

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN
STAFİLOKOKLAR'DA *mecA* VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

AYFER KOYUNCU

HAZİRAN 2014

Biyoloji Anabilim Dalında Ayfer KOYUNCU tarafından hazırlanan ‘‘KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN STAFİLOKOKLAR’DA *mecA* VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI’’ adlı Yüksek Lisans Tezinin Anabilim Dalı Standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. İlhami TÜZÜN

Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumu ve tezin **Yüksek Lisans Tezi** olarak bütün gereklilikleri yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Aysun ERGENE

Danışman

Jüri Üyeleri

Başkan : Doç. Dr. Sema ÇETİN

Üye (Danışman): Prof. Dr. Aysun ERGENE

Üye : Yrd. Doç. Dr. Serdar GÜL

...../...../.....

Bu tez ile Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onaylamıştır.

Doç. Dr. Erdem Kamil YILDIRIM

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Yeğenim

Arya Delal Koyuncu'ya

ÖZET

KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN STAFİLOKOKLAR'DA *mecA* VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

KOYUNCU, Ayfer

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Aysun ERGENE

Haziran 2014, 86 Sayfa

Bu çalışmanın amacı, çeşitli klinik örneklerden izole edilen 102 adet stafilokok suşunun, biyokimyasal tanımlanması, çoklu direnç probleminin en çok yaşandığı metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşlarının alternatif antibiyotiklere direnç oranlarının saptanması ve genetiksel olarak *mecA* varlığının araştırılması esasına dayanmaktadır. *S. aureus* geniş bir spektrumda enfeksiyonlara neden olan, özellikle metisiline dirençli suşları ile ciddi hastane enfeksiyonları oluşturan bir etkindir. Uzun süreli antibiyotik kullanımı direnç gelişimi için önemli olup bu direnci (metisilin ve diğer beta-laktam antibiyotiklere) *mecA* geni oluşturur. Tedavisi oldukça zor ve maliyetlidir. Bu yüzden *S. aureus* (MRSA) suşlarının doğru tanısı çok önemlidir. Bu çalışmada çeşitli klinik örneklerden izole edilen stafilokok suşlarının tanımlanması konvansiyonel yöntemler ve VITEK 2 (bioMerieux, St. Louis, ABD) otomatik tanımlama sistemi kullanılarak yapılmıştır. Antibiyotik duyarlılıkları Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) önerileri doğrultusunda Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Suşların 75'i (% 73,5) metisiline dirençli (71 adet MRSA ve 4 adet MR-KNS), 27'si (% 26,5) metisiline duyarlı (3 adet MSSA, 3 adet MRSA ve 21 adet KNS) olarak tespit edilmiştir.

Bütün stafilokok suşları vankomisine duyarlı olarak saptanmıştır. Stafilokoklarda heterojen dirençli suşlar nedeniyle metisilin direncinin fenotipik yöntemlerle gösterilmesi sıklıkla yanlışlıklara neden olduğundan *S. aureus* izolatlarında metisilin direncinin gösterilmesinde en uygun yöntem polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile *mecA* gen varlığının belirlenmesidir. Bu amaçla, disk difüzyon yöntemi ile metisiline dirençli veya metisiline duyarlı olduğu belirlenen 102 adet stafilokok suşlarında DNA ekstraksiyonu yapılmış, PZR yöntemiyle *mecA* geni araştırılmıştır. Disk difüzyon yöntemiyle metisiline dirençli olarak saptanan 75 adet suşun hepsi dirençli olarak saptanmış olup PZR yöntemiyle *mecA* geni içerip içermediği araştırılmış ve yapılan işlemler sonucu *mecA* pozitif olduğu bulunmuştur. Aynı şekilde disk difüzyon yöntemiyle metisiline duyarlı çıkan 16AC, 18AC ve 9AE kodlu izolatların ise metisilin direnç geni içerdiği PZR yöntemiyle tespit edilmiştir. Sonuç olarak bu çalışma bize metisilin direncinin tespitinde disk difüzyon tekniğinin moleküler yöntemler ile desteklenmesi gerektiğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Antibiyotik duyarlılığı, MRSA, MSSA, *Staphylococcus aureus*, metisilin direnci, *mecA*

ABSTRACT

INVESTIGATION of *mecA* and GENES in STAPHYLOCOCCI STRAIN ISOLATED FROM CLINICAL

KOYUNCU, Ayfer

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, MSc. Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Aysun ERGENE

June 2014, 86 Pages

The aim of this thesis is to provide biochemical definition of 102 staphylococci strains that were isolated from some clinics, and the ratio of resistance between multi-resistant *staphylococcus aureus* (MRSA) strains and alternative antibiotics. In this thesis, we discuss the existence of *mecA* based on genetical investigations. In a broad spectrum, *S.aureus* causes infections, especially when it is with methicillin-resistant strains from hospital infections. Long-terms use of antibiotics that are important for the development of resistance (methicillin and other beta-lactam antibiotic) creates the *mecA* gene. Thus it is very imperative that MRSA strains can be diagnosed accurately. In this thesis, we study the identification of staphylococci, by using conventional methods and VITEX 2 (bioMerieux, St.Louis, USA) automatic identification system. We used CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) standards and Kirby-Bauer disc diffusion method to determine the sensitivity of antibiotics. It was found that 27 of strains (26,5 %) were methicillin-sensitive (MSSA) and 75 of strains (73,5 %) were methicillin-resistant. All staphylococci strains were found to be sensitive to vancomycin. Because staphylococci contains heterogeneously resistant strains, it can be misleading showing the resistance of methicillin by phenotypic methods. The most appropriate method for determining the resistance of *S. aureus* to methicillin is polymerase chain reaction along with *mecA*

gene. For this purpose, the DNA extraction of 102 staphylococci strains, which are known to be methicillin-resistant and sensitive by disc diffusion method, were made, and the *mecA* gene were investigated by PCR method. All 75 staphylococci methicillin-resistant strains, which is known by disc diffusion method, were discovered to be resistant and further investigations were done on whether all 75 staphylococci contain *mecA* gene or not and positive results were obtained as a result. Similarly, The methicillin-resistant 16AC, 18AC and 9AE which are known to be sensitive by disc diffusion method, codes were discovered to contain gene-resistance by using polymerase chain reaction (PCR) method.

Key Words: Antibiotic susceptibility, MRSA, MSSA, *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistance, *mecA*

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezimin her aşamasında bilgi ve tecrübesiyle bana öncülük eden, bana bu çalışma imkanlarını sağlayan ve her daim arkamda duran tez danışman hocam Sayın Prof. Dr. Aysun ERGENE' ye çok teşekkür ederim.

Tezim üzerinde çok emeği olan, çalışmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, her türlü bilgi, deneyim ve desteğini benden esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. Yakut Akyon Yılmaz'a çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında nazik yaklaşımlarıyla klinik tecrübelerini esirgemeyen Dr. Ayfer DAİ ÖZİŞİK, Doç. Dr. Birgül KAÇMAZ, Dr. İpek MUMCUOĞLU, Yrd. Doç. Dr. Serdar GÜL, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi, Prof. Dr. Deniz Gür AKMAN, Prof. Dr. Pınar ZARAKOLU, Teknisyen Gülden KAYA'ya çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen ve her konuda bana her zaman destek olan değerli biyolog arkadaşlarım Dr. Fadime YILMAZ, Gizem GÜLTEKİN, Sevilay AKBULUT, Hatice AYGÜN, Eftal BÖKE ve Tülay TARIM'a ayrıca Kırıkkale Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvar (KÜBTAL) çalışanlarına ve laboratuvar çalışma arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Hayatımın her alanında olduğu gibi önemli bir bölümünü oluşturan eğitim hayatımda da maddi ve manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan, hayatımı güzelleştiren ve anlam katan babam Sabit KOYUNCU, annem Gülüzar KOYUNCU ve ağabeylerim Selim KOYUNCU ve Selçuk KOYUNCU'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Kaynak özetleri.....	3
1.1.1. Stafilocoklar.....	3
1.1.1.1. Stafilocoklar'da Tarihçe ve Sınıflandırma.....	3
1.1.1.2. Stafilocoklar'ın Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri.....	6
1.1.2. Hücre Yapısı.....	9
1.1.2.1. Genom.....	9
1.1.2.2. Hücre Duvarı Yapısı.....	9
1.1.3. Virulans ve Patojenik Önemleri.....	11
1.1.3.1. Toksinler.....	12
1.1.3.1.1. Sitolitik Toksinler.....	12
1.1.3.1.2. Eksfoliyatif Toksin (Eksfoliyatin).....	13
1.1.3.1.3. Toksik Şok Sendromu Toksini-1 (TŞST-1).....	14
1.1.3.1.4. Enterotoksin.....	14
1.1.4. Stafilocoklar'ın Sahip Olduğu Enzimler.....	15
1.1.4.1. Katalaz.....	15
1.1.4.2. Koagülaz (Prokoagülaz).....	15
1.1.4.3. Stafilokinaz (Fibrinolizin).....	16

1.1.4.4. Hiyalüronidaz	17
1.1.4.5. Beta-laktamaz (Penisilinaz).....	17
1.1.4.6. Lipaz.....	17
1.1.4.7. Deoksiribonükleaz (DNaz).....	17
1.1.5. <i>S. aureus</i> 'un Epidemiyolojisi.....	17
1.1.6. <i>S. aureus</i> 'un Oluşturduğu Enfeksiyonlar.....	20
1.1.7. Stafilokoklar'da Tanı.....	20
1.1.8. <i>S. aureus</i> 'da Metisilin Direnç Mekanizması.....	21
1.1.8.1. İntrensek (Kromozomal) Metisilin Direnci.....	21
1.1.8.2. Sınırdaki (Borderline) Metisilin Direnci.....	23
1.1.8.3. Mevcut PBP'lerde Beta-laktam Antibiyotik Afinitesinde Azalma ile Oluşan Metisilin Direnci.....	23
1.1.9. Metisilin Direncinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler.....	24
1.1.9.1. Disk Difüzyon Yöntemi.....	24
1.1.9.2. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi.....	25
1.1.9.3. Agar Tarama Yöntemi.....	25
1.1.9.4. E-test Yöntemi.....	26
1.1.9.5. Lateks Aglutinasyon Testi.....	26
1.1.9.6. Kromojenik Yöntemler.....	26
1.1.9.7. Moleküler Yöntemler.....	26
1.1.10. MRSA'da Tedavi Seçenekleri.....	27
1.1.11. Çalışmanın Amacı.....	29
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	30
2.1. Materyal.....	30
2.1.1. Kullanılan Besiyerleri.....	30
2.1.1.1. % 5 Koyun Kanlı Agar.....	30
2.1.1.2. Mueller Hinton Agar (MHA).....	30

2.1.1.3. Mueller Hinton Broth (MHB).....	30
2.1.2. Kullanılan Antibiyotik Diskler.....	31
2.1.3. Kullanılan Kimyasallar ve Tamponlar.....	32
2.1.3.1. Kullanılan Kimyasallar.....	32
2.1.3.2. Kullanılan Tampon Çözeltiler.....	32
2.1.3.2.1. Kromozomal DNA İzolasyonunda Kullanılan Tamponlar.....	32
2.1.3.2.1.1. Tris/EDTA Tamponu.....	32
2.1.3.2.1.2. Lizostafin Tamponu.....	32
2.1.3.2.1.3. Proteinaz K'nın Hazırlanması.....	32
2.1.3.2.1.4. Elektroforez Tamponu (50xTAE) Hazırlama.....	33
2.1.3.2.1.5. %1.5'luk Agaroz Jelin Hazırlanması.....	33
2.2. Yöntem.....	34
2.2.1. Örneklerin Toplanması.....	34
2.2.2. Mikrobiyolojik Kültür ve Tanımlama İşlemleri.....	34
2.2.3. Kanlı Agarda Hemoliz Oluşumu.....	35
2.2.4. Gram Boyama.....	35
2.2.5. Katalaz Testi.....	35
2.2.6. Koagülaz Testi.....	36
2.2.7. Antibiyotik Duyarlılığı.....	36
2.2.8. Kromozomal DNA İzolasyonu.....	37
2.2.9. <i>mecA</i> Gen Varlığının Araştırılması.....	37
2.2.10. Agaroz Jelin Hazırlanması ve Örneklerin Jele Uygulanması.....	39
3. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	40
3.1. İzole Edilen Stafilokok Suş Değerlerinin Belirlenmesi.....	40
3.2. Fenotipik Tanımlama Test Sonuçları.....	42
3.3. Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçları.....	44

