspB* genini kaybeden *S.aureus*'ların pigmentlerinin azaldığı ve ciddi şekilde üreme defekti meydana geldiği gösterilmiştir. Ayrıca *cspB* genine sahip gentamisin, amikasin ve tobramisin gibi aminoglikozidlere daha fazla direnç kazandığı gösterilmiştir (Duval et al., 2010). Soğuk şok proteinlerinden CspA, lökositlerin *S.aureus*'u öldürmelerinde düzenleyici rol oynamaktadır (Katzif et al., 2003). Ayrıca aynı araştırmacının başka bir çalışmasında CspA'nın, *S.aureus*'ta pigment üretimini düzenlediği, yapılan deneylerle gösterilmiştir (Katzif et al., 2005). Bizim çalışmamızda, farklı ısılardaki 1 saat inkübasyonun, *S.aureus*'un pigment oluşmasına, aminoglikozid duyarlılığına ve koloni morfolojisine etkisi araştırıldı. *S.aureus*'un 1 saatlik farklı ısılardaki inkübasyonunun ardından pigment oluşması ve pigmentin antibiyotik direnciyle bağlantısı araştırıldı ve MRSA ve MSSA suşlarında pigmentasyon açısından bir fark olmadığı görüldü. Bu sonuca göre, pigmentin metisilin direncinden bağımsız olarak bakterinin bir özelliği olduğuna karar verildi. Metisilin direncine bakılmaksızın, suşların 42°C'de, 37°C'ye göre daha az pigment yaptığı gözlemlendi. Stafilokok kolonilerinde pigment, 37°C'de 24 saat inkübasyondan sonra görülmektedir ancak inkübasyondan sonra kültürler oda sıcaklığında bekletildiğinde pigmentlerin arttığı görülmektedir (Wieland et al., 1994). Bu durum oda ısısında bekleyen kültürlerde pigment artışı uygun olmayan koşullarda bakterinin direncini arttırmaya katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir. Yaradan izole edilen *S.aureus* suşlarda kanamisin ve penisilin direncini araştıran bir çalışmada, aynı zamanda direncin pigmentasyonla bağlantısı araştırılmış; yaradan izole edilen suşların dirençli ve duyarlı olanlarının hepsinde bol miktarda pigment olduğu gösterilmiş, pigmentin dirençle bir bağlantısı bulunamamıştır (Annear et al., 1971). Yakın bir zamanda, CspA proteininin, pigment üretimini düzenlediği konusunda bir çalışma yayınlanmıştır; pigment üreten

S.aureus suşlarının soğğun etkisiyle daha fazla pigment ürettikleri, pigment üretme özelliği olmayanlarda ise herhangi bir değişiklik olmadığı gösterilmiştir (Katzif et al., 2005). Bizim çalışmamıza, 15°C’de inkübe edilen suşların 37°C ve 42°C’de 1 saat inkübe edilen suşlara göre bir farklılık izlenmedi. CspA proteini ölçülmemesine rağmen, CspA proteininin soğğun etkisiyle salgılandığı varsayılırsa CspA’nın pigment oluşumu üzerine bir etkisi bu çalışmada gösterilememiştir.

Çalışmamızda, çevre faktörlerinden ısının *S.aureus*’un antibiyotik direncine etkisi fenotipik yöntemler kullanılarak test edildi. Triptik soy sıvı besiyerinde 20 saatlik inkübasyonun takriben eşit parçalara ayrılarak 1 saatlik ısı stresine bırakılan *S.aureus* suşlarının artan ve azalan ısıya karşı aminoglikozid duyarlılık profilinin nasıl etkilendiği test edildi. MRSA suşlarının amikasin için MİK değerleri 15°C ile 37°C arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0,05$); ancak 37°C ile 42°C arasında amikasin MİK değerleri anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$). MSSA suşlarının farklı ısılardaki amikasin MİK değerleri arasında anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$). MİK değerlerine göre, duyarlı ve dirençli ayırımı yapıldıktan sonra ki-kare testiyle karşılaştırıldığında, MRSA ve MSSA suşlarının amikasin duyarlılığı farklı ısılarda istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0,05$). MRSA ve MSSA suşlarının gentamisin için farklı ısılardaki MİK değerleri arasında anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$). MİK değerlerine göre, duyarlı ve dirençli ayırımı yapıldıktan sonra ki-kare testiyle karşılaştırıldığında, MRSA ve MSSA suşlarının gentamisin duyarlılığı farklı ısılarda istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0,05$). MRSA ve MSSA suşlarının netilmisin için farklı ısılardaki MİK değerleri arasında anlamlı fark bulunmadı. MİK değerlerine göre, duyarlı ve dirençli ayırımı yapıldıktan sonra ki-kare testiyle karşılaştırıldığında, MRSA suşlarının netilmisin duyarlılığı farklı ısılarda istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0,05$). Literatürde, bu sonuçların karşılaştırılabileceği, klinikten elde edilmiş suşlarla yapılan, çevre faktörlerinin antibiyotik direncine etkisinin araştırıldığı herhangi bir çalışma bulunmamaktadır, yapılan bir-iki çalışmada laboratuvarında genetik olarak yeniden düzenlenen suşlar kullanılarak bir sonuca varılmaya çalışılmıştır (Katzif et al., 2005; Duval et al., 2010). Klinik örneklerden elde edilen suşlarda, çevre faktörlerinin antibiyotik direncine etkisinin araştırıldığı bu çalışmamız bir ilk olma özelliğine sahiptir. Genel olarak, pigmentin ısı farkından etkilendiği ancak ısı faktörünün aminoglikozid duyarlılığını etkilemediği gözlenmiştir. Farklı ısıda, MİK değerlerine bakılarak, *S.aureus* suşlarının aminoglikozidlere karşı duyarlılığında minimal değişiklikler gözlenmesine rağmen

