

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YATAN HASTA VE HASTANE PERSONELİNİN
BURUNÖRNEKLERİNDEN İZOLEMETİSİLİNE
DİRENÇLİ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* SUŞLARINDA
(MRSA) PVL GEN BÖLGESİNİN ARAŞTIRILMASI

HATİCE YAREN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ BÖLÜMÜ
ANABİLİM DALI
KONYA, 2009

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YATAN HASTA VE HASTANE PERSONELİNİN BURUN ÖRNEKLERİNDEN İZOLE METİSİLİNE DİRENÇLİ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* SUŞLARINDA (MRSA) PVL GEN BÖLGESİNİN ARAŞTIRILMASI

Hatice YAREN

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Bölümü Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Hasibe (Cingilli)VURAL

2009, 72 Sayfa

Jüri: Yrd. Doç. Dr. Hasibe (Cingilli)VURAL

Prof. Dr. E. İnci TUNCER

Yrd. Doç. Dr. Nesrin TURAÇLAR

Dünyada en sık görülen infeksiyon kaynaklarından biri olan metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşu (MRSA), antimikrobiyallere karşı geliştirdiği direnç mekanizmaları ile her geçen gün daha büyük bir sorun haline gelmektedir.

Bu çalışmanın ilk aşamasında Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesinde 477 yatan hasta ve 233 hastane personelinin (=710) burun sürüntü kültürlerinden 40 adet (36 yatan hasta, %7,5; 4 hastane personeli, % 1,7) metisiline dirençli *S. aureus* suşu (MRSA) ve 2 adet (yatan hastalardan) metisilin duyarlı *S. aureus* suşu (MSSA) toplandı. APİ testi ile *S. aureus* suşları tanımlandı. Bu suşların metisilin direnci ise disk difüzyon ve Epsilometre (E-Testi) ile belirlendi.

İkinci aşaması ise Selçuk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Arkeoloji ve Arkeometri laboratuvarında yapılmıştır. Her bir örnekte *mecA-1*, *mecA-2*, *PVL-1*, *PVL-2*, *PVL-3* genlerinin varlığı PZR metodu ile araştırıldı. Çalışılan 40 MRSA örneğinde *mecA-1* ve *mecA-2* genleri çoğaldı. *PVL-1* geni 22, *PVL-2* geni 25, *PVL-3* geni 33 MRSA suşlarında çoğalma gözlemlendi. Moleküler çalışmalar mikrobiyolojik çalışmaları doğruladı. Çalışılan bölgelerde mutasyon olup olmadığı SSCP yöntemi ile belirlendi. Ancak hiçbir örnekte mutasyon gözlenmedi.

Anahtar Kelimeler: MRSA, *mecA*, PVL, *Staphylococcus aureus*, SSCP

ABSTRACT

MSc. Thesis

INVESTIGATION OF PVL GENE LOCI IN METHICILLIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (MRSA) STRAINS ISOLATED FROM NOSOCOMIAL SAMPLES OF HOSPITAL PATIENT AND HOSPITAL STAFF

Hatice YAREN

Selcuk University, Life Sciences Institute

Advisor: Assis.Prof.Dr. Hasibe (Cingilli)VURAL

2009, 72 Page

Jury : Assis. Prof. Dr. Hasibe (Cingilli) VURAL

Prof. Dr. E. İnci TUNCER

Assis. Prof. Dr. Nesrin TURAÇLAR

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a bacterium responsible for difficult to treat infections in humans. Antibiotic resistance is the ability of a microorganism to withstand the effects of antibiotics. MRSA is by definition a strain of *Staphylococcus aureus* that is resistant to a large group of antibiotics. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is the most frequently identified antimicrobial drug-resistant pathogen in the world. The epidemiology of infections caused by MRSA is rapidly changing.

The first phase of in this study, we were collected for this research 2 Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) from hospital patients and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is 40 patients (36 hospital patients, 7,5%, 4 hospital staffs, 1,7%) from cultured nosocomial infections of 233 hospital staffs and 477 hospital patients (total 730) in the Hospital Medical Faculty, Selcuk University, Meram. These strains or *Staphylococcus aureus* were determined with the API test. As methicillin-resistant of these strains, was determined by Disk Diffussion method and E-Test analysis.

As the second phase of in this study, we were studied in the Archeometry and Biotechnology Laboratory, Science Faculty, Selcuk University. We looked into present of *mecA-1*, *mecA-2*, *PVL-1*, *PVL-2*, and *PVL-3* genes in each samples by PCR methods. It was amplified *mecA-1* ve *mecA-2* gene loci or band patterns in 40 MRSA samples by PCR. Furthermore, It was screened reproduction in *PVL-1* gene 22, *PVL-2* gene 25, *PVL-3* gene 33 MRSA strains. Molecular findings were verified the microbiologic results in the research. It was defined by SSCP methods if mutation were in regions for which study each bacterium. None mutation in these *Staphylococcus aureus*. That is, they weren't heterodublex band profile. PCR-SSCP, although very sensitive, can only be used to detect mutations in small DNA fragments. Microbiologists and clinicians are faced with increasing options for the use of genotypic or phenotypic methods. We repeated at least three times for each bacteria strain all of molecular workings in this study.

Key Words: MRSA, *mecA*, PVL, *Staphylococcus aureus*,SSCP

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK BİLGİSİ	3
2.1. Stafilocoklar	3
2.2. Sınıflandırma	4
2.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	4
2.4. Virulans ve Patojeniteleri	5
2.4.1. Hücre duvarı	5
2.4.2. Kapsül	5
2.4.3. Yüzey proteinleri	5
2.4.4. Toksinleri	5
2.4.5.1. Sitolitik toksinler	6
2.4.5.1.1. Alfa toksin	6
2.4.5.1.2. Beta toksin	6
2.4.5.1.3. Gama toksin	6
2.4.5.1.4. Delta toksin	6
2.4.5.2. Lökositin	6
2.4.5.3. Enterotoksinler	7
2.4.5.4. Eksfoliyatif toksin (Eksfoliyatin)	7
2.4.5.5. Toksik şok sendromu toksini-1 (TSST-1)	7
2.5. Enzimleri	7
2.5.1. Katalaz	8
2.5.2. Koagülaz	8
2.5.3. Lipaz	8
2.5.4. Hiyalüronidaz	8
2.5.5. Deoksiribonükleaz	8
2.5.6. Beta-laktamazlar	8
2.6. Epidemiyoloji	8
2.7. <i>S. aureus</i> ' un Tespiti	10
2.7.1. Koagülaz testi	10
2.7.2. Deoksiribonükleaz testi	11
2.7.3. Termostabil endonükleaz testi	11
2.7.4. Katalaz testi	11

2.7.5. Üreaz testi.....	11
2.7.6. Mannitol fermentasyonu	12
2.8. <i>Staphylococcus aureus</i> Taşıyıcılığı.....	12
2.8.1. <i>S.aureus</i> için taşıyıcılık özellikleri	12
2.8.2. Burun taşıyıcılığı	13
2.8.2.1.Devamlı taşıyıcılık	13
2.8.2.2.Aralıklı taşıyıcılık.....	13
2.8.3. Cilt Taşıyıcılığı.....	14
2.8.4. Perine ve aksilla taşıyıcılığı.....	14
2.8.5. Boğaz taşıyıcılığı.....	15
2.9. Stafilokoklarda Metisiline Direnç Mekanizmaları	15
2.9.1. Yeni bir penisilin bağlayıcı protein (PBP 2a) sentezi nedeniyle oluşan direnç	15
2.9.1.1. Metisiline direnç iki şekilde olabilir.....	16
2.9.1.1.1. Homojen direnç.	16
2.9.1.1.2. Heterojen direnç.	17
2.9.2. Beta laktamaz salgılanması	17
2.9.3. Mevcut PBP’lerde beta laktam antibiyotik afinitesinde azalma	17
2.10. Metisiline Direncin Saptanması Amacıyla Kullanılan Testler.....	17
2.11. Tanı.....	19
2.12. MRSA İnfeksiyonlarına Karşı Kullanılan Antibiyotikler	19
2.12.1. Penisilinaza dirençli penisilinler (Antistafilokokal penisilinler).....	19
2.12.2. Beta laktamaz inhibitörlü kombine penisilinler).....	20
2.12.3. Sefalosporinler.	20
2.12.4. Aminoglikozidler.	20
2.12.5. Makrolidler.....	20
2.12.6. Kinolonlar.....	21
2.12.7. Trimetoprim-sülfametoksazol (TMP-SMZ).....	21
2.12.8. Linkozamidler.	21
2.12.9. Fusidik asit.	22
2.12.10. Karbapenemler	22
2.12.11. Streptograminler (Kinupristin/Dalfopristin).	22
2.12.12. Oksazolidinonlar (Linezolid-Eperozolid)	22
2.12.13. Rifampisin.	23
2.12.14. Mupirosin	23

2.12.15. Glikopeptitler.	23
2.13. İnfeksiyon Hastalıklarında Moleküler Tanı Yöntemleri	23
2.14. Polimeraz Zincir Reaksiyon (PZR)	24
3. MATERYAL VE METOD	25
3.1. Örneklerin toplanması	25
3.2. Örneklerin incelenmesi	28
3.2.1. Alınan burun örneklerinden <i>S. aureus</i> İzolasyonu	28
3.2.2. Besiyerleri	28
3.2.2.1. %5'lik Koyun kanlı agar besiyerinin hazırlanışı	29
3.2.3. Değerlendirme	29
3.2.4. Antibiyotik duyarlılık testleri	29
3.2.4.1. Katı besiyerinin hazırlanması	29
3.2.4.2. Duyarlılık testleri için bakteri süspansiyonunun hazırlanması	30
3.2.4.3. Disk difüzyon yöntemi	30
3.2.4.4. E-Testi yöntemi	30
3.3. Moleküler Testler	31
3.3.1. DNA örneklerin hazırlanması	31
3.3.2. DNA izolasyon yöntemleri	31
3.3.2.1. Alkali lizis manuel DNA izolasyon yöntemi	31
3.3.2.2. EZ1 biorobot (Qiagen) DNA izolasyon cihazında izolasyon yöntemi	33
3.3.2.3. Spektral yöntemler	33
3.3.3. PZR yöntemi ile mecA ve PVL genlerinin çoğaltılması	33
3.3.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyon (PZR)	33
3.3.3.2. PZR Mix Koşulları	34
3.3.3.3. PZR optimizasyon koşulları	35
3.3.4. Agaroz jel elektroforez incelemeleri	37
3.3.4.1. 50X TAE tamponu	37
3.3.4.2. Etidyum bromür stok çözeltisi	37
3.3.5. Mutasyon tanımlama yöntemleri	38
3.3.5.1. SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) tekniği	38
4. DENEY SONUÇLARI	40
4.1. Mikrobiyolojik test sonuçları	40
4.1.1. API testi sonuçları	40
4.1.2. E-Testi bulguları	40

4.1.3. İzole edilen MRSA suşlarının kliniklere göre dağılımı	44
4.2. Moleküler Test Sonuçları	45
4.2.1. DNA izolasyon bulguları	45
4.2. PZR Bulguları	45
4.3. SSCP Bulguları	52
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	55
KAYNAKLAR.....	62

KISALTMALAR

- MRSA:** Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*
YBÜ: Yoğun bakım ünitesi
KNS: Koagülaz negatif stafilokok
TSST-1: Toksik şok sendromu toksini-1
CRF: Coagulase-reacting faktör
HIV: Human infected viruses
PBP: Penisilin bağlayıcı protein
MSSA: Metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus*
SCC: Stafilokokal kaset kromozomu
CLSI: Clinical Laboratory Standards Institute
LA: Lateks aglutinasyon
TMP-SMZ: Trimetoprim-sülfametoksazol
MLS: Makrolid-linkozamid-streptogramin
PVL: Pantone valentine leucosidan
SCCmec: Staphylococcal cassette chromosome mec
RT-PZR: Real-Time PZR
RAPD: Random Amplification of Polymorphic DNA
PFGE: Pulse Field Gel Electroforesis
SSCP: Single Strand Conformation Polymorphism
TEMED: Tetra-methyl-ethylene-diamine
PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TE-MRSA: Toplumdan elde edilen MRSA
HE-MRSA: Hastaneden elde edilen MRSA

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>mecA</i> geninin yapısı.....	16
Şekil 3.2. Kanlı agarda MRSA kolonileri	28
Şekil 4.3. Bir <i>Staphylococcus aureus</i> suşunun API identifikasyon test panelinde görünümü..	40
Şekil 4.4. (a,b) E-testinde direnç ve duyarlılığın tespiti	41
Şekil 4.5. İzole edilen MRSA DNA'ların %1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	45
Şekil 4.6.a. <i>mecA</i> -1 geninin PZR'da çoğaltılması.....	46
Şekil 4.6.b. <i>mecA</i> -1 geninin PZR'da çoğaltılması.....	46
Şekil 4.7.a. <i>mecA</i> -2 geninin PZR'da çoğaltılması.....	46
Şekil 4.7.b. <i>mecA</i> -2 geninin PZR'da çoğaltılması.....	47
Şekil 4.7.c. <i>mecA</i> -2 geninin PZR'da çoğaltılması.....	47
Şekil 4.8.a. <i>PVL</i> -1 geninin PZR'da çoğaltılması.....	48
Şekil 4.8.b. <i>PVL</i> -1 geninin PZR'da çoğaltılması.....	48
Şekil 4.9.a. <i>PVL</i> -2 geninin PZR'da çoğaltılması.....	49
Şekil 4.9.b. <i>PVL</i> -2 geninin PZR'da çoğaltılması.....	49
Şekil 4.10.a. <i>PVL</i> -3 geninin PZR'da çoğaltılması.....	50
Şekil 4.10.b. <i>PVL</i> -3 geninin PZR'da çoğaltılması.....	50
Şekil 4.11. <i>mecA</i> -1 geninin poliakrilamid jelde yürütülmesi.....	52
Şekil 4.12. <i>mecA</i> -2 geninin poliakrilamid jelde yürütülmesi.....	53
Şekil 4.13. <i>PVL</i> -1 geninin poliakrilamid jelde yürütülmesi.....	53
Şekil 4.14. <i>PVL</i> -2 geninin poliakrilamid jelde yürütülmesi.....	54
Şekil 4.15. <i>PVL</i> -3 geninin poliakrilamid jelde yürütülmesi.....	54

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Alınan örneklerin servislere göre dağılımı.....	26
Çizelge 3.2. Hasta bilgilerinin alındığı anket.....	27
Çizelge 3.3. Personel bilgilerinin alındığı anket.....	27
Çizelge 3.4. Disk difüzyon testinde oksasilin ve sefoksitin sınır değerleri.....	30
Çizelge 3.5. E-testinde oksasilin ve vankomisin sınır değerleri	31
Çizelge 3.6. PZR’de kullanılan primerler.....	34
Çizelge 3.7. <i>mecA1</i> ve <i>mecA2</i> primerleri için PZR koşulları.....	34
Çizelge 3.8. <i>PVL-1</i> , <i>PVL-2</i> , <i>PVL-3</i> primerleri için PZR koşulları	35
Çizelge 3.9. <i>mecA-1</i> primeri için PZR şartları.....	35
Çizelge 3.10. <i>mecA-2</i> primeri için PZR şartları.....	36
Çizelge 3.11. <i>PVL-1</i> ve <i>PVL-3</i> primeri için PZR şartları.....	36
Çizelge 3.12. <i>PVL-2</i> primeri için PZR şartları.....	36
Çizelge 4.14.a. E-testinde antibiyotik duyarlılık oranları (R: dirençli, D: duyarlı).....	42
Çizelge 4.14.b. E-testinde antibiyotik duyarlılık oranları (R: dirençli, D: duyarlı).....	43
Çizelge 4.15. E-testinde antibiyotik duyarlılık oranları (R: dirençli, D: duyarlı).....	43
Çizelge 4.16. Örnek alınan servislerden izole edilen MRSA suşları.....	44
Çizelge 4.17.a. Çalışılan örneklerde PZR sonuçları.....	51
Çizelge 4.17.b. Çalışılan örneklerde PZR sonuçları.....	52

1.GİRİŞ

Stafilokoklar gerek toplum kaynaklı gerekse nozokomiyal infeksiyonların önemli etkenlerindendir. Bu mikroorganizmalar deri, yumuşak doku, solunum sistemi, santral sinir sistemi ve üriner sisteme kolayca yerleşerek infeksiyona neden olurlar. İnfektif endokardit, bakteriyemi, sepsis, yabancı cisim infeksiyonları gibi birçok infeksiyonda stafilokokların etiyolojik önemi bilinmektedir. Ağır stafilokok infeksiyonları, yaşamı tehdit eden komplikasyonlara ve yüksek mortalite oranına yol açması nedeniyle halen önemli bir sorun olma özelliğini korumaktadır (Dickema ve ark. 2001, Lowy 1998).

S. aureus izolatlarının en önemli habitatı insanlarda burun mukozasıdır. Stafilokok infeksiyonlarının tedavisinde stafilokok türleri arasındaki direnç yaygınlığı önemli bir sorundur. Yapılan bazı çalışmalara göre metisilin direnci son yıllarda dikkate değer şekilde artış göstermiştir (Ito ve ark. 2003).

Son zamanlarda metisiline dirençli stafilokok infeksiyonlarının görülme sıklığında artış dikkat çekmektedir (Haddadin ve ark. 2002; Gould 2005). *Staphylococcus aureus*'ta metisiline direnç ilk olarak 1960'lı yıllarda saptanmış, 1980'lere gelindiğinde ise bu suşların etken olduğu hastane kaynaklı salgınlar önemli bir sorun oluşturmaya başlamıştır. Metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) izolatlarında beta-laktam dışı antibiyotiklere karşı da yüksek düzeyde direnç görülmesi bu bakterilerle gelişen infeksiyonların tedavisini belirgin olarak güçleştirmektedir. Bazı *S. aureus* suşlarının epidemik karakter taşıdığı ve nozokomiyal epidemilere neden olduğu bilinmektedir. Bu epidemiler artmış mortalitenin yanı sıra büyük bir mali yükü de beraberinde getirmektedir (Loveday ve ark. 2006; Sardan 2000). MRSA'nın ciddi infeksiyonlara neden olmasının dışında diğer bir ürkütücü yanı da penisilinaz enzimine dayanıklı tüm penisilin türevlerine (oksasilin, nafsilin, kloksasilin), ayrıca sefalosporin, klindamisin, eritromisin, tetrasiklin ve aminoglikozidler gibi antibiyotiklere de dirençli olmasıdır (Yıldız ve Aygen 2002).

Stafilokok genusu içerisinde çok sayıda tür bulunur. Epidemiyolojik araştırmalarda etkenlerin alt tiplendirmeleri yapılmakta bir patojenin doğadaki yayılım yolları ve kaynakları tam olarak belirlenerek etkili kontrol mekanizmaları geliştirilmektedir (Derbentli 1996).

Tiplendirmede mikroorganizmaların karakteristik özelliklerini tespit etmeye dayanan genotipik metodlar ile mikroorganizmaların kromozomal ve ekstra kromozomal genetik elementlerinin analizine dayanan genotipik metodlarla yapılmaktadır. Genotipik tiplendirme metodlarından olan plazmid profil analizleri, kromozomal DNA'nın restriksiyon endonükleaz analizi (RFLP-PZR), RAPD (Random amplified polymorphic DNA), PFGE (Pulse Field Gel

Electrophoresis) olarak sıralanabilir. Bu tekniklerin her birinin ayırma gücü tekrarlanabilirlik ve tiplendirilebilirliklerine göre avantaj ve dezavantajları vardır (Aslantaş ve ark. 2006, Sancak ve Günel 2001).

Son yıllarda stafilokok infeksiyonlardaki artışın yanı sıra bu bakterilerin direnç profilleri de değişmiş ve birçok suşta geniş spektrumlu antimikrobiyallere karşı da direnç gelişmiştir. Gelişen antibiyotik direnciyle bu infeksiyonların tedavisindeki ilaç seçeneklerindeki belirgin azalmada önemli bir sorun oluşturmaktadır. Çünkü metisiline dirençli *S.aureus* suşları sadece metisiline değil stafilokok infeksiyonlarının tedavisinde kullanılan tüm beta-laktam antibiyotiklere de dirençlidir. Gelişen bu direncin sebebi kromozomal *mecA* geninin kodladığı PBP2a olarak adlandırılan bir proteindir. Metisiline dirençli *S.aureus* suşlarının çeşitli fenotipik testlerle saptanması sonucu elde edilen verilerin kesinliği tartışmalıdır. Bu nedenle metisiline karşı direnci oluşturan *mecA* geninin ortaya çıkarılmasını sağlayan genotipik çalışmalar büyük önem taşımaktadır. *S.aureus* direncinin fenotipik ekspresyonu büyük miktarda sıcaklık, osmolarite, şel oluşturucu ajanlar, divalent katyonlar ve pH'ya bağlıdır (Berger-Bächi 1999).

Bu çalışmada hastane personeli ve hastanede yatan hastaların burun kültürlerinden izole edilen metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ve metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus* (MSSA) suşlarının genotipik olarak tanımlanmasında mikrobiyolojik tekniklerin yanı sıra moleküler teknikler ve özellikle *mecA* geninin iki varyantı ile *PVL* geninin üç varyantı çalışılmıştır. Çünkü *PVL* geni *Staphylococcus aureus* bakterisi için virülans faktörlerini tanımlayan önemli bir genidir. *Staphylococcus aureus*'larda *PVL*'nin bulunduğu durumlarda canlıdan aniden gelişen infeksiyonlar görülebilir. Örneğin, sağlıklı yetişkin ve çocuklarda pnömoni gibi hayati tehlikeye neden olan infeksiyonlara sebep olabilir.

Bizim bu çalışmadaki amacımız, Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesinde yatan hasta ve hastane personelinin burun örneklerinden izole edilen metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşlarında virülans etki gösteren *PVL* gen bölgesinin varlığını araştırmaktır.

2.KAYNAK BİLGİSİ

2.1. Stafilocoklar

Stafilocoklar yuvarlak, 0,5-1,5 μ çapında, çoğu kez düzensiz kümeler bazen dörtlü ikişerli kok yada tek tek koklar şeklinde görülen gram pozitif bakterilerdir.

Stafilocokları ilk kez 1878’de Robert Koch tanımlamış, 1880’de Pasteur sıvı besiyerinde üretmiş ve 1881’de Alexander Ogston, fare ve kobaylar için patojen olduğunu vurgulamıştır. Rosenbach 1884’de beyaz renkli kolonileri *Staphylococcus albus*, sarı-portakal renkli kolonileri ise *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) olarak isimlendirmiştir (Moreillon ve ark. 2005). Bu ayırım yakın zamana kadar devam etmiştir. Son 25 yılda koagülaz negatif stafilocokların (KNS)’da nozokomiyal infeksiyonların önemli bir etkeni olduğu ve sepsis, endokardit, osteomyelit gibi değişik klinik tablolar yapabildiği bildirilmektedir (Boyce 1998).