3.4. Moleküler Yöntem İçin Kullanılan Standart Suşun Belirlenmesi.....	45
3.5. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cebeci Hastanesi Suşlarının Biyokimyasal Test Analizi, Antibiyotik Dirençlilik Profilleri ve Kromozomal DNA Lokasyonunun Belirlenmesi.....	46
3.6. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Suşlarının Biyokimyasal Test Analizi, Antibiyotik Dirençlilik Profilleri ve Kromozomal DNA Lokasyonunun Belirlenmesi.....	50
3.7. Ankara Numune Hastanesi Suşlarının Biyokimyasal Test Analizi, Antibiyotik Dirençlilik Profilleri ve Kromozomal DNA Lokasyonunun Belirlenmesi.....	53
3.8. Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Suşlarının Biyokimyasal Test Analizi, Antibiyotik Dirençlilik Profilleri ve Kromozomal DNA Lokasyonunun Belirlenmesi.....	56
3.9. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Suşlarının Biyokimyasal Test Analizi, Antibiyotik Dirençlilik Profilleri ve Kromozomal DNA Lokasyonunun Belirlenmesi.....	59
4. TARTIŞMA-SONUÇ.....	68
KAYNAKLAR.....	79

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. <i>S. aureus</i> suş'unun yıllara göre antibiyotik dirençliliği	5
1.2. <i>S. aureus</i> 'un ışık mikroskobu görüntüsü ve taramalı elektron mikroskop görüntüsü.....	6
1.3. Dünya'da ülkeler bazında MRSA prevalansı	19
3.1. Yapılan deneylerin sonuçlarına göre tespit edilen Stafilokok suş tiplerinin yüzdeleri dağılımları	41
3.2. <i>S. aureus</i> 'un kanlı agarda hemoliz pozitif görüntüsü ve hemoliz negatif görüntüsü	42
3.3. <i>S. aureus</i> 'un lamda katalaz pozitif test görüntüsü.....	42
3.4. <i>S. aureus</i> 'un lam'da koagülaz negatif ve koagülaz pozitif görüntüsü	43
3.5. <i>S. aureus</i> 'un tüp'de koagülaz pozitif test görüntüsü ve koagülaz negatif test görüntüsü.....	43
3.6. Sefoksitin antibiyotik disk'in kontrol suşları olarak kullanılan ATCC 25923 duyarlı <i>S. aureus</i> ve ATCC 43300 dirençli <i>S. aureus</i> izolatlarına etki görüntüsü.....	44
3.7. Moleküler Weight Marker, duyarlı ve dirençli standart <i>S. aureus</i> kontrol suşlarının PZR'daki görüntüsü.....	45
3.8.a. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cebeci Hastanesi 1-17AC kodlu suşların kromozomal DNA lokasyonu görüntüsü.....	49
3.8.b. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cebeci Hastanesi 18-19AC kodlu suşların kromozomal DNA lokasyonu görüntüsü.....	49
3.9. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi 1-17AE kodlu suşların kromozomal DNA lokasyonu görüntüsü.....	53
3.10. Ankara Numune Hastanesi 1-16AN kodlu suşların kromozomal DNA lokasyonu görüntüsü.....	56
3.11. Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi 1-10KK kodlu suşların kromozomal DNA lokasyonu görüntüsü.....	59

3.12.a. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi 1-17HÜ kodlu suşların kromozomal DNA lokasyonu görüntüsü.....	66
3.12.b. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi 18-34HÜ kodlu suşların kromozomal DNA lokasyonu görüntüsü.....	66
3.12.c. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi 35-40HÜ kodlu suşların kromozomal DNA lokasyonu görüntüsü.....	67

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Stafilokok türlerinin belirgin ayırt edici özellikleri.....	8
2.1. Antibiyotik diskler ve konsantrasyonları.....	31
2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) protokol şeması.....	38
2.3. Amplifikasyon programı.....	38
3.1. İzole edilen suşların örnek türlerine göre dağılımı.....	40
3.2.a. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cebeci Hastanesi 1-10AC kodlu suşların biyokimyasal test sonuçları	46
3.2.b. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cebeci Hastanesi 11-19AC kodlu suşların biyokimyasal test sonuçları	47
3.3. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cebeci Hastanesi suşlarının antibiyotik dirençlilik profilleri	48
3.4.a. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi 1-9AE kodlu suşların biyokimyasal test sonuçları.....	50
3.4.b. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi 10-17AE kodlu suşların biyokimyasal test sonuçları.....	51
3.5. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi suşlarının antibiyotik dirençlilik profilleri.....	52
3.6. Ankara Numune Hastanesi suşlarının biyokimyasal test sonuçları.....	54
3.7. Ankara Numune Hastanesi suşlarının antibiyotik dirençlilik profilleri.....	55
3.8. Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi suşlarının biyokimyasal test sonuçları.....	57
3.9. Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi antibiyotik dirençlilik profilleri.....	58
3.10.a. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi 1-17HÜ kodlu suşların biyokimyasal test sonuçları.....	60
3.10.b. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi 18-30HÜ kodlu suşların biyokimyasal test sonuçları.....	61
3.10.c. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi 31-40HÜ kodlu suşların biyokimyasal test sonuçları.....	62

3.11.a. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi 1-15HÜ kodlu suşların antibiyotik dirençlilik profilleri.....	63
3.11.b. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi 16-27HÜ kodlu suşların antibiyotik dirençlilik profilleri.....	64
3.11.c. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi 28-40HÜ kodlu suşların antibiyotik dirençlilik profilleri	65

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER DİZİNİ

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
δ	Delta
pH	Asitlik değeri
bç	Baz çifti
rpm	Devir sayısı
g	Gram
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
kb	Kilobaz
\leq	Küçük eşit
\geq	Büyük eşit
l	Litre
μ g	Mikrogram
μ l	Mikrolitre
ml	Mililitre
M	Molar
O ₂	Oksijen
°C	Santigrat derece
%	Yüzde
μ M	Mikromolar
μ g	Mikrogram

KISALTMALAR DİZİNİ

MİK	Minimal İnhibitör Konsantrasyonu
KNS	Koagülaz Negatif Stafilokok
MR-KNS	Metisiline Dirençli Koagülaz Negatif <i>S. aureus</i>
MRSA	Metisiline Dirençli <i>S.aureus</i>
MSSA	Metisiline Duyarlı <i>S. aureus</i>
PBP	Penisilin Bağlayan Protein
PBP 2a	Penisilin Bağlayan Protein 2a veya 2'
CLSI	Klinik ve Laboratuar Standartları Enstitüsü
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
UV	Ultraviyole
SCC	Stafilokokal kaset kromozom
Ig	İmmünoglobulin
IS	“Insertion sequence”
MHA	Mueller Hinton Agar
MHB	Mueller Hinton Broth
CFU	Koloni oluşturan ünite “Colony forming unit”
CRF	“Coagulase reacting factor”
ATCC	“American Type Culture Collection”
BORSA	Borderline resistant <i>S. aureus</i>
MODSA	Moderately resistant <i>S. aureus</i>
EF	Eksfoliyatif toksin
PVL	Panton-Valentine leukocidin
SCC _{mec}	Staphylococcal cassette chromosome
TŞS	Toksik şok sendromu
TSST-1	Toksik şok sendromu toksini-1
VRSA	Vankomisine dirençli <i>S. aureus</i>
VISA	Vankomisine duyarlı <i>S. aureus</i>
TK-MRSA	Toplum kaynaklı metisiline dirençli <i>S.aureus</i>
HK-MRSA	Hastane kaynaklı metisiline dirençli <i>S.aureus</i>

1. GİRİŞ

Stafilokoklar, *Micrococcaceae* ailesinde yer alan gram pozitif bakterilerdir. Ortam şartlarına dayanıklı olduklarından doğada yaygın bulunurlar. Bu nedenle, patojen ve patojen olma potansiyelinde olanların, hastalık yapmayanlardan ayrılması gerekir. Stafilokokların bir kısmı insan ve hayvanlar için patojen olup çoğu da fırsatçı patojendirler. Patojen stafilokoklar çeşitli hücre dışı enzim ve toksin oluştururlar [1,2,3].

Stafilokoklar çok sayıda tür içeren, deri ve mukozalarda kolonize olabilen, değişik türleri ile farklı hastalıklar yapan önemli bir cinstir. Bu cins içinde *Staphylococcus aureus* çok sayıdaki virulans faktörü ile çeşitli doku ve organlarda ciddi enfeksiyonlar oluşturabilen önemli bir türdür [4]. Doğal olarak en fazla burun ve boğaz boşluğunda, insan ve hayvan dışkılarında, apseli yaralarda ve sivilcelerde yoğun olarak bulunurlar. Gıdalarda ve gıda işletmelerinde, elle gıda hazırlayanlarda, hastane personeli ve hastane ortamlarında da yaygın olarak bulunurlar. Nazal stafilokoklar, taşıyıcılar (portör) ile çevreye yayılarak tehlike oluştururlar. Portör olan ve özellikle gıda sektöründe bizzat elleriyle gıda hazırlayanlar stafilokokal besin zehirlenmesinin önemli bir kaynağıdır [2].

Uygun antibiyotik tedavisine rağmen stafilokoklar hastane kaynaklı enfeksiyonların başta gelen nedenlerinden biri olup özellikle metisiline dirençli suşlar tedavisi güç, morbidite ve mortalitesi yüksek enfeksiyonlara neden olurlar [5].

Stafilokoklar koagülaz enzimi üretmelerine göre koagülaz pozitif stafilokoklar ve koagülaz negatif stafilokoklar (KNS) olarak iki grupta incelenir. Koagülaz pozitif stafilokoklar arasında *S. aureus*, KNS'ler arasında ise *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus* insan enfeksiyonlarında en sık rastlanan türlerdir [1]. *S. aureus* sıklıkla yara enfeksiyonu, endokardit, osteomyelit ve sepsise yol açarken, KNS'ler yabancı cisim enfeksiyonu ve nozokomiyal bakteremilerde ilk sıralarda yer almaktadır [5].

S. aureus suşları beta-laktamaz üretimi ile sadece penisilin ve türevlerine dirençli iken, genomlarında bulunan penisilin bağlayan protein 2a (PBP 2a veya PBP 2') değişimi sonucunda tüm beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç geliştirmiştir.

Beta-laktamazlara dayanıklı penisilin türevlerine de direnç geliştirmiş olan suşlar metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) olarak adlandırılmaktadır [6]. Hemen hemen tüm MRSA izolatları PBP 2a denilen ek bir penisilin bağlayan protein üretir. PBP 2a, kromozomal bir gen olan *mecA* geni tarafından kodlanmaktadır [7].

Staphylococcus'larda genellikle plazmid aracılığı ile aktarılabilen direnç genleri, birçok antibiyotiğe dirençli suşların ortaya çıkmasına neden olmakta ve bu bakterilerde metisilin direnci, çoklu direncin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir [8]. Günümüzde Amerika Birleşik Devletleri'nin birçok eyaletinde deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarından izole edilen MRSA oranı % 50'lerin üzerine çıkmıştır. Daha da endişe verici olanı toplum kaynaklı MRSA'ların (TK-MRSA) ilaçlara direnç oranlarının artması, yeni coğrafi alanlarda ve popülasyonlarda yayılmasıdır. Göçler ve yabancı ülkelere seyahat muhtemelen Avrupa'daki yayılımın hızında anahtar rol oynamaktadır [9].

Hem coğrafi bölgeler arasında hem de aynı bölgede değişkenlik gösteren metisilin dirençli *S. aureus* prevalansının belirlenmesinde izolatların çeşitli antibiyotiklere ve özellikle metisiline dirençliliğinin araştırılması önem arz etmektedir. Çünkü; MRSA izolatları ciddi ve tedavisi güç enfeksiyonlar oluşturmaktadırlar. Bu nedenle farklı kaynaklardan izole edilen *S. aureus* izolatlarının yayılımının izlenmesi açısından bunların tiplendirilmesi önem taşımaktadır [2].

1.1. Kaynak Özetleri

1.1.1. Stafilocoklar

Stafilocoklar, memelilerin deri ve muköz membranlarında bulunan normal flora elemanıdır. Genelde buldukları yerde konakla iyi huylu ve simbiyotik bir ilişkiye sahiptirler. Ancak deri ve mukozal travma, enjeksiyon veya cerrahi müdahale ile dokuya girmesi sonucu patojen özellik gösterebilirler [10].

1.1.1.1. Stafilocoklar'da Tarihçe ve Sınıflandırma

Stafilocoklar ilk kez 1878 yılında Robert Koch tarafından ışık mikroskobu altında görülmüş ve 1880 yılında Louis Pasteur tarafından sıvı besiyerinde üretilmiştir. 1881 yılında Sir Alexander Ogston stafilocokların fareler ve kobaylar için patojen olduğunu gösterirken bu mikroorganizmaları; üremeleri sırasında birbirlerinden ayrılmayıp, üzüm salkımına benzeyen düzensiz kümeler oluşturmalarına dayanarak ‘‘*Staphylococcus*’’ (Staphyle: üzüm salkımı) olarak adlandırmıştır.