derecelendirmede duyarlı olan bir suş dirençli veya dirençli olan bir suş ısının etkisiyle duyarlı hale (konversiyon) geçmemiştir.

Çalışmamızda, ısının direnç mekanizması üzerine etkisi, AME'lerin moleküler olarak varlığının gösterilmesi şeklinde planlandı. Aminoglikozidlere direnç; ribozomal direnç, permeabilite direnci, aminoglikozidleri modifiye edici enzimlere bağlı olarak gelişen direnç olmak üzere üç mekanizma ile olmaktadır. Bunlar içinde en yaygın ve önemli olanı aminoglikozid modifiye edici enzim (AME) varlığında gelişen dirençtir (Hauschild et al., 2008). Ribozomal direnç ve permeabilite direnci nadiren görülmektedir. Çalışmada kullanılan *S.aureus* suşlarından seçilen bir grupta, AME'nin varlığı araştırıldı (Çizelge 4.11). Aminoglikozid duyarlılık testine başlanmadan önce, suşlar, ısı faktörüne göre, sıvı besiyerinde 15°C veya 42°C'de 1 saat inkübe edildi, sonra test işlemine uygun şekilde 37°C'de, sonuçlar okunmadan en az 18 saat inkübe edildi. Farklı ısılardaki 1 saatlik inkübasyon sırasında, bakterinin strese girebileceği ve bu sırada stres proteinlerini salgılayacağı, yapılan çalışmalardan elde edilen sonuca göre varsayıldı. Salgılanan stres proteinlerinin, *S.aureus*'un aminoglikozid direncine etkisi, AME bulundurmayan suşlarda en iyi şekilde anlaşılacağı öngörüldü. AME enzimi bulundurmayan suşların ısı şokundan sonra dirençli veya duyarlı hale geçmeleri durumunda, meydana gelen değişikliğin ısı şokundan kaynaklanabileceği düşüncesiyle yaklaşıldı. Ancak, çalışılan suşlarda, 1 saatlik ısı farkının etkisiyle duyarlılıkta bir değişiklik olmadı, sadece bazı suşların MİK değerlerinde değişiklikler meydana geldi. Çalışmaya bu doğrultuda devam edildi.

Çalışmamızda ve diğer çalışmalardan elde edilen sonuca göre, gentamisin dirençli suşların genelinde *aac(6')/aph(2'')* geni pozitif bulunmaktadır, ancak az da olsa gentamisin dirençli suşlarda *aac(6')/aph(2'')* geni negatif olabileceği gibi gentamisin duyarlı suşlarda da *aac(6')/aph(2'')* geni pozitif olabilmektedir. Japonya'da yapılan bir çalışmada 381 MRSA izolatının % 62'sinde gentamisine direnç tespit edilmiştir, gentamisine dirençli suşların tümü *aac(6')/aph(2'')* geni pozitif olarak bulunmuştur (Ida et al., 2001). Kore'de yapılan başka bir çalışmada; 45 *S.aureus* suşunun % 69'u gentamisine dirençli ve gentamisine dirençli suşların tümü *aac(6')/aph(2'')* geni pozitif olarak bulunmuştur (Choi et al., 2003). Gentamisin ve *aac(6')/aph(2'')* geni arasındaki korelasyonu araştıran bir çalışmada; 206 *S.aureus* suşunun % 20'si gentamisine dirençli ve dirençli tüm suşlarda *aac(6')/aph(2'')* geni pozitif olarak bulunmuştur (Martineau et al., 2000). İran'da yapılan bir çalışmada 100 *S.aureus* suşunun % 46'sında gentamisine direnç ve *aac(6')/aph(2'')* geni pozitif bulunmuştur (Yadegar et al., 2009). Farklı olarak; Polonya'da 2002-2006 yıllarında 118 *S.aureus* suşunun % 24'ü gentamisine dirençli;