Alexander Fleming’in 1928 yılında penisilini bulması ile stafilocok infeksiyonlarının tedavisinde önemli bir aşama kaydedilmiştir. Ancak penisilin’in klinikte yaygın olarak kullanılmaya başlanması ile birlikte penisilini parçalayan stafilocok suşları ortaya çıkmıştır. Bakterilerde penisilinaz enzimi üretimi ilk kez 1940’da Chain tarafından *Escherichia coli*’de saptanmış, stafilocoklarda penisilinaz üretimi ise ilk kez 1944’te Kirby tarafından gösterilmiştir (Shopsin ve Kreiswirth 2001). Bu tarihten itibaren stafilocoklarda penisilin direnci giderek artan düzeyde gözlenmiş, 1950’li yıllarda penisilin’in yanı sıra eritromisin, tetrasiklin, streptomisin gibi diğer antibiyotiklere de direnç gelişmiştir. 1960 yılında metisilin’in ve daha sonra diğer penisilinaza dirençli penisilinlerin kullanıma girmesiyle birlikte, hem hastanede yatan düşük dirençli bireylerde, hem de toplumdaki sağlıklı bireylerde infeksiyon oluşturma yeteneğinde olan bu patojenin neden olduğu infeksiyonların tedavisinde ikinci önemli aşama kaydedilmiştir. Ancak çok kısa bir süre içerisinde stafilocoklarda metisilin direnci de tanımlanmış ve 1970’li yıllardan itibaren metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşlarında “oklu antibiyotik direnci” problemi ortaya çıkmıştır. Direnç probleminin artmasıyla birlikte MRSA tüm dünyada nozokomiyal epidemilere yol açan ciddi bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Türkiye’de gerçekleştirilmiş bazı çalışmalara göre *S.aureus* suşları arasında MRSA oranının % 13 -59 arasında olduğu bildirilmektedir (Baron ve ark. 1994).

2.2. Sınıflandırma

Stafilokok cinsi içinde çok sayıda tür bulunmasına rağmen bunlardan 17 tür insan örneklerinde üretilmiştir (Wenzel ve ark. 1998).

Stafilokok türleri genotipik ilişkileri ve fenotipik özelliklerine göre dört grup altında toplanırlar;

1- *Staphylococcus epidermidis* grubunda; *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* ve *S. saccharolyticus*

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

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

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

S. aureus, *S. auricularis*, *S. intermedius*, *S. hyicus* ve *S. caseolyticus* bu grupların dışında tutulurlar (Bilgehan 2000).

Stafilokoklar; insan ve hayvanlar için fırsatçı patojendir. İnsan vücudunun çeşitli yerlerinde kolonize olurlar. *S. aureus* normal insanların, hastanede çalışanların ve tedavi altındaki hastaların %70'nin burun mukozasına kolonize olur (Wenzel ve ark. 1998).

2.3. *Staphylococcus aureus*

Stafilokoklar basit besiyerleri dahil birçok besiyerlerinde ürerler. Ancak kanlı besiyerlerinde daha iyi çoğalırlar. *S. aureus*'a ait koloniler geniş (6-8 mm çapında), düz, yüzeyden hafifçe kabarıp, yarı şeffaf görünümündedir. Çoğu suşa ait koloniler krem-sarı, portakal rengi pigmentasyon gösterirler. *S. aureus* kanlı agarda beta hemoliz yapmaktadır. *S. aureus* hem aerob hem de anaerob ortamda ürer (Schito 2006, Felten ve ark. 2002).

Plazmayı pıhtılaştırma yeteneğini gösteren koagülaz testi, *S. aureus*'u diğer stafilokoklardan ayırt etmede en yaygın olarak kullanılan, en çok önem taşıyan ve genel olarak kabul gören identifikasyon kriteridir. *S. aureus* koagülaz pozitifdir. Mannitolü yalnız *S. aureus* parçaladığı halde koagülaz negatif olanlar parçalamazlar. Mannitole etki deneyi, koagülaz testinden sonra *Staphylococcus aureus*'u diğer stafilokoklardan ayırt etmede en yararlı deneydir. Diğer karbonhidratlardan trehaloz, mannoz, maltoz, süktroz ve laktozu parçalarlar, ksiloz, sellobioz, arabinoz ve rafinozu parçalamazlar. Nitratları nitritlere indirgerler. Oksidaz olumsuzdur (Schito 2006).

2.4. Virulans ve Patojeniteleri

S. aureus virölansı en yüksek olan stafilokok türüdür. Ancak infeksiyon olup olmaması mikroorganizmanın virölansı ile konak savunma sisteminin oluşturacakları dengeye bağlıdır. Stafilokokların virölansında rol oynayan faktörler hücre duvar yapıları, kapsül, yüzey proteinleri, toksinleri ve enzimleridir.

2.4.1. Hücre duvarı: Diğer Gram pozitif bakterilerde olduğu gibi stafilokokların da hücre duvarı kuru ağırlığının yaklaşık %50'sini peptidoglikan tabaka oluşturmaktadır. Bu tabaka insanda Gram negatif bakterilerin endotoksinlerine benzer aktivite gösterir. Yani makrofajlardan sitokin salınımını uyarır, komplemanın aktivasyonuna yol açar ve trombosit agregasyonuna neden olur. Ayrıca monositlerden interlökin-1 salınımını uyarak polimorfonükleer lökositlerin infeksiyon bölgesine toplanmalarına ve sonuçta apse oluşumuna da yol açar. Sadece Gram pozitif bakterilerde bulunan teikoik asit stafilokokların hücre duvarında da yer alır ve mukozalarda bulunan özgül reseptörleri ile birleşerek stafilokokların konağa adherensini sağlar (Boutiba- Ben ve ark. 2004).

2.4.2. Kapsül: Birçok *S. aureus* kökeninde polisakkarid yapıda bir mikrokapsül bulunmaktadır. Bu ekzopolisakkarid bakteriyi fagositozdan korur ve konak hücrelerine özellikle de kateterler gibi yabancı cisimlere adherensini sağlar (Boutiba- Ben ve ark. 2004).

2.4.3. Yüzey proteinleri: Protein A, elastin, kollajen, fibronektin bağlayan proteinler ve “clumping” faktör, kimyasal yapıları ve hücre duvarı yerleşimleri birbirlerine benzeyen stafilokoksik yüzey proteinleridir. Bu proteinler stafilokokların konak dokularında kolonize olmasında en önemli faktörlerdir. Bu proteinlerin prototipi olan protein A'nın en önemli özelliği, IgG3 dışındaki tüm IgG ve IgA2 ile bazı IgM'lerin Fc reseptörleri ile birleşebilmesidir. Bu nedenle protein A'nın antikomplemanter ve antifagositer etkinliği vardır (Boutiba-Ben ve ark. 2004).

2.4.4. Toksinleri: *S. aureus*, konak hücre morfolojisini ve/veya fonksiyonunu etkileyen çok sayıda ekstraselüler toksin üretebilir. Bunlardan bir kısmı toksik etkilerini enzimatik aktivite ile gösterirken, diğerleri süperantijen özellikleri nedeniyle sitokin salınımını indükler. Ayrıca, bu toksinler sayesinde stafilokoklar yoğun inflamatuvar yanıt olan bölgelerde bile üremelerini sürdürebilirler.

2.4.5.1. Sitolitik toksinler: Stafilokokların salgıladığı, eritrositler ve çeşitli hücreler üzerinde sitolitik, deney hayvanlarında öldürücü, nekrotik etkileri olan ekzotoksinlerdir. İyi antijen yapısındaki bu toksinlere karşı organizmada nötralizan antikorlar oluşmaktadır. Bu toksinler dört tiptir (Boutiba-Ben ve ark. 2004).

2.4.5.1.1. Alfa toksin: *S. aureus* insan suşlarının ana hemolizindir. Hemolitik, dermonekrotik, lizozom parçalayıcı ve doku kültürlerinde sitolitik etkileri vardır. Tavşan eritrositleri için hemolitik aktivitesi en fazladır, insan eritrositlerine fazla bir etkisi yoktur. İnsan makrofajları ve trombositleri üzerine litik etkisi vardır, monositlere etkisizdir. Dolaşım, kas ve böbrek korteksi dokuları toksine karşı duyarlıdır, bu dokularda tahribat yapar (Boutiba-Ben ve ark. 2004).

2.4.5.1.2. Beta toksin: Stafilokok sfingomyelinazıdır. En iyi koyun, daha az olarak insan ve tavşan eritrositlerini eritir. Soğukta ve sfingomyelin üzerine etki ederek eritrositleri eritir.

2.4.5.1.3. Gama toksin: İnsan, tavşan ve koyun eritrositleri duyarlıdır, at ve kuş eritrositleri dirençlidir.

Özellikle stafilokoklara bağlı kemik infeksiyonlarında kanda bu toksine karşı antikor düzeyinin yüksek bulunması, bu toksinin bu hastalıklarda etkili olduğunu düşündürmektedir.

2.4.5.1.4. Delta toksin: İnsan, tavşan, koyun ve maymun eritrositlerini eritir. Biyolojik etkinliği geniş olup, eritrosit, lökosit, makrofaj, lenfosit ve trombositleri hasara uğratan bir proteindir.

Bu sitolitik toksinlerden alfa ve delta toksin, insanlarda hastalık oluşturan *S. aureus* suşlarında en çok bulunanlardır. *S. aureus* suşlarının %95’inde bunlardan biri, %82’sinde her ikisi birlikte bulunur (Schito 2006).

2.4.5.2. Lökosidin: *S. aureus* tarafından oluşturulan bu toksinin polimorf nüveli lökositler ve makrofajlar üzerine litik etkisi vardır. Diğer hücreleri etkilemez. Toksin elektroforetik olarak birbirinden ayrı F (Fast) ve S (Slow) adında iki protein komponentinden oluşmuştur. Bu komponentlerden her biri iyi antijen yapısında olup, herbirinden ayrı toksoid oluşturulur. Hücre zarında potasyum ve diğer katyonlara karşı geçirgenliği artırıcı gözeneklerin açılmasını sağlayarak etkili olurlar (Schito 2006).

2.4.5.3. Enterotoksinler: Isıya dirençli, 100°C'ye 30 dakika dayanabilen, polipeptit yapıda maddelerdir. Özellikle yüksek CO₂'li atmosfer ortamında karbonhidratlı ve proteinli besiyerlerinde üreyen stafilokoklar tarafından oluşturulurlar. Enterotoksinin A, B, C1, C2, D, E ve F şeklinde yedi immünolojik tipi vardır. *S. aureus* kökenlerinin %35-50'sinin bu toksinleri oluşturabildikleri saptanmıştır. A ve D besin zehirlenmelerinde, B ise hastane infeksiyonlarında çok karşılaşılan bir toksindir. Özellikle burun veya nazofarenks portörlerinden oluşan gıda elleyicilerinin kontamine ettiği gıdalarla besin zehirlenmesi tablolarına yol açarlar. Besin zehirlenmelerinde tablo, stafilokok üremiş ve enterotoksin oluşmuş besinlerin yenmesini izleyen 2-6 saat içinde bulantı, kusma ve ishal ile başlar. Semptom ve bulgular genellikle 24 saat içinde düzelir. İyileşme tamdır. Enterotoksijenik stafilokok üremesine uygun ortam oluşturan besin maddeleri arasında jambon, patates, salam, dondurulmuş tavuk, süt tozu, yağ, krema ve mayonez sayılabilir. Kusturucu etkileri mide ve barsaklardaki reseptörler aracılığıyla Nervus vagus ve sempatik sinirler yoluyla kusma merkezine iletilen uyarı ile oluşmaktadır. İshal oluşturmaları barsak lümeninden su absorpsiyonunun engellenmesi ve mukozadan barsak boşluğuna sıvı boşalmasının artması yoluyla olur (Schito 2006, Felten ve ark. 2002).

2.4.5.4. Eksfoliyatif toksin (Eksfoliyatin): Epidermolitik toksin olarak da bilinen bu toksin, stafilokok infeksiyonlarının veziküler ve eksfoliyatif deri lezyonlarından sorumludur. Antijenik ve biyokimyasal yapıları bakımından en az iki farklı eksfoliyatin bulunduğu saptanmıştır. A tipi kromozomal, B tipi plazmide bağlı genlerce oluşturulur (Felten ve ark. 2002).

2.4.5.5. Toksik şok sendromu toksini-1 (TSST-1): Toksik şok sendromunda yer alan stafilokokların çoğu faj-1 grubundan 29 ve 52 tiplerindendir. Bu özgül toksini salgılayan *S.aureus* suşlarının hastane kaynaklı olabileceği bildirilmektedir (Felten ve ark. 2002).

2.5. Enzimleri

S. aureus'un neden olduğu hastalıkların çoğunda patogeneze çoklu faktörler tarafından sağlanır. Bu yüzden hangi faktörün hastalığa neden olduğunu kesin olarak tanımlamak zordur. Konakçı dokularda *S. aureus*'un yayılımı yüksek miktarda ekstra selüler proteinlerin

üretimi ile gerçekleşir. *S. aureus* pek çok virülans faktör salınımı yapar (Waldvogel ve ark. 1999).

2.5.1. Katalaz: Tüm stafilokok türleri toksik hidrojen peroksidi toksik olmayan oksijen ve suya ayırtıran katalaz enzimi üretir. Bakteriler, bu enzim sayesinde fagositlerin içinde toksik oksijen radikalleri tarafından öldürülmeye direnç kazanır.

2.5.2. Koagülaz: Ekstrasellüler bir proenzimdir. Coagulase-Reacting faktör (CRF) ile birleşerek aktif duruma geçer ve plazmayı pıhtılaştırır. *S. aureus* için standart belirleyici olan koagülazla, patojen olan veya patojen olmayan stafilokok ayrımı yapılır. Koagülaz pozitif stafilokokların üzerinde oluşan kalın fibrin tabakasının, mikroorganizmayı fagositoza karşı koruyarak, patojenliğe katkı sağladığı ileri sürülmektedir.

2.5.3. Lipaz: *S. aureus* suşlarının tümü ve koagülaz negatif stafilokokların da yaklaşık 1/3'ü lipaz enzimi üretir. Lipaz, yağları hidrolize ederek vücudun lipid içeren bölgelerinde stafilokokların yaşamasını sağlamakta ve stafilokokların yüzeysel dokuları invaze ederek fronkül ve karbonkül gibi infeksiyonların gelişimine neden olmaktadır.

2.5.4. Hiyalüronidaz: Bağ dokusunun aselüler matriksindeki asit mukopolisakkaridler olan hiyalüronik asidi hidrolize eden enzimlerdir.

2.5.5. Deoksiribonükleaz: DNaz enzimleri endo ve ekzonükleaz aktivitesine sahip, nükleik asitleri 3'-fosfomononükleotidlere parçalayan fosfodiesterazlardır.

2.5.6. Beta-laktamazlar: Klinik kullanıma girdiği dönemlerde hemen tüm stafilokok kökenleri penisiline duyarlı iken, günümüzde özellikle hastane kaynaklı izolatlarda bu oran %5'in altına düşmüştür. Stafilokoklarda penisilin direncine neden olan mekanizma beta-laktamaz üretimidir.

2.6. Epidemiyoloji

Hastaneye yatırılan hastalara tanı ve tedavi amacıyla uygulanan endoskopi, kateterizasyon, biyopsi, mekanik ventilasyon, trakeostomi gibi girişimler konak savunma mekanizmasının bozulmasına ve konağın özgül florasının yerine, hastane ortamında yaygın

olan mikroorganizmalarla kolonizasyonuna yol açar. Bu mikroorganizmaların başında MRSA gelmektedir (Moreillon ve ark. 2005, Haddadin ve ark. 2002).

S. aureus infeksiyonlarının doğal seyri özetlenecek olursa; pekçok yenidoğan, çocuk ve yetişkinler *S. aureus* ile kolonize olurlar ve bu mikroorganizmayı tercihen nazofarinkslerinde, bazen cilt ve giysilerinde, daha nadiren vajinalarında ya da istisnai olarak rektum veya perineal bölgelerinde barındırırlar. Bu bölgelerdeki *S. aureus* cilt veya müköz membranlardaki herhangi bir bölgeyi veya kişiden kişiye transfer yoluyla, aerosol yolla veya direk kontakt yoluyla diğer konakları kontamine ederler. Müköz membranlar ve cilt, lokal doku invazyonuna karşı çok etkili bir mekanik bariyer oluştururlar. Bu bariyer travma ya da cerrahi ile bozulursa, *S. aureus* alttaki dokuya girebilir ve nekrotik doku, fibrin ve çok sayıda canlı ve ölü polimorfonükleer lökositten oluşan lokal bir abse lezyonuna yol açabilir. Herhangi bir zamanda çoğalan bakteriler lokal fagositik mekanizmaları aşabilir ve lenfatik kanallara ve kan dolaşımına girebilirler. Bunu izleyen stafilokokal bakteriyemi korkutucu bir komplikasyondur ve metastatik infeksiyonlara ve hastanın ölümüne yol açabilir (Moellering ve ark. 2000).

Doğumdan kısa bir süre sonra çoğu yenidoğan çevredeki yakın insanlar aracılığıyla *S.aureus* ile kolonize olur. Kolonizasyon bölgeleri; umbilikal kordon, perineal alan, cilt ve bazen de gastrointestinal sistemdir. *S. aureus* ayrıca giysileri ve çarşafları da kontamine edebilir ve bu yolla atmosferi daha fazla kontamine etmek üzere saçılırlar. Yaşamın daha ileri yıllarında nazal bölgede kolonize olurlar. Çocukların ve yetişkinlerin %25 kadarı taşıyıcı olurlar. Herhangi bir zamanda yetişkinlerdeki nazal taşıyıcılık oranının, mevsimsel ve lokal epidemiyolojik faktörlere bağlı olarak, %20 ile %40 arasında olduğu tahmin edilmektedir. Yaklaşık olarak nüfusun %20'si sürekli olarak, %60'ı ise geçici olarak *S. aureus* ile kolonize olur, %20'si ise hiç kolonize olmaz. Kadın popülasyonunda toksik şok sendromu insidansı nedeniyle erişkin premenopozal kadınlarda vajinal taşıyıcılık oranları araştırılmıştır. Bildirilen değerler menstrüel dönemde artış göstermekle beraber %10'a yakındır. Rektal ve perineal taşıyıcılıklar da tanımlanmıştır (Topçu ve Gergin 2002).

Bazı gruplar *S. aureus* ile kolonize olmaya eğilimlidir. Örneğin doktorlar %50, hemşireler %70 ve hastane koğu görevlileri %90 sıklıkla olmak üzere, %33 olan genel popülasyon taşıyıcılık oranlarına göre, daha yüksek nazofarengeal taşıyıcılık oranlarına sahiptirler. İnsülin kullanan diabetik hastalar, kronik hemodiyaliz hastaları, çeşitli dermatolojik bozuklukları olan hastalar, yasadışı intravenöz ilaç kullanıcıları ve HIV pozitif hastalar genel popülasyona göre daha yüksek taşıyıcılık oranlarına sahiptir. Taşıyıcılar nazal bölgeden organizmayı ciltlerine transfer ederler. Travma organizma için giriş kapısı oluşturur,

bunu lokal ve bazen jeneralize enfeksiyon izler. Bu örnekte organizma endojen orijinlidir, başka vakalarda hastane personeli veya bir aile üyesinden geçebilir (Topçu ve Gergin 2002).

2.7. *S. aureus*' un Tespiti

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

2.7.1. Koagülaz testi

Bu test özellikle stafilokoklarda bulunan ve kan plazmasını pıhtılaştıran koagülaz enzimini ortaya koymak için yapılır. *S. aureus* bu testle pozitif reaksiyon vermesine karşın, *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus* negatif reaksiyon gösterir. Lam ve tüp testi olmak üzere iki farklı şekilde uygulanmaktadır. Lam testiyle *S. aureus* suşlarında bağlı koagülaz enziminin tespiti yapılır. Bu amaçla *S. aureus* suşları, yüksek tuz konsatrasyonu bazı suşların otoaglutinasyonuna neden olduğu için kanlı agar ya da seçici olmayan nutrient ortamlarda üretilir. Temiz bir lam alınır ve uca yakın kısımlarına birer damla saf su damlatılır. Stafilokok kolonilerinden öze ile alınarak bu iki damlaya karıştırılıp homojen süspansiyonlar elde edilir ve elde edilen bu süspansiyonların birisinin üzerine bir damla plazma, diğerinin üzerine bir damla fizyolojik tuzlu su damlatılır. Koagülaz pozitif sonuçlarda 10-30 saniye içinde plazmalı damlada kümeler oluşurken kontrol damlası homojen görünümde kalmaktadır. Tüp testiyle ekstraselüler bir enzim olan serbest koagülaz araştırılır. Bu testle ideal olarak Brain Heart Infusion Broth kültürü kullanılmalıdır. Brain Heart kullanılacak ise koloni 1ml steril saf su içerisinde süspanse edilerek kullanılabilir. Liyofilize tavşan plazmalı (EDTA'lı) 3 ml steril saf su ile sulandırılıp steril küçük tüplere 0,3 ml olacak şekilde dağıtılır ve üzerine 0,1 ml kültür ilave edilip 37°C'de inkübasyona bırakılır. Her saat başı tüpte pıhtılaşma olup olmadığı tüpü yavaşça eğerek kontrol edilir. Tüpte belirgin bir pıhtı oluşumu (%75 pıhtı) pozitif olarak değerlendirilir (Arda 2000).

2.7.2. Deoksiribonükleaz testi

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

2.7.3. Termostabil endonükleaz testi

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

2.7.4. Katalaz testi

Bu test *S. aureus*'ta sentezlenen ve hidrojen peroksidi, su ve oksijene ayrıştıran katalaz enziminin varlığını tespit etmek için yapılır. Katı besiyerinde üretilmiş mikroorganizmada kolonilerinden bir lamın üzerine yeterli miktarda alınıp üzerine %30'luk hidrojen peroksitten bir damla damlatılır. Sıvı besiyerinde üretilmişse kültürden 5 ml alınarak üzerine %3'lük hidrojen peroksitten 3-4 damla ilave edilir. Hidrojen peroksidin katılmasından sonra kabarcıkların görülmesi veya çıkması pozitif reaksiyon olarak değerlendirilir (Arda 2000).

2.7.5. Üreaz testi

Bu test, içinde üre bulunduran spesifik besiyerleri kullanılarak *S. aureus*'ta üreyi hidrolize eden üreaz enzimini saptamak amacıyla yapılır. Ürenin hidrolizasyonu 2 molekül

amonyak ve karbondioksit meydana gelir. Bu testte bakteri uygun besiyerlerine ekildikten sonra 37°C’de 1-5 gün inkübasyona bırakılır. Kültürde amonyak oluşumu nedeniyle pH’ın yükselmesi sonucu besiyerindeki renk değişikliği pozitif reaksiyon ve hiçbir değişikliğin olmaması da negatif olarak değerlendirilir (Arda 2000).

2.7.6. Mannitol fermentasyonu

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

2.8. *Staphylococcus aureus* Taşıyıcılığı

İnfeksiyon gelişiminde risk oluşturan faktörlerden biri *S. aureus* taşıyıcılığıdır. Sağlıklı kişilerde *S. aureus* taşıyıcılığı başta burun olmak üzere perine ve aksillada kolonizasyon şeklindedir. *S. aureus*’un nazal kolonizasyonu ise en sık, vestibulum nasi bölgesinde saptanır.

2.8.1. *S.aureus* için taşıyıcılık özellikleri

Süre açısından insanlarda 3 çeşit taşıyıcılık durumu gözlenir.

1. Aralıklı taşıyıcılıklar (%50),
2. Devamlı taşıyıcılar (%30),
3. Hiçbir zaman taşıyıcı olmayanlar (%20).

S.aureus’un insan vücudunda kolonizasyon için tercih ettiği bölgeler, sebase ve apokrin bezlerce zengindir. Burun, yanak, alın, göbek, meme altı, kasık, ön kol, el, boğaz, aksilla, perine ve perianal bölge kolonizasyonunun görülebildiği sahalardır. Bunlardan

taşıyıcılıkta ve yayılmada önemli olanlar burun, perine, aksilla, el ve boğazdır (Casewell ve Hill 1986).

2.8.2. Burun taşıyıcılığı

Nazal taşıyıcılık 2 şekilde olabilir.

2.8.2.1.Devamlı taşıyıcılık

Bu çeşit taşıyıcılık %20 oranında görülür ve taşıyıcı kişiler bir tip suş taşırlar. Çocuklarda erişkinlere göre daha yaygındır. Birçok kişide 10-20 yaşları arasında taşıyıcılık paterni değişir. Hastanede yatış sırasında bu grup taşıyıcılarda başka suşlarla kolonizasyon saptanmaz.