Rosenbach 1884’de insan hastalık örneklerinden ilk kez stafilocokları izole etmiş ve kültür ortamlarında kolonilerin oluşturduğu renklere göre stafilocokları iki gruba ayırmıştır. Sarı koloni oluşturan mikroorganizmalara *Staphylococcus aureus* (aureus: sarı), beyaz koloni oluşturan mikroorganizmalara ise *Staphylococcus albus* (albus: beyaz) adını vermiştir [3,11]. Sonradan stafilocoklar, pek çok alt gruba ayrılmıştır. Ancak, enfeksiyon etkeni olarak çoğunlukla *S. aureus* izole edildiği için çalışmalar daha çok bu bakteri üzerinde yoğunlaşmış ve bunun dışında kalan stafilocok alt grupları genel bir isimlendirme ile koagülaz negatif stafilocok (KNS) olarak adlandırılmışlardır [12,13].

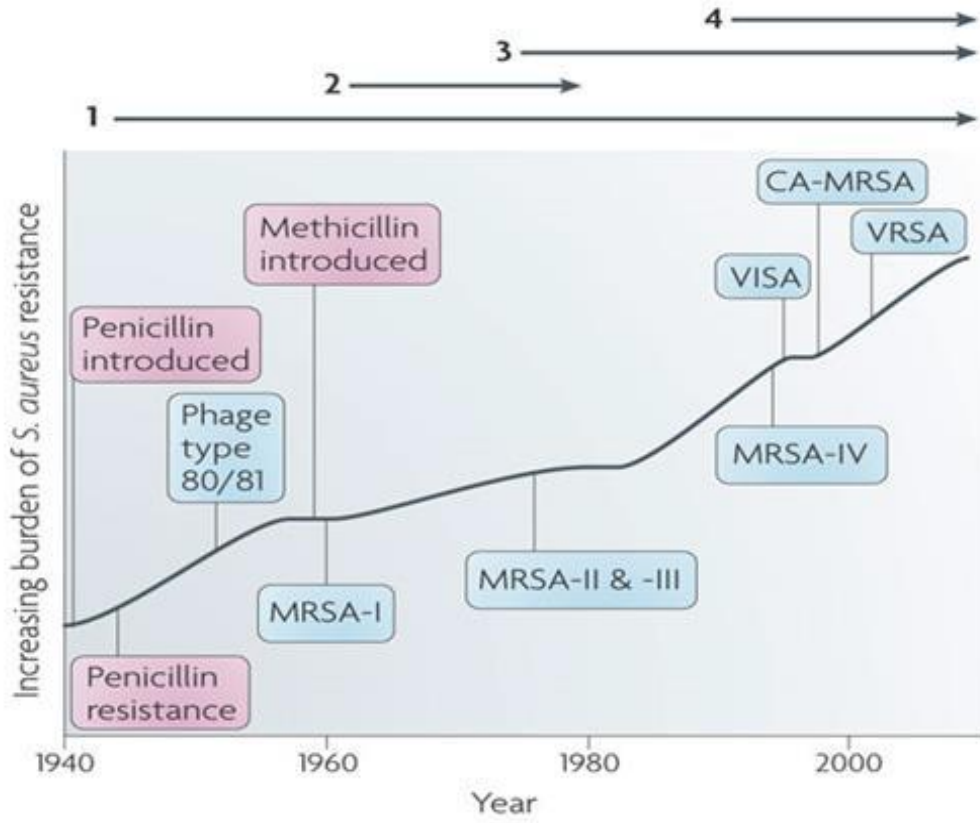
Stafilocoklara karşı 1936 yılından itibaren sülfanamidler ve 1940’lı yılların başlarından itibaren de penisilinler kullanılmaya başlanmış, ancak 1944’ten itibaren penisilinazın üretilmesiyle meydana gelen penisilin direnci gittikçe artarak 1966-1967 yıllarında % 80’e kadar ulaşmıştır. Bunu takip eden yıllarda yalnız hastane

kaynaklı değil toplum kaynaklı izolatlarda da penisilin direnci görülmeye başlanmıştır. 1950'li yıllarda günümüzde ST30-TK-MRSA-IV olarak adlandırılan penisilin dirençli faj 80-81 *S. aureus* klonu tüm dünyada gerek hastane kaynaklı gerekse toplum kaynaklı enfeksiyonlara yol açmıştır (Şekil 1.1). 1961 yılında metisilin kullanılmaya başlanılmış ve kısa sürede bu antibiyotiğe de direnç gelişmiştir. MRSA suşları 1970'li yıllardan beri yaygın olarak tespit edilmeye başlanılmış ve bu bakteriler; penisilinaza dirençli (antistafilokoksik) penisilinler olarak bilinen metisilin, nafsilin, oksasilin gibi ilaçlar ile beraber başka ilaç gruplarına da direnç göstermeye başlamışlardır.

1980'li yılların başlarından itibaren hastanelerde sporadik MRSA suşlarının izolasyonu artmış ve 1982 yılının başından itibaren hastane enfeksiyonu etkeni olan epidemik MRSA suşları ortaya çıkmıştır. Ayrıca, 1980'lerden itibaren KNS'lerin de çok önemli nozokomiyal enfeksiyonların etkeni olduğu; sepsis, endokardit ve osteomyelit gibi değişik tablolar yapabildiği gösterilmiştir.

1956 yılında kullanıma giren vankomisin, ilk yıllarda saf preparatlarının hazırlanamamış olmasından dolayı bir süre sonra terk edilmiş, ancak MRSA grubu bakterilerin yaygın hale gelmesiyle tekrar kullanılmaya başlanılmış ve bu enfeksiyonların başarıyla tedavi edilmesini sağlamıştır. Ancak stafilokoklar, bu ilaca karşı da direnç geliştirmeye başlamış ve vankomisine orta derecede dirençli ilk suş 1997'de Japonya'dan bildirilmiş olup bu durumu takip eden yıllarda ABD, Fransa, Kore, Güney Amerika, Brezilya ve İskoçya gibi pek çok ülkeden azalmış vankomisin duyarlılığını bildiren çalışmalar rapor edilmiştir. Bu durum stafilokoklarda vankomisin direncinin global bir sorun olduğuna işaret etmiştir.

2002 ve 2004 yıllarında ABD'den bildirilen 3 VRSA suşun ($MİK \geq 32\mu\text{g/ml}$) *vanA* genini taşıdığı saptanmış ve bu izolatlar "vankomisin dirençli *S. aureus*" (VRSA) olarak adlandırılarak bu konudaki endişeleri iyice arttırmıştır [12,13].



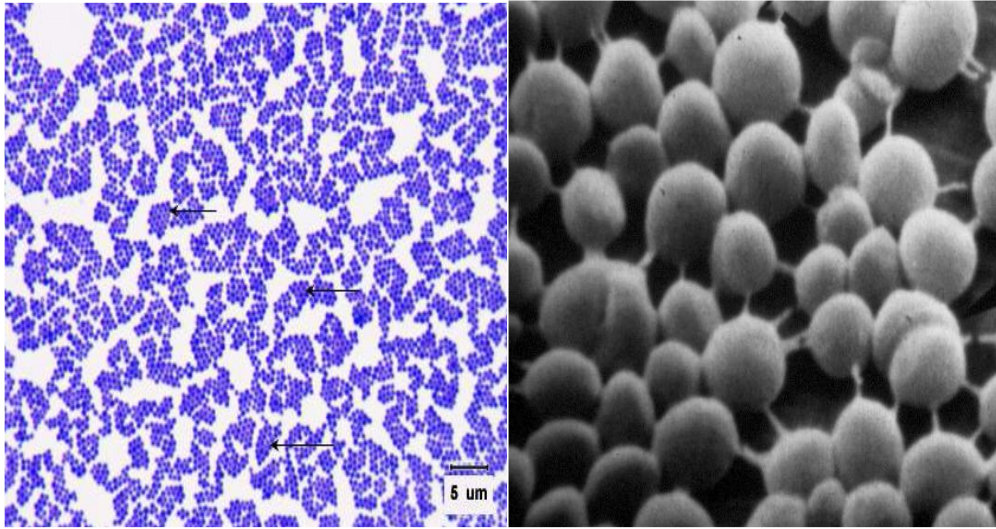
Şekil 1.1. *S. aureus* suş'unun yıllara göre antibiyotik dirençliliği [14]

Baird-Parker 1974 yılında *Staphylococcus*'ları koagülaz reaksiyonlarına göre üç tür olarak (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*) tanımlamıştır. Daha sonraki yıllarda ise DNA homoloji çalışmaları, immunokimyasal ve biyokimyasal özellikler temel alınarak 22 tür daha tanımlanmıştır. *Staphylococcus*'ların hayvanlarda konukçu olan *S. intermedius*, *S. hyicus*, insanlarda konukçu olan *S. aureus* dışında diğer 19 tür koagülaz negatif stafilokok (KNS) türleridir.

Bu türler; *S. arlettae*, *S. auricularis*, *S. capitis*, *S. caprae*, *S. caseolyticus*, *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. equorum*, *S. gallinarum*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. koossii*, *S. lentis*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri*, *S. simulans*, *S. saccharolyticus*, *S. warneri* ve *S. xylosus*'tur [11].

1.1.1.2. Stafilokoklar'ın Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

Staphylococcus genusunda bulunan bakteriler tekli, ikili, dörtlü hücreler halinde bulunabilirler, üç veya dört hücreden oluşan kısa zincirler yapabilirler ve düzensiz üzüm salkımı benzeri şekiller oluştururlar (şekil 1.2) [15]. Hareketsiz, spor oluşturmayan, katalaz pozitif ve genellikle koagülaz pozitif, oksidaz negatif, kapsülsüz, anaerob olan ve karbohidratlardan gaz oluşturmayan *S. saccharolyticus* ve *S. aureus subsp. anaerobius* haricinde fakültatif anaeroblardır. Birçok türünde karotenoid pigment bulunabilir. Stafilokokların, sporsuz olmalarına rağmen kuruluğa dayanıklılıkları fazladır. Sporsuz bakteriler içinde evre şartlarına ve dezenfektanlara karşı en dayanıklı olan bu bakteri grubu, kültürel ortamlarda 4°C'de 2-3 ay, 20°C'de ise 3-6 ay canlılıklarını korumaktadırlar [12,15,16].



şekil 1.2. *S. aureus*'un ışık mikroskobu görüntüsü (solda) [2009] ile taramalı elektron mikroskop görüntüsü (sağda) [2000] [17]

Staphylococcus lar optimum 30-37°C sıcaklıkta, pH 7-7.5'da gelişirler, % 10-15 arasındaki tuz konsantrasyonunda ise gelişmeleri oldukça iyidir [11].

Stafilokoklar, başta glikoz olmak üzere birçok karbonhidratı fermentatif olarak parçalar ve son ürün olarak laktik asit meydana getirirler (Glikozu, Emb'den Meyerhoff glikolitik yolu ile ya da heksomonofosfat glikolitik yolu ile piruvata metabolize ederler). Lizostafine duyarlı, lizozime dirençlidirler. Mannitole etkileri değişkenlik gösterir, özellikle *S. aureus* bu şekere etkilidir ancak koagülaz negatif olanlar bu şekeri parçalayamaz. Bundan dolayı mannitol fermantasyonu bu bakteriyi diğerlerinden ayırmada kullanılan bir özelliktir [11,12,15].

Stafilokoklar basit besiyerleri dahil birçok besiyerinde ürerler. Ancak kanlı besiyerlerinde daha iyi çoğalırlar. *S. aureus*'a ait koloniler geniş (0.5-1.5µm çapında), düzgün, yuvarlak, yüzeyden hafifçe kabarık, yarı-mat görünümündedir [12,15]. Kanlı agarda değişik tipte (α , β , γ , δ , ϵ) hemolizli koloniler oluştururlar (Şekil 3.2). Kültürlerin karbondioksitli (CO₂) ortamda uzun süre inkübe edilmeleri halinde hemoliz daha belirgindir. 60°C'lik ısıya 30 dakika dayanabilirler. γ -radyasyona oldukça dirençlidirler [11].

Proteaz, lipaz ve esteraz enzimleri vardır. Aerobik üreyebilmek için aminoasit, adenin ve tiamine de ihtiyaç duyarlar. Anaerob şartlarda inkübe edilen bakteriler ilave olarak urasil ve piruvata da ihtiyaç gösterirler. % 40 safra bulunan ortamda da üreyebilirler [11]. İnsanlarda enfeksiyonlarına rastlanan başlıca stafilokok türlerinin önemli özellikleri Çizelge 1.1.' de özetlenmiştir [18].