gentamisine dirençli suşların % 100'nde *aac(6')/aph(2'')* geni pozitif bulunmuştur; ayrıca gentamisine duyarlı iki suşta da *aac(6')/aph(2'')* geni tespit edilmiştir (Hauschild et al., 2008). Kuveyt'te yapılan bir çalışmada; 40 *S.aureus*'un % 75'inde gentamisine direnç tespit edilmiştir; gentamisine dirençli 2 *S.aureus* suşunda *aac(6')/aph(2'')* geni negatif, gentamisine duyarlı 1 *S.aureus* suşunda ise bu gen pozitif olarak bulunmuştur (Udo and Dashti, 2000). İran'da yapılan başka bir çalışmada ise, *aac(6')/aph(2'')* genini taşıyan 91 MRSA suşunun 8 tanesi gentamisine duyarlı bulunmuştur (Fatholahzadeh et al., 2009). Aminoglikozid direnç mekanizmasını araştıran 2008 yılında yapılan bir çalışmada; 40 klinik *S.aureus* suşundan rastgele seçilen 6 *S.aureus* suşunun tümünde gentamisin direnci tespit edilmiş; 3 *S.aureus* suşunda aminoglikozid modifiye edici enzimlerden en az birisi olmasına rağmen; diğer 3 suşta aminoglikozid modifiye edici enzimlerden hiçbiri bulunamamıştır. Araştırmacılar bu direncin adaptif dirençten kaynaklandığını ve adaptif direncin de AME'lerden bağımsız olarak stres koşulları altında gelişen bir özellik olduğunu belirtmişlerdir (Chandrakanth et al., 2008). Ülkemizde bu konuyla ilgili literatürde, bizim araştırmalarımıza göre (Pubmed, Google Akademik) sadece bir çalışma vardır, bu çalışmada 17 gentamisine dirençli MRSA suşunun 16'sında (% 94) *aac(6')/aph(2'')* geni bulunmuş, 1 tanesinde ise gen bulunamamıştır (Ardıç ve ark., 2006). Genel olarak, yapılan çalışmalarda gentamisine dirençli olan suşlarda *aac(6')/aph(2'')* geni pozitif bulunmuştur, ayrıca bazı çalışmalarda gentamisin direnci negatif olmasına rağmen *aac(6')/aph(2'')* geni pozitif bulunmuştur. Bizim çalışmamızda, gentamisine dirençli 38 *S.aureus* suşunun 35 (% 92,1) tanesinde *aac(6')/aph(2'')* geni pozitif olarak bulunmuştur; diğer çalışmalarla kıyaslandığında sonuçların benzer olduğu görülmektedir. Bir çalışmada, gentamisin direnci olduğu halde 30 suşun 2 tanesinde *aac(6')/aph(2'')* geni negatif bulunmuştur, bizim çalışmamızda da benzer şekilde gentamisine dirençli 3 (% 8) suşta *aac(6')/aph(2'')* geni tespit edilmemiştir.

Amikasin dirençli *S.aureus* suşlarının AME enzimiyle ilişkisi araştırıldığında gentamisinde olduğu gibi tek bir enzimin baskın olmadığı anlaşılmaktadır. Amikasin dirençli suşlara *aph(3')-IIIa* ve ayrıca *aac(6')/aph(2'')* genlerinin belli oranlarda pozitif olduğunu gösteren çalışmalar vardır. İran'da yapılan bir çalışmada amikasin dirençli gentamisine duyarlı suşlarda *aph(3')-IIIa* geninin var olduğu, amikasin direnci ile bu gen arasında bir uyum olabileceği bildirilmiştir (Fatholahzadeh et al., 2009). Kuveyt'te yapılan bir çalışmada yine amikasin direnci *aph(3')-IIIa* geni ile ilişkilendirilmiştir (Udo and Dashti, 2000). Başka bir çalışmada amikasin direnci ve *aac(6')/aph(2'')* gen varlığı arasındaki uyum % 78; *ant(4')-Ia* geni arasındaki uyum % 50'den az olarak bildirilmiştir

(Choi et al., 2003). Bizim çalışmamızda 32 amikasin dirençli suşun 29 (% 90,6) tanesinde *aac(6')/aph(2'')* geni pozitif olarak bulunmuştur. Ayrıca amikasin dirençli bir suşta, *aac(6')/aph(2'')* ve *aph(3')-IIIa* genleri pozitif olarak bulunmuştur.

Netilmisin tüm *S.aureus* suşlarına karşı en etkili aminoglikoziddir. (Hauschild et al., 2008; Vanhoof et al., 1994). Kuveyt'te yapılan çalışmada netilmisine dirençli suşlarda her üç gene de rastlanmıştır (Udo and Dashti, 2000). Bizim çalışmamızda ise 38 *S.aureus* suşunda sadece 4 suş netilmisine dirençli olarak bulunmuş ve bu suşlarda sadece *aac(6')/aph(2'')* bifonksiyonel geni tespit edilmiştir.