2.8.2.2.Aralıklı taşıyıcılık

Toplunun yaklaşık %60'ında sıklıkla değişik suşların aralıklı olarak taşındığı taşıyıcılık şeklidir.

S. aureus'un nazal taşıyıcılık prevalansı ve insidansı araştırılan topluluklara göre değişiklik göstermektedir. Bu oran %19-55 arasında değişebilmektedir. Nazal taşıyıcılığı etkileyen faktörler; hastanede uzun süre yatış, diabetes mellitus, hemodiyaliz, kronik ambulator periton diyaliz, damar içi ilaç kullanımı alışkanlığı, *S. aureus*'un oluşturduğu cilt enfeksiyonu varlığı ve HIV enfeksiyonu olarak özetlenebilir. Bunların dışında, *S. aureus*'un hücre duvarında bulunan lipoteikoik asit ve bazı yüzey proteinleri ayrıca, viral enfeksiyonlar arasında burun epiteline aderensin artması, bazı HLA tipleri, nazal anomaliler, yaş, ırk, genetik yapı, immünolojik durum ve kadınlarda gözlenen hormonal değişiklik gibi durumlarda taşıyıcılığı etkileyen faktörlerdendir (Altemeier ve ark. 1981, Gross-Schulman 1998). Kolonizasyon ve taşıyıcılıkta en önemli bölge ön burun delikleri ve çevresidir. Taşıyıcıların vücut florasında bulunan MRSA rezervuarının burun olduğu kabul edilmektedir. Ön burun taşıyıcılarının 2/3'sinde arka burun boşluğunda da taşıyıcılık mevcuttur (Herold ve ark. 1998).

Burun sürüntüsünden 10^6 bakteri üretilen bir taşıyıcı, bulunduğu yerin havasını 20 cfu/ft³ düzeyinde kontamine edebilmektedir. Oysa 10 cfu/ft³ miktarda bakterinin havaya verilmesi çevrenin kontaminasyonu için yeterlidir. Normal toplumlarda *S.aureus* sabit burun taşıyıcılığı %10 -20 arasında değişmektedir. Bu oran antibiyotik tedavisi altındaki hastalarla temasta bulunan hastane personeline oldukça yüksek bulunabilir. Toplumun %70-90'ı ise geçici taşıyıcı olabilmektedir. Kadınlarda burun taşıyıcılığı hormonal durum ile ilişkili bulunmuştur. Premenapozal dönemde, postmenapozal döneme göre ve proliferasyon fazında, sekresyon fazına oranla daha yüksek oranda taşıyıcılık mevcuttur (Sanford ve ark. 1994).

Burunlarında *S.aureus* taşıyan kişiler mikroflorası bulunmayan bölgelerin ameliyat sonrası otoinfeksiyonuna neden olabildiği gibi, birarada bulunduğu diğer hastaların da infeksiyonuna, ayrıca çevrede ve personelde kolonizasyona neden olabilmektedir. Bu durum faj ve plazmid tiplendirmesi ile kanıtlanmıştır (Grady ve ark. 2001, Grady ve ark. 2000).

2.8.3. Cilt Taşıyıcılığı

Parmak, yüz, karın, meme altı kıvrımı, kasık gibi vücudun diğer cilt bölgelerinde geçici olarak taşınabilmekle birlikte, sabit taşıyıcılık açısından burun delikleri, perine ve aksillaya göre daha nadirdir. Burun taşıyıcılığı yokken cilt taşıyıcılığı yaklaşık %4'tür. Burun taşıyıcılarının cildinden izole edilen *S.aureus* suşlarının %75 oranında burunda taşınan suş ile aynı faj tipinden olduğu anlaşılmıştır. Cilde kolonize olmuş bakteriler kolayca çevreye yayılır. Bunlar taşıyıcılık açısından son derece riskli bireylerdir. Atopik dermatitlerde %85 gibi çok yüksek oranda *S.aureus* taşıyıcılığı bulunabilmektedir (O'Brien ve ark. 1999).

2.8.4. Perine ve aksilla taşıyıcılığı

S.aureus ve bunların MRSA suşlarının rektumda kolonizasyon oranının ön burun deliklerindeki kadar fazla olduğunu savunan araştırmacılar vardır. Gastrointestinal taşıyıcılığının araştırılmasında rektum, perineal ve perianal bölgelere ait örnekler ve gaita kullanılabilir. Perineal taşıyıcılığının ameliyathane gibi bölgelerde yayılım açısından önemi büyüktür. Perineal bölgeden kültür alma güçlüğünden dolayı bildirilen taşıyıcılık oranları sağlıklı değildir. Normal toplumlarda perinede %4-12, aksillada %1 oranında *S.aureus*

taşıyıcılığı mevcuttur. Hastaneye yatan hastalarda, çıkıştaki taşıyıcılık oranları, giriştekinden iki kat fazla olarak bulunmuştur (Verhoef ve Schmitz 1999).

2.8.5. Boğaz taşıyıcılığı

Boğaz *S.aureus*'un birincil kolonizasyon bölgesi olmamakla birlikte burunun tekrar kolonizasyonu için kaynak teşkil edebilir. Burun taşıyıcılarının %51'inin aynı zamanda boğaz taşıyıcısı olduğu ve bunların da %69 oranında aynı suş olduğu bildirilmektedir. Bazı hastalıklarda cilt taşıyıcılığı sıktır ve önemlidir. Örneğin psöriyazis ve egzema gibi tablolarda dökülen skuamlar üzerinde izole edilebilir (Waldvogel 2000).

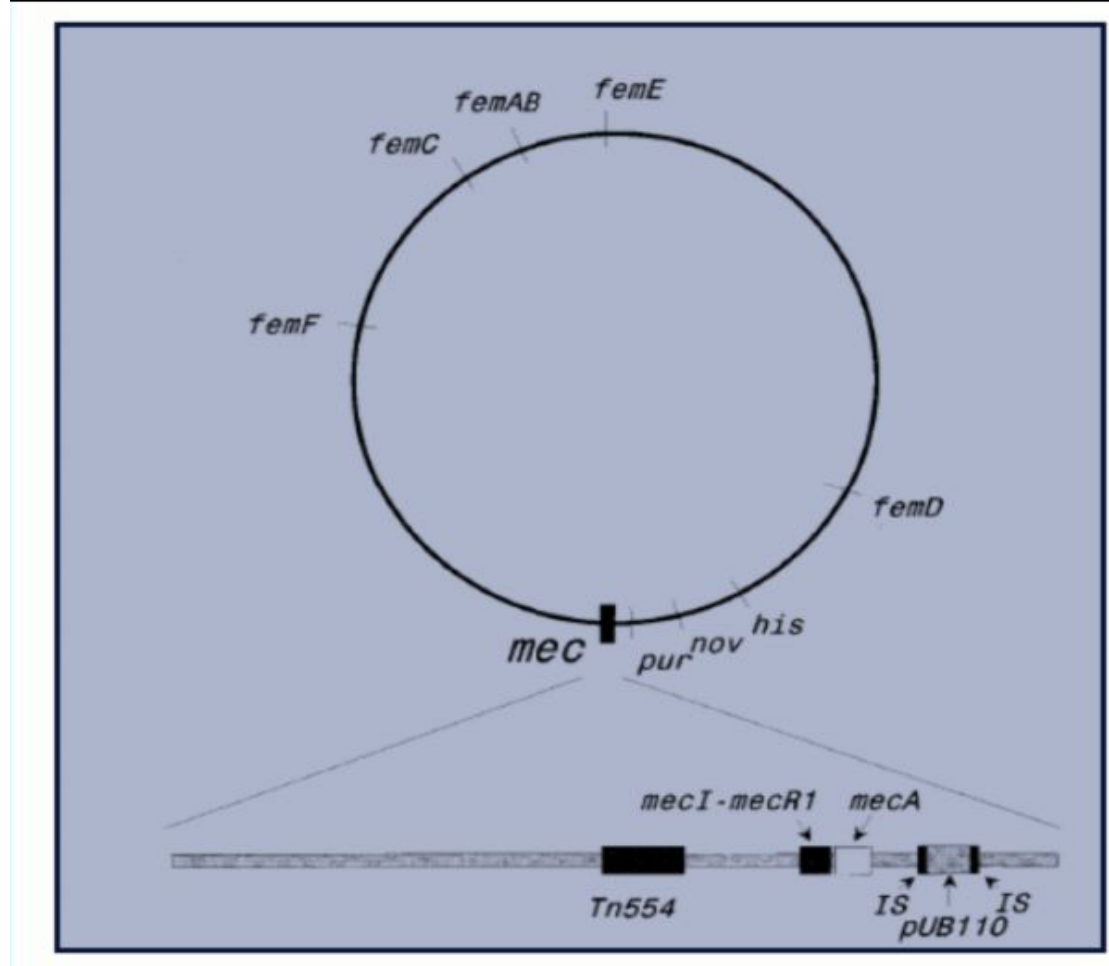
2.9. Stafilokoklarda Metisiline Direnç Mekanizmaları

Stafilokoklardaki metisiline direnç gelişmesi ciddi bir problemdir ve bu direnç üç şekilde olmaktadır:

2.9.1. Yeni bir penisilin bağlayıcı protein (PBP 2a) sentezi nedeniyle oluşan direnç

En sık rastlanan direnç, stafilokokların yeni bir PBP kazanmaları ile oluşan dirençtir. MRSA suşlarında MSSA'lardan farklı olarak ek bir PBP vardır ve PBP 2a olarak adlandırılmaktadır (Ünal 1996). PBP 2a'nın beta laktam antibiyotiklere afinitesi diğer PBP'lerden daha düşüktür. Bu nedenle metisiline dirençli bakteri beta laktam antibiyotik ile karşılaşırsa tüm PBP'ler antibiyotik tarafından bloke edilir, ancak PBP 2a düşük afinite nedeniyle beta laktam antibiyotiğe bağlanmaz ve ortamda antibiyotik yoksa fonksiyon göstermez (Ünal 1996, Vincent ve ark. 1998). PBP 2a, 2 kb'lik DNA segmentine lokalize bir gen olan *mec A* geni tarafından kodlanmaktadır. Bazen bu gen indüklenabilir ve transdüksiyon ile dirençli suşlardan duyarlı suşlara aktarılabilir (Vincent ve ark. 1998). *MecA* geni, regülasyonunu sağlayan *mecI* ve *mecR* genleriyle beraber stafilokoksik kaset kromozomu (SCC) ismi verilen genetik yapının üzerinde taşınır (Şekil 2.1). *S. aureus* için beş farklı SCC*mec* tipi tanımlanmıştır. Taşıdıkları genetik elemanların yapı ve kompozisyonları farklıdır. Bunlar *mecA* kompleksinin yanısıra çeşitli plazmidler ve transpoze olabilen genetik

elemanlar içerebilirler. Taşıdıkları *Tn554* makrolid, klindamisin ve streptogramin B direncinden sorumluyken; *pT181* tetrasiklinlere karşı dirençten sorumludur. SCCmec tip I, II ve III genelde hastanede edinilmiş MRSA (HE-MRSA) suşlarında bulunur. SCCmec IV ve V ise TE-MRSA suşlarında saptanmıştır. *Mec* IV ve V diğer tiplerden farklı olarak daha küçük yapıdadırlar ve *mecA* dışında direnç geni taşımazlar. Bu nedenle toplum kaynaklı suşlar genelde β -laktam dışı antibiyotiklere duyarlıdırlar (Moreillon ve ark. 2005).



Şekil 2.1: *mecA* geninin yapısı

2.9.1.1. Metisiline direnç iki şekilde olabilir

2.9.1.1.1. Homojen direnç: Bakteri kolonisini oluşturan tüm *S.aureus* suşlarında *mecA* geni bulunur. Bu bakteri kolonilerinin hepsinde *mecA* geni fonksiyoneldir. Yüksek düzeyde dirence sebep olurlar. Direnç ortam pH'sı, ısı, tuz konsantrasyonu, inkübasyon süresi gibi çevresel faktörlerle ilişkili değildir (Ünal 1996, Franciulli ve ark. 1991).

2.9.1.1.2. Heterojen direnç: Klinik uygulamada daha sık görülen, ancak çevre koşullarından etkilenmesi nedeniyle tespiti güç olan direnç türüdür. Koloniyi oluşturan tüm bakteriler *mec A* geni taşımalarına rağmen, direnç ancak 10^6 yada 10^8 bakteriden birinde tespit edilebilmektedir. Bunun *mec A* geninin fonksiyonunu kontrol ettiği sanılan *fem A*, *faktör X* veya *mec R*, *mec I* gibi kontrol genlerine bağlı olarak meydana geldiği sanılmaktadır (Ünal 1996).

2.9.2. Beta laktamaz salgılanması

Beta laktamazların aşırı salgılanması metisilini kısmen parçalayarak metisiline dirence neden olur. Bu tür direnç, beta laktam antibiyotiklerin beta laktamaz inhibitörü ile kombine edilmesi ile yenilebilir (Ünal 1996, Francioli ve ark. 1991).

2.9.3. Mevcut PBP'lerde beta laktam antibiyotik afinitesinde azalma

Son yıllarda beta laktamaz negatif olup, *mec A* geni taşımadıkları halde metisiline dirençli stafilokoklar tespit edilmiştir. Çok az sayıdaki bu tür izolatlar incelendiğinde, bu bakterilerin mevcut PBP'lerinin beta-laktam antibiyotiklere düşük afinite gösterdikleri saptanmıştır (Ünal 1996).

2.10. Metisiline Direncin Saptanması Amacıyla Kullanılan Testler

Metisiline direncin saptanmasında disk difüzyon ve broth dilüsyon temeline dayalı testler yaygın olarak kullanılmaktadır. Oksasilin kimyasal yapı itibarı ile penisilinaze dayanıklı penisilinler içerisinde daha dayanıklı yapıya sahip olması nedeniyle, bu amaçla en sık kullanılan indikatör antibiyotiktir. CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) tarafından tanımlanan oksasilin ve tuz içeren agar tarama testi (Oxacillin Salt Screening Agar) *S. aureus* izolatlarında metisiline direncin belirlenmesinde özgüllüğü ve duyarlılığı oldukça yüksek bir testtir. Mililitrede 6 µg oksasilin ve %4 oranında NaCl içeren Muller-Hinton agarda 35°C'da 24 saatlik inkübasyonu takiben bir koloniden fazla üreme olması metisiline direnci göstermektedir (Swensen ve ark. 2003). Bu seçici besiyerine mannitol eklenmesi

klirik materyalden MRSA'nın doğrudan tanımlanmasını sağlamaktadır (Jayaratne ve Rutherford 1999). Sefalosporinler son yıllarda üzerinde çalışılan bir diğer önemli indikatör antibiyotik grubunu oluşturmaktadır. Moksolaktam ve sefoksitin kullanılan disk difüzyon yönteminin MRSA ayırımı için duyarlılık ve özgülüğü %100 olarak saptanmıştır (Felten ve ark. 2002). Kısa süre önce yapılan bir çalışmada sefoksitin içeren kromojenik agarın *S. aureus*'ta metisilin direncinin saptanmasında duyarlılığı %89, özgülüğü ise %99.5 olarak bildirilmiştir (Boutiba-Ben ve ark. 2004). Sefoksitin performansının oksasiline karşılaştırıldığı bir başka çalışmada ise 115 MRSA ve 350 MSSA izolatı test edilmiş; sefoksitin oksasiline göre daha duyarlı bulunmuştur (sefoksitin özgülüğü %100, duyarlılığı %96.5, oksasilin özgülüğü % 99.1, duyarlılığı %90.4). Hem oksasilin hem de sefoksitin kullanıldığında testin duyarlılığı % 100'e çıkmıştır (Smyth ve Kahlmeter 2005). Litrede 4 mg sefoksitin içeren mannitol tuzlu agarla yapılan çalışmada ise *mecA* pozitif suşlardan %96.6'sı besiyerinde ürerken, *mecA* negatif suşların tamamının üremesi baskılanmıştır (Perry ve ark. 2004).

Hastaların uygun tedavi alabilmesi için antibakteriyel duyarlılığın bilinmesi büyük önem taşımaktadır. Bu ihtiyaç çoklu dirençli bakterilerin yaygın olduğu merkezlerde daha da belirgindir. Bu amaçla yapılan kültür ve ardından uygulanan fenotipik duyarlılık testleri halen pek çok laboratuvar da uygulanan temel yaklaşımdır. Ancak fenotipik testlerin sonuçlandırılması bakterinin kültürde üretilmesinden sonra 24 saat kadar bir süreyi gerektirir. Bunun yanısıra metisiline direncin belirlenmesi inokulum miktarı, inkübasyon zamanı, besiyerinin pH'sı ve tuz konsantrasyonu gibi pek çok faktörden etkilenmektedir. Bu nedenle son 20 yılda immunolojik veya moleküler tekniklere dayalı olarak geliştirilen hızlı duyarlılık testleri büyük önem kazanmıştır. Bu testlerden elde edilecek pozitif sonuçlar hastalara daha erken dönemde uygun antibiyotik tedavisinin başlanmasını sağladığı gibi; olası salgınların erken dönemde saptanmasına ve hastaların uygun şartlarda izolasyonuna imkan tanımaktadır. Bunların yanısıra hızlı testler direnç genlerinin doğrudan klinik materyalden saptanması ve sınır noktaya yakın MİK değerlerinin daha sağlıklı yorumlanmasının sağlanması gibi diğer avantajlara da sahiptir (Metan ve ark. 2005). *MecA* geninin saptanması metisiline direncin saptanmasında altın standarttır. Polimeraz zincir reaksiyonu bu amaçla kullanılan altın standard yöntemdir, fakat özel yetişmiş personel gerektirmesi ve yüksek maliyeti nedeniyle genelde uygulanması referans laboratuvarlarla sınırlı kalmaktadır (Murakami ve ark. 1991, Predari ve ark. 1991, Moreillon ve ark. 2005).

Metisiline direncin erken dönemde saptanması amacıyla pek çok farklı test yöntemi geliştirilmiştir. Kolay uygulanması ve düşük maliyeti nedeniyle yaygın olarak kullanılan

lateks aglutinasyon testleri (LA) ise *mecA* geni kontrolünde sentezlenen PBP2a'nın lateks ile kaplı monoklonal antikorlar ile reaksiyon vermesine dayanır. *S. aureus*'da metisiline direncin saptanması için yapılan çalışmalarda bu testlerin özgülük ve duyarlılığı %95-100 arasında bildirilmektedir (Soloaga ve ark. 2004).

2.11. Tanı

S. aureus'un identifikasyonunda koloni morfolojisi ve boyanma, pigment üretimi, hemoliz, mannitol fermantasyonu, yüksek tuz konsantrasyonlu ortamda üreme ve koagülaz varlığı gibi kriterler araştırılır. Kanlı agarda 24 saatte üreyen stafilocoklar beta hemoliz zonu bulunan, altın sarısı renginde koloniler yaparlar. *S. aureus*'un bütün suşları koagülaz ve mannitol pozitifdir. Sporsuz, hareketsiz, kapsülsüz, genellikle katalaz pozitif, oksidaz negatif olup Gram pozitif boyanırlar. Fakültatif anaerob olup daha çok aerob üremeyi tercih ederler. Çoğu % 7,5 NaCl içeren basit besiyerlerinde, 18-45 °C'de kolaylıkla ürer. Birçok türünde karotenoid pigment bulunabilir. Başta glikoz olmak üzere birçok karbonhidratı parçalarlar ve son ürün olarak laktik asit oluştururlar (Cengiz 1999, Bilgehan 2000).

2.12. MRSA İnfeksiyonlarına Karşı Kullanılan Antibiyotikler

2.12.1. Penisilinaza dirençli penisilinler (Antistafilokokal penisilinler)

Metisilin, nafsilin ve izoksazolil penisilinler (kloksasilin, dikloksasilin, flukloksasilin ve oksasilin) bu grupta yer almaktadır. *S. aureus* izolatlarında penisilin direncinin ilk kez 1944 yılında bildirilmesinden sonra, ilk penisilinaza dirençli penisilin olan metisilin 1959 yılında kullanılmaya başlandı. Bu bileşikler *S. aureus* tarafından sentezlenen beta laktamazların hidrolizine dirençlidirler. Bu gruptaki penisilinlerin kullanımı stafilocok infeksiyonlarının tedavisiyle sınırlıdır. Bu nedenle bu gruptaki penisilinlere “antistafilokokal penisilinler” de denmektedir. Ancak giderek artan oranda *S. aureus* suşlarında metisilin direnci bildirilmektedir. Metisiline dirençli stafilocoklar bu grubun diğer üyelerine dirençli oldukları gibi, diğer tüm beta laktam antibiyotiklere de dirençlidirler. Hatta in vitro olarak diğer beta laktam antibiyotiklere duyarlı görülse bile, bu suşlar tüm beta laktamlara dirençli

olarak rapor edilmelidir (Murray ve ark. 1998). *S. aureus* izolatlarında metisiline direnç ilk kez 1961 yılında İngiltere’den bildirilmiştir (Barber 1961). Metisiline dirençli *S. aureus* suşlarının çoğu başta diğer beta laktam antibiyotikler olmak üzere, aminoglikozitlere ve tetrasikline de dirençli olmaktadır. Beta laktam antibiyotikler bakteri hücre duvarında yer alan penisilin bağlayıcı proteinleri (PBP) inhibe ederek etkilerini göstermektedir. Metisiline duyarlı ve dirençli stafilokoklar arasındaki temel fark PBP’lerdedir. Metisilin direnci PBP 2 ya da 2a denen proteinin varlığına bağlıdır. Bu protein duyarlı suşlarda bulunmamaktadır. Direncin nedeni olan 2a’yı kodlayan gen kromozomal DNA üzerinde “*mec*” olarak adlandırılan bölgededir. PBP’lerde oluşan değişikliklerle meydana gelen metisilin direnci, beta laktamlara genel direncin ifadesidir. Bu nedenle metisiline dirençli stafilokoklarla oluşan infeksiyonların tedavisinde beta laktam antibiyotikler önerilmemektedir (Witte 1999).

2.12.2. Beta laktamaz inhibitörlü kombine penisilinler: Klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam gibi beta laktamaz inhibitörleri ile ampisilin, amoksisilin, tikarsilin, piperasilin gibi penisilin türevlerinin kombinasyonu ile beta laktamaz salgılayan bakterileri de etki spektrumuna alan ilaçlar geliştirilmiştir. Bu ilaçlar genellikle stafilokok beta laktamazlarını inhibe ederler (Mutlu ve Ögünç 1999).

2.12.3. Sefalosporinler: Sefalosporinler *Cephalosporium acremonium* isimli fungustan elde edilmiştir. Parenteral ve oral yolla kullanılabilen iki formları vardır. Parenteral sefalosporinler yapılarına ve antimikrobiyal etkinliklerine göre 1. 2. 3. ve 4. kuşak olmak üzere 4 gruba ayrılırlar. Birinci kuşak sefalosporinler, metisiline duyarlı stafilokoklara en etkili sefalosporinlerdir. Ancak hiçbir sefalosporin grubunun metisiline dirençli *S. aureus* üzerine etkinliği yoktur (Leblebicioğlu 2003).

2.12.4. Aminoglikozidler: Aminoglikozidler *Streptomyces* ve *Micromonospora* cinsi toprak bakterilerinden elde edilen antibiyotiklerdir. Metisiline duyarlı stafilokoklara genellikle etkilidirler. Aminoglikozidler, Gram pozitif koklara bağlı gelişen infeksiyonların tedavisinde beta laktam antibiyotikler ve vankomisin gibi diğer bazı antibiyotiklerle sinerjik etkilerinden yararlanmak amacıyla kombine tedavide kullanılırlar. Stafilokoklara en etkili aminoglikozid grubu antibiyotikler; amikasin ve netilmisindir (Topçu 2002).

2.12.5. Makrolidler: 1952 yılında *Streptomyces erythreus*’tan eritromisin elde edilmiştir. Bununla birlikte makrolid grubu antibiyotikler ilk kez gündeme gelmiştir.

Metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus* suşlarının çoğu eritromisine duyarlı olmakla birlikte, tedavi sırasında direnç gelişme riski yüksektir. Metisiline dirençli *S. aureus* suşları ise genellikle eritromisine dirençlidir. Klaritromisinin metisiline duyarlı *S. aureus*'a etkinliği eritromisinden 2-4 kat daha fazla, azitromisinin ise eritromisinden 2-4 kat daha azdır. Eritromisine dirençli olan *S. aureus* suşları ise klaritromisin ve azitromisine de dirençlidir (Çokça 2002). Telitromisin, makrolidlerin ketolid subgrubunda yer alan ilk antibiyotik olup, eritromisinin semisentetik derivesidir. *S. aureus*'a karşı klaritromisin ve azitromisinden daha etkilidir (Leblebicioğlu 2003).

2.12.6. Kinolonlar: Kinolonlar 1960'lı yıllardan beri bilinen eski bir antibiyotik grubudur. Bu grubun ilk üyesi antimalaryal bir ajan olan klorokinin saflaştırılması sırasında elde edilen bir ara üründen üretilen nalidiksik asittir. 1980'li yıllardan sonra geliştirilen florokinolonlar veya 4-kinolonlar adı verilen yeni kinolon türevleri nalidiksik aside göre daha geniş etkinliğe sahiptir. Klinik kullanıma giren ilk kinolon olan nalidiksik asit sadece Gram negatif enterik bakterilere etkilidir, *S. aureus* üzerine etkinliği yoktur. İkinci kuşak kinolonların da stafilokoklara etkinliği orta derecededir. Özellikle siprofloksasin ve ofloksasinin klinik kullanıma ilk girdiği yıllarda *S. aureus*'a karşı çok iyi etkinlik gözlenmiş ancak kısa sürede kinolon direnci gelişmiştir (Ulusoy ve ark. 2003).

2.12.7. Trimetoprim-sülfametoksazol (TMP-SMZ): Sülfonamidler bakteriyel infeksiyonların tedavisinde sistemik olarak kullanılan ilk antibiyotiklerdir. Sülfametoksazol Türkiye'de sadece trimetoprimle kombine şekilde bulunmaktadır. TMP-SMZ kombinasyonu in vitro olarak *S. aureus* suşlarına karşı etkili idi. Ancak yaygın ve uygunsuz kullanımı sonucu son yıllarda bu kombinasyona karşı pekçok bakteride direnç gelişmiştir (Topçu 2002).

2.12.8. Linkozamidler: Linkozamidler olarak anılan antibiyotikler; linkomisin ve klindamisinidir. Linkomisin 1962 yılında *Streptomyces lincolnensis*'ten elde edilmiştir. Antibakteriyel spektrumları Gram pozitif mikroorganizmalar ve anaerob mikroorganizmalarla sınırlıdır. Temel terapötik endikasyonları arasında; penisilin allerjisi olan kişilerin penisiline duyarlı infeksiyonları, özellikle kemik ve eklemlerdeki stafilokok infeksiyonları gelir. Stafilokokların neden olduğu yumuşak doku ve üst solunum yolu infeksiyonlarında klindamisin alternatif ilaç olabilir. Klindamisin genellikle metisiline duyarlı *S. aureus*'a karşı etkin ancak metisiline dirençli suşlara karşı etkin değildir (Çokça 2002).

2.12.9. Fusidik asit: İlk olarak Danimarka’da geliştirilen fusidik asit, 1962 yılında Avrupa’da, 1998 yılında ise Türkiye’de kullanıma girmiştir. Penisilin ve metisiline dirençli stafilokok infeksiyonlarında glikopeptit antibiyotiklere oral kullanım kolaylığı ve maliyet açısından alternatif oluşturabilecek bir antibiyotiktir. Fusidik asit dar spektrumludur. Beta laktamlarla çapraz direnç göstermedikleri için metisiline dirençli kökenlerde güvenle kullanılabilirler. Özellikle metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* ve metisiline dirençli *Staphylococcus epidermidis* suşlarına etkindir. MRSA suşlarıyla oluşan infeksiyonların doğrudan veya ardışık tedavisinde tek başına ya da diğer antistafilokokal antibiyotiklerle birlikte kullanılabilmektedir (Topçu 2002).

2.12.10. Karbapenemler: Karbapenemlerin iki üyesi; imipenem ve meropenemdir. Beta laktam antibiyotikler içinde en geniş etki spektrumuna sahip antibiyotiklerdir. Karbapenemlerin Gram pozitif aerop bakterilere etkinlikleri, penisilinler ve birinci kuşak sefalosporinler gibi oldukça fazladır. Metisiline duyarlı *S. aureus* suşlarına etkin, metisiline dirençli *S. aureus* suşlarına etkisizdirler. *S. aureus* dahil Gram pozitiflere etkinlik açısından imipenem meropeneme göre daha üstündür (Özgüven ve Dizer 2002).

2.12.11. Streptograminler (Kinupristin/Dalfopristin): *Streptomyces pristinaspiralis*’ten köken alan streptograminler makrolid-linkozamid-streptogramin (MLS) ailesi içinde yer alan bir antibiyotik grubudur. Kinupristin/dalfopristin; iki farklı streptogramin bileşiğinin sinerjik etki gösteren semisentetik bir kombinasyonudur. Tek başına oldukça sınırlı bir antibakteriyel etkisi olan bu bileşikler birlikte sinerjistik etki oluşturmaları nedeniyle iyi bir antibakteriyel etkinlik gösterirler. Her ikisi de suda çözünen bu bileşiklerin %30 kinupristin-%70 dalfopristin şeklindeki kombine preparatı intravenöz formuyla klinik kullanıma giren ilk streptogramindir. Dar spektrumlu bir antibiyotik kombinasyonudur. Temel etki spektrumu içinde Gram pozitif mikroorganizmalar yer almaktadır. Hem metisiline duyarlı, hem de dirençli *S. aureus* kökenlerine etkilidir (Korten 2003).

2.12.12. Oksazolidinonlar (Linezolid-Eperozolid): Linezolid ve eperozolidin üyeleri oldukları oksazolidinon grubunun antimikrobiyal özellikleri, antidepresan ilaçlar olan monoamin oksidaz inhibitörlerinin araştırmaları esnasında farkedilmiş ve daha sonra antibiyotik olarak geliştirilmişlerdir. Tamamen sentetik antibiyotiklerdir. Linezolid tüm önemli Gram pozitif bakterilere karşı mükemmel in vitro aktiviteye sahiptir. Hem metisiline duyarlı, hem de dirençli *S. aureus* suşlarına etkilidir (Balık ve Birengel 2003).

2.12.13. Rifampisin: Rifampisin *Streptomyces mediterranei*'den elde edilen rifamisinin semisentetik bir türevidir. Vankomisin ve diğer antistafilokokal ajanlarla kombine olarak metisiline duyarlı ve dirençli stafilokok infeksiyonlarının tedavisinde kullanılır. Kronik stafilokok osteomyelitinde vankomisin veya nafsilinle kombine olarak kullanıldığında tedavi başarısının artırdığı bildirilmektedir (Erol 2003).

2.12.14. Mupirosin: Mupirosin *Pseudomonas fluorescens*'in fermentasyonu ile elde edilen doğal bir antibiyotiktir. Primer ve sekonder deri infeksiyonlarında etken olan stafilokoklara ve streptokokların çoğuna mükemmel in vitro etkinlik gösterir. Metisiline dirençli stafilokokların büyük bir kısmı mupirosine duyarlıdır. Çoklu antibiyotiğe dirençli *S. aureus* suşları daha az duyarlıdır. Mupirosin %2 pomad, primer deri infeksiyonları ve dermatozlar ile yaralı dokuların sekonder infeksiyonlarında 5-14 gün, günde 2-3 kez uygulanır. Mupirosin kalsiyum %2 nazal pomadının 5 gün, günde iki kez buruna uygulanmasının, metisiline dirençliler de dahil *S. aureus* nazal taşıyıcılığının eradikasyonunda etkili olduğu bildirilmektedir (Felek 2003).

2.12.15. Glikopeptitler: Glikopeptitler dar spektrumlu antibiyotiklerdir. Bu grupta vankomisin, teikoplanin, daptomisin, ramoplanin, ristosetin ve aktinoidin bulunur. Son yıllarda stafilokoklar, enterokoklar ve piyojenik streptokokların dahil olduğu Gram pozitif bakteriler önemli nozokomiyal patojenler haline gelmiştir. Beta laktam antibiyotiklere dirençli stafilokoklar ve enterokoklardaki artış nedeniyle glikopeptit antibiyotikler klinikte yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Felek 2003).

2.13. İnfeksiyon Hastalıklarında Moleküler Tanı Yöntemleri

Moleküler teknikler günümüzde tıbbın tüm uzmanlık alanlarında vazgeçilmez yöntemler haline gelmektedir. Bu tekniklerden gerek sınıflama patogenetik çalışmalarda gerekse tanıda giderek daha yaygın bir şekilde yararlanılmaktadır. Bu teknikler hem hızlı sonuç vermeleri, hem de kolay uygulanabilirliklerinden dolayı hemen hemen tüm araştırma ve tanı laboratuvarlarına girmişlerdir. Bu tekniklerin tıpta ve biyolojide uygulamaya girmesiyle, sınıflandırmalar daha güvenilir ve kolay hale gelmiş; pek çok organizmanın sınıflandırılması mümkün olmuş ya da sınıflandırmalardaki belirsizlikler/yanlışlıklar giderilmiştir.

Moleküler teknikler infeksiyon hastalıkları alanında bugün pek çok aşamada kullanılmaktadır. Bu teknikler sayesinde yavaş ya da üretilmeyen hastalık etkenleri, çok kısa sürelerde tanımlanabilir hale gelmiş; bazı hastalıklarla mikroplar arasındaki bağlantı ortaya konmuş ve pek çok yeni etken tanımlanabilmiştir. Böylece sınıflandırmalar konusundaki belirsizlikler ve yanlışlıklar giderilmiştir. Eskiden çok uzun zaman ve para harcanarak ancak çok özel laboratuvarlarda yapılabilen deneyler, çok daha ucuza, çok daha kısa sürelerde ve daha verimli bir şekillerde uygulanabilir hale gelmiştir.

Moleküler teknikler sayesinde, hastalık etkenlerinin terapötiklere karşı geliştirdikleri direnç ve savunma mekanizmaları çok kısa sürelerde çözümlenebilmekte ve bunlara karşı uygun stratejiler anında hatta daha ortaya çıkmalarından önce geliştirilebilmektedir.

Başta bazı virüs hastalıkları olmak üzere moleküler teknikler bugün pek çok infeksiyon hastalığının tanı ve tedavi kriterlerine yaklaşımı kolaylaştırmıştır.

İnfeksiyon hastalıklarının epidemiyolojik takibinde de bu tekniklerden geniş ölçülerde yararlanılmakta ve hastalıkların, dirençli ya da hastalık yapma gücü daha yüksek etkenlerin yayılmasının engellenmesinde daha etkin önlemler alınabilmekte ve koruyucu hekimlikte, daha verimli stratejiler belirlenmektedir (Altaş ve Midilli, 2003).

2.14. Polimeraz Zincir Reaksiyon (PZR)

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

PZR türe özgün çok sayıda DNA fragmentlerinin üretilmesi için enzimatik bir reaksiyondur. Özellikle çok sayıda infeksiyona neden mikroorganizmaların kısa sürede teşhis edilmesi ve tanımlanmasının yanı sıra ait olduğu mikroorganizmaya özgün olan DNA dizisinin varlığını ortaya koymak için; yani, genetiğin tanımlanması için kullanılan hızlı, güvenilir sonuçlar veren bir analiz yöntemidir. Bunun için, forward ve revers primerleri olan sentetik oligonükleotidler, DNA fragmenti ve sıcaklığa duyarlı Taq polimeraz enzimi kullanılır. Moleküler çalışmalarda PZR reaksiyon karışımının ve koşullarının çok iyi belirlenmesi gerekir. Özellikle de sentetik primerlerin bağlanma sıcaklığının belirlenmesi önemlidir.

Çalışmamızda *mecA*-1, *mecA*-2, *PVL*-1, *PVL*-2, *PVL*-3 primerleri kullanıldı (Martin-Lopez ve ark. 2004, McDonald ve ark. 2005, Stephens ve ark. 2006, Kwon ve ark. 2005).

3. MATERYAL VE METOD

Bu çalışma Ekim 2007-Ocak 2009 tarihleri arasında Konya Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı ve Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Arkeometri ve Biyoteknoloji Laboratuvarında yapılmıştır.

3.1. Örneklerin toplanması

Konya Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesinde çeşitli kliniklerde yatan hastalardan ve hastane personelinden, burun sürüntü örnekleri alınacak kişilere çalışma hakkında bilgi verildi ve anket dolduruldu (Çizelge 3.1, 3.2 ve Çizelge 3.3).

Çizelge 3.1. Alınan örneklerin servislere göre dağılımı

SERVİSLER	HASTA SAYISI	PERSONEL SAYISI	TOPLAM
1-Nefroloji	42	29	71
2-İntaniye	9	4	13
3-Endokrinoloji	13	3	16
4-Beyin cerrahi	27	10	37
5-Ameliyathane	-	60	60
6-Gastroenteroloji- Hematoloji	48	13	61
7-Reaminasyon	-	13	13
8-Nöroloji	49	6	55
9-Onkoloji	18	9	27
10-Ortopedi- Travmatoloji	45	15	60
11-Üroloji	44	15	59
12-Göğüs Hastalıkları	45	31	76
13-Kalp Damar Cerrahi	27	8	35
14-Kardiyoloji	39	-	39
15-Yeni Doğan	25	5	30
16-Çocuk İntaniye	15	5	20
17-Genel pediatri	31	7	38
GENEL TOPLAM	477	233	710

Çizelge 3.2. Hasta bilgilerinin alındığı anket

HASTA NO:	TARİH:
	DOSYA NO:
ADI SOYADI:	CİNSİYET:
YAŞ:	YATIŞ SÜRESİ:
KLİNİĞİ:	HASTALIĞI:
KATETER:	SONDA:
ANTİBİYOTİK KULLANIMI:	STEROİD VEYA KANSEROJEN İLAÇ KULLANIMI:
MRSA:	ÜREYEN DİĞER MİKROORGANİZMALAR:

Çizelge 3.3. Personel bilgilerinin alındığı anket

PERSONEL NO:	TARİH:
	SİCİL NO:
ADI SOYADI:	CİNSİYET:
YAŞ:	ÇAİŞTIĞI KLİNİK:
ÇALIŞMA SÜRESİ:	HASTALIĞI:
DÜZENLİ İLAÇ KULLANIMI:	ANTİBİYOTİK KULLANIMI:
MRSA:	ÜREYEN DİĞER MİKROORGANİZMALAR:

3.2. Örneklerin incelenmesi

3.2.1. Alınan burun örneklerinden *S. aureus* İzolasyonu

Yatan hasta ve hastane personelinden burun sürüntü örnekleri, steril swap (Or-Bak) ile alındı. Alınan örnekler koyun kanlı agara ve MRSA tarama besiyerlerine (Biomerieux) ekilerek 18-24 saat 35-37 °C’de inkübe edildi (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. Kanlı agarda MRSA kolonileri

3.2.2. Besiyerleri

%5’lik Koyun kanlı agar besiyeri, üretici firma önerilerine uygun olarak hazırlanıp kullanıldı.

MRSA tarama besiyeri, Biomerieux firmasından alınan hazır dökülmüş besiyeri kullanıldı

3.2.2.1. %5'lik Koyun kanlı agar besiyerinin hazırlanışı

Trypton 14 gr.

Pepton Nötralize 4.5 gr.

Maya Özütü 4.5 gr.

Sodyum Klorür 5.0 gr.

Agar 12.5 gr.

pH:7.3±0.2

Balon içinde bir litre distile suda 40 gr dehidrate besiyeri ilave edildi. Sıcak su banyosunda eritildikten sonra sodyum fosfat tampon sistemi kullanılarak pH: 7.5'e ayarlandı. 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edildi. Besiyeri 45-50°C'ye soğutularak içerisine 50 ml Defibrine steril koyun kanı eklendi. Karıştırılarak aseptik koşullarda petri kutularına döküldü.

3.2.3. Değerlendirme

Kanlı agara ekilen burun sürüntü örnekleri 37 derecede 18-24 saat inkübe edildikten sonra incelendi. Kuşku kolonilere Gram boyama, katalaz ve koagülaz testi yapılarak *Staphylococcus aureus* tanısı kondu. Koagülaz testinde slidex staph kit kullanıldı.

Ek olarak çalışmamızda izole ettiğimiz *Staphylococcus aureus* suşlarını doğrulamak amacı ile API (Biomérieux) Staph kitleri kullanıldı. Örnekler mini API cihazında 24 saatlik inkübasyon sonunda okutularak değerlendirilmiştir (Şekil 4.3).

MRSA tarama besiyerine ekilen aynı örnekler ise besiyerinde yeşil koloni oluşturması ile Metisiline Dirençli *S. aureus* (MRSA) oldukları doğrulandı.

3.2.4. Antibiyotik duyarlılık testleri

3.2.4.1. Katı besiyerinin hazırlanması

Çalışmaya alınan suşların oksasilin ve vankomisin duyarlılıkları Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) standartlarına uygun olarak disk difüzyon ve E-testi yöntemleri ile belirlendi. Bu amaçla Mueller Hinton agar besiyeri hazırlanıp 121°C'de 15

dakika otoklavda sterilize edildikten sonra petrilere dökülmüş ve oda sıcaklığında katılaşması beklenmiştir. Kontaminasyon kontrolü için petriler 37°C'lik etüvde bir gece inkübe edilmiş ve hiç bakteri üremesi olmayan petriler antibiyotik duyarlılık testlerinde kullanılmıştır.

3.2.4.2. Duyarlılık testleri için bakteri süspansiyonunun hazırlanması

Duyarlılık testleri için %5'lik koyun kanlı agarda üretilmiş *S. aureus* suşları Mueller Hinton broth besiyerine ekilerek 0.5 Mc-Farland bulanıklık standardına (10^8 bakteri/mL) uygun olacak şekilde hazırlanmıştır.

3.2.4.3. Disk difüzyon yöntemi

Çalışmamızda her bir suş için 0,5 Mc-Farland bulanıklığında hazırlanan standart bakteri süspansiyonu Mueller Hinton agar bulunan petrilere tüm besiyerinin üzerini kaplayacak şekilde yayıldı. Besiyeri yüzeyine steril pensle oksasilin ve cefoksitin antibiyotiklerini içeren diskler yerleştirildikten sonra petriler 35°C de 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda disklerin çevresinde bakterilerin test edilen antibiyotiklere duyarlılık derecesini ifade eden bakterilerin üremediği dairesel alanın çapı ölçülerek duyarlı, orta duyarlı ve dirençli suşlar CLSI'nın kriterlerine göre belirlendi (Çizelge 3.4.).

Çizelge 3.4. Disk difüzyon testinde oksasilin ve sefoksitin sınır değerleri

Antibiyotik	Duyarlı	Orta Duyarlı	Dirençli
Oksasilin	≥ 13	11-12	≤ 10
Cefoksitin	≥ 16	13-15	≤ 12

3.2.4.4. E-Testi yöntemi

E-testinde disk difüzyon yönteminde olduğu gibi her bir suş için Mc-Farland 0.5 bulanıklığında hazırlanan standart bakteri süspansiyonunu Mueller Hinton agar bulunan petrilere tüm besiyerinin üzerini kaplayacak şekilde yayıldı. Besiyeri yüzeyine steril pensle

oksasilin ve vankomisin E-testi şeritleri konularak 35 °C’de 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda elips şeklindeki inhibisyon zonunun şeridi kestiği noktadaki konsantrasyon değeri CLSI’nin kriterlerine göre MİK değeri olarak kaydedildi (Şekil 4.4.), (Çizelge 3.5.).

Çizelge 3.5. E-testinde oksasilin ve vankomisin sınır değerleri

Antibiyotik	Duyarlı	Orta Duyarlı	Dirençli
Oksasilin	≤ 2 mcg/ml	---	≥ 4 mcg/ml
Vankomisin	≤ 2 mcg/ml	4-8 mcg/ml	≥ 16 mcg/ml

3.3. Moleküler Testler

3.3.1. DNA örneklerin hazırlanması

DNA izolasyonu Alkali Lizis yöntemi ve EZ1 biorobot (Qiagen) DNA izolasyon cihazı kullanılarak yapıldı. İzole edilen DNA’lar %1’lik agaroz jel elektroforezde yürütüldü (Şekil 4.5.).

3.3.2. DNA izolasyon yöntemleri

3.3.2.1. Alkali lizis manuel DNA izolasyon yöntemi

Gerekli malzemeler

- LB-Broth Besiyeri (5 gr maya özütü, 10 gr pepton,10 gr NaCl 1 lt saf su içerisinde eritilerek 121°C ’de 15 dk otoklavlandı ve 3 ml’lik cam tüplere döküldü.)
- Tris-EDTA tamponu pH: 8
 - 10 mM tris HCl
 - 1 mM EDTA pH 8
- Lizozim
- %10’luk SDS (Sodyum Dodesil Sülfat)
- Proteinaz K (20 mg/ml)
- %10’luk CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide)

- 0.7 M NaCl
- %100'lük Etanol
- İzopropanol
- Kloroform izoamil alkol (24:1)
- Fenol Kloroform İzamil Alkol (25:24:1)
- Fenol

İzolasyon Aşaması

1. Gün: 5 ml'lik LB besiyerine tek koloniden ekim yapıldı. 37°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı.
2. Gün: inkübasyon sonrası:
 1. Hazırlanan kültürden 1.5 ml alındı. 5000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi. Süpernatantı mikropipetle uzaklaştırıldı.
 2. Pelletin üzerine tris-EDTA pH:8 tamponundan 10 µl eklenerek vortekslendi. 5000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi. Süpernatantı atıldı.
 3. Çökelti üzerine 567 µl TE (Tris-EDTA) ve üzerine 1 µl lizozim eklendi. Mikropipetle süspanse edildi. 37°C'de 30 dk. benmaride bekletildi.
 4. Üzerine 3 µl proteinaz K ve %10'luk SDS 30 µl eklendi. 37°C'de 15 dk. Su banyosunda bekletildi.
 5. Tüp bir sefer alt üst edilerek üzerine 1 µl 5 M NaCl ve 80 µl CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) ilave edildi. 65 °C'de 10 dk. benmaride bekletildi.
 6. Üzerine 780 µl kloroform-izoamil-alkol eklenip alt üst edildi. 10000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilip süpernatant temiz bir tüpe alındı.
 7. Süpernatant üzerine fenol-kloroform-izoamil-alkol eklenip 10000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi.
 8. Süpernatant temiz bir tüpe alınarak üzerine 0.6 hacim olarak izopropanol eklendi. 10000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.
 9. Çökelti üzerine 10 µl %70'lik etanol eklendi. 5000 rpm'de 2 dk. santrifüj edildi. Tüp ters çevrilerek alkolün uçması sağlandı.
 10. Çökelti üzerine 100 µl TE (Tris-EDTA) pH:8 konularak karıştırıldı.

Daha sonra bakteri DNA'larının her biri PZR ve diğer çalışmalarda kullanılmak üzere -20 °C'de muhafaza edildi.

3.3.2.2. EZ1 biorobot (Qiagen) DNA izolasyon cihazında izolasyon yöntemi

1- LB-Broth besiyerinde üreme gözlenen her bir tüpe 10 µl lizozim ilave edildi. 37°C’de 30 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında EZ1 biorobot (Qiagen) DNA izolasyon cihazına konularak izolasyon sağlandı.