Çizelge 1.1. Stafilokok türlerinin belirgin ayırt edici özellikleri [18]

Özellikler	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermis</i>	<i>S. capitis</i>	<i>S. warneri</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. hominis</i>	<i>S. auricularis</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. cohnii</i>	<i>S. simulans</i>	<i>S. intermedius</i>
Pigment	+ z	-	-	d	d	d	-	d	-	-	-
Aerop üreme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Anaerop üreme	+	+	(+)	+	(+)	- z	- z	(+)	d	+	(+)
% 10 NaCl'da üreme	+	z	+	+	+	z	+	+	+	+	+
% 15NaCl'da üreme	z	-	- z	z	d	-	z	d	d	z	d
Asetoin oluşturma	+	+	d	+	d	d	d	+	d	-z	-
Sükroz	+	+	(+)	+	+	(+)	d	+	-	+	+
Maltoz	+	+	-	(+)	+	+	(+)	+	(d)	-z	z
D-Mannitol	+	-	+	d	d	-	-	d	d	+	d
D-Mannoz	+	(+)	+	-	-	-	-	-	d	d	+
D-Trehaloz	+	-	-	+	+	d	(+)	+	+	d	+
α - Laktoz	+	d	-	d	d	d	-	d	-	+	d
Hyalüronidaz	+	d									
Üreaz	+ z	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
Koagülaz	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Hemoliz	+	- z	- z	d	(+)	- z	-	-	d	- z	d
DNase	+	- z	z	d	d	- z	- z	-	- z	z	+
Isıya dirençli Nükleaz	+	- z	-	-	-	-	-	-	-	- z	+
Novobiosin'e direnç	-							+	+		

+ = % 90'dan çok olumlu,

- = % 90'dan çok olumsuz,

d= Değişken,

() = Gecikmeli Tepkime,

z = Zayıf Tepkime

1.1.2. Hücre Yapısı

1.1.2.1. Genom

Bakteri genomu; yaklaşık 2000-3000 kbp bir kromozom ile profajlar, plazmidler ve transpozonlardan oluşur. *S. aureus* genomu ise, 2500'e yakın geni kodladığı düşünülen 2800 kbp uzunluğunda sirküler tek bir kromozomdan oluşur. Antibiyotik direnci ve bakteri virülansından sorumlu olan genler bu kromozom veya ekstrakromozomal yapılar üzerinde bulunabilir [12,19].

1.1.2.2. Hücre Duvarı Yapısı

Stafilokokların hücre duvarı peptidoglikan, teikoik asit ve protein A olmak üzere üç ana komponentten oluşur. *S. aureus*'un hücre duvarının esas komponenti ise hücre duvarı ağırlığının % 50'sini oluşturan peptidoglikan polisakkarit tabakasıdır.

Peptidoglikan; hücre duvarının esas yapısını oluşturan, hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilerde bulunan karmaşık bir makro moleküldür. Yapısının temel taşı glikan zincirleridir. Glikan zincirleri, N-asetil glukozamin ve N-asetil müramik asit birimlerinin dönüşümlü bir şekilde sıralanmasıyla oluşan disakkarit zincirlerden oluşur. Glikan zincir üzerinde, müramik asidin laktil grubuna bağlı tetrapeptid yapısı bulunmaktadır. Tetrapeptidin üçüncü pozisyonundaki diaminoasit ile diğer tetrapeptidin dördüncü pozisyonundaki D-Alanin arasında çapraz bağlar oluşur. Peptidoglikan tabakadaki çok sayıdaki çapraz bağ, bu bakterilerin hücre duvarlarının çok sağlam bir yapıya sahip olmasını sağlayarak konak dokularında bu bakterilerin canlılıklarını sürdürebilmelerini sağlar [20].

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

Hücre duvarının diğeri bir önemli komponenti ise hücre duvarı ağırlığının % 40'ını oluşturan teikoik asittir. Teikoik asit, fosfodiester bağları ile bağlı ribitol birimlerinden oluşan suda çözülebilen bir polimerdir [20]. Hücre duvarında bulunan teikoik asit, mukozalarda bulunan özgül reseptörler (fibronektin, fibrinojen, laminin, trombospondin, elastin, kollajen, vitronektin ve sialoprotein) ile birleşerek stafilokokların enfeksiyon bölgesine yapışmasını sağlar [12]. Sadece Gram pozitif bakterilerin hücre duvarında bulunan bu yapı hücre yüzeyine negatif yük vererek çeşitli metal iyonlarının, katyonların lokalizasyonunda ve otolitik enzimlerin aktivasyonunda rol oynar.

Bu asit ayrıca virülans faktörü olarak birçok özelliğe daha sahiptir. Bunlar arasında inflamasyon hücrelerinin kemotaksisini inhibe etmesi ve antikör üretimini sitimüle etmesi sayılabilir [20]. Teikoik asit, peptidoglikan tabakaya ya da lipofilik zincir arasında sitoplazmik membrana kovalent olarak bağlanmış, türe özgü fosfat içeren polimerlerden oluşur. Kalınlığı, bakteri türüne göre değişmekle birlikte 10-12 nm arasındadır.

Teikoik asitler buldukları yere göre 2 kısma ayrılır. Bunlar; hücre duvarı teikoik asitleri ve membran teikoik asitleridir. Hücre duvar teikoik asitlerinden N-asetil glukozamin (GlcNAc) rezidüleri içeren ve polisakkarit A olarak da adlandırılan ribitol teikoik asit *S. aureus*'ta, glikozil rezidüleri içeren ve polisakkarit B olarak adlandırılan gliserol teikoik asit ise *S. epidermidis*'te bulunur [12].

Peptidoglikan yapının en dışındaki hücre duvar komponenti ise protein A'dır ve bu yapı sadece *S. aureus* da bulunur. Protein A; duvarın yaklaşık % 7'sini oluşturur, organizmayı fagositoza karşı korur ve kompleman aktivasyonunu sağlar.

S. aureus hücre duvarları, protein A aracılığıyla IgG molekülünün Fc bölgesine bağlanabilmektedir. Protein A immüoglobulinlerin Fc reseptörlerine bağlanarak bakteriyi antikora bağlı fagositozdan korur. Ayrıca hücre dışına salgılanan protein A aynı reseptörlere bağlanarak komplemanın tüketimine neden olur ve komplemana bağlı vücut savunmasından bakteri korunur.

Protein A virülans faktörü olarak da rol oynar. Aynı zamanda immünoglobulinlerle nonspesifik olarak etkileşime girdikleri ve antifagositik özellik gösterdikleri için konakta aşırı duyarlılık tepkimelerine de yol açabilmektedir [20].

1.1.3. Virülans ve Patojenik Önemleri

Çeşitli kaynaklardan izole edilen ve tanımlanan *Staphylococcus*'ların *invivo* ve *invitro* olarak üretildiği ortama salgıladıkları ve konakçı üzerinde etki gösteren ekstraselüler maddeler (toksin ve enzimler) ve selüler maddeler (peptidoglikan, kapsüler substantlar, clumping faktör ve protein A) vardır. Bunlardan ekstraselüler olanların patojenite ile yakından ilişkili olduğu uzun yıllardır bilinmektedir. Bu nedenle, *Staphylococcus*'larda bulunan ekstraselüler maddelerin tespit edilmesi bu mikroorganizmaların tanımlanmasında önemli yer tutmaktadır [11].

Virülansı en yüksek olan stafilokok türü ise *S. aureus*'tur. Ancak enfeksiyon olup olmaması mikroorganizmanın virülansı ile konak savunma sisteminin oluşturacakları dengeye bağlıdır [15]. Stafilokoksik enfeksiyonlar; daha önceden kolonize olmuş hastalarda enfeksiyon oluşması şeklinde ya da geçici el kolonizasyonu olan sağlık personelinin hastalara teması ile ortaya çıkabilmektedir. Bu enfeksiyonların patogenezinde rol oynayan mekanizmalar; bakterinin konağa yapışması, anatomik bariyerlerden girişi, fagositik hücrelerin inaktivasyonu, konağın hümmoral savunmasının baskılanması ve toksinlerin salgılanması şeklinde özetlenebilir. Enfeksiyonu etkileyen faktörler arasında insanın bağışıklık sisteminin durumu, mikroorganizmanın sayısı ve virülansı, deri ve mukoza bütünlüğünün bozulması sayılabilir.

Burunda stafilokok taşıyanlar önemli bir enfeksiyon kaynağıdır. Bakteri, hava yolu veya temasla da bulaşabilir. *S. aureus*, enfekte ettiği bölgede hızla kolonize olabilen bir bakteridir. Aynı zamanda deri ve mukozadaki minör çatlaklardan invaze olmasını ve konak savunma mekanizmalarının çoğundan kendini korumasını sağlayan biyokimyasal mekanizmalara da sahiptir. Bundan dolayı dolaşım sistemine girdiğinde, bakteriyel endokardit ve yaygın metastatik abselere neden olabilmektedir.

İnsanlardaki stafilokok enfeksiyonlarında *S. aureus* öncelikli patojen olarak yer alır. Bunun haricinde deri ve mukozaların normal flora bakterileri olarak kabul edilen *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus* gibi KNS'ler de enfeksiyona neden olur. Bu bakteriler fırsatçıdır ve konak organizmanın uygun koşullarında enfeksiyon oluştururlar. Bu grup içinde en sık (% 70-80) izole edilen tür olan *S. epidermidis*'in oluşturduğu enfeksiyonlar, genellikle yabancı cisimlerin üzerine yapışma ve bu yüzeyler üzerinde biyofilm oluşturma yeteneği ile açıklanmaktadır [12].

1.1.3.1. Toksinler

S. aureus, enfeksiyonlardaki semptomlardan sorumlu çeşitli toksinler salgılar. Bakteri, Sitolitik toksin (alfa, beta, gamma, delta toksin ve lökositidin), eksfoliyatif toksin, toksik şok sendromu toksini-1 ve farklı tiplerde enterotoksin üretir [21,22].

1.1.3.1.1. Sitolitik Toksinler

Eritrositler ve çeşitli hücreler üzerine sitolitik etki gösterirler. Bunlardan en iyi tanımlananları hemolizinler ve lökositindir.

Hemolizinlerin belirli hayvan eritrositlerini eritmelerine göre alfa, beta, gamma ve delta olmak üzere çeşitli tipleri mevcuttur. Alfa hemolizin; tavşan, beta hemolizin; koyun, öküz, gamma hemolizin; tavşan, insan, koyun, delta hemolizin; insan, koyun, tavşan ve maymun eritrositlerini eritir [23].

Alfa (α) hemolizin, *S. aureus* suşlarının ana hemolizindir. Bakteriyel kromozomlarda ve plazmidlerde kodlanır. İnsan makrofaj ve trombosit hücre membranları üzerinde litik etkiye sahiptir ancak monositlere etkisizdir. Hemolitik, dermonekrotik ve sitolitik etkileri vardır [24,25,26].

Beta (β) hemolizin, en iyi koyun eritrositlerine, daha az olarak da insan ve tavşan eritrositlerine litik etki gösterir. Sfingomiyelinazdır ve sfingomiyelin içeren zarlara

etki eder. Toksinin en önemli özelliği sıcak-soğuk lizis yapabilme yeteneğine sahip olmasıdır. Bu toksinin hemolitik aktivitesinin 37°C’de inkübasyondan sonra +4°C’de tutulduğunda arttığı gözlemlenmiş ve buna bağlı olarak sıcak-soğuk toksin olarak adlandırılmıştır. Eritrositler üzerindeki etki soğukla artar [25,26].

Delta (δ) hemolizin, *S. aureus* suşlarının % 97’si tarafından üretilmektedir. Koagülaz negatif stafilokokların da % 50-70’inin bu toksini ürettiği belirtilmektedir. Geniş bir sitolitik aktiviteye sahiptir. Hücre membranını deterjan benzeri bir etkiyle parçaladığı düşünülmektedir.

Gamma (γ) hemolizin, insan, koyun, tavşan gibi farklı türlerin eritrositlerini ve ayrıca insan lenfoblastik hücrelerini parçalayabilme yeteneğine sahiptir. *S. aureus* suşlarının hemen hepsi tarafından üretilmektedir. Belirgin hemolitik aktivitesi olmasına rağmen etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir [21,22].