Aminoglikozid modifiye edici enzimlerin yaygınlığı coğrafik bölgelere, zamana ve hatta hastaneden hastaneye değişebilmektedir (Willke, 2003; Schmitz et al., 1999). Çeşitli ülkelerde yapılan çalışmalara göre AME'lerin yaygınlığı şöyledir: Avrupa'da yapılan bir çalışmada; *S.aureus* suşlarının % 72'sinde *aac(6')/aph(2'')* geni, % 52'sinde *ant(4')-Ia* geni, % 8'inde *aph(3')-IIIa* geni tespit edilmiştir (Schmitz et al., 1999). Polonya'da yapılan çalışmada *aac(6')/aph(2'')* geni *S.aureus* suşlarının % 28,9'unda; *ant(4')-Ia* geni % 26,7'sinde ve *aph(3')-IIIa* geni % 15,6'sında pozitif olarak bulunmuştur (Hauschild et al., 2008). Bu çalışmalara göre AME'ler içinde en yaygın görülen gen *aac(6')/aph(2'')* bifonksiyonel genidir. Japonya'da yapılan çalışmada *ant(4')-Ia* geni *S.aureus* suşlarının % 84,5'inde, *aac(6')/aph(2'')* geni % 61,7'sinde ve *aph(3')-IIIa* geni % 8,9'unda pozitif olarak tespit edilmiştir (Ida et al., 2001). İran'da yapılan bir çalışmada; *ant(4')-Ia* geni *S.aureus* suşlarının % 58'inde *aac(6')/aph(2'')* geni % 46'sında ve *aph(3')-IIIa* geni % 6'sında bulunmuştur (Yadegar et al., 2009). Bu çalışmalara göre ise AME'ler için en sık karşılaşılan gen *ant(4')-Ia* genidir. Ülkemizde *S.aureus* suşlarının % 94'ünde *aac(6')/aph(2'')* geni pozitif olarak tespit edilmiş diğer iki gene hiçbir *S.aureus* suşunda rastlanılmamıştır (Ardıç ve ark., 2006). Bizim çalışmamız ülkemizde yapılan çalışmanın sonucunu desteklemektedir. *aac(6')/aph(2'')* geni *S.aureus* suşlarının % 92,1'inde tespit edilerek; en yaygın gen olarak bulunmuştur. *aph(3')-IIIa* geni 1 (% 2,6) suşta pozitif olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda küçük koloni özelliği gösteren suşlara rastlanmadı. Bunun nedeni küçük koloni varyantlarının özellikle osteomyelit, kistik fibrozis gibi kronik infeksiyonu olan hastalardan izole edilebilmesi olabilir (Proctor et al., 1998).

Genel olarak stafilokokların aminoglikozidlere olan duyarlılıkları, ülkemiz de dâhil olmak üzere, dünyanın çeşitli yerlerinde araştırılmıştır. Ülkemizde *S.aureus*'un gentamisin direnci % 34 - % 93 arasında bulunmuştur (Akkurt ve ark., 2002; Gürsoy ve ark., 2009; Turkdığı ve ark., 2011). Yurtdışında ise bu oran ortalama % 60 civarındadır (Choi et al.,

2003). Bizim çalışmamızda, 181 *S.aureus* suşunun 87 (% 48) tanesi gentamisine dirençli bulunmuştur. Bu oran diğer çalışmalarda belirtilen oranların arasında bir değer olduğundan uyumlu bulunmuştur. *S.aureus*'larda amikasin direnci, ülkemizde % 13,2 – 24,0 arasında bulunmuştur (Altoparlak ve ark., 2002, Ertek ve ark., 2003). Yabancı yayınlarda ise oran ortalama % 20 civarındadır (Choi et al., 2003). Bizim çalışmamızda, 181 *S.aureus* suşunun 49 (% 27) tanesi amikasin dirençli bulundu. Bu oran diğer çalışmalarda belirtilen oranlarla uyumlu olduğu gözlenmiştir. *S.aureus*'larda netilmisin direnci, ülkemizde % 2,4 - 22 gibi geniş bir aralıkta bulunmuştur (Altoparlak ve ark., 2002, Güler ve ark., 2008). Bizim çalışmamızda 181 *S.aureus* suşunun 4 (% 2,2) tanesi netilmisine dirençli bulunmuştur. Çıkan sonuç Altoparlak ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile uyumlu; fakat Güler ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre netilmisine daha düşük oranda direnç tespit edilmiştir; aradaki farkın çalışmaların yapıldığı bölgelerin coğrafik özelliklerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bölgelere ait benzer çalışmaların artırılması gerçek profilin ortaya çıkartılmasına yardımcı olacaktır.