2- LB-Broth besiyerinde üreme gözlenen her bir tüp 5000 g’de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılıp pellet üzerine 190 µl G2 solüsyonu (Qiagen, D-40724) eklendi. Üzerine 10 µl lizozim ilave edildikten sonra 37 °C’de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu işlemlerin ardından EZ1 biorobot (Qiagen) DNA izolasyon cihazına yerleştirildi.

EZ1 biorobot (Qiagen) DNA izolasyon cihazından çıkan DNA’lar %1’lik agaroz jel elektroforezde yürütüldü. (Şekil 4.5.).

3.3.2.3. Spektral yöntemler

DNA’nın saflık kontrolü için absorbans $A_{260/280}=1,8$ bağıntısı kullanılıp sonuç 1,8’e eşitse DNA saftır. Buna göre çalışmamızdaki DNA örneklerinin konsantrasyonu tayin edildi.

3.3.3. PZR yöntemi ile mecA ve PVL genlerinin çoğaltılması

3.3.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyon (PZR)

Çalışmamızda PZR yöntemi ile her bir *S. aureus* suşunun *mecA* ve *PVL* genlerinin spesifik primerler kullanıldı. Her bir primer için ayrı ayrı PZR reaksiyonu hazırlanmak suretiyle çoğaltıldı. *mecA* ve *PVL* genlerinin çoğaltılması için gerekli spesifik primerlerinin dizilimi çizelge 3.6.’da verilmiştir.

Çizelge 3.6. PZR’de kullanılan primerler

1) PVL L:	5’ ACA CAC TAT GGC AAT AGT TAT TT 3’
R:	5’ AAA GCA ATG CAA TTG ATG TA 3’
2) PVL L:	5’ GAG ACT ATT TTG TGC CAG AC 3’
R:	5’ CAC CTG ACA AGC CGT TA 3’
3) PVL L:	5’ TCA CAA AAT GCC AGT GTT ATC CAG 3’
R:	5’ TTT TGC AGC GTT TTG TTT TCG 3’
4) <i>mecA</i>-1 L:	5’ GTA GAA ATG ACT GAA CGT CCG ATA A 3’
R:	5’ CCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTA A 3’
5) <i>mecA</i>-2 L:	5’ GGC AAT ATT ACC GCA CCT CA 3’
R:	5’ GTC TGC CAC TTT CTC CTT GT 3’

3.3.3.2. PZR Mix Koşulları

mecA ve PVL gen bölgeleri yukarıda belirtilen spesifik primerler kullanılarak ve her bir gen için ayrı reaksiyon hazırlanarak PZR ile çoğaltıldı.

Çizelge 3.7. *mecA1* ve *mecA2* primerleri için PZR koşulları

PZR Tamponu (10X)	2.5 µl
MgCl ₂	2 µl
dNTP karışımı	2.5 µl
Primer F (10 pmol)	0.75 µl
Primer R (10 pmol)	0.75 µl
Taq polimeraz enzimi	0,6 µl
Kalıp DNA	3 µl
Steril saf su	12,9 µl
Toplam hacim	25 µl

Çizelge 3.8. *PVL-1, PVL-2, PVL-3* primerleri için PZR koşulları

PZR Tamponu (10X)	2.5 µl
MgCl ₂	2,5 µl
dNTP karışımı	2.5 µl
Primer F (10 pmol)	1,25 µl
Primer R (10 pmol)	1,25 µl
Taq polimeraz enzimi	0,8 µl
Kalıp DNA	3 µl
Steril saf su	11,2 µl
Toplam hacim	25 µl

3.3.3.3. PZR optimizasyon koşulları

PZR aşamasında DNA'nın çift sarmal yapısını bozup tek bir zincir haline getirmek (denatürasyon) için 95°C, primerlerin hedef bölgeye tutunması için her bir primer için gerekli olan sıcaklık, primerlere nükleotid eklenerek komplementer DNA'nın polimerizasyonu için 72°C sıcaklık gerekmekte ve bu üç farklı sıcaklığın ardarda uygulanmasından oluşan döngünün, 35 kez tekrarlanması Bio-Rad marka cihazla sağlandı.

Çizelge 3.9. *mecA-1* primeri için PZR şartları

Başlangıç denatürasyonu 94 °C'de 5 dk.

94 °C 30 sn
64 °C 30 sn
72 °C 45 sn } 10 döngü

94 °C 30 sn
50 °C 45 sn
72 °C 2 dk } 25 döngü

Son uzama 72 °C'de 10 dk.

PZR sonunda oluşması beklenen 300-400 baz çifti aralığındaki *mecA-1* geninin varlığı %2'lik agaroz jel elektroforezde incelenmiştir (Şekil 4.6.).

Çizelge 3.10. *mecA*-2 primeri için PZR şartları

Başlangıç denatürasyonu 95 °C’de 10 dk.

$$\left. \begin{array}{l} 95\text{ °C } 30\text{ sn} \\ 59\text{ °C } 30\text{ sn} \\ 72\text{ °C } 30\text{ sn} \end{array} \right\} 35\text{ döngü}$$

Son uzama 72 °C’de 5 dk.

PZR sonunda oluşması beklenen 200-300 baz çifti aralığındaki *mecA*-2 geninin varlığı %2’lik agaroz jel elektroforezde incelenmiştir (Şekil 4.7.).

Çizelge 3.11. *PVL*-1 ve *PVL*-3 primeri için PZR şartları

Başlangıç denatürasyonu 95 °C’de 1 dk.

$$\left. \begin{array}{l} 94\text{ °C } 30\text{ sn} \\ 52,3\text{ °C } 30\text{ sn} \\ 72\text{ °C } 30\text{ sn} \end{array} \right\} 35\text{ döngü}$$

Son uzama 72 °C’de 10 dk.

PZR sonunda oluşması beklenen 100-200 baz çifti aralığındaki *PVL*-1 geni ve 50-100 baz çifti aralığındaki *PVL*-3 geninin varlığı %2’lik agaroz jel elektroforezde incelenmiştir (Şekil 4.8. ve Şekil 4.10.).

Çizelge 3.12. *PVL*-2 primeri için PZR şartları

Başlangıç denatürasyonu 95 °C’de 1 dk.

$$\left. \begin{array}{l} 94\text{ °C } 30\text{ sn} \\ 54\text{ °C } 30\text{ sn} \\ 72\text{ °C } 30\text{ sn} \end{array} \right\} 35\text{ döngü}$$

Son uzama 72 °C’de 10 dk.

PZR sonunda oluşması beklenen 600-700 baz aralığındaki *PVL*-2 geninin varlığı %2’lik agaroz jel elektroforezde incelenmiştir(Şekil 4.9.).

3.3.4. Agaroz jel elektroforez incelemeleri

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

Çalışmamızda *mecA* ve *PVL* genlerinin PZR sonucunda oluşan ürünleri %2'lik agaroz jelde incelendi. Bu amaçla 2 g agaroz tartılıp 100 ml 1XTAE (Tris- Asetik Asit-EDTA) içerisinde kaynatılarak tamamen çözülmesi sağlandı. Bu sırada jel dökme tablasının kenarları otoklav bandı ile sarılarak bir kalıp oluşturuldu ve PZR ürünlerinin yükleneceği kuyucukları oluşturmak için tablaya tarak yerleştirildi. Oda sıcaklığına kadar soğutulan agaroz çözeltisi tablaya döküldü. Jel polimerleştikten sonra tarak ve otoklav bandı çıkartıldı ve içerisinde 1L 1XTAE (Tris-Asetik Asit-EDTA) tampon bulunan elektroforez tankının içerisine yerleştirildi. 8 µL PZR ürünü için 2 µL jel yükleme tamponu eklenip jeldeki kuyuya yüklendi. PZR ürünlerinin büyüklüklerini belirlemek için jelin ilk kuyusuna 100 bp'lik markır (Fermentas) yüklendi. Jel elektroforez tankı güç kaynağına bağlandı ve 1 saat süreyle 150 Volt 75 mA şiddetinde akım uygulandı.

3.3.4.1. 50X TAE tamponu

- 242 gr Tris Base
 - 57,1 ml glasiyal asetik asit
 - Üzerine 1 lt ye tamamlanincaya kadar distile su ilave edildi.
- 120 °C'de 15 dk otoklavlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

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

3.3.4.2. Etidyum bromür stok çözeltisi

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

3.3.5. Mutasyon tanımlama yöntemleri

3.3.5.1. SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) tekniği

Agaroz jel elektroforez sonrasında DNA’da oluşan değişimi belirlemek için SSCP tekniği uygulandı. SSCP tekniğinde %8’lik nondenatüre poliakrilamid jel kullanılarak gümüş boyama ile boyama yapıldı. %8’lik nondenatüre poliakrilamid jel için;

- Akrlamid stok solüsyonu (%30’luk) 142,5 gr Akrlamid ile 7,5 gr bisakrlamid karışımı 500 ml dH₂O’da çözdürülerek hazırlandı.
- Beher içerisine 5,35 ml akrlamid stok solüsyonu, 4 ml 5xTBE tamponu, 1 ml Gliserol ve 10,65 ml dH₂O eklenerek manyetik karıştırıcıda 5 dakika homojenize edildi.
- Amonyum Per Sülfat (APS) (%10’luk) çözeltisi hazırlanarak 125 µl eklendi ve polimerizasyonu başlatmak için 12,5 µl Tetra Methyl Ethylene Daimine (TEMED) ilave edildi.

Dikey jel elektroforez sistemine (Biorad,10x10 cm) poliakrilamid jel dikkatli bir şekilde döküldü ve taraklar yerleştirildi. Yaklaşık bir saat jelin donması için bekletildi. Amplifiye edilen PZR ürünleri Formamidli Loading Dye (yükleme tamponu) ile denatüre edildi. Denatürasyon çözeltisi olarak kullanılan Loading dye; 10 ml Formamid, 10 mg Xylene Cyanol (Ksilen Syanol), 10 mg Bromophenol blue ve 0,5 M EDTA’dan (pH 8) 200 µl alınarak hazırlandı. PZR ürünlerinden 3 µl alınarak 9 µl denatürasyon çözeltisi ile karıştırıldı ve 95°C de blok ısıtıcıda 10 dakika denatüre edildi. Denatürasyon işleminden sonra renatürasyonu (tekrar bağlanmasını) engellemek için PZR ürünleri buz üzerine alındı. Donmuş olan poliakrilamid jele yaprak pipet uçları yardımıyla 10’ar µl yüklendi ve dikey jel elektroforez sistemde 200 Voltta 100 Amper bç uzunluklarına göre değişen zaman aralıklarında yürütme yapıldı

Süre sonucunda beş farklı solüsyon hazırlandı ve poliakrilamid jel gümüş boyama tekniği ile boyandı.

Solüsyon 1: 100 ml asetik asit, 100 ml %96’lık etanol, 1800 ml dH₂O’dan,

Solüsyon 2: 25 ml asetik asit, 500 ml %96’lık etanol, 4500 ml dH₂O’dan,

Solüsyon 3: 0,6 gr AgNO₃, 50 ml dH₂O’dan,

Solüsyon 4: 1,5 gr NaOH, 70 µl Formaldehit, 50 ml dH₂O’dan

Solüsyon 5: ise 100 ml Asetik asit, 200 ml Metanol ve 700 ml dH₂O’dan oluşmaktaydı.

Solüsyon 3 ve 4 taze olarak diğer üç solüsyon ise stok olarak kullanıldı.

Boyama işlemi orbital karıştırıcıda her solüsyon için 50 ml alınarak gerçekleştirildi. Solüsyon 1 de 10 dakika karıştırıldı ve süre sonunda dökülerek 5 dakika solüsyon 2 de muamele edildi. Solüsyon 2 dökülerek boyama basamağı olan solüsyon 3 te 23 dakika karıştırıldı. AgNO_3 çözeltisinde boşaltıldı ve 2 dakika dH_2O da bekletildi. Süre sonunda dökülen dH_2O yerine solüsyon 4 eklenerek bantlar gözlenene kadar elde karıştırıldı. Değerlendirme yapılabilecek duruma gelen bantlar gözlenince solüsyon 4 boşaltılarak solüsyon 5 ilave edildi ve 10 dakika karıştırıcıda bekletildi. Poliakrilamid jel asetat arasına alınıp değerlendirme yapıldı. (Şekil 4.10, 4.11, 4.12, 4.13, 4.14).

4. DENEY SONUÇLARI

4.1. Mikrobiyolojik test sonuçları

4.1.1. API testi sonuçları

Bu teste göre burundan izole edilen 42 bakteri örneği (40 MRSA, 2 MSSA) *Staphylococcus aureus* olarak tanımlanmıştır.

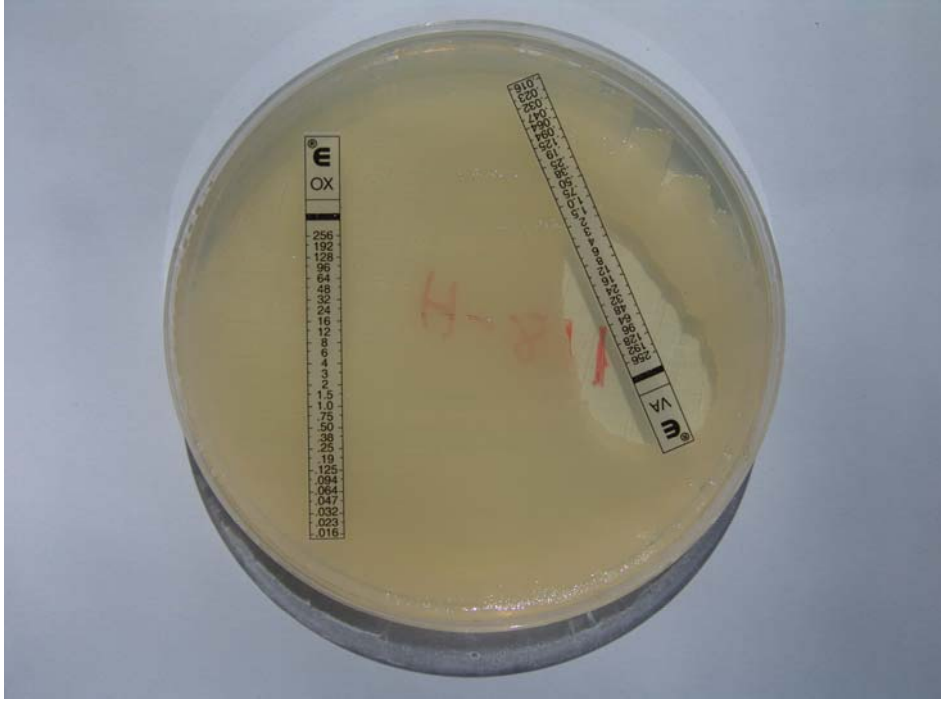


Şekil 4.3. Bir *Staphylococcus aureus* suşunun API identifikasyon test panelinde görünümü.

4.1.2. E-Testi bulguları

Çalışmaya alınan suşların metisilin duyarlılıkları oksasilin ve vakomisin E-testleri kullanılarak ve CLSI kriterlerine uygun olarak MİK değerleri belirlenmiştir. (Şekil 4.4 a,b.)

a)



b)



Şekil 4.4. (a,b) E-testinde direnç ve duyarlılığın tespiti (a. Oksasilin dirençli, vankomisin duyarlı *S. aureus* suşu b. oksasiline duyarlı, vankomisine duyarlı *S. aureus* suşu.).

Çalışmaya alınan MRSA suşlarının tamamının oksasiline dirençli, vankomisine ise duyarlı olduğu gözlenmiştir (Çizelge 14.).

Çizelge 4.14.a. E-testinde antibiyotik duyarlılık oranları (R: dirençli, D: duyarlı)

Örnek No (MRSA)	Oksasilin MİK (µg/ml)	Vankomisin MİK(µg/ml)
1	R	D
2	R	D
3	R	D
4	R	D
5	R	D
6	R	D
7	R	D
8	R	D
9	R	D
10	R	D
11	R	D
12	R	D
13	R	D
14	R	D
15	R	D
16	R	D
17	R	D
18	R	D
19	R	D
20	R	D

Çizelge 4.14.b. E-testinde antibiyotik duyarlılık oranları (R: dirençli, D: duyarlı)

Örnek No (MRSA)	Oksasilin MİK (µg/mL)	Vankomisin MİK(µg/mL)
21	R	D
22	R	D
23	R	D
24	R	D
25	R	D
26	R	D
27	R	D
28	R	D
29	R	D
30	R	D
31	R	D
32	R	D
33	R	D
34	R	D
35	R	D
36	R	D
37	R	D
38	R	D
39	R	D
40	R	D

Çizelge 4.15. E-testinde antibiyotik duyarlılık oranları (R: dirençli, D: duyarlı)

Örnek No (MSSA)	Oksasilin MİK (µg/mL)	Vankomisin MİK(µg/mL)
41	D	D
42	D	D

4.1.3.İzole edilen MRSA suşlarının kliniklere göre dağılımı

Örnek alınan servislerden, metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) suşlarının bulunma oranları farklılık göstermektedir.(Çizelge 4.15.)

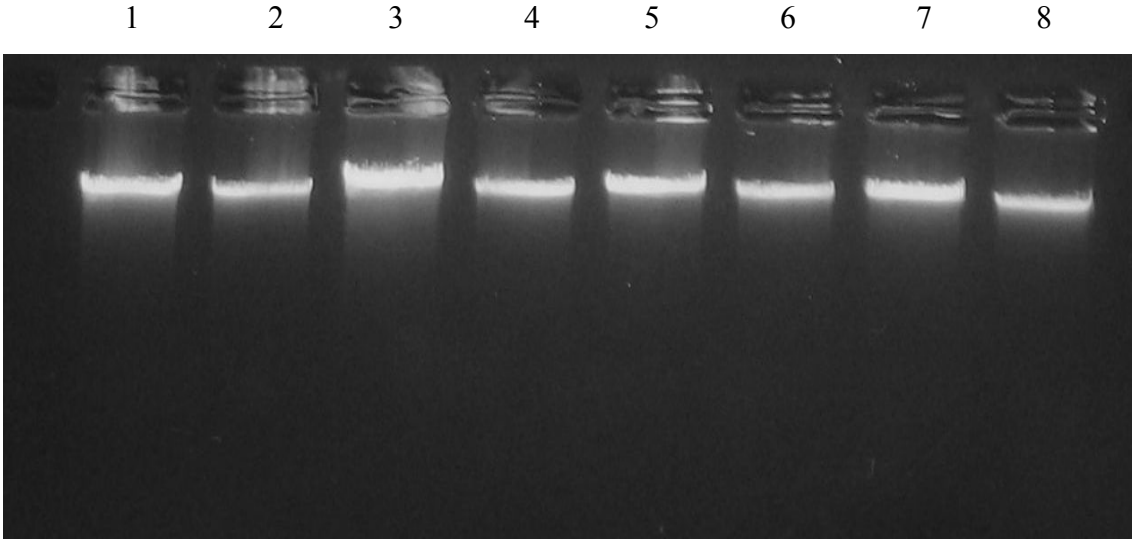
Çizelge 4.16. Örnek alınan servislerden izole edilen MRSA suşları

SERVİSLER	MRSA (+)
1-Nefroloji	8
2-İntaniye	4
3-Endokrinoloji	3
4-Beyin cerrahi	-
5-Ameliyathane	-
6-Gastroenteroloji-Hematoloji	5
7-Reaminasyon	-
8-Nöroloji	2
9-Onkoloji	-
10-Ortopedi-Travmatoloji	-
11-Üroloji	9
12-Göğüs Hastalıkları	8
13-Kalp Damar Cerrahisi	-
14-Kardiyoloji	-
15-Yeni Doğan	1
16-Çocuk İntaniye	-
17-Genel pediatri	-
GENEL TOPLAM	40

4.2. Moleküler Test Sonuçları

4.2.1. DNA izolasyon bulguları

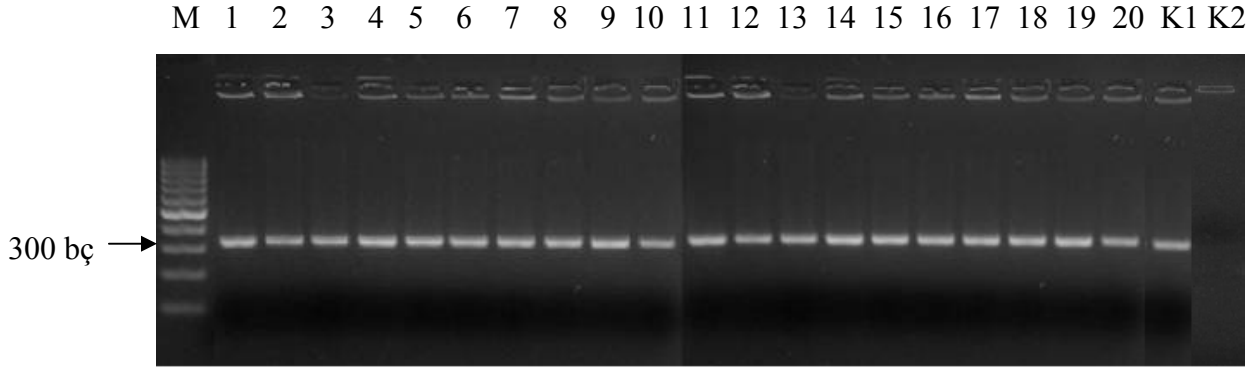
Alkali Lizis yöntemi ile izole edilen DNA'lar %1'lik agaroz jel elektroforezde yürütüldü (Şekil 4.5.).



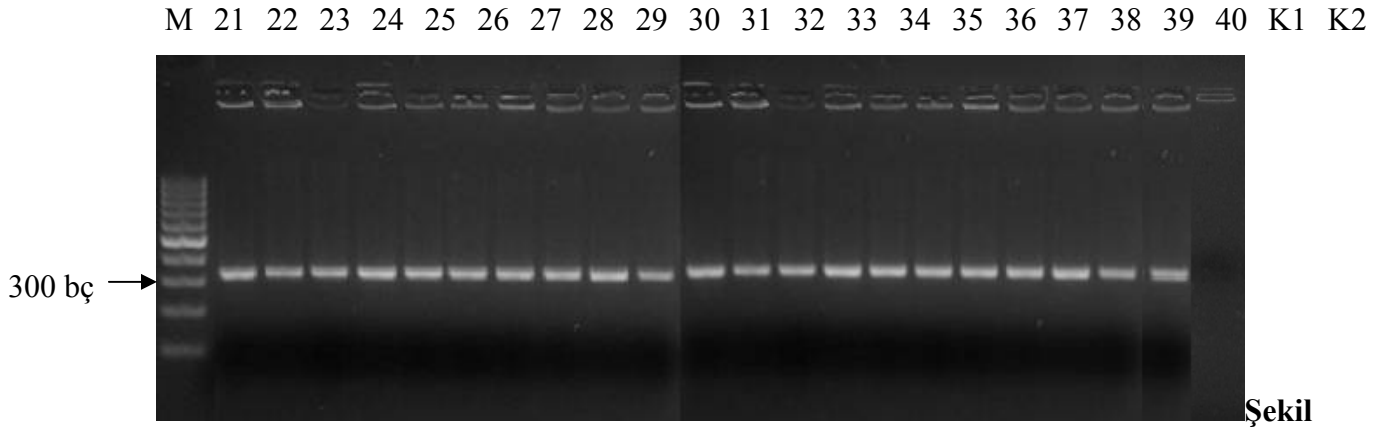
Şekil 4.5. İzole edilen DNA'ların %1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü (1-8 arası).