Lökosidin (Panton-Valentin lökosidin), polimorf nüveli lökosit, monosit ve makrofajlar üzerine etkilidir. Elektroforetik olarak birbirinden ayrılan F (fast) ve S (slow) adı verilen iki proteinden oluşur. Gamma toksin (hemolizin) ile sinerjistik etki gösterir ve antijeniktir. Lökosidin etkisinde kalmış lökositlerin katyon permeabilitesi değiştiğinden hücre hareketini kaybederek şişer ve granüllü, yuvarlak bir şekle dönüşerek parçalanır [23].

1.1.3.1.2. Eksfoliyatif Toksin (Eksfoliyatin)

Ciltte yaygın büller ve cildin soyulmasıyla karakterize bir klinik tablo olan stafilokokal haşlanmış deri sendromu (staphylococcal scalded skin syndrome; SSSS)’na yol açan bir toksindir. Özellikle yeni doğan epidermisinde ciddi sonuçlara yol açar.

Eksfoliyatif toksinin eksfoliyatif toksin-A (ET-A) ve eksfoliyatif toksin-B (ET-B) olmak üzere iki farklı tipi vardır. Birincisi ısıya dirençli ve kromozomal genlerde

kodlanırken, ikincisi ısıya duyarlıdır ve sentezi plazmit genlerinin kontrolü altındadır. Bir suş her ikisini salgıladığı gibi, her ikisini de salgılamayabilir [23,27].

1.1.3.1.3. Toksik Şok Sendromu Toksini -1 (TŞST-1)

Birçok *S. aureus* suşları tarafından salınan aynı zamanda bir süper antijen olabilen bu toksin, toksik şok sendromuna (TŞS) neden olur. Sağlıklı insanların yaklaşık % 90'ında TSST-1'e karşı koruyucu antikorlar bulunur.

Isıya ve proteolitik enzimlere karşı dirençlidir. *S. aureus* suşlarının % 5-25'i TŞST-1 geni taşır. TSST-1'in *S. aureus* dışındaki türlerde varlığı halen tartışma konusudur. Ancak, KNS'lerin ve A grubu streptokokların da TŞS'na yol açabildikleri bilinmektedir [23,27,28,29].

1.1.3.1.4. Enterotoksin

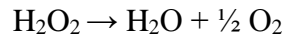
S. aureus suşlarının yaklaşık üçte biri çeşitli enterotoksinler üretir. Kimyasal ve immünolojik olarak 6 farklı (A, B, C, D, E, G) tipi vardır. Bir suş bu toksinden yalnız birini veya bir kaçını oluşturabilir. Enterotoksinler ısı ve gastrointestinal enzimler tarafından hidrolize karşı oldukça dirençlidir. Besin zehirlenmesine neden olur. 100°C de 30 dakika kaynatılmaya dayanabilirler. Bu nedenle enterotoksin üreten stafilokoklar besin ürünlerini kontamine eder ve toksinlerini salgılayorsa, yiyeceğin yeniden ısıtılması koruyucu olmaz. İnsanda en sık A tipi enterotoksin hastalık yapar [23,27].

1.1.4. Stafilokoklar'ın Sahip Olduğu Enzimler

1.1.4.1. Katalaz

Katalaz testi, katalaz enziminin varlığının gösterilmesi için yapılır [10]. *Micrococcaceae* ailesi içinde yer alan stafilokoklar ile *Streptococcaceae* ailesi içinde bulunan streptokokları birbirinden ayırmada kullanılan önemli bir testtir. Stafilokokların dahil olduğu *Micrococcaceae* ailesi katalaz pozitifken, streptokoklar katalaz negatif özellik gösterirler [23].

Tüm stafilokoklar tarafından salgılanan bu enzim, hidrojen peroksiti (H₂O₂), su (H₂O) ve oksijene (O₂) parçalayarak etkisiz hale getirir (Şekil 3.3). Dolayısıyla toksik olan hidrojen peroksiti inaktive ederek mikroorganizmayı konağın savunma mekanizmalarına karşı korur. Bakteriler, bu enzim sayesinde fagositlerin içinde toksik oksijen radikalleri tarafından öldürülmeye direnç kazanır. Eritrositler katalaz enzimine sahip olduğundan, test kan içermeyen besiyerlerinde üretilmiş bakterilerde yapılır [21,22,27].



(Biyokimyasal tepkime Katalaz enzimi varlığıyla gerçekleşir)

1.1.4.2. Koagülaz (Prokoagülaz)

S. aureus ve insanda patojen olmayan bazı türler (*S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. lugdunensis*, *S. schleiferi*) tarafından salgılanan, kan plazmasını pıhtılaştıran ekstrasellüler bir proenzimdir. Bu test bakterinin patojenliğini belirler. *S. aureus* suşları serbest ve hücreye bağlı olmak üzere iki çeşit koagülaz üretir. Serbest koagülaz plazmada bulunan CRF (Coagülaz-Reacting Factor) ile reaksiyona girerek pıhtılaşmaya neden olur. Hücreye bağlı olan koagülaz, kümeleşme faktörü (Clumping Faktor) olarak isimlendirilir. Kümeleşme sırasında CRF'ye gereksinim yoktur ve doğrudan plazmadaki fibrinojene etki eder ve stafilokokların

kümeleşmelerine yol açar. Koagülaz testi *S. aureus* için standart bir belirleyicidir. Koagülaz pozitif stafilocokların üzerinde oluşan fibrin tabakası bakteriyi fagositoza karşı koruyarak patojenitesini arttırır.

Koagülaz testi, *S. aureus*'un diğer stafilocok türlerinden ayırımında kullanılan bir test yöntemidir. İnsanlarda patojen olan ve plazmayı pıhtılaştırın tek tür *S.aureus*'tur; bunu koagülaz negatif olan *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus* izler [21,22,23,27].

S. aureus için patojenliğin en önemli ölçütü koagülaz enziminin varlığıdır ve bu suşun iki türlü koagülaz enzimi ürettiği bilinmektedir. Bunlardan bir tanesi hücre duvarına bağılı olarak kalmakta, diğeri ise hücre dışına salgılanmaktadır. Koagülaz testi tüpte veya lamda olmak üzere iki şekilde yapılabilmektedir (Şekil 3.4 ve Şekil 3.5) [10].

Lamda koagülaz testiyle; hücre duvarı yüzeyinde bulunan bağılı koagülaz (clumping faktör), tüpte koagülaz testiyle salgılanmış ekstraselüler koagülaz araştırılır [27].

Nadir olarak *S. aureus* suşları koagülaz negatif olabilir ve özellikle metisiline dirençli suşlarda, lam deneyi ile koagülazın negatif olarak bulunabileceği belirtilmektedir [27,30,31].

1.1.4.3. Stafilokinaz (Fibrinolizin)

S. aureus suşlarının çoğu tarafından plazminojeni aktive eden stafilokinaz adı verilen bir madde salgılanır. Stafilokinaz, plazmadaki plazminojeni aktive ederek plazmine (fibrinolizin) dönüşmesini ve böylece fibrin erimesine neden olur. Stafilokinaz, fibrini eriten proteolitik bir enzim olduğundan bakterinin dokular arasında yayılmasını sağlar [23].

1.1.4.4. Hiyalüronidaz

Hücre aralarında bulunan hiyalüronik asidi depolimerize ederek bakterinin yayılmasını sağlar. Hiyalüronidaz enzimi antijeniktir ve özgül antikolar ile nötralize olur [23].

1.1.4.5. Beta-laktamaz (Penisilinaz)

Beta-laktam antibiyotikleri etkisiz hale getirerek bakterinin bu grup antibiyotiklere direnç kazanmasına ve dolayısıyla tedavinin başarısız sonuç vermesine yol açar. Çoğu, plazmidler tarafından kodlanır [23].

1.1.4.6. Lipaz

Lipidleri hidrolize eden enzimdir. Vücudun yağlı bölgelerinde bakterinin kolonize olmasını sağlar. Kronik fronküle neden olan *S. aureus* suşları tarafından salgılanarak bakterinin kütan ve subkütan dokulara yayılmasına yardımcı olur [23].

1.1.4.7. Deoksiribonükleaz (DNaz)

DNA'yı hidrolize eden ve ısıya dirençli olan DNaz enzimi *S. aureus* suşlarının % 90'dan fazlası tarafından üretilmektedir [26].

1.1.4. *S. aureus*'un Epidemiyolojisi

Toplum kökenli (TK-MRSA) ve hastane kökenli (HK-MRSA) enfeksiyonların önde gelen etkenlerinden olan *S. aureus*, hayatı tehdit eden ciddi enfeksiyonlara yol açabilmektedir. Özellikle metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) suşlarında çoklu antibiyotik direnci geliştiğinden dolayı MRSA ile oluşan ağır enfeksiyonların tedavi

seçenekleri çok azdır. MRSA özellikle nozokomiyal enfeksiyonların önde gelen etkenlerinden olmakla birlikte, son yıllarda TK-MRSA enfeksiyonları da giderek önem kazanmaya başlamıştır [32].

S. aureus sporsuz bakteriler içerisinde en dayanıklılarından. Kuruluğa, ısıya, yüksek tuz içerikli ortama dayanıklıdır. Bu nedenle etkili antibiyotiklerin, hastane enfeksiyonu kontrol programlarının ve uygun halk sağlığı koşullarının varlığına rağmen hala önemli sorunlar yaratan patojenlerdendir.

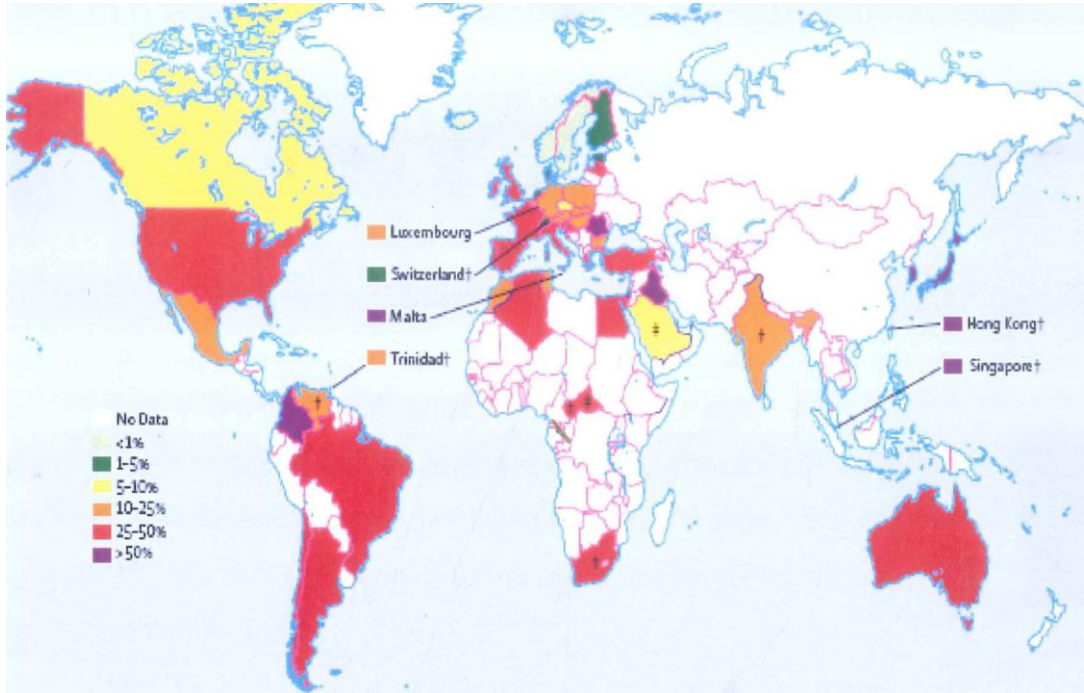
S. aureus kolonizasyonu yenidoğanda başlar. Bakteri önce göbek kordonu sonra da burunda ortaya çıkar. Yetişkinde en sık ön burun boşluğu ve perinede yerleşir. Deri ve gastrointestinal sistem taşıyıcılığı da vardır. Genellikle ilk yerleşen bakteri ömür boyu kalır ve yeni suşların yerleşimi flora tarafından önlenir. Bu durum antibiyotik kullanımı sonrasında değişebilir. Floranın bozulması başka suşların yerleşmesine yol açabilir. Bu durum özellikle hastanelerde görülür ve yatan hastalarda dirençli *S. aureus* suşları kolonize olur. Hastanede yatan hastalar ve hastane personeline bu tür suşların taşınma oranı toplumdan daha yüksektir. Yetişkinlerde burun taşıyıcılığı oranları toplumda % 20-40 arasında değişirken, hastane popülasyonunda % 90'a kadar çıkabilir. Taşıyıcılardan bulaşma temas veya damlacık yoluyla olabilir. Taşıyıcılığın klinik önemi vardır. Cerrahi işlem sonrası *S. aureus* enfeksiyonu gelişme olasılığı taşıyıcılarda daha sıktır.