Aminoglikozid direnci MRSA suşlarında MSSA suşlarına göre daha yüksektir (Schmitz et al., 1999). Aminoglikozid direncinden sorumlu aminoglikozid modifiye edici enzim genleri ve metisiline direnç geni arasında bir ilişki olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (Schmitz et al., 1999; Fatholahzadeh et al., 2009; Choi et al., 2003). Bu yakın ilişkinin AME'leri kodlayan gen lokuslarının ve mecA gen lokusunun bitişik olmasından kaynaklanıyor olabileceği bildirilmiştir (Choi et al., 2003). Yapılan çalışmalarda MRSA'larda aminoglikozid direnci, MSSA'lara oranla daha yüksek bulunmuştur. Ülkemizde yapılan çalışmalarda MRSA'ların gentamisin direnci % 43-69 arasında; MSSA'ların ise % 5-11 arasında bulunmuştur (Altoparlak ve ark., 2002; Ertek ve ark., 2003). Bizim çalışmamızda ise, 102 MRSA suşunun 85 (% 83) tanesi; 79 MSSA suşunun 2 (% 3) gentamisine dirençli bulunmuştur. Ülkemizde amikasin antibiyotiginin, MRSA ve MSSA suşlarındaki duyarlılık profillerine bakan çalışmalarda; MRSA'ların amikasin direnç oranı % 12-21 arasında iken MSSA'ların % 0-1 olarak bulunmuştur (Altoparlak ve ark., 2002; Ertek ve ark., 2003). Bizim çalışmamızda ise, 102 MRSA suşunun 49 (% 48) tanesi amikasin dirençli bulunurken; 79 MSSA suşunun hepsi amikasin duyarlı olarak bulunmuştur. Çalışmamızda amikasin duyarlılık oranları yapılan diğer çalışmalar ile uyumlu bulunmuştur. Ülkemizde yapılan bir çok çalışmada MRSA ve MSSA'ların netilmisine direnç oranları oldukça düşük; MRSA'ların % 1-19 ve MSSA'ların ise % 0-1 arasında bulunmuştur (Altoparlak ve ark., 2002; Ertek ve ark., 2003). Tez çalışmamızda ise, 102 MRSA suşunun 4 (% 4) tanesi netilmisine dirençli bulunurken 79 MSSA suşunun

tümü netilmisine duyarlı bulunmuştur. Çalışmamızda elde edilen netilmisin duyarlılık oranı Altoparlak ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma ile uyumlu fakat Ertek ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmaya göre daha düşük bulunmuştur. Stafilocokların aminoglikozid duyarlılığı test edilen birçok çalışmada netilmisin en etkili antibiyotik olarak bulunmuştur (Anupurba et al., 2003; Ardiç ve ark., 2006). Anupurba ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada netilmisinin en etkili aminoglikozid olmasına rağmen stafilokokal infeksiyonların ampirik tedavisinde kullanılmaması gerektiğini bildirmiştir. Bizim çalışmamızda da *S.aureus*'un en duyarlı olduğu aminoglikozidin netilmisin olduğu görülmüştür.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Staphylococcus aureus herhangi bir stresle karşılaştığında virülans faktörlerini, düzenleyici mekanizmalarını kullanarak ve strese karşı özel proteinler sentezleyerek strese baş edebilme yeteneğine sahiptir. Ayrıca bu olumsuz durumlarda şok düzenleyici proteinleri sentezleyerek maruz kaldığı stres ile başa çıkabilmektedir. Ancak strese karşılık oluşan mikrobiyal yanıt çeşitli sonuçlar doğurmaktadır. Örneğin; bakteride fenotipik bazı değişikliklere yol açabilir, bakteri konak organizmanın savunma mekanizmasından kaçabilir, böylece tedavisi daha zorlaşabilir. Bu nedenlerden dolayı çalışmamızda çevresel faktörlerden ısının *S.aureus* klinik suşları üzerindeki etkisi araştırılmıştır. *S.aureus*'un virülans faktörleri ile alakalı birçok çalışma bulunmasına rağmen, strese başa çıkabilmesi konusundaki çalışmaların oldukça az olduğu görülmüştür. Fakat bakterinin bu yeteneği oldukça önemlidir ve patojenitesine büyük katkı sağlamaktadır, antibiyotik tedavilerini zorlaştırabilmektedir, besin zehirlenmelerine daha kolay yol açabilmektedir. Yapılan çalışmaların artmasıyla *S.aureus*'un antibiyotik direnç mekanizmalarının incelenmesinde çevresel faktörlerin etkisi aydınlatılmış olacaktır.