4.2. PZR Bulguları

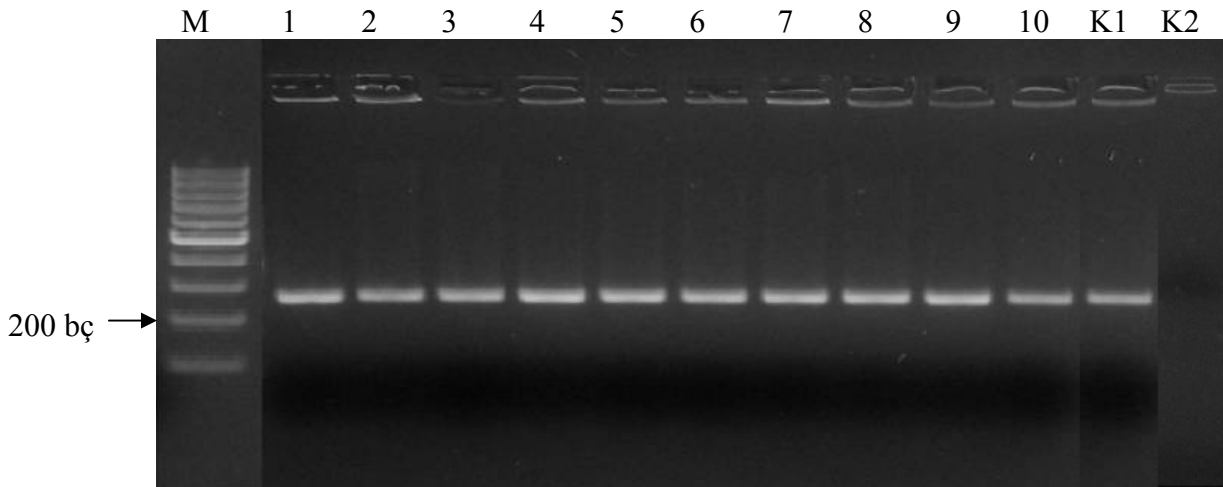
Bu çalışmada 300-400 baz aralığındaki *mecA1*; 200-300 baz aralığındaki *mecA2*; 100-200 baz aralığındaki *PVL-1*, 600-700 baz aralığındaki *PVL-2*, 50-100 baz aralığındaki *PVL-3* genlerini PZR metodu ile çoğaltıldıktan sonra bu bölgelerin varlığı %2'lik agaroz jel elektroforezde incelendi (Şekil 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10.).



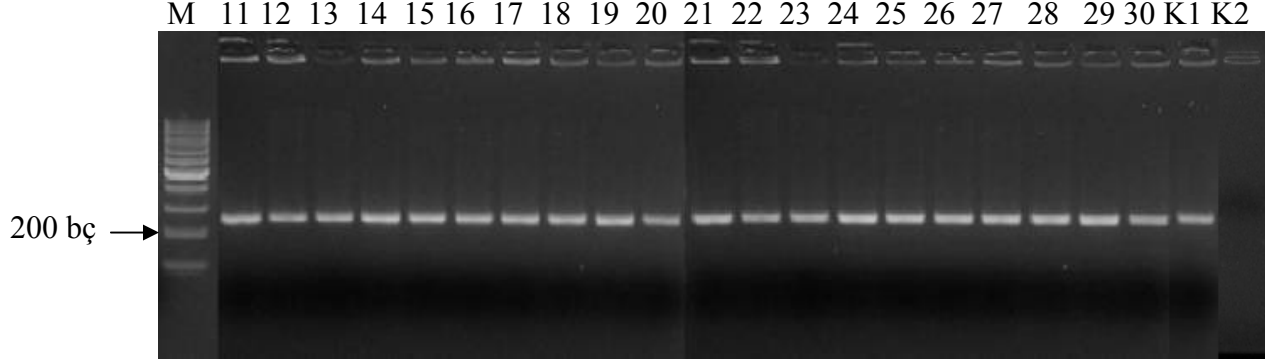
Şekil 4.6.a. *mecA-1* geninin PZR'da çoğaltılması. M: 100 bç'lik DNA markır (Fermentas). K1: ATCC 29213 *Staphylococcus aureus* kontrol suşu, K2: ATCC 25923 *Staphylococcus aureus* kontrol suşu.



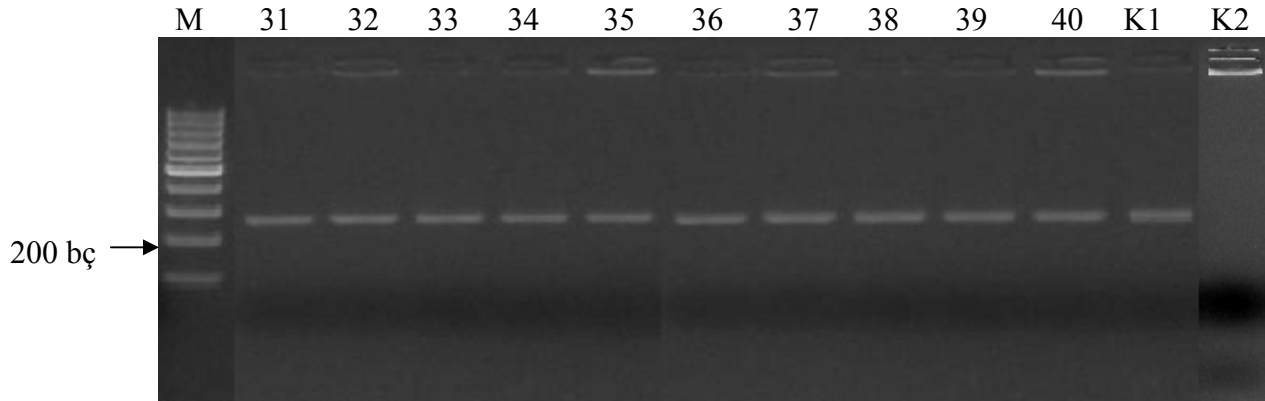
Şekil 4.6.b. *mecA-1* geninin PZR'da çoğaltılması. M: 100 bç'lik DNA markır (Fermentas). K1: ATCC 29213 *Staphylococcus aureus* kontrol suşu, K2: ATCC 25923 *Staphylococcus aureus* kontrol suşu.



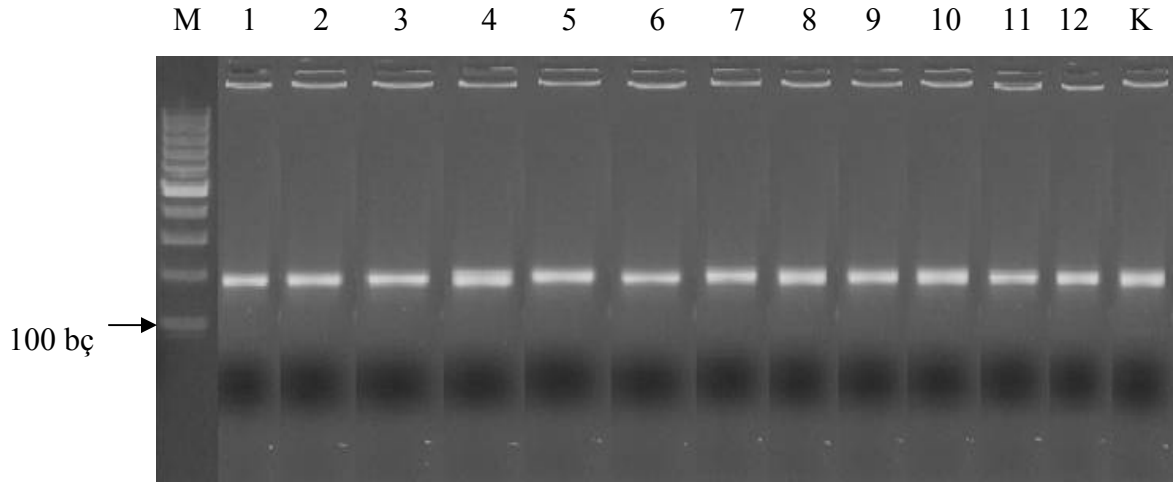
Şekil 4.7.a. *mecA-2* geninin PZR'da çoğaltılması. M: 100 bç'lik DNA markır (Fermentas). K1: ATCC 29213 *Staphylococcus aureus* kontrol suşu, K2: ATCC 25923 *Staphylococcus aureus* kontrol suşu.



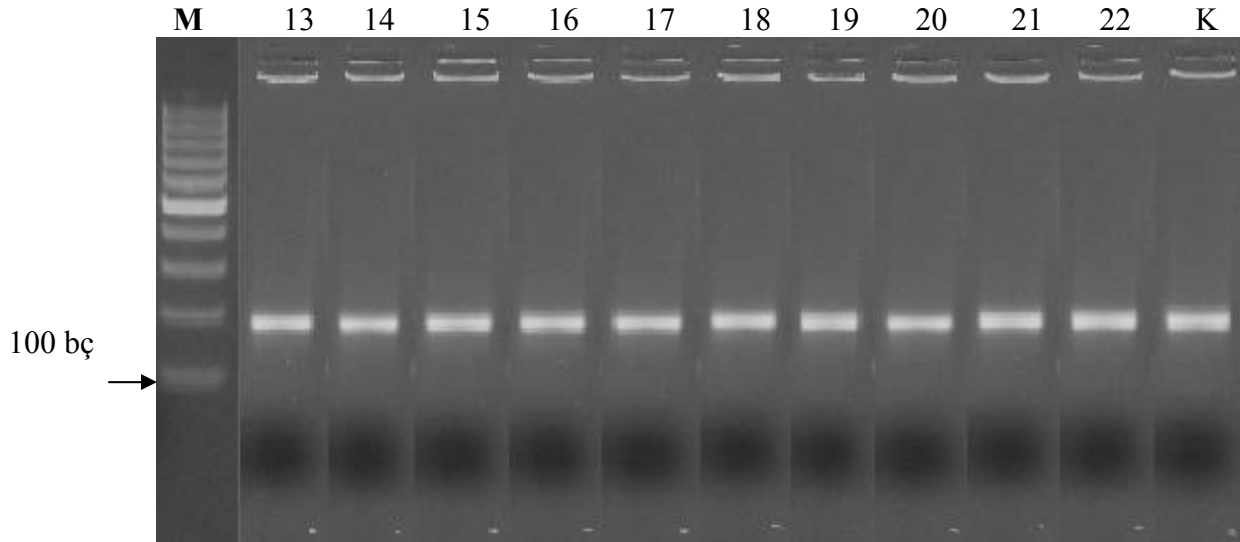
Şekil 4.7.b. *mecA-2* geninin PZR'da çoğaltılması. M: 100 bç'lik DNA markır (Fermentas). K1: ATCC 29213 *Staphylococcus aureus* kontrol suşu, K2: ATCC 25923 *Staphylococcus aureus* kontrol suşu, bç: baz çifti.



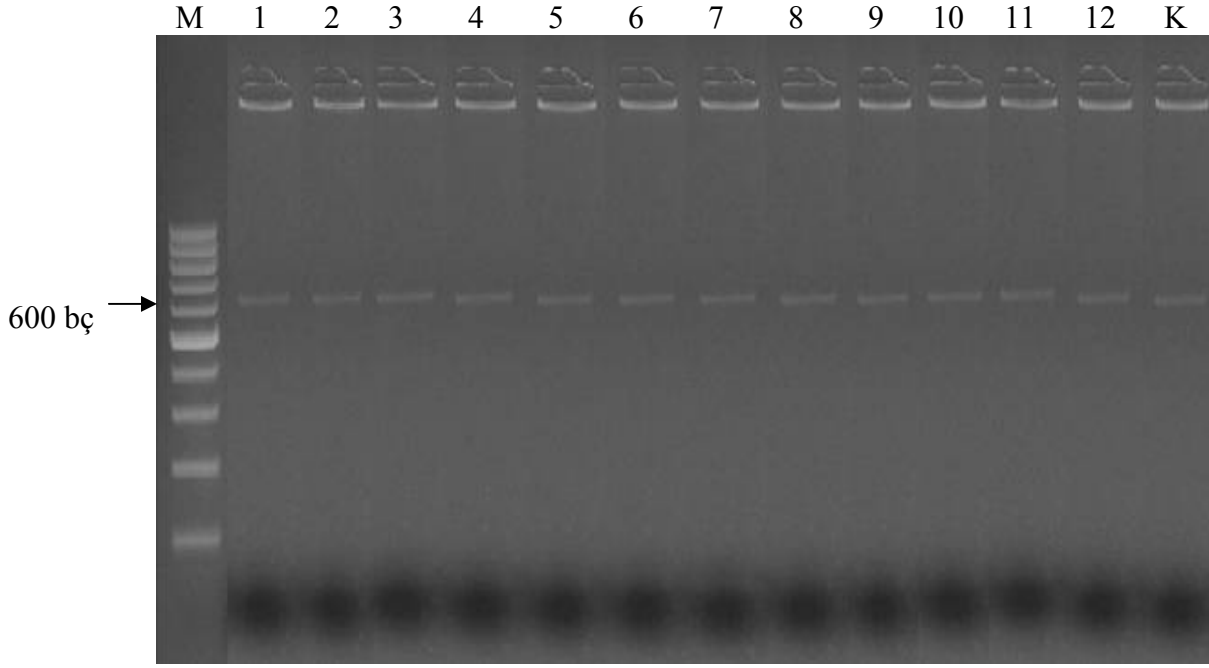
Şekil 4.7.c. *mecA-2* geninin PZR'da çoğaltılması. M: 100 bç'lik DNA markır (Fermentas). K1: ATCC 29213 *Staphylococcus aureus* kontrol suşu, K2: ATCC 25923 *Staphylococcus aureus* kontrol suşu.



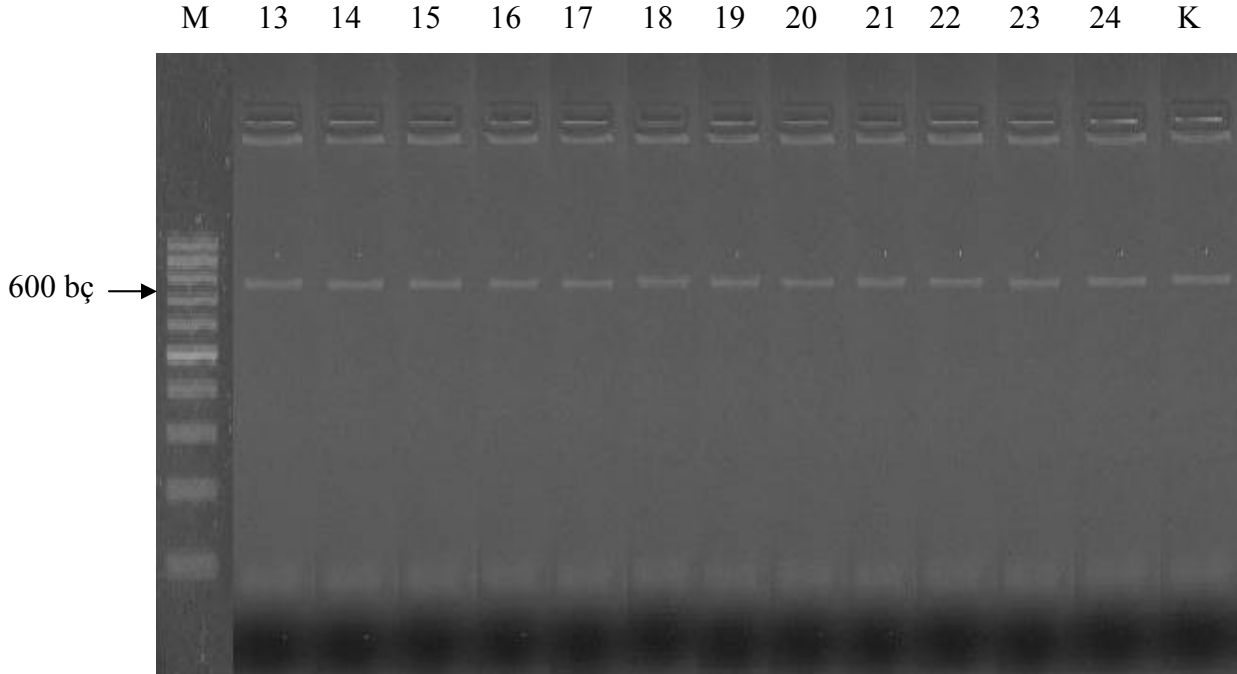
Şekil 4.8.a. *PVL-1* geninin PZR’da çoğaltılması. M: 100 bç’lik DNA markır (Fermentas), K: LY19990053 MRSA pozitif, PVL pozitif kontrol suşu.



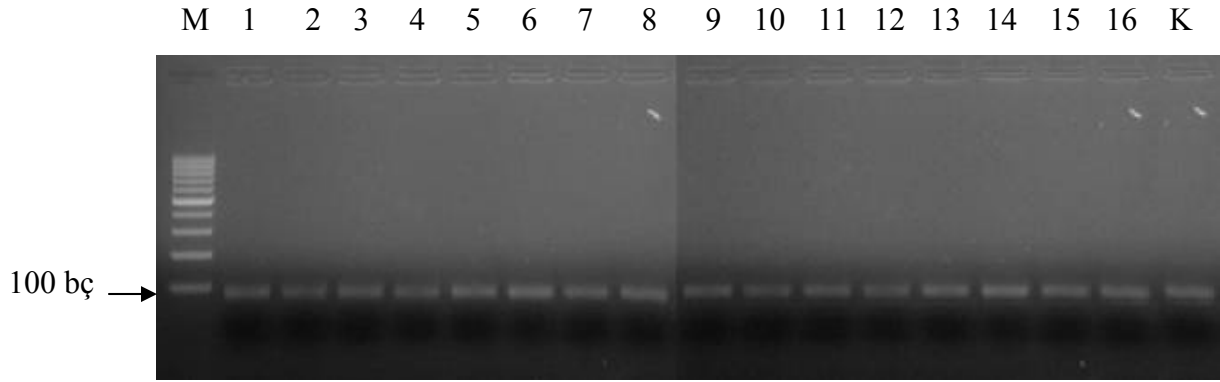
Şekil 4.8.b. *PVL-1* geninin PZR’da çoğaltılması. M: 100 bç’lik DNA markır (Fermentas), K: LY19990053 MRSA pozitif, PVL pozitif kontrol suşu.



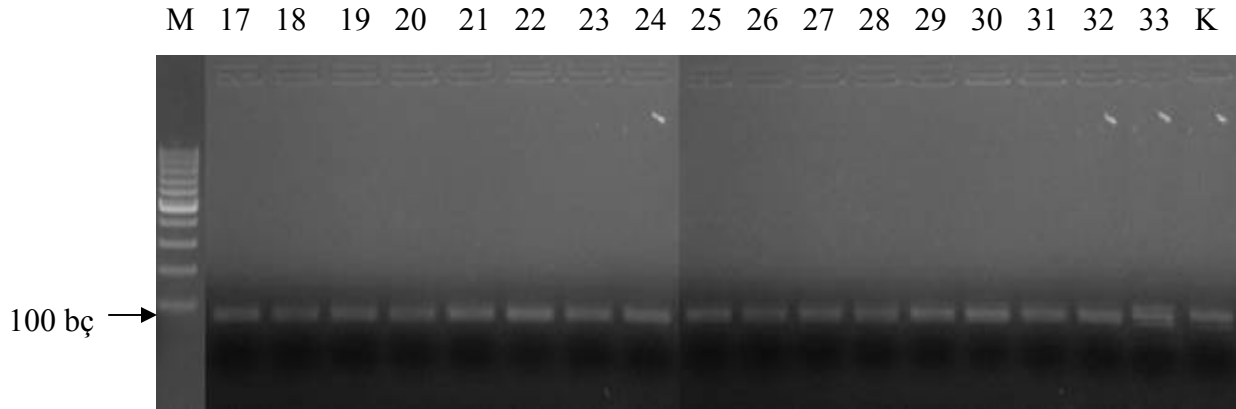
Şekil 4.9.a. PVL-2 geninin PZR'da çoğaltılması. M: 100 bç'lik DNA markır (Fermentas), K: LY19990053 MRSA pozitif, PVL pozitif kontrol suşu.



Şekil 4.9.b. PVL-2 geninin PZR'da çoğaltılması. M: 100 bç'lik DNA markır (Fermentas). K: LY19990053 MRSA pozitif, PVL pozitif kontrol suşu.



Şekil 4.10.a. PVL-3 geninin PZR’da çoğaltılması. M: 100 bç’lik DNA markır (Fermentas). K: LY19990053 MRSA pozitif, PVL pozitif kontrol suşu.



Şekil 4.10.b. PVL-3 geninin PZR’da çoğaltılması. M: 100 bç’lik DNA markır (Fermentas), K: LY19990053 MRSA pozitif, PVL pozitif kontrol suşu.

Çalışmamızda 40 adet MRSA suşu, 2 adet MSSA suşu ve kontrol suşlarının PZR’da çoğaltıldı. Çalışılan her bir örnekte bu gen bölgelerinin varlığı farklılık göstermektedir (Çizelge 4.16.a. ve 4.16.b.).

Çizelge 4.17.a. Çalışılan örneklerde PZR sonuçları

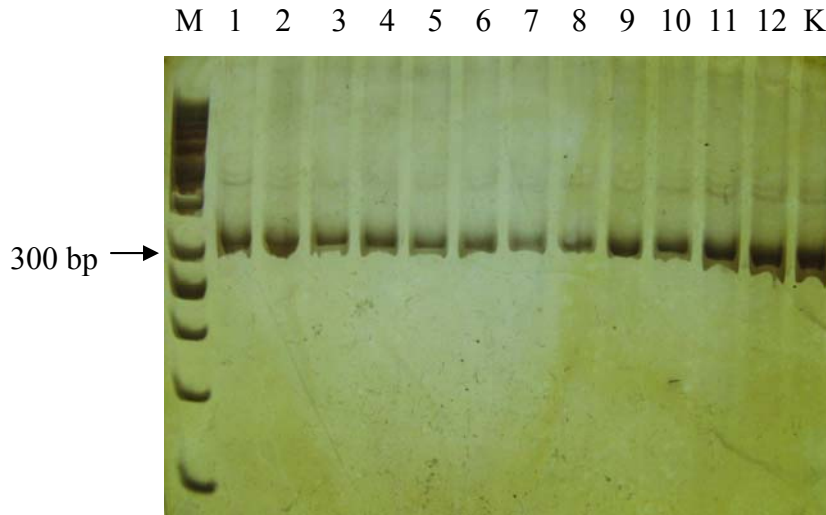
Örnek no:	mecA-1	mecA-2	PVL-1	PVL-2	PVL-3
1	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+
12	+	+	+	+	+
13	+	+	+	+	+
14	+	+	+	+	+
15	+	+	+	+	+
16	+	+	+	+	+
17	+	+	+	+	+
18	+	+	+	+	+
19	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+
21	+	+	+	+	+
22	+	+	+	+	+
23	+	+	-	+	+
24	+	+	-	+	+
25	+	+	-	+	+
26	+	+	-	-	+
27	+	+	-	-	+
28	+	+	-	-	+
29	+	+	-	-	+
30	+	+	-	-	+
31	+	+	-	-	+
32	+	+	-	-	+
33	+	+	-	-	+
34	+	+	-	-	-
35	+	+	-	-	-
36	+	+	-	-	-
37	+	+	-	-	-
38	+	+	-	-	-
39	+	+	-	-	-
40	+	+	-	-	-
MSSA	mecA-1	mecA-2	PVL-1	PVL-2	PVL-3
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-

Çizelge 4.17.b. Çalışılan örneklerde PZR sonuçları.