Yaşlılar, immün yetmezliği olanlar, yoğun bakım ve yanık ünitelerindeki hastalar, intravenöz kateteri olanlar, cerrahi yarası olanlar MRSA enfeksiyonu için daha yüksek risk taşıyan gruplardır. Ayrıca hastanede kalış süresinin uzaması, önceden antibiyotik kullanmış olmak ve taşıyıcı veya enfekte olan kişilerle yakınlık da kolonizasyon ve enfeksiyonu kolaylaştırır [33].

Farklı hastanelerde MRSA enfeksiyon oranı % 50'ye ulaşmakta ve bu durum yüksek bir ekonomik yüke neden olmaktadır [34].

Stafilokoklarda metisilin direnç oranları ülkeler, bölgeler, hastaneler, hatta aynı hastanenin servisleri arasında bile değişiklik göstermektedir. 1999-2002 yılları

arasında gerçekleştirilen yirmi altı Avrupa ülkesini kapsayan çalışmada İtalya (% 40.9), İngiltere (% 41.5), Malta (% 43.8) ve Yunanistan (% 44.4) metisilin direncinin en yüksek olduğu ülkeler olup; İzlanda (% 0.5), Danimarka (% 0.6), Hollanda (% 0.6), İsveç (% 0.8) ve Estonya (% 0.9) ise metisilin direncinin en düşük olduğu ülkeler olarak bildirilmiştir [35]. 2003-2005 yıllarında Akdeniz ülkelerini kapsayan ve ülkemizin de yer aldığı çalışmada en düşük MRSA oranları, Lübnan (% 12), Tunus (% 18) ve Fas'da (% 19); en yüksek MRSA oranları ise Ürdün (% 56), Kıbrıs (% 55) ve Mısır'da (% 52) saptanmıştır. Bu çalışma kapsamında Türkiye'deki metisilin direnci ise % 39 olarak bildirilmiştir [36]. Çeşitli çalışmalarda da Türkiye'de % 14-73.8 arasında değişen metisilin direnç oranları bildirilmektedir. Dündar ve arkadaşlarının [32], 2005, 2006, 2007 yılları arasında yaptıkları çalışmada klinik örneklerden izole edilen *S. aureus* suşlarında 2005 yılında yaptıkları % 34, 2006 yılında % 14, 2007 yılında ise % 21 oranında metisilin direnci saptamışlardır.



Şekil 1.3. Dünya'da ülkeler bazında MRSA prevalansı [34]

1.1.6. *S. aureus*'un Oluşturduğu Enfeksiyonlar

S. aureus toplum kökenli sepsislerin en önemli nedenidir ve en önemli hastane patojenidir. Hastalık geniş yelpazede toksin bağımlı hastalıklar (besin zehirlenmesi, haşlanmış deri sendromu ve toksik şok sendromu gibi), cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları (fronkül, selülit, impetigo gibi), derin enfeksiyonlar (kemik, eklem, kalp kapağı, dalak ve akciğer gibi hemen hemen her bir organı tutabilir), akciğer ve üriner sistem enfeksiyonları olarak görülebilir. *S. aureus* bakteriyemisinin önemli bir komplikasyonu organizmanın bir veya daha fazla uzak bölgesine yayılmasıdır. Diğer klinik tablolar ise, cerrahi yara enfeksiyonu, ventilatör ile ilişkili pnömoni, intravenöz katater nedenli bakteriyemi ve serebrospinal sıvı şantları, prosterik eklemler, vasküler greftler gibi protezlere bağlı enfeksiyonlar şeklinde görülen hastane enfeksiyonlarıdır. Farklı hastanelerde MRSA enfeksiyon oranı % 50'ye ulaşmakta ve bu durum yüksek bir ekonomik yüke neden olmaktadır [37].

1.1.7. Stafilokoklar'da Tanı

Stafilokokların laboratuvar tanısında koloni morfolojisi, boyanma özelliği, pigment üretimi, hemoliz, mannitol fermantasyonu, yüksek tuz konsantrasyonlu ortamda üreme gibi özelliklerine bakılarak değerlendirme yapılır. Stafilokokların tür tanısında en çok kullanılan yöntemler koagülaz ve DNaz deneyleridir. Protein A'nın gösterilmesi, ticari hazırlanmış kitler (API), DNA prob yöntemi ve PZR gibi moleküler teknikler de tanıda kullanılabilir [23]. *S. aureus*'un bütün suşları koagülaz pozitif olup mannitolü fermente ederler. Stafilokokların tanısında kullanılan ticari kit tanımlama sistemleri ve otomatize sistemler stafilokok türlerini % 70 ile % 90 doğrulukta ve nispeten hızlı ve kolay şekilde tanımlamaktadır [37].

Lokal veya sistemik hastalıklarda alınacak uygun örneklerden (cerehat, balgam, beyin omurilik sıvısı, idrar, kan, biopsi) yapılacak preparatta üzüm salkımı şeklinde kümelenmiş Gram pozitif kokların görülmesi ve kültür besiyerinde bakterinin üretilmesi ile tanı konur. Toksinlerle gelişen hastalıklarda ise lezyonlarda bakteri saptanmaz. Klinik bulgular tanıda yardımcı olmaktadır [33].

1.1.8. *S. aureus*'da Metisilin Direnç Mekanizması

Beta-laktamaz enzimiyle hidrolize olmayan beta-laktam antibiyotiklere (metisilin, oksasilin, nafsilin, kloksasilin, dikloksasilin) karşı olan direnç metisilin direnci olarak adlandırılır [38].

1.1.8.1. İntrensek (Kromozomal) Metisilin Direnci

En sık rastlanılan dirençtir. Bu direnç yeni bir penisilin bağlayan protein (PBP) sentezi ile gerçekleşir. PBP'ler bakteri hücre membranında bulunan beta-laktam antibiyotiklerin bağlandığı hedef proteinlerdir. Bu proteinler bakteriyel hücre duvarının sentezi esnasında peptidoglikan ağın birleşmesinde terminal çapraz bağlanma reaksiyonunu katalizleyen enzimlerdir. Metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA) suşlarında, beş adet PBP bulunurken, MRSA'larda bunlara ek olarak PBP 2' ya da PBP 2a olarak adlandırılan 78 kDa ağılıkta olan farklı bir PBP sentezlenmektedir. PBP 2a, diğer PBP'lerden farklı olarak beta-laktam yapısındaki antibiyotiklere karşı düşük afinite göstermektedir. Dolayısıyla, beta-laktam grubu antibiyotik varlığında, yüksek afiniteli PBP'lerin fonksiyonunu görerek peptidoglikan sentezini sürdürebilme yeteneğinde olan tek transpeptidazdır. Beta-laktam grubu antibiyotikler, normalde hücre duvarında yer alan PBP'lere bağlanarak peptidoglikan sentezini engeller. MRSA'larda ise bu antibiyotikler PBP 2a'ya bağlanamazlar ve bunun sonucunda peptidoglikan sentezi devam eder. PBP 2a'yı kodlayan gen 2,1 kb büyüklüğünde olan ve *mecA* olarak adlandırılan bir genidir. *mecA* geninin ekspresyonu *mecR1* ve *mecI* genleri ile kontrol edilir. *mecR1* geni, sinyal dönüştürücü (signal transducer) bir protein olan MecR1'i, *mecI* geni de represör bir protein olan MecI'yı kodlamaktadır. Beta-laktam grubu antibiyotik ortamda yokken MecI, hem *mecA* hem de *mecR1* genlerinin transkripsiyonunu inhibe eder.

MecR1, transmembran yerleşim gösteren bir proteindir. Ortamda bulunan beta-laktam yapısındaki antibiyotikleri hücre dışı yerleşim gösteren penisilin bağlayan domaini sayesinde algılar ve otomatik olarak parçalanır. Bunun sonucunda

sitoplazmik yerleşim gösteren metalloproteaz, *mecA* geninin operatör bölgesine bağlı bulunan *MecI*'yi parçaladıktan sonra *mecA* geninin operatör bölgesine bağlanarak *mecA*'nın transkripsiyonuna yol açar. Ayrıca *mecR1* ve *mecI* geni, IS1272 veya IS431 insersiyon dizileri nedeniyle delesyona uğrayabilirler ki bu da *mecA* geni üzerindeki baskının ortadan kalkması ile sonuçlanır. Tüm MRSA'lar da bu gen bulunmasına rağmen metisiline duyarlı (MSSA) olan suşlarda bu gen bulunmamaktadır. *mecA* geni, bakteri kromozomunda *SCCmec* kaseti üzerinde yer alır. *SCCmec* kasetinin, büyüklükleri 20 kb'dan 68 kb'a kadar değişkenlik gösteren 5 alt tipi (Tip I-V) bulunmaktadır. Tip I, IV ve V sadece yapısal genler, regülatör genler ve rekombinaz genlerini içerir. Bu alt tiplerde, transpozon elemanları ve beta-laktam antibiyotik dışındaki antibiyotiklere dirençten sorumlu olan genler bulunmamaktadır.

Metsilin direncinin fenotipik olarak ortaya konması bakteriler arasında değişkenlik göstermektedir. Tüm MRSA suşları PBP 2a oluşturmalarına rağmen, direnç değişik derecelerde ortaya çıkmaktadır. Bir başka deyişle, metisilin direncinin fenotipik olarak eksprese edilmesi, homojen ya da heterojen olmak üzere iki şekildedir.

Homojen dirençte, bakterilerin hepsi yüksek konsantrasyondaki metisilin varlığında üreyebilme özelliği göstererek yüksek düzeyde direnç ortaya koyarlar. Heterojen dirençte ise, o bakteri topluluğunda bulunan tüm bakteriler metisilin direnci için gerekli olan bilgiyi yani *mecA* genine sahip olmalarına rağmen bu topluluğun sadece belirli bir kısmında direnç açığa çıkar. Bu konuda yapılan çalışmalar, yüksek tuz konsantrasyonu ve düşük sıcaklık gibi bazı çevresel koşulların hücre otolizindeki değişikliklerle ilişkili olduğunu düşündürmüştür. Örneğin; ortama % 4 NaCl'nin eklenmesi, PBP 2a miktarını arttırmamasına rağmen direncin eksprese edilmesini arttırdığını gözlemlemişlerdir. Yüksek tuz konsantrasyonunun ya da 30°C 'de inkübasyonun, otolizini inhibe ederek etki gösterdiği düşünülmektedir [17,38,39].

MRSA suşları sıklıkla beta-laktam grubu antibiyotiklere heterojen direnç gösterir, diğer bir ifadeyle kültür ortamı içinde iki alt popülasyon bir arada yer alır. Biri duyarlı iken diğeri dirençlidir. Popülasyondaki her bir organizma direnç için genetik bilgi taşıyabilir, fakat invitro test ortamında sadece küçük bir bölümü (10^{-8} ile 10^{-4})

dirençli fenotipi gösterir. Dirençli alt popülasyon genellikle duyarlı popülasyona göre çok daha yavaş ürer ve laboratuvar taramalarında atlanabilir. Heterojen dirençli suşların bir şekilde tespitinde, dirençli alt popülasyonun üremesine büyük oranda katkı sağlayan faktörler, nötral pH, daha düşük ısılar (30-35°C), ortamda NaCl bulunması ve inkübasyon süresinin (48 saate kadar) uzatılmasıdır [37].

1.1.8.2. Sınırdaki (Borderline) Metisilin Direnci

Aşırı beta-laktamaz üretimine bağlı olarak gelişen bir dirençtir. Bu suşlar metisiline sınırdaki bir direnç gösterdiğinden dolayı bunlara "borderline resistant *S. aureus*" (BORSA) denmektedir. Penisilinaza dirençli penisilinler aslında stafilokokların penisilinaz enzimlerinin hidrolitik etkilerine dayanıklıdır. Fakat bazı suşlar aşırı miktarda penisilinaz oluşturarak metisilin ve oksasilini yavaş ancak önemli ölçüde parçalar. BORSA suşları PBP 2a oluşturmamaları ile MRSA'lerden farklıdır. MRSA izolatlarının, sınırdaki oksasilin direnci gösteren *S. aureus* suşlarından ayırımındaki güçlüklerden dolayı, standart metot olarak PZR'yi rutin olarak kullanmayan klinik laboratuvarlar için MRSA'nın tespiti sorun oluşturabilir. Bununla birlikte, günümüze kadar bu organizmalarla oluşan enfeksiyon olgularında penisilinaz dirençli penisilinler ile yapılan tedavilerde bildirilmiş olumsuzluk yoktur [37,40].