Çalışmamızda ısının pigment üzerine etkisi gösterilebilirken, aminoglikozid duyarlılığı üzerine etkisi gösterilememiştir. Değişen ısının aminoglikozid duyarlılığında değişime yol açmaması, 1 saatlik 42°C sıcak ve 15°C soğuk şokunun, bakteride yeterli proteinleri salgılayarak duyarlılığının değişmesine yol açmaması sonucu olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle sıcak ve soğuk şokunun süresi uzatılmalı, hatta hangi sürede şok proteinlerini sentezleyerek değişime yol açtığını bulmak için farklı sürelerde şoka maruz bırakan bir çalışma yapılmalıdır. *S.aureus*'un strese nasıl başa çıktığının öğrenilmesi, özellikle yoğun bakım gibi sıcaklığın düşük olduğu yerlerden bu bakterinin eradike edilmesini sağlayacak yeni yöntemler geliştirilmesini sağlayabilecektir. Bu durum da hastane infeksiyonlarını önlemek açısından önemlidir.

KAYNAKLAR

- Akkurt L., Havuz S. G., Uyar Y., Karadağ A., Esen Ş., Günaydın M. (2002) 1999-2000 Yıllarında Yoğun Bakım Ünitesinde İzole Edilen Bakterilerde Antibiyotik Direnci. *Ankem Derg*; 16 (1): 14-17.
- Altöparlak Ü., Uslu H., Kireççi E., Aktaş F. (2002) Klinik Örneklerden İzole Edilen Stafilocoklarda Antibiyotik Direnci. *Ankem Derg*; 16 (1): 69-72.
- Anderson K. L., Roberts C., Disz T., Vonstein V., Hwang K., Overbeek R., Olson P. D., Dunman P. M. (2006) Characterization of the *Staphylococcus aureus* Heat Shock, Cold Shock, Stringent, and SOS Responses and Their Effects on Log-Phase mRNA Turnover. *Journal of Bacteriology*; 188 (19): 6739-6756.
- Annear D. I., Grubb W. B., (1972) Linked and Unstable Resistance to Kanamycin and Penicilin and Diffusible Pigment Production in an İsolate of *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol*; Vol 5.
- Anupurba S., Sen MR., Nath G., Sharma BM., Gulati AK., Mohapatra TM. (2003) Prevalence of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* in a Tertiary Referral Hospital in Eastern Utar Pradesh. *Indian Journal of Medical Microbiology*; 21 (1): 49-51.
- Ardic N., Sareyyupođlu B., Ozyurt M., Haznedaroglu T., Ilga U. (2006) Investigation of aminoglycoside modifying enzyme genes in methicillin-resistant staphylococci. *Microbiological Research* 161 (1): 49-54.
- Bailey & Scott's (2002) *Staphylococcus, Micrococcus and Similar organism*. In:Forbes AB., Sahm DF., Weissfeld AS. *Diagnostic Microbiology*. (11th edition) Mosby St. Louis.
- Balwit J.M., Langevelde P., Vann J. M., Proctor R. A. (1994) Gentamicin-Resistant Menadione and Hemin Auxotrophic *Staphylococcus aureus* Persist within Cultured Endothelial Cells. *The Journal of Infectious Diseases*, 170: 1033-7.
- Barber M. (1955) Pigment Production by Staphylococci. *J. gen. Microbiol.* 13: 338-345.
- Cengiz A. T., (1999) *Staphylococcus*. Ustaçelebi Ş., Tümbay E., Mete Ö., Cengiz T., İmir T., Mutlu G. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Güneş Kitabevi, Ankara, s: 339-347.
- Chandrakanth R. K., Raju S., Patil S. A. (2008) Aminoglycoside-Resistance Mechanism in Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates. *Curr Microbiol.* 56: 558-562
- Choi Su. Mi, Kim Seung-Han., Kim Hee-Jung, Lee D. G., Choi Jung-Hyun, Yoo J. H., Kang Jin. Han., Shin W. S., Kang Moon-Won (2003) Multiplex PCR for the Detection of Genes Encoding Aminoglycoside Modifying Enzymes and Methicillin Resistance among *Staphylococcus* Species. *J Korean Med Sci*; 18: 631-636.
- Clements MO., Foster SJ. (1999) Stres resistance in *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 7 (11): 458-462.
- Clinical and Laboratory Standarts Institute: Performance standarts for antimicrobial suspectibility testing *Staphylococcus* spp. 2011, *CLSI document M-100-S21*, 31 (1): 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne Pennsylvania, USA.
- Duval B. D., Mathew A., Satola S. W., Shafer W. M. (2010). Altered Growth, Pigmentation, and Antimicrobial Susceptibility Properties of *Staphylococcus aureus* Due to Loss of the Major Cold Shock Gene *csxB*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 54 (6): 2283-2290.
- Dündar V., Dündar Ö. D. (2008) Stafilocok Enfeksiyonları. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Etkenlere göre Enfeksiyonlar*. Willke AT., Söyletir G., Doğanay M., 2065-2076. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, Cilt 2.