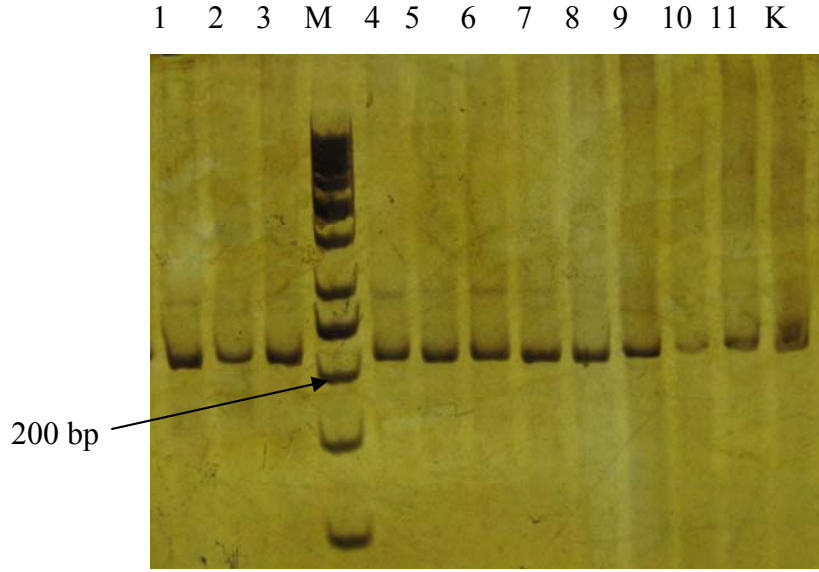
KONTROL SUŞLARI	mecA-1	mecA-2	PVL-1	PVL-2	PVL-3
ATCC 29213	+	+	-	-	-
ATCC 25923	-	-	-	-	-
LY19990053 MRSA pozitif, PVL pozitif	+	+	+	+	+

4.3. SSCP Bulguları

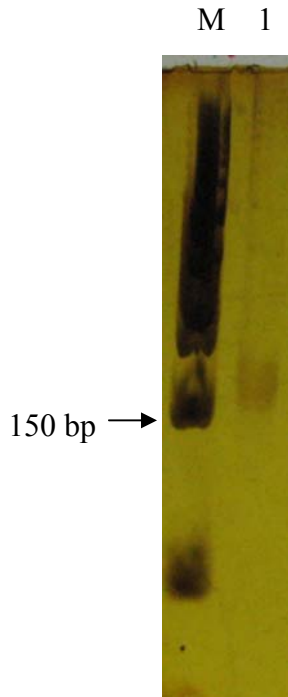
Çalışmamızda çalışılan gen bölgelerinde mutasyon varlığını araştırmak için PZR ürünlerini poliakrilamid jel elektroforezinde yürütüldü (Şekil 4.11, 4.12, 4.13, 4.14, 4.15.).



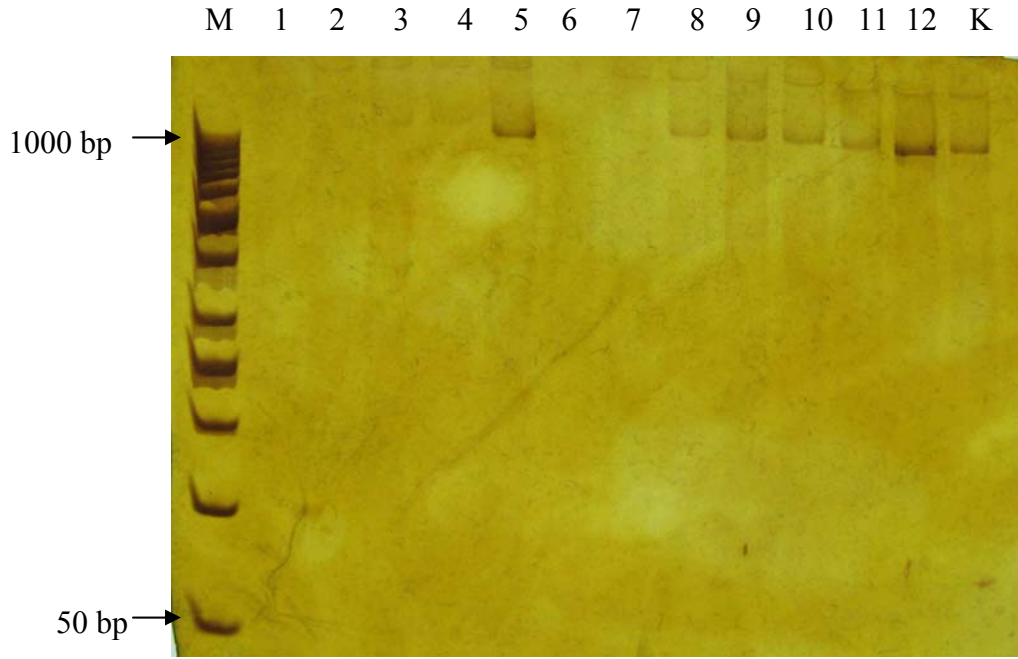
Şekil 4.11. *mecA-1* geninin poliakrilamid jelde yürütülmesi. M:50 bç'lik DNA markır (Fermentas). K: ATCC 29213 *Staphylococcus aureus* kontrol suşu.



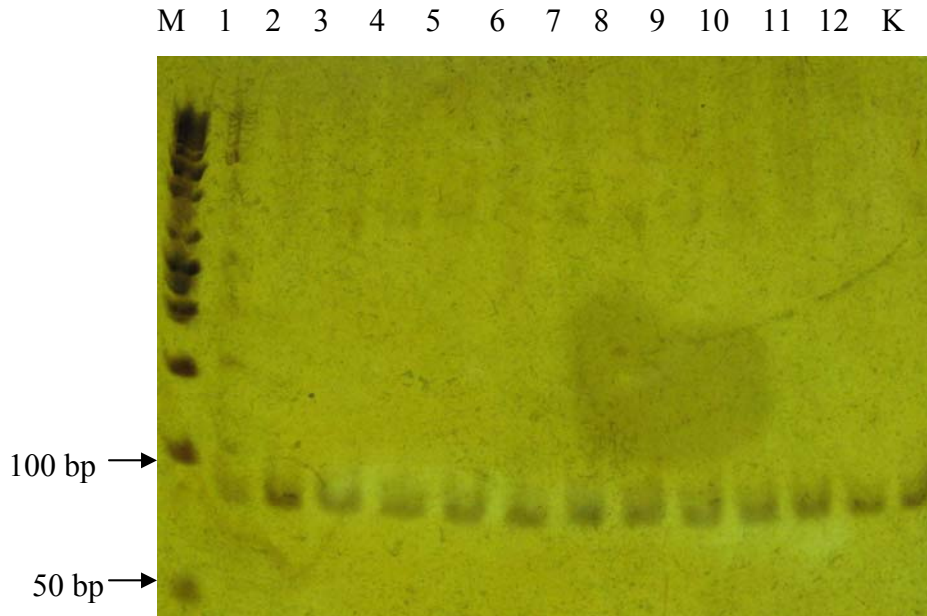
Şekil 4.12. *mecA-2* geninin poliakrilamid jelde yürütülmesi. M:50 bç'lik DNA markır (Fermentas). K: ATCC 29213 *Staphylococcus aureus* kontrol suşu.



Şekil 4.13. *PVL-1* geninin poliakrilamid jelde yürütülmesi. M:50 bç'lik DNA markır (Fermentas).



Şekil 4.14. *PVL-2* geninin poliakrilamid jelde yürütülmesi. M:50 bç'lik DNA markır (Fermentas). K: LY19990053 MRSA pozitif, PVL pozitif kontrol suşu.



Şekil 4.15. *PVL-3* geninin poliakrilamid jelde yürütülmesi. M:50 bç'lik DNA markır (Fermentas). K: LY19990053 MRSA pozitif, PVL pozitif kontrol suşu.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Hastane kaynaklı nozokomiyal örneklerde PVL gen bölgesini taşıyan *S.aureus* suşunun mikrobiyolojik ve moleküler genetik olarak tanımlanması ve bu bakteri florasının infeksiyon meydana getirme olasılığının değerlendirilmesi için 45 bakteri suşu (40 MRSA, 2 MSSA ve 3 Kontrol suşu) çalışıldı. 233 hastane personelinin burun kültürlerinden örnek alındı ve 4 adet MRSA suşu izole edildi (% 1,7). 477 yatan hastalarının burun kültürlerinden örnek alındı ve 36 adet MRSA suşu izole edildi (% 7,5). Yine 2 adet MSSA suşu yatan hastaların burun kültürlerinden izole edildi. Kontrol suşlarımız ise (ATCC 25923 *S.aureus*, ATCC 29213 *S.aureus* ve LY19990053 MRSA pozitif, PVL pozitif kontrol suşu) Konya Meram Tıp Fakültesi hastanesi mikrobiyoloji laboratuvarından temin edildi.

Elde edilen PZR bulgularına göre; *mecA-1* ve *mecA-2* direnç genleri 40 MRSA suşunda da gözlemlendi. 2 MSSA suşunda gözlenmedi. Bu nedenle moleküler çalışmalar mikrobiyolojik çalışmaları doğruladı. *PVL-1* geni 22 adet MRSA suşunda, *PVL-2* geni 25 adet MRSA suşunda, *PVL-3* geni ise 33 adet MRSA suşunda da gözlemlendi.

Çalışmamızda kullanılan izolatların mutasyon bakımından anlamlı olup olmadığını tanımlamak için SSCP yöntemi uygulandı. Ancak çalışılan örneklerde anlamlı bölgelere rastlanmadı.

Çalışmamızda PVL gen bölgesi 2 MSSA suşunda da gözlenmedi. Oysaki Afroz ve ark. (2008)'de yaptıkları bir çalışmada PVL geni bakımından *S.aureus*'ları PZR'a dayalı tekniklerle tanımlamaya çalışmışlar ve 9 PVL pozitif içeren MSSA suşlarına rastlamışlardır. Buna göre araştırmacılar *S.aureus*'ları moleküler tanımlarken MSSA suşlarında pozitif olan gen bölgesinin MRSA'larda bulunmadığını göstermişlerdir. Bakterilerle ilgili olarak yapılan çalışmalarda mikrobiyolojik tanımlamanın yanı sıra moleküler genetik yöntemlerine de mutlak surette ihtiyaç olduğunu savunmuşlardır. Çünkü izole ettiği kaynağa göre bakterinin mutasyona uğramasıyla direnç ve hassasiyeti değişiklik göstermektedir. PVL geni bakımından pozitif olan klinik MSSA suşlarında, negatif olan MRSA suşlarından daha çok toksin kodlayan, protein şifreleyen ve virulans faktörleri bakımından etkin olan genleri taşıdığını bulmuşlardır (Afroz ve ark. 2008).

S. aureus yaygın hastane infeksiyonlarına neden olan önemli bir insan patojenidir. MRSA'lar ise özellikle burun mukozasında taşınması sebebiyle önemlidir. Çünkü bunlar çoklu ilaç direncine sahip bakterilerdendir. Hatta bazı araştırmalarda cilt ve yumuşak doku

infeksiyonlarına neden olmasının yanı sıra ölümcül, sistemik infeksiyonlara da neden olmaktadır (Maier ve ark. 2005, Harbarth ve ark. 2005, Eady ve Cove 2003).

Metisilin direnci *mecA* geninin varlığı ile ortaya çıkmaktadır. Çünkü bu gen penisiline bağlı bir proteinin direnç genlerini kodlayan referans genidir. *S. aureus*'ların kromozom kasetinde yer alan *mecA* geni (SCC *mec*) *S. aureus*'un kromozomunda özel bir bölgeyi kodlar. *S. aureus* genomunun dizi analizinde 3 kromozom kasetinin varlığı saptanmıştır (Witte ve ark. 2007). Çalışmamızda *S. aureus*'un metisiline dirençli olup olmadığını anlamak için *mecA* gen ailesinden sadece 2 varyantı araştırılmıştır. Bakteri kromozomunda bulunan ve faj genomunun önemli bir komponenti olan *lukS-PV* ve *lukF-PV* olarak şifrelenen ve *PVL*'nin etkinliğinden sorumlu olan bölge de çalışmaya dâhil edildi.

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

Özellikle *S. aureus* çeşitli organlarda infeksiyonlar yapması ve hastane infeksiyonu oluşturması nedeniyle önemli patojenler arasında yer almaktadır (Archer 1998). *S. aureus* metisilin, nafsilin ve oksasilin gibi penisilinaza dirençli penisilinlere karşı direnç oluşturmaktadır. Bunların içinde en önemlisi metisiline karşı oluşan dirençtir (Henze 1996).

MRSA kromozomal *mecA* geninin kodladığı penisilin bağlayan proteini (PBP 2a) oluşturur. PBP 2a beta-laktam antibiyotik için düşük bağlanma afinitesi olan bir proteindir. MRSA suşları beta-laktam halkası taşımayan antibiyotiklere karşı da çoklu direnç oluşturabilir. Penisilinlere duyarlılığı azalmış *S. aureus* suşları 3 grupta toplanır (Petersson 1999).

S. aureus suşlarında metisilin direncinden başka direnç oluşumu PBP'lerde oluşacak nokta mutasyonu, PBP'lerin veya beta-laktamaz enziminin fazla miktarda üretilmesi de antibakteriyel ajanlara karşı direnç oluşturan etmenler arasındadır. Ayrıca dirençli *S. aureus* suşlarında metisilin direncini oluşturan genin ekspresyonu düzenleyici genlerin varlığı, inkübasyon ısısı ve süresi gibi çevresel faktörlerin etkisiyle değişmektedir (Maranan 1997).

Diğer bir çalışma ise PZR yöntemi ile disk difüzyon ve oksasilin agar dilüsyon testlerini karşılaştırmışlardır. Oksasilin agar dilüsyon testi ile metisiline dirençli oldukları saptanan örneklerin PZR'la *mecA* geni içermediklerini göstermişler ve bu izolatların yüksek miktarda beta-laktamaz oluşturarak direnç geliştirdiklerini belirtmişlerdir (Eroğlu 2001). *mecA* geni taşımayan metisiline dirençli olan stafilokoklarda PBP'lerde oluşan bir yapısal değişiklik sonucu direnç gelişebileceği açıklanmıştır (Prasad 2000).

Coello ve ark. (1997)'na göre MRSA ile kolonize olduğu bilinen 479 hastanın değerlendirildiği bir başka çalışmada ise 53 hastada (%11.1) 68 MRSA infeksiyon atağı gelişmiş; üç ya da daha fazla antibiyotik kullanımı, ülser, cerrahi yaralar, nazogastrik ya da endotrakeal tüpler, drenler ve üriner ya da intravenöz kateterizasyonun MRSA infeksiyon oranlarının artışıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Graffunder ve Venezia (2002)'ya göre nozokomiyal MRSA infeksiyonları ile ilişkili risk faktörlerinin değerlendirildiği bir başka çalışmada 121 MRSA ile infekte hasta 123 MSSA ile infekte hasta ile karşılaştırılmıştır ve MRSA ile infekte olan hastalarda MSSA ile infekte hastalara göre daha fazla eşlik eden hastalık, daha uzun süre yoğun bakım ünitesinde (YBÜ) yatış ve antibiyotiklere daha fazla maruziyet söz konusudur.

Mikrobiyolojik kirliliğin yayılımı ve birbiriyle olan ilişkisinin ortaya konması, aynı türden klinik izolatların teşhis edilmesi, izolatlar arasında genetik ilişkinin ortaya konması, patojen kolonilerin ayırt edilmesi, duyarlı ve dirençli patojenlerin direnç genlerinin saptanabilmesi, bakteri genotipi üzerinde mikrobiyolojik tanı yöntemleri dediğimiz fenotipik tanımlama, kesinlikle genotip tanımlama ile desteklenmelidir (Khairulddin ve ark. 2004, Faria ve ark. 2005).

Mikroorganizmalar arasındaki farkların ortaya konması için kullanılan yöntemler mikrobiyolojide genellikle suş tiplendirmesi olarak bilinir. Antibiyogram, biyotiplendirme, serotiplendirme ve faj tipinin tanımlanmasının yanı sıra bakterilerde direnç geni taşıyan plazmid profillerinin tespit edilmesi, DNA'nın elde edilmesi ve PZR'da çoğaltılması gibi moleküler yöntemlerle yapılmaktadır (Koreen ve ark. 2004).

Parmak izi yöntemi denilen plazmid analizleri PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis) ribotiplendirme ve PZR'ye dayalı diğer teknikler ile birlikte DNA dizi analizi yapılabilir. PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis) tekniği bakteri moleküler genetiği çalışmaları için ayırım gücü en yüksek ve tekrarlanabilir olmasıyla en güvenilir metoddur (Zadoks ve ark. 2000).

S. aureus suşlarında direnç gelişiminden sorumlu olan gen bölgesi ise *mec* gen ailesi ve varyantlarıdır. *S.aureus*'ların metisiline dirençli olup olmadığının tespit edilmesinde *mecA*

geninin varlığı önemlidir. Bundan başka *mecA* geninin tesbit edilmesiyle, *S. aureus* suşlarının karakterize edilmesinde *mecA* geni MRSA ve MSSA için seçici bir moleküler belirleçtir.

Çalışmamızda 40 izolatta *mecA* gözlemlendi. Bu sonuçlar mikrobiyolojik çalışmaları da doğruladı. Bu çalışmaya göre MSSA'ların *mecA* geni taşımadığı ve fenotipik direnç göstermemelerinin nedeninin genotipik olarak moleküler genetik yöntemlerinin uygulanmasıyla da gösterilmiş oldu.

Bakterilerde metisilin direncinin gelişmesinde genetik ve çevresel faktörlerin de önemli rol oynadığı bilinmektedir. Bu nedenle antibiyotik tedavisinin geliştirilmesinde *S. aureus*'ların genomunun bilinmesi önemlidir. Hastane personelinde ve yatan hastalarda nozokomial infeksiyon gelişmesini ve oluşan bu infeksiyonların diğer hastalıklara neden olabileceği için, en etkili antibiyotik tedavisinin geliştirilmesinde *S. aureus*'ların mikrobiyolojik tanıların yanı sıra genomik düzeyde de kontrol altına alınması gerekmektedir. Bu çalışmada elde edilen moleküler veriler ülkemizin diğer bölgelerinde gerçekleştirilecek olan çalışmalarda elde edilen verilerle birlikte değerlendirilerek hastane infeksiyonunun kontrolünde yararlanılacak etkili aşılardan ve antibiyotiklerin gelişmesine yardımcı olacaktır.

Toplumdan elde edilmiş (TE-MRSA) MRSA'lar önemli bir infeksiyon olarak ortaya çıkmıştır. TE-MRSA hastaneden elde edilmiş MRSA (HE-MRSA)'ların aksine geniş bir antibiyotik grubuna duyarlıdır. TE-MRSA aynı zamanda HE-MRSA izolatlarına kıyasla daha çok virulandır. TE-MRSA sıklıkla nötrofillerin hücre membranlarında litik porlar oluşturan ve doku yıkımını başlatan nötrofil kemotaktik faktörlerin salınımını sağlayan PVL (Pantone-valentine leucosidine) geni taşımaktadır. MRSA'lar toplumda artan sıklıkta ortaya çıkmasına rağmen asıl kaynakların hastanede yatan hastalar ve çalışanlardır. Bakteriye bakteriofajlarla taşınan PVL birbirine komşu olan ve birlikte transkripte olan genlerden *lucF-PV* ve *lucS-PV* tarafından kodlanır. Dolayısıyla PVL iki protein komponentinin bir araya gelmesiyle oluşmuş bir toksindir (Diep 2004, Witte 2007).

S. aureus'larda metisilin direnç mekanizmasının ortaya çıkarılmasında stafilokokal kaset kromozom *mec* (SCC *mec*-the staphylococcal cassette chromozom *mec*) denilen büyük hareketli bir genetik element varlığında metisiline dirençli hale gelir. SCC-*mec* içerisinde hareketi sağlayan *ccrA* ve *ccrB* genleri ve beta laktam direncine neden olan *mecA* geni bulunmaktadır. *mecA* PBP-2a (penisilin bağlayan protein) denilen değişik bir proteini kodlar. Bakteri kromozomunda yer alan bu protein metisilin dahil beta laktam antibiyotiklere düşük afinite gösterir. Ayrıca *mecA* geni IS431 denilen ve gen toplayıcı olarak da davranan bir yapıyla kuşatılmıştır. IS431 daha başka antibiyotik kodlayan genlerin eklenmesini

kolaylaştırır ve böylece MRSA'nın ilaç direncine sahip suşları ortaya çıkar (Diep 2004, Lelievre ve ark. 1999, Seal ve ark. 2003).

Genellikle taşıdığı *mecA* genlerine bağlı olarak SCC-mec'in tanımlanmış tip I, II, III, IV olmak üzere dört tipi vardır. Tip I, II ve III çok sayıda antibiyotik direnci kodlayan genleri taşıma eğilimindedir. Tip IV ise MRSA'nın toplumdan elde edilmiş suşlarıyla ilgilidir. Son zamanlarda bu patojene bağlı olarak gelişen infeksiyon ve pnömonilerin tedavi stratejilerinin belirlenmesi için bu çalışmayla birlikte çalışmayı destekleyecek özellikle moleküler tanı yöntemlerinin geliştirilmesi bakımından yeni çalışmalara ihtiyaç vardır (Weber 2005, Robicsek ve ark. 2008). Ayrıca bu çalışmada *PVL* taşıyan bakterilerin PZR ile ayırabilmek için metot optimizasyonu yapılmıştır. Daha sonraki çalışmalarda *PVL* içeren MRSA suşlarının yaygınlığını ve orijininin tanımlanması da amaçlanmaktadır. Bu çalışma sonuçlarına göre nozokomial örneklerde *PVL* varlığının bütün olarak araştırılması ciddi infeksiyonları önlemede rol oynayacaktır.

Moleküler genetik yöntemlerinin mikrobiyoloji alanında yaygın olarak kullanımı:

1- Tanıda süreyi kısaltmak veya kültürü yapılamayan bakteriler ile oluşan infeksiyonları tanımlamak

2- İnfekte olmuş hastalarda veya stoklanmış örneklerde tanı koyma.

3-) Bakterilerin toksijenik suşlarının ayırt edilmesi. Örneğin PZR yöntemiyle *S. aureus*'ların patojenezinde etkili olan enteretoksinlerin tesbit edilmesi.

4-) İnvaziv olmayan metisilin kullanımında erken tanı koyma.

5-) Patojenlerin araştırılması.

6-) Antimikrobial direncin saptanması. Örneğin *S. aureus*'larda metisilin direncinin araştırılmasında MRSA suşları hastane personeli ve yatan hastalarda yaygın olarak izole edilmekte ve hastadan hastaya ya da personelden hastaya kolaylıkla yayılmaktadır. Metisilin direncinin kaynağı olan *mecA* geninin moleküler yöntemlerle teşhisi mikrobiyolojik çalışmalara önemli katkıyı sağlamaktadır. MRSA suşlarında gözlenen çoklu direnç de tek bir izolattan oluşan bakteri popülasyonu içinde metisilin direnç seviyesinde büyük fark vardır. Bakterilerin büyük çoğunluğu düşük seviyede direnç gösterir. Yüzbinde biri yüksek derecede dirence sahip olmakta ve tedavide başarısızlığa neden olmaktadır. Dirençten sorumlu olan *mecA* geni PZR yöntemiyle gösterilerek MRSA suşları klasik yöntemlere göre daha duyarlı ve kısa sürede saptanabilmektedir. Aynı şekilde geniş spektrumlu antibiyotik direncinden sorumlu beta laktamaz genleri de PZR ile araştırılabilmektedir.

7-) PZR'in tiplendirmede kullanımı: Bakteri tiplendirilmesi herhangi bir salgın esnasında kaynağın saptanması, bulaş yollarının belirlenmesi ve etkin koruma önlemlerinin

alınması açısından büyük yarar sağlamaktadır. Biyokimyasal yöntemlerin çoğu tür düzeyinde tanımlama sağlar. Epidemiyolojik çalışmalar için gerekli olan alt tür düzeyinde tiplendirmede biyotipleme, faj tiplemesi, serotipleme ve antibiyotipleme gibi moleküler yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bunlarda PZR'a dayalı yöntemler olup her bir izolatın tanımlanmasında kısa sürede kesin sonuçlara ulaşmak mümkün olmaktadır (Tenover ve ark. 2006, Moran ve ark. 2005).