1.1.8.3. Mevcut PBP'lerde Beta-laktam Antibiyotik Afinitesinde Azalma İle Oluşan Metisilin Direnci

Modifiye PBP'lere bağlı metisiline duyarlılık azalmasıyla gelişen bir metisilin direncidir. Bu suşlar beta-laktamaz negatif olup *mecA* geni taşımazlar. Fakat metisiline direnç gösterirler. Çok az sayıdaki bu izolatlarda, mevcut PBP'lerin beta-laktam antibiyotiklere düşük afinite gösterdikleri görülmüştür. Bunun sonucu olarak bu tip dirençli suşlara MODSA (Moderately resistant *S. aureus*) adı verilmektedir. Bu suşlardaki direnç mekanizması var olan PBP'lerdeki nokta mutasyonlarından veya PBP4'ün aşırı yapımından kaynaklanabilir [24,40,41,42].

1.1.9. Metisilin Direncinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

MRSA, hastane kaynaklı enfeksiyonların en önemli etkenlerinden birisidir. MRSA'larda tüm beta-laktam yapısındaki antibiyotiklere ve aynı zamanda diğer grup antibiyotiklere olmak üzere çoklu ilaç direnci görülmektedir. Bu nedenle, metisilin direncinin en kısa sürede doğru olarak saptanmasının bu enfeksiyonların kontrol altına alınmasında ve tedavide doğru antibiyotiğin seçilmesinde büyük önem taşımaktadır [38].

Günümüzde metisilin direncinin tespitinde *mecA* geninin moleküler yöntemlerle saptanması önemli bir standart olarak kabul edilmektedir. Ancak bu yöntemlerin klinik laboratuvarlarda uygulanması oldukça zor ve pahalıdır. Laboratuvarlar için en önemli nokta MRSA'nın izolasyonu ve tanımlanmasıdır. Bundan dolayı, klinik laboratuvarlarda *S. aureus* izolatlarında metisilin direncinin saptanmasında çeşitli yöntemler kullanılmaktadır [37,38].

1.1.9.1. Disk Difüzyon Yöntemi

En sık kullanılan bir laboratuvar yöntemidir. Bu yöntemde MRSA izolatlarının saptanması amacıyla oksasilin (1µg) diski kullanılmaktadır. 0.5 McFarland bulanıklığa ayarlanmış olan bakteri süspansiyonundan Mueller Hinton Agar (MHA)'a ekim yapıldıktan sonra, plaklar 35°C'de 24 saat inkübe edilmektedir. Oksasilin disk difüzyon yöntemi için CLSI (Clinical Laboratory Standarts Institute) tarafından belirlenen direnç sınır değerlerine göre inhibisyon zon çapı ≤ 10 mm olan izolatlar dirençli, 11-12 mm olan izolatlar orta düzeyde duyarlı, ≥ 13 mm olan izolatlar ise duyarlı olarak kabul edilmektedir.

Yüksek miktarda beta-laktamaz enzimi oluşturan bazı *S. aureus* suşları disk difüzyon testiyle metisiline sınırda dirençli olarak saptanırlar. Bundan dolayı testin duyarlılığını arttırmak amacıyla besiyerine % 5 NaCl eklemek, inkübasyon süresini 48 saate uzatmak, yüksek inokulum kullanmak ya da inkübasyon derecesini

35°C'den 30°C'ye azaltmak gibi girişimler beta-laktamaz yapımını artırabilir ve duyarlı suşların dirençli olarak saptanmasına yol açabilir [38].

Son yıllarda metisilin direncinin saptanmasında sefoksitin disk difüzyon yönteminin kullanılması gündeme gelmiştir. Yapılan çalışmalarda, oksasilin disk difüzyon yöntemiyle elde edilen sonuçlara göre bu sefoksitin disk difüzyon yönteminin duyarlılık ve özgülüğünün daha yüksek olduğu bulunmuştur. Ayrıca, sefoksitin disk difüzyonu *mecA* bağımlı direncin varlığını göstermede oksasilin diskinden daha iyi bir belirteçtir. Bununla birlikte oksasilin disk difüzyon yöntemine göre değerlendirilmesinin daha kolay olduğu bildirilmiştir. Bu yöntemde sefoksitin (30µg) diski kullanılmaktadır. 0.5 McFarland bulanıklığa ayarlanmış olan bakteri süspansiyonundan MHA'ya ekim yapıldıktan sonra, plaklar 35°C'de 24 saat inkübe edilmektedir. Sefoksitin disk difüzyon zon çapı ≤ 21 mm olan izolatlar dirençli, ≥ 22 mm olan izolatlar ise duyarlı olarak kabul edilmektedir [37,38].

1.1.9.2. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi

Bu yöntemde % 2 NaCl içeren Mueller Hinton sıvı besiyeri kullanılmaktadır. CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute), testte kullanılacak olan inokulum miktarının 5×10^5 cfu/ml olmasını ve 24 saat 35°C'de inkübasyonu içermektedir. Antibiyotik olarak oksasilin tercih edilmektedir. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi için CLSI tarafından belirlenen direnç sınır değerlerine göre MİK (Minimum İnhibisyon Konsantrasyon) değeri $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ olan izolatlar duyarlı, $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ olan izolatlar ise dirençli olarak kabul edilmektedir [38].

1.1.9.3. Agar Tarama Yöntemi

Bu yöntemde 6 µg/ml oksasilin ve % 4 NaCl içeren MHA'ya 0.5 McFarland bulanıklığa ayarlanmış olan bakteri süspansiyonundan ekim yapılır. Plaklar 24 saat 35°C'de inkübe edilir. Herhangi bir koloni üremesi halinde test edilen suş metisiline dirençli olarak kabul edilir. Testin duyarlılık ve özgülüğü oldukça yüksektir [38].

1.1.9.4. E-test Yöntemi

E-test yöntemi, mikrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemlerine benzer şekilde test koşullarından etkilenmektedir. % 2 NaCl içeren MHA'ya 0.5 McFarland bulanıklığa ayarlanmış olan bakteri süspansiyonundan ekim yapılır. E-test stribi yerleştirilip, 35°C'de 24 saat inkübasyona bırakılır ve inkübasyon sonunda, elips şeklindeki inhibisyon alanının stribi kestiği konsantrasyon MİK (Minimum İnhibisyon Konsantrasyon) olarak belirlenir [38,43].

1.1.9.5. Lateks Aglütinasyon Testi

Oldukça kısa bir sürede sonuç veren lateks aglütinasyon testi, PBP 2a saptanmasını temel alan bir yöntemdir. Koloni süspansiyonlarından PBP 2a ekstraksiyonu yapıldıktan sonra lateks ile kaplanmış olan PBP 2a monoklonal antikora aglütinasyon saptanır. *S. aureus* için testin duyarlılık ve özgüllüğü oldukça yüksektir. Bununla birlikte lateks aglütinasyon testini kullanarak sınırda oksasilin dirençli *S. aureus*'un MRSA'dan doğru ayrımının yapılabildiği raporlanmıştır [37].

1.1.9.6. Kromojenik Yöntemler

Son yıllarda MRSA'ların saptanmasında enzimatik substratları içeren kromojenik besiyerleri denenmektedir. Bunlar arasında MRSA-ID (bioMerieux), MRSASelect (Bio-Rad) ve ORSAB (Oxoid) (oksasilin direnç tarama agar besiyeri) gibi değişik kromojenik besiyerleri yer almaktadır [37,38].

1.1.9.7. Moleküler Yöntemler

MRSA izolatlarının saptanmasında *mecA* geninin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) temelli yöntemlerle araştırılması önemli bir standart olarak kabul edilmektedir.

Bununla birlikte, *mecA* geni bulunan ancak bunu eksprese etmeyen duyarlı suşların bulunabileceği unutulmamalıdır [38].

PZR, nükleik asitlerin invitro şartlarda replikasyonu için geliştirilmiş bir test tüp sistemidir. Hedef DNA'nın selektif olarak amplifikasyonuna olanak sağlar. Bir test tüpü içerisinde gerçekleştirilen PZR'da DNA polimeraz enzimi sayesinde genomdaki istediğimiz spesifik bölgelerin kopyalanması gerçekleştirilir.

Mikroorganizmaların tanımlanması amacıyla uygulanan PZR'de önemli olan, o mikroorganizma için kesin tanıtıcı nitelikteki DNA ya da RNA parçasının çoğaltılarak ortaya konulmasıdır. Bu parça mikroorganizmanın esas DNA'sındaki özgül bir parça olabildiği gibi o mikroorganizmaya özgül karakterler kazandıran örneğin; 16 S rRNA, bir plazmit DNA parçası hatta bir IS elementinin DNA parçası da olabilir [44,45].

1.1.10. MRSA'da Tedavi Seçenekleri

Stafilokok türlerinde metisilin direnç artışı ile birlikte diğer antibiyotikler bu tür bakterilerce oluşmuş ciddi enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır. Bir glikopeptit olan vankomisin, metisilin dirençli stafilokoklara bağlı enfeksiyonların tedavisinde tercih edilen bir ilaçtır. Ancak son yıllarda vankomisine bağlı direnç görülmesinden dolayı vankomisinin dikkatli kullanımı gereklidir [37].

İlk kez 1996 yılında Japonya'dan Hiramatsu ve arkadaşları, vankomisine azalmış duyarlılık gösteren ilk MRSA klinik izolatını tanımlamıştır. Bu izolatın vankomisin minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değeri, mikrodilüsyon yöntemi ile 8 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Bu olguyu takiben ABD'den (Michigan ve New Jersey) iki olgu ve Fransa'dan bir olgu olmak üzere vankomisine azalmış duyarlılık gösteren diğer *S. aureus*'lar bildirilmiştir. Vankomisin MİK değerleri 8 µg/ml olarak saptandığı için bu izolatlar, CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) kriterlerine göre vankomisine orta düzeyde dirençli *S. aureus* [vancomycin-intermediate resistant *S. aureus* (VISA)] olarak tanımlanmıştır. Bütün bu olgularda

ortak olan özellik, direnç gelişiminden altı ay önceki dönem içinde birçok kez ve uzun süreli olmak üzere vankomisin ya da teikoplanin tedavisinin uygulanmış olmasıdır. Farklı duyarlılık paternleri gösteren bu izolatların, tedavide birçok kez vankomisin kullanılması sonucunda ya da başka bir ifadeyle vankomisine defalarca maruz kalma neticesinde ortaya çıktığı tezi ortaya atılmıştır. 1996 yılından sonra Asya, ABD ve Avrupa ülkelerinden olmak üzere vankomisin MİK değerleri 8-16 µg/ml arasında değişen diğer VISA izolatları bildirilmeye başlanmıştır. VISA'ların ortaya çıkmasından çok kısa bir süre sonra 1997 yılından Hiramatsu ve arkadaşları, "heterojen VISA (hVISA)" olarak adlandırılan yeni bir vankomisin direnç tipi tanımlamışlardır. Mu 3 olarak nitendirilen ilk hVISA izolatı, 64 yaşında pnömoni tanısı almış ve vankomisin tedavisine yanıt vermeyen bir hastadan izole edilmiştir. Bugüne kadar farklı ülkelerden ve değişik oranlarda olmak üzere hVISA izolatları rapor edilmiştir. Vankomisin MİK değeri 2 µg/ml olarak saptanan hVISA izolatları CLSI kriterlerine göre duyarlı olarak kabul edilmektedir. Fakat bu bakteri popülasyonu içinde vankomisinin değişik konsantrasyonlarına (2-9 µg/ml) direnç gösteren hücreler bulunduğu saptanmıştır. Bunu takiben ilk kez 2002 yılında Michigan'da olmak üzere vankomisine dirençli *S. aureus* (VRSA) izolatı tanımlanmıştır [38].

MRSA enfeksiyonları için son yıllarda tek tedavi seçeneği gibi görünen glikopeptit antibiyotikler için MİK yükselmesi ve giderek direnç gelişiyor olması gibi nedenlerle klinik başarısızlıkların ortaya çıkması, yeni antibiyotik arayışlarına neden olmuş ve bazı yeni antibiyotikler bu amaçla klinik kullanıma girmiştir [46]. Bu nedenle son yıllarda MRSA enfeksiyonlarının tedavisi için daptomisin ve linezolid gibi yeni bileşiklerin araştırılmakta ve denenmekte olduğu bildirilmektedir. Vankomisin ve linezolid tedavilerini karşılaştıran çeşitli çalışmalarda, linezolidin MRSA nedenli cerrahi enfeksiyonları, pnömoni ve komplike cilt ve yumuşak doku enfeksiyonlarında daha iyi sonuçlar verdiği görülmektedir. Linezolid ile klinik başarısızlıkların oluştuğunun bilinmesi önemlidir [37].

1.1.11. Çalışmanın Amacı

Bu tezin amacı, Klinik örneklerden izole edilen stafilocoklar'da *mecA* varlığının araştırılmasıdır. Gün geçtikçe daha fazla morbidite ve mortalite etkeni olan stafilocokların metisilin direncinin daha güvenilir bir şekilde saptanıp, izolatların metisilin duyarlılıklarının mümkün olan en kısa sürede nasıl belirlenmesi gerektiğine dair bilgi verilmesi amaçlanmıştır. Bu bilgiler ışığında, bu çalışmada çeşitli klinik örneklerden izole edilen (kan, yara, nazal, balgam, idrar, abse v.s) 102 adet stafilocok suşunun tanımlanması biyokimyasal testlerle yapılmıştır. Stafilocokların metisilin direncine sahip olup olmadıkları ise CLSI (Clinical Laboratory Standarts Institute) önerileri doğrultusunda disk difüzyon yöntemi ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemi kullanarak yapılmıştır. Metisilin direncinden sorumlu olan stafilocoklar'da *mecA* gen varlığının araştırılması Polimeraz Zincir Reaksiyonu yöntemiyle kanıtlanmıştır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Besiyerleri

2.1.1.1. % 5 Koyun Kanlı Agar

Stok kültür olarak microbank'lerde (Or-bak, Türkiye) saklanan izolatların % 5 Koyun Kanlı Agara (Or-bak, Türkiye) ekim yapıp 37°C etüvde canlandırılmaları sağlandıktan sonra, üreyen izolatların biyokimyasal ve moleküler çalışmalarının yapılması için kullanılmıştır.

2.1.1.2. Mueller Hinton Agar (MHA)

İzole edilen bakterilerin antibiyotik dirençliliğini test etmek için MHA (Oxoid, England) kullanılmıştır.

Gerekli miktarda hazırlanan besiyeri kullanılmadan önce 121°C'de 1 atm basınçta otoklavda steril edilmiştir.

2.1.1.3. Mueller Hinton Broth (MHB)

İzole edilen bakterilerin DNA izolasyonu, antibiyotik direnç profilleri ve biyokimyasal testleri için MHB (Oxoid, England) kullanılmıştır.

Gerekli miktarda hazırlanan besiyeri kullanılmadan önce 121°C'de 1 atm basınçta otoklavda steril edilmiştir.

2.1.2. Kullanılan Antibiyotik Diskler

Metisiline dirençli suşların antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesinde Çizelge 2.1.'de gösterilen antibiyotik diskleri (Oxoid, England) kullanılmıştır.

Çizelge 2.1. Antibiyotik diskler ve konsantrasyonları

Antibiyotikler	Konsantrasyon (µg/disk)
Penisilin (P)	10
Oksasilin (OX)	1
Gentamisin (GM)	10
Siprofloksasin (CIP)	5
Sefoksitin (FOX)	30
Eritromisin (E)	15
Klindamisin (CC)	30
Linezolid (INZ)	10
Teikoplanin (TP)	15
Vankomisin (VA)	30
Tetrasiklin (TE)	30
Tigesiklin (TIG)	15
Rifampisin (RA)	5
Trimetoprim/sulfametaksazol (SXT)	25

2.1.3. Kullanılan Kimyasallar ve Tamponlar

2.1.3.1. Kullanılan Kimyasallar

Kullanılan kimyasallar Merck ve Sigma firmalarından temin edilmiştir.

2.1.3.2. Kullanılan Tampon Çözeltiler

2.1.3.2.1. Kromozomal DNA İzolasyonunda Kullanılan Tamponlar

2.1.3.2.1.1. Tris/EDTA Tamponu (TE) (250 mL)

0.3 g Tris ve 0.008 g EDTA tartılıp 250 mL distile suyla (pH: 8.0) tamamlanmıştır.

2.1.3.2.1.2. Lizostafin Tamponu (500 mL)

25 mg lizostafin % 1 NaCl içeren 0.02 M fosfat tuz tampon çözeltisi içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. 5 ml distile su ile ana stok sulandırılmıştır. Oluşturulan 500 ml çözelti 4500 ml distile su ile tekrar sulandırılıp çalışmaya hazırlanmıştır.

2.1.3.2.1.3. Proteinaz K'nın Hazırlanması (10 mL)

0.0384 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tartılarak, 5 mL gliserol ve 100 mL, 1 M Tris-HCl (pH: 8.0) ile çözülmüştür. Son hacim 10 mL oluncaya kadar distile su ile tamamlanmış ve 100 mg proteinaz K çözülmüştür.

2.1.3.2.1.4. Elektroforez Tamponu (50x TAE) Hazırlama

242 g Tris, 37.2 g Na₂EDTA.2H₂O tartılarak (pH: 8.0) 57.1 mL glasiyal asetik asit ile çözülür. Son hacim 1000 mL olacak şekilde distile su ile tampon tamamlanmıştır.

Gerekli miktarda hazırlanan tampon kullanımdan önce 121°C'de 1 atm basınçta otoklavda steril edilmiştir.

2.1.3.2.1.5 % 1.5'luk Agaroz Jelin Hazırlanması

3 gr agar tartılarak 200 ml 1x TAE içerisinde süspanse edilmiş ve mikrodalga fırında kaynamadan ısıtılarak agaroz tamamen eritilmiştir.

2.2. Yöntem

2.2.1. Örneklerin Toplanması

Bu çalışmada, 2013-2014 yılları arasında, Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cebeci Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı ve Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na gelen çeşitli örneklerden (yara, kan, balgam, trakeal aspirasyon, kateter, beyin-omurilik sıvısı, idrar, periton sıvısı, balgam, eklem sıvısı, burun v.s) izole edilmiş 102 adet stafilocok suşu çalışmaya dahil edilmiştir. Her hastadan tek bir izolat alınmıştır.

2.2.2. Mikrobiyolojik Kültür ve Tanımlama İşlemleri

Laboratuvara gönderilen örneklerden elde edilen suşlar belli bir sayıya ulaşınca kadar stok besiyerine konulup (microbank) (Or-bak, Türkiye) -80°C'de saklanmış, sayı tamamlandığında suşlar çıkarılarak % 5 koyun kanlı besiyerine (Or-bak, Türkiye) tekrar ekim yapıp canlandırılmaları sağlanmıştır. Çalışma öncesinde % 5 koyun kanlı besiyerine pasajlanan stafilocok şüpheli kolonilerin öncelikle Gram boyası yapılmıştır. Gram boyamada üzüm salkımı şeklinde kümeler oluşturmuş Gram pozitif koklar lama yayılarak üzerlerine % 3'lük Hidrojen Peroksit (H₂O₂) damlatılarak gaz kabarcığı oluşturan bakteriler stafilocok olarak kabul edilmiş, *S. aureus*'u diğer stafilocoklardan ayırmak için tüp koagülaz testi uygulanmıştır. Bu test için tavşan plazmasının içine eklenen birkaç koloni içeren tüp etüve kaldırılmış ve 37°C'de 24 saatlik inkübasyona tabi tutulmuştur. Pıhtı oluşturan bakteriler *S. aureus*, diğerleri koagülaz negatif stafilocok (KNS) olarak kabul edilmiştir. Çalışmada kontrol suşu olarak ATCC 43300 dirençli *S. aureus* ve ATCC 25923 duyarlı *S. aureus* kullanılmıştır.

2.2.3. Kanlı Agarda Hemoliz Oluşumu

Klinik örneklerden alınan Stafilokok izolatları tanımlama amacıyla önce, % 5 koyun kanlı agara tek koloni ekim yapılmış ve izolatların koloni morfolojileri, pigmentasyon ve hemoliz tipine bakılarak değerlendirilmeye alınmıştır.

İzolatlar, hazır olarak temin edilen % 5 koyun kanlı besiyerine ekim yapılarak 37°C'de bir gece boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası bakteri kolonileri etrafında oluşan şeffaf zon, hemoliz pozitif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.2). Tam hemolizde, kanlı agar besiyerinde gelişen bakteri kolonilerinin etrafında düzgün bir hatla çevrilmiş temiz ve berrak bir hemoliz zonu meydana gelmektedir. Fakat *S. aureus*'un kanlı besiyerinde küçük, pigmentsiz ve hemoliz oluşturmeyen koloniler şeklinde üreyen küçük koloni varyantları da bulunmaktadır [10,37].

2.2.4. Gram Boyama

% 5 Koyun Kanlı agarda hemoliz pozitif olarak değerlendirilen birkaç koloni lam üstüne alınarak serum fizyolojik ile homojen hale getirilmiştir. Tespit işleminin ardından Gram boyama tekniği ile boyandıktan sonra ışık mikroskopunda boyanma özelliklerinin yanında morfolojik özellikleri de araştırılmıştır. Burada, düzensiz üzüm benzeri kümeler oluşturan Gram pozitif 0.5-1.5 µm çapında koloniler *S. aureus* olarak değerlendirilmiştir (Şekil 1.2).

2.2.5. Katalaz Testi

Çalışmamızda, Mueller Hinton Broth (MHB) besiyerinde 24 saat inkübasyona bırakılmış izolatlardan öze ile küçük miktarda lam üzerine örnek alınarak, distile su ile süspansiyon edilmiştir. Bunun üzerine 2-3 ml % 30'luk Hidrojen Peroksit (H₂O₂) ilave edilip karıştırıldığında, hava kabarcıklarının çıkışı pozitif olarak değerlendirilmiştir. Çalışmada negatif kontrol olarak *Streptococcus thermophilus* ATCC 14425 suşu kullanılmıştır (Şekil 3.3).

2.2.6. Koagülaz Testi

Çalışmamızda, koagülaz varlığı lam deneyi ile araştırılmıştır. Lam deneyi negatif sonuç veren izolatlar tüp koagülaz testine tabi tutulmuştur (Şekil 3.5). Temiz bir lamın iki ucuna birer damla distile su damlatıp, bakterinin taze kültüründen 2-3 koloni öze yardımıyla alınarak her iki uçtaki distile suyla homojen bir süspansiyon elde edilmiştir. Süspansiyonlardan birinin üzerine bir damla plazma damlatıp elde çevirme hareketleri yapılarak karıştırılmıştır. 10-30 saniye içerisinde plazmalı damlada oluşan kümeleşme koagülaz pozitif olarak değerlendirilmiştir. Lamın diğer ucundaki homojen süspansiyon ise kontrol olarak kullanılmıştır (Şekil 3.4).

2.2.7. Antibiyotik Duyarlılığı

Metisiline direnç durumunu saptamak amacıyla CLSI (Clinical Laboratory Standarts Institute) önerilerine uygun olarak sefoksitin (30µg) diskleri kullanılarak disk difüzyon testi yapılmıştır. Antibakteriyel duyarlılıkları incelenecek izolatların taze kültüründen 0.5 McFarland standart disk difüzyon yöntemiyle süspansiyon hazırlanmıştır. Bu süspansiyondan yüzeye yayma yöntemiyle MHA besiyerinin yüzeyine steril eküvyon yardımıyla homojen olarak yayılmıştır. Ekim yüzeyi kuruduktan sonra antibakteriyel ajan içeren diskler steril pens yardımıyla kenarlardan en az 1.5 cm ve birbirlerinden en az 2-2.5 cm uzaklıkta olacak şekilde dizilmiştir. 37°C’de 24 saatlik inkübasyondan sonra oluşan inhibisyon zon çapları CLSI önerileri doğrultusunda dirençli, duyarlı, orta duyarlı olarak değerlendirilmeye alınmıştır.

Sefoksitin diski çevresindeki inhibisyon zonu ≤ 21 mm. olan *S. aureus*’lar dirençli, ≥ 22 mm. olanlar duyarlı; ≤ 24 mm olan KNS’ler dirençli, ≥ 25 mm olanlar duyarlı kabul edilmiştir (Şekil 3.6) [12].

2.2.8. Kromozomal DNA İzolasyonu

Bakteri DNA'sının izolasyonunda Ünal ve arkadaşları tarafından stafilokoklar için tanımlanmış olan hızlı lizis protokolü kullanılmıştır [34]. 24 saatlik bakteri kültüründen tek koloni Mueller Hinton besiyerine ekilip 37°C'de bir gece inkübe edilmiştir. Bir gecelik bakteri kültürleri 1.5 ml'lik MHB içeren tüplere koyularak 3000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Üst kısım uzaklaştırıldıktan sonra üstüne 1000 µl (1ml) TE buffer (10mM Tris/ pH: 7.5, 1mM EDTA/ pH: 8.0) ekleyip vortekslenip pipetajlanmıştır. Elde edilen süspansiyon tekrar 10 dakika 14.000 rpm'de santrifüj