- Emaneini M, Taherikalani M, Eslampour MA, Sedaghat H, Aligholi M, Jabalameli F, Shahsavan S, Sotoudeh N, (2009). Phenotypic and genotypic evaluation of aminoglycoside resistance in clinical isolates of staphylococci in Tehran, Iran. *Microb Drug Resist* 15 (2): 129-132.
- Ertek M., Yazgı H., Özkurt Z., Uyanık M. H., Aktaş O. (2003) Hastane İzolatlarında Aminoglikozid Direnci. *Ankem Derg*; 17 (4): 400-404
- Fatholahzadeh B., Emaneini M., Feizabadi M. M., Sedaghat H., Aligholi M., Taherikalani M., Jabalameli F. (2009) Characterisation of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from two hospitals in Tehran, Iran. *International Journal of Antimicrobial Agents* 33: 264–265
- Foster JF. and Höök M. (1998) Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology*; 6 (12): 484-488
- Giesbrecht P., Kertsen T., Maidhof H., Wecke J. (1998) Staphylococcal Cell Wall: Morphogenesis and Fatal Variations in the Presence of Penicilin. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62 (4): 1371-1414.
- Gilbert DN. (2000) Aminoglycosides. In the Principles and Practice of Infectious Diseases, Mandell GL, Benet JE, Dolin R. 307-336 (5th edition). Churchill and Livingstone, Philadelphia.
- Güler Ö., Aktaş O., Uslu H. (2008) Klinik Örneklerden İzole Edilen Bakterilerde Beta-Laktamaz Varlığının ve Çeşitli Antibiyotik Gruplarına Karşı Duyarlılıklarının Araştırılması. *Ankem Derg*; 22 (2): 72-80.
- Gürsoy N. C., Ersoy Y., Günel S., Kuzucu Ç. (2009) Kan Kültürlerinde İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarının Antibiyotiklere Direnç Durumlarının Değerlendirilmesi. *Ankem Derg*; 23(1):26-29
- Hauschild T., Sacha P., Wiczorek P., Zalewska M., Kaczynska K., Tryniszewska E. (2008) Aminoglycosides resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from a University Hospital in Bialystok, Poland. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 46 (2): 225-228.
- Ida T., Okamoto R., Shimauchi C., Okubo T., Kuga A., Inoue M. (2001) Identification of Aminoglycoside-Modifying Enzymes by Susceptibility Testing: Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Japan. *Journal of Clinical Microbiology* 39 (9): 3115-3121
- Isenberg HD. (2004) *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Washington, DC: ASM pres.
- Katzif S., Danavall D., Bowers S., Balthazar J. T., Shafer W. M. (2003) The Major Cold Shock Gene, *cspA*, Is Involved in the Susceptibility of *Staphylococcus aureus* to an Antimicrobial Peptide of Human Cathepsin G. *Infection and Immunity*, 71 (8): 4304–4312.
- Katzif S., Lee E., Law A. B., Tzeng Y. L., Shafer W. M. (2005) CspA Regulates Pigment Production in *Staphylococcus aureus* through a SigB-Dependent Mechanism. *Journal of Bacteriology*; 187 (23): 8181-8184.
- Kayaalp OS. (1991) Aminoglikozidler., Rasyonel tedavi yönünden Tibbi Farmakoloji, Kayaalp OS, 734-752, 6. Baskı. Ankara: Feryal Matbaacılık.
- Koneman E. W., Allen S. D., Janda W. M., Schreckenberger P. C., Winn W. C., (2006) *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Lippincott-Raven Publishers.
- Liu G. Y., Essex A., Buchanan J. T., Data V., Hoffman H. M., Bastian J. F., Fierer J., Nizet V. (2005) *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioksidant activity. *The Journal of Experimental Medicine*. 202 (2): 209–215.
- Lowy F. D. (2003) Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. 111: 1265–1273.
- Mandell, Douglas, Bennett. *Staphylococcus aureus*. In: Mandell GL., Bennet JE., Dolin R., Mandell, Douglas and Bennet's Principles and Practice of Infectious Diseases. (6th edition). New York Churchill Livingstone; p: 2321-2360.

- Marshall J. H., Wilmoth G. W., (1981) Pigments of *Staphylococcus aureus*, a Series of Triterpenoid Carotenoids. *Journal of Bacteriology*, p. 900-913.
- Martineau F., Picard F. J., Lansac N., Menard C., Roy P. H., Ouellette M., Bergeron M. G. (2000) Correlation between the Resistance Genotype Determined by Multiplex PCR Assays and the Antibiotic Susceptibility Patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44(2):231-238.
- Morikawa K., Maruyama A., Inose Y., Higashide M., Hayashi H., Ohta T. (2001) Overexpression of Sigma Factor, σ^B , Urges *Staphylococcus aureus* to Thicken the Cell Wall and to Resist β -Lactams. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288 (2): 385–389.
- Proctor R. A., Kahl B., Eiff C., Vaudaux P. E., Lew D. P., Peters G. (1998) Staphylococcal Small Colony Variants Have Novel Mechanisms for Antibiotic Resistance. *Clinical Infectious Diseases*; 68–74.
- Proctor R. A., Langevelde P., Kristjansson M., Maslow J. N., Arbeit R. D. (1995) Persistent and Relapsing Infections Associated with Small-Colony Variants of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Diseases*; 20: 95-102.
- Schmitz FJ., Fluit AC., Gondolf M., Beyrau R., Lindenlauf E., Verhoef J., Heinz HP., Jones ME. (1999) The prevalence of aminoglycoside resistance and corresponding resistance genes in clinical isolates of staphylococci from 19 European hospitals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 43 (2): 253-259.
- Shaw KJ., Rather PN., Hare RS., Miller GH. (1993) Molecular Genetics of Aminoglycoside Resistance Genes and Familial Relationships of the Aminoglycoside-Modifying Enzymes. *Microbiological Reviews*, 57 (1): 138-163
- Türk Dağı H., Arslan U., Tuncer İ. (2011). Kan Kültürlerinde İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarının Antibiyotiklere Duyarlılıkları. *Ankem Derg*; 25 (2): 84-88.
- Ubukata K., Yamashita N., Gotoh A., Konno M. (1984) Purification and Characterization of Aminoglycoside-Modifying Enzymes from *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 25 (6): 754-759.
- Udo E. E., Dashti A. A., (2000) Detection of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes in staphylococci by polymerase chain reaction and dot blot hybridization. *International Journal of Antimicrobial Agents* 13 (4): 273–279
- Ulus N. N., Tezcan E. F. (2001) Cold Shock Proteins. *Turk J Med Sci Tübitak* 31: 283-290.
- Vakulenko S. B., Mobashery S. (2003). Versatility of Aminoglycosides and Prospects for Their Future. *Clinical Microbiology Reviews* 16 (3): 430–450
- Vanhoof R., Godard C., Content J., Nyssen H. J., Hannecartpokorni E., and Belgian Group of Hospital Infections (GDEPIH/GOSPIZ) (1994) Detection by polymerase chain reaction of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates of epidemic phage types. *J. Med. Microbiol.* 41 (4): 282-290.
- Wieland B., Feil C., Gloria Maercker E., Thumm G., Lechner M., Bravo J. M., Poralla K., Gotzl F. (1994) Genetic and Biochemical Analyses of the Biosynthesis of the Yellow Carotenoid 4,4'-Diapobeuosporene of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, p: 7719-7726
- Willke A. (2003) Aminoglikozidler. Leblebicioğlu H., Usluer G., Ulusoy S. Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler. s:Ankara, Bilimsel Tıp Yayınevi.
- Willke A. (2002) Aminoglikozidler.. Willke AT, Söyletir G. Doğanay M. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, 214-223. 2. Baskı Cilt 1, Ankara, Nobel Tıp Kitapevleri.

Yadegar A, Sattari M, Mozafari NA, Goudarzi GR. (2009) Prevalence of the genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes and methicillin resistance among clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in Tehran, Iran. *Microb Drug Resist.* 15 (2): 109-13.

Yamazhan T. (2007) Sulfonamidler ve Aminoglikozidler. *Ankem Derg.* 21 (2): 52-56

Zhang W., Fisher JF., Mobashery S. (2009) The bifunctional enzymes of antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology* 12 (5) :505–511.

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

CANSU SEMİZ

Doğum Yeri İzmit
Doğum Tarihi 28 Temmuz 1987
Uyruđu TC
Medeni Durumu Bekar

İletişim Adresi: Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakóltesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD
Tel: (0) 262 303 74 36

Eğitim

2009–2012 Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakóltesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Programı

2005–2009 Marmara Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakóltesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Lisans Programı

2001-2005 Körfez Oruç Reis Anadolu Lisesi

Mesleki Deneyim:

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakóltesi Moleküler Mikrobiyoloji Proje Araştırma Laboratuvarı
Kocaeli, 20 Haziran - 01 Eylül 2006, Stajyer

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakóltesi Moleküler Mikrobiyoloji Proje Araştırma Laboratuvarı
Kocaeli, 25 Haziran– 01 Eylül 2007

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakóltesi Moleküler Mikrobiyoloji Proje Araştırma Laboratuvarı
Kocaeli, 01 Temmuz – 10 Eylül 2008

Monitor Medikal Araştırma ve Danışmanlık Tic. Ltd. Sti. Kocaeli Üniversitesi Klinik Araştırmalar Birimi, Merkez Koordinatörü, Kocaeli, Nisan 2011 – halen