Sonuç olarak, doğrudan klinik örnekler de MRSA saptanması için kullanılan hızlı moleküler testlerin önündeki en önemli engel, gerçek MRSA varlığı ile, MSSA ve MRSE birlikte bulunmasının ayırt edilmesindeki güçlülüdür. FDA onaylı testler bu engeli sadece MRSA izolatlarına özgü bir diziyi çoğaltarak aşmışlardır.

Bu çalışmada *mecA* geni PZR yöntemi ile çoğaltılarak *S. aureus* suşları arasında metisilin dirençli *S. aureus*'lar (MRSA) tanımlandı. Tez konumuzu oluşturan MRSA ve MSSA suşlarında *mecA* ve *PVL* gen bölgelerinin varyantlarının çoğaltılması neticesinde elde edilen PZR ürünlerinin değerlendirilmesiyle *PVL* gen bölgesi içeren MSSA'ların ve MRSA'ların virulansları tanımlanmıştır.

Metisilin direncinin belirlenmesindeki hatalar ciddi klinik sorunlara neden olabilir. Yalancı duyarlı sonuçlar tedavide yetersizliğe ve MRSA suşlarının yayılmasına, yalancı dirençli sonuçlar ise glikopeptitlerin aşırı kullanımı ve gereksiz izolasyon tedbirleri nedeniyle aşırı maliyetle sonuçlanmaktadır. Bu nedenle *S. aureus* kökenlerinde metisilin direncinin doğru tanımlanması gereklidir. Bu çalışma, özellikle çoklu ilaç direnci gösteren *S. aureus* suşlarının tanımlanmasında moleküler yöntemlerin destekleyici ve doğrulayıcı nitelikte olduğu belirlenmiştir. *mecA* geninin belirlenmesi MRSA suşlarının ortaya çıkarılmasında en kesin yöntemdir, ancak rutin laboratuvarlarda kullanımı uygun değildir ve özel laboratuvar ortamı gerektirmektedir.

MRSA ve MSSA bakterilerinde infeksiyon nedenlerini tanımlamanın yanısıra mevcut bakterilerin direnç ve virülans faktörlerini belirlemek için mikrobiyolojik çalışmaların yanısıra moleküler tekniklerin uygulanmasının gerekliliği de bu çalışma ile tesbit edilmiş oldu. Ayrıca çalışma da moleküler yöntemlerin etkin kullanımı için diğer araştırmalara yardımcı olacak protokol modifikasyonlarının ve optimizasyonlarının sağlanması ile de bu alanda özellikle bakteri genetiği ve tanımlanmasında gerek teorik gerekse uygulamalı alanlarda önemli bir veri tabanı oluşturarak kaynak teşkil edeceği inancındayız.

Bakterilerin tiplendirilmesi ve herhangi bir salgın esnasında kaynağın belirlenmesi ile birlikte etkin koruma önlemlerinin alınması son derece önemlidir. Bu nedenle epidemiyolojik çalışmalar için gerekli olan alt türlerin oluşturulması, biyotiplerin ve yeni genotiplerin

oluşturulması moleküler genetik yöntemlerle sağlanmaktadır. Çünkü sadece moleküler yöntemler fenotip bilgileri doğrular nitelikte olup türün tam olarak teşhisi ve tanımlanması için mutlak surette uygulanması gereken yöntemlerdir. Böylece günümüzün önemli bilim dallarından olan farmakogenetik, genomiks ve bakteri genetiği ve biyoinformatik alanlarının gelişmesine de katkı sağlayabilecektir. Böylece hızla gelişen teknolojiyle birlikte ilerleyen biyoteknoloji alanında da bakterilerin gelişen direnç mekanizmalarının konakçı canlılar üzerindeki infeksiyon ve daha şiddetli etkilerinin ortadan kaldırılmasında bakteri gen profilinin genomik düzeyde tesbit edilmesi ve böylece etki spektrumu yüksek ilaçların üretiminin sağlanmasına ve antibiyotik kullanım stratejilerine katkısı olacağı düşünülebilir.

Staphylococcus aureus genotiplerinin tanımlanmasında mikrobiyolojik yöntemlerin yanı sıra moleküler yöntemlerin de her bir tür için cins ve tür bazında; DNA izolasyonu, her bir türün endonükleaz aktivitesi, PZR amplifikasyonu yöntemlerine göre tür identifikasyonu, orjine bağlı olarak *Staphylococcus aureus* genotiplerinde gelişen mutasyonların tesbit edilmesi ile birlikte ileride devamı yapılacak olan çalışma mutant türlerdeki mutasyon tipini tanımlamak açısından hem mikrobiyolojik hem de moleküler biyoloji disiplinlerinin ortak bir çalışması olmasının yanında, türe özgü spesifik primerlerin de kullanılmasıyla *mecA* ve *PVL* gen bölgelerinin PZR teknikleri ile tesbit edilerek hem tür hem de filogenetik açıdan genomun tanımlanması sağlanmıştır. Ayrıca mikrobiyolojik çalışmaların tür identifikasyonu yapılırken yanıltıcı olabileceği ve çalışmaların genomik düzeyde de yapılması ve doğrulanması gerektiği bu tezle birlikte açıklanmıştır.

KAYNAKLAR

- Afroz, S., Kobayashi, N., Nagashima, S., et. al.** 2008. Genetic characterization of *Staphylococcus aureus* isolates carrying panton- valentine leukocidin genes in Bangladesh. Jpn. J Infect Dis. 61: 393-6.
- Altaş, K., Midilli, K.** 2003. Enfeksiyon Hastalıklarında Moleküler Tanı Yöntemleri. Kalıtsal Hastalıklara Moleküler Tıp Alanından Bakış Sempozyumu. S. 59-71. Elazığ.
- Altemeier, W.A., Lewis, S., Brackett, K.** 1981. The versatile *Staphylococcus*. The Staphylococci. Proceedings of the Alexander Ogston Centennial Conference. Aberdeen University. 125-48.
- Arda, M.** 2000. Koagülaz Testi. Temel Mikrobiyoloji. 2.Baskı. Medisan Yayınevi, Ankara. 294-314.
- Aslantaş, Ö., Öztürk, F., Çelebi, A., Açık, L., Ergün Y.** 2006. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from subclinic bovine mastitis by protein patterns, antibiotic resistance and plasmid profile. Ankara Üniv. Vet Fak Derg. 53: 47-51.
- Balık, İ., Birengel, S.** 2003. Oksazolidinonlar: Linezolid-Eperozolid. Leblebicioğlu, H., Usluer, G., Ulusoy, S., (Ed). Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler, Ankara, Bilimsel Tıp Yayınevi 365-73.
- Barber, M.** 1961. Methicillin-resistant staphylococci. J Clin Pathol. 14: 385-93.
- Baron, E.J., Peterson, R.L., Finegold S., M.** 1994. Stafilocoklar. Bailey&Scott's Diagnostic Microbiol , Ninth Edition ,Chapter 25;321-32, Mosby, USA.
- Berger Bächli, B.** 1999. Genetic Basis of Methicilin Resistance in *Staphylococcus aureus*. Cell Mol Life Sci. 56: 764-70.
- Bilgehan, H.** 2000. Stafilocoklar. Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. Barış Yayınları. İzmir. 239-68.

Boutiba-Ben, Boubaker, I., Ben, Abes, R., Ben, Abdallah, H., et. al. 2004. Evaluation of a cefoxitin disk diffusion test for the routine detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect;10:762-5.

Boyce, J.M. 1998. Are the epidemiology and microbiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* changing? JAMA. 279:623-4.

Casewell, M.W., Hill, R.L. 1986. The Carrier State:Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Antimicrob Chemother. 18:1-12.

Cengiz, A.T. 1999. *Staphylococcus*. Ustaelebi ř. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Gneş Kitabevi, Ankara. 339-46.

Chambers, H.F. 1997. Methicillin resistance in staphylococci: Molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin Microbiol Rev. 781-91.

Coello, R., Glynn, J.R., Gaspar, C., Picazo, J.J., Fereres, J. 1997. Risk factors for developing clinical infection with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) amongst hospital patients initially only colonized with MRSA. J Hosp Infect. 37:39-46.

oka, F. 2002. Linkozamidler. Topçu, A.W., Söyletir, G., Doğanay, M., (Ed). İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul. 264-6.

oka F. 2002. Makrolidler, Azalidler, Streptograminler. Topçu A.W., Söyletir, G., Doğanay, M., (Ed). İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul. 227-34.

Derbentli, ř. 1996. Stafilokok ne Enterokoklarda antibiyotik duyarlılık deneylerinin zellikleri. ANKEM Derg. 10:211-9.

Diekema, D.J., Pfaller, M.A., Schmitz, F.J., Smayevsky, J., Bell, J., Jones, R.N., Beach, M. 2001. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America,

Europe and the Western Pacific region for the SENTRY antimicrobial surveillance program 1997-1999. Clin Infect Dis. 32:114-32.

Diep, B.A., Sensabaugh, G.F., Somboona, N.S., Carleton, H.A., Perdreau-Remington, F. 2004. Widespread skin and soft-tissue infections due to two methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains harboring the genes for Panton-Valentine leucocidin. J Clin Microbiol. 42:2080-4.

Dünder, V. 2000. Metisiline Dirençli Stafilokok İnfeksiyonları. Klimik Derg. 13: 26-7.

Dünder V, Öztürk D.D. 2002. Stafilokok İnfeksiyonları. Topçu, A.W., Söyletir, G., Doğanay, M., (Ed). İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul. 1507-16.

Eady, E.A., Cove, J.H. 2003. Staphylococcal resistance revisited: community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* emerging problem for the management of skin and soft tissue infections. Curr Opin Infect Dis. 16: 103-24.

Eroğlu, C., Pekbay, A., Duyar, E., Günaydın, M., Esen, S., Sünbül, M., Leblecioğlu, H. 2001. Stafilokoklarda metisilin direncinin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve oksasilin agar tarama yöntemi ile araştırılması. İnfek Derg. 15:79-82.

Erol S. 2003. Rifampisin. Leblebicioğlu, H., Usluer, G., Ulusoy, S., (Ed). Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler. Ankara. Bilimsel Tıp Yayınevi. 417-20.

Faria, N.A., Oliveira, D.C., Westh, H., Monnet, D.L., Larsen, A.R., Skov, R., de Lencastre, H. (2005). Epidemiology of emerging methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Denmark: a nationwide study in a country with low prevalence of MRSA infection. J Clin Microbiol. 43:1836-42.

Felek S. 2003. Mupirosin. Leblebicioğlu, H., Usluer, G., Ulusoy, S., (Ed). Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler. Ankara. Bilimsel Tıp Yayınevi. 427-30.

Felten, A., Grandry, B., Lagrange, P.H., Casin, I. 2002. Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test. J Clin Microbiol. 40: 2766-71.

Francioli, M., Bille, J., Glauser, M.P., Moreillon, P. 1991. Beta-lactam resistance mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Infect Dis. 163: 514-23.

Gould, I.M. 2005. The clinical significance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Hosp Infect. 61: 277-82.

Grady, R., O'Neill, G., Cookson, B., Stanley, J. 2000. Fluorescent amplified-fragment length polymorphism analysis of the MRSA epidemic. FEMS Microbiol Lett. 187:27-30.

Grady, R., Blanc, D., Hauser, P., Stanley, J. 2001. Genotyping of European isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by fluorescent amplified-fragment length polymorphism analysis (FAFLP) and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) typing. J Med Microbiol 50: 588-93.

Graffunder EM, Venezia RA. 2002. Risk factors associated with nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection including previous use of antimicrobials. J Antimicrob Chemother. 49: 999-1005.

Gross-Schulman, S., Dassey, D., Mascola, L., Anaya, C. 1998. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. JAMA. 280: 421-2.

Haddadin, A.S., Fappiano, S.A., Lipsett, P.A. 2002. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the intensive care unit. Postgrad Med J 78: 385-92.

Harbarth, S., Francois, P., Shrenzel, J., Fankhauser-Rodriguez, C., Hugonnet, S., Koessler, T., Huyghe, A., Pittet, D. (2005). Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Switzerland. Emerg Infect Dis. 11:962-65.

Henze, U.U., Berger-Bachi, B. 1996. Penicilin binding protein 4 overproduction increases beta laktam resistance in *S. aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 40:2121-5.

Herold, B.C., Immergluck, L.C., Maranan, M.C., Lauderdale, D.S., Gaskin R.E., Boyle-Vavra, S., Leitch, C.D., Daum, R.S. 1998. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk. JAMA. 279:593-8.

Hollis, R.J., Barr, J.L., Doebbeling, B.N. at. al. 1995. Familial carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and subsequent infection in a premature neonate. Clin Infect Dis.;21:328-32.

Ito, T., Okuma, K., Ma, X.X., Yuzawa, H., Hiramatsu, K. 2003. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. Drug Resist Updat. 6: 41-52.

Jayaratne, P., Rutherford, C. 1999. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from growth on mannitol salt oxacillin agar using PCR for nosocomial surveillance. Diagn Microbiol Infect Dis. 35: 13-8.

Khairulddin, N., Bishop, L., Lamagni, T.,L., Sharland, M., Duckworth, G. (2004). Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) bacteraemia among children in England and Wales, 1990e2001. Arch Dis Child. 89: 378-9.

Koreen, L., Ramaswamy, S.V., Graviss, E.A., Naidich, S., Musser, J.M., Kreiswirth, B.N. 2004. *Spa* typing method for discriminating among *Staphylococcus aureus* isoates: Implications for use of a single marker to detect genetic micro- and macrovariation. J Clin Microbiol. 42:792-9.

Korten, V. 2003. Kinopristin ve Dalfopristin. Leblebicioğlu, H., Usluer, G., Ulusoy, S., (Ed). Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler, Ankara, Bilimsel Tıp Yayınevi. 359-63.

Kwon, N.H., Park, K.T., Moon, J.S., et al. 2005. Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) characterization and molecular analysis for methicillin- resistance *Staphylococcus*

aureus and novel SCCmec subtype IVg isolated from bovine milk in Korea. J of Antimicrobial Chemotherapy. 56: 624-32.

Leblebicioğlu, H. 2003. Parenteral Sefalosporinler. Leblebicioğlu, H., Usluer, G., Ulusoy, S., (Ed). Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler, Ankara, Bilimsel Tıp Yayınevi. 253-66.

Lelievre, H., Lina, G., Jones, M.E., Olive, C., Forey, F., Koussel-Delvallez, M., et. al. 1999. Emergence and spread in French hospitals of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with increasing susceptibility to gentamicin and other antibiotics. J Clin Microbiol. 37:3452-7.

Loveday, H.P., Pellowe, C.M., Jones, S.R., Pratt, R.J. 2006. A systematic review of the evidence for interventions for the prevention and control of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (1996-2004): report to the Joint MRSA Working Party (Subgroup A) J of Hosp Infect. 1: 45-70.

Lowy, F.D. 1998. *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med. 339:520-32.

Maier, J., Melzl, H., Reischl, U., Drubel, I., Witte, W., Lehn, N., Linde, H. (2005). Pantón-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant- *Staphylococcus aureus* in Germany associated with travel or foreign family origin. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 24: 637-39.

Maranan, M.C., Moreria, B., Boyle-Vavra, S., Daum, R.S. 1997. Antimicrobial Resistance in Staphylococci. Infect Dis Clin North Am. 11: 813-49.

Martin-Lopez, J.V., Diez-Gil, O., Morales, M., Batiska, N., et al. 2004. Simultaneous PCR detection of ica cluster and methicillin and mupirocin resistance genes in catheter-isolated *Staphylococcus*. International Microbiology. 7: 63-66.

McDonald, R.R., Antonishyn, N.A., Hansen, T., et al. 2005. Development of a triplex real-time PCR assay for detection of pantón-valentine leukocidin toxin genes in clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J of Clinical Microbiology. 43: 6147-9.

Metan, G., Zarakolu, P., Unal, S. 2005. Rapid detection of antibacterial resistance in emerging Gram-positive cocci. *J Hosp Infect* 61: 93-9.

Moellering, R.C., Mandell, G.L., Bennett, J.E., Dolin, R. 2000. Principles and Practice of Infectious Diseases. Churchill Livingstone, Philadelphia, 223-35.

Moran, G.J., Amii, R.N., Abrahamian, F.M., Talan, D.A. 2005. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in community-acquired skin infections. *Emerg Infect Dis.* 11:928–30.

Moreillon, P., Que, Y., Glauser, M.P. 2005. *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock) In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, (eds). Principles and Practice of Infectious Disease. 6th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone. 2321-51.

Murakami, K., Minamide, W., Wada, K., Nakamura, E., Teraoka, H., Watanabe, S. 1991. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 29: 2240-4.

Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Kobayashi, G.S., Pfaller, M.A. 1998. Staphylococcus and Related Organisms. Medical Microbiology. Mosby. 175-88.

Mutlu, G., Ögünç, D. 1999. Mikroorganizmalarda hücre yapısı. Ustaçelebi, Ş., (Ed). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Ankara, Güneş Kitabevi Ltd. Şti. 7.

O'Brien, F.G., Pearman, J.W., Gracey, M., Riley, T.V., Grubb, W.B. 1999. Community strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* involved in a hospital outbreak. *JCM* 37: 2858-62.

Özgüven, V., Dizer, U. 2002. Monobaktam ve Karbapenemler. Topçu, A.W., Söyletir, G., Doğanay, M., (Ed). İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul. 209-14.

Perry, J.D., Davies, A., Butterworth, L.A., Hopley, A.L., Nicholson, A., Gould, F.K. 2004. Development and evaluation of a chromogenic agar medium for methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 42: 4519-23.

Petersson, A.C., Kamme, C. Miörner H. 1999. Disk with high oxacillin content discriminates between methicillin-resistant and borderline methicillin – susceptible *Staphylococcus aureus* strains in disk diffusion assays using a low salt concentration. J Clin Microbiol. 37: 2047.

Prasad, K.N., Kumar, R., Tiwari, D.P., Mishra K.K., Ayyagari, A. 2000. Comparison of various conventional methods with polymerase chain reaction assay for detecting methicillin resistant & susceptible *Staphylococcus aureus* strains. Indian. J Med Res. 198-202.

Predari, S.C., Ligozzi, M., Fontana, R. 1991. Genotypic identification of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci by polymerase chain reaction. Antimicrob Agents Chemother. 35: 2568-73.

Progulske-Fox, A. 1994. Bacterial Structure. In Murrey PR, Kobayashi GS, Pfaller MA, Rosenthal KS. Medical Microbiology, 2nd Ed., St.Louis, Missouri, Mosby-Year Book, Inc. 6.

Robicsek, A., Suseno, M., Beaumont, J.L., Thomson, R.B., Peterson, L.R. 2008. Prediction of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* involvement in disease sites by concomitant nasal sampling. J Clin Microbiol. 46:588-92.

Sancak, B., Günalp, A. 2001. Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* izolatların kantitatif antibiyogram ve plazmid profil analizi yöntemleri ile tiplendirilmesi. Mikrobiyol Bült. 35: 11-24.

Sanford, M.D., Widmer, A.F., Bale, M.J., Jones, R.N., Wenzel, R.P. 1994. Efficient detection and long-term persistence of the carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis. 19: 1123-8.

Sardan, Y.Ç. 2000. Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* infeksiyonlarının epidemiyolojisi ve kontrolü. Hastane infeksiyonları Derg. 4: 205-7.

Seal, J.B., Moreira, B., Bethel, C.D., Daum, R.S. 2003. Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* at the University of Chicago Hospitals: a 15-year longitudinal assessment in a large university-based hospital. Infect Control Hosp Epidemiol. 24:403–8.

Schito, G.C. 2006. The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect. 12: 3-8.

Shopsin, B., Kreiswirth, B.N. 2001. Molecular epidemiology of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Emerg Infect Dis. 7: 323-6.

Smyth RW, Kahlmeter G. 2005. Mannitol salt agar-cefoxitin combination as a screening medium for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 43: 3797-9.

Soloaga, R., Corso, A., Galletti, P., Faccone, D., Galas, M. 2004. Grupo Colaborador MRSA. Methicillin resistance detection in *Staphylococcus aureus*: Comparison between conventional methods and MRSA-Screen latex agglutination technique. Rev Argent Microbiol. 36:36-40.

Stephens, A.J., Huygens, F., Imman-Bamber,J., et al. 2006. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* genotyping using a small set of polymorphisms. J of Medical Microbiology. 55: 43-51.

Swensen, J.M., Hindler, J.F., Jorgensen, J.H. 2003. Specific phenotypic methods for detecting antibacterial resistance. In: Murray RP, Baron JE, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Eds. *Manual of Clinical Microbiology*, Vol.1, 8th edition, Washington, DC: American Society for Microbiology.

Tenover, F.C., McDougal, R.V., Goering, G., Killgore, S.J., Projan, J.B., Patel, P.M. 2006. Characterization of a strain of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* widely disseminated in the United States. J Clin Microbiol. 44:108-18.

Topçu, A.W. 2002. Aminoglikozidler. Topçu, A.W., Söyletir, G., Doğanay, M., (Ed). *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul. 214-22.

Topçu, A.W., Gergin, Gündeş, S. 2002. Fusidik asit. Topçu, A.W., Söyletir, G., Doğanay, M., (Ed). *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul. 260–4.

Topçu, A.W. 2002. Sulfonamidler, Trimetoprim, Trimetoprim-Sulfametoksazol. Topçu, A.W., Söyletir, G., Doğanay, M., (Ed). İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul. 248–52.

Topçu A.W., Gergin G.S. 2002. Fusidik asit. Topçu, A.W., Söyletir, G., Doğanay, M., (Ed). İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Nobel Tıp Kitabevleri. İstanbul. 260–4.

Ulusoy, S., Leblebicioğlu, H., Usluer, G. 2003. Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler. 407-15

Ünal, S. 1996. Stafilokoklarda metisilin direnç mekanizmaları ve metisilin direnç tespit yöntemleri. Flora İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Dergisi. 1: 14-7.

Verhoef, J., Schmitz, F.J. 1999. *Staphylococci*. Section 8, Chapter 13, Armstrong D., Cohen J Infectious Diseases, Mosby, USA. Vol 2.

Vincent, J.L., de Mendonca, A., Cantraine, F., et. al. 1998. Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. Working group on "sepsisrelated problems" of the European Society of Intensive Care Medicine. *Crit Care Med*, 26:1793-1800.

Waldvogel, F.A. 1999. New resistance in *S. aureus*. <http://www.nejm.org>

Waldvogel, F.A. 2000. *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock). In: Mandell, G.L., Bennett, J.E., Dolin, R. (eds). Mandell, Douglas and Bennet's Principles and Practice of Infectious Diseases. New York: Churchill Livingstone. 2069-92.

Weber, J.T. 2005. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis*. 41:S269–72.

Wenzel, R.P. et al. 1998. Methicillin-resistant *Staphylococcus* outbreak: A consensus panel's definition and management guidelines. *American Journal of Infection Control*. 26: 2, 102-10

Witte, W., Strommenger, B., Cuny, C., Heuck, D., Nuebel, U. 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the Panton-Valentine leucocidin gene in Germany in 2005 and 2006. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 10: 1093-384

Witte, W. 1999. Antibiotic resistance in Gram-positive bacteria: epidemiological aspects. *J. Antimicrob Chemother.* 44: 1-9.

Yalçın, A.N. 2003. Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler. 325-33.

Yıldız, O., Aygen, B. 2002. Stafilokokların Antibiyotik Duyarlılıkları ve Direnç Sorunu. *İnfeksiyon Hastalıkları Serisi*. 5: 128-36.

Zadoks, R., Van Leeuwen, W., Barkema, H., Sampion, O., Verbrugh, H., Schukken, Y.H., Van Belkum, A. 2000. Application of pulsed-field gel electrophoresis binary typing tools in veterinary clinical microbiology and molecular epidemiologic analysis of bovine and human *Staphylococcus aureus* isolated. *J Clin Microbiol.* 38: 1931-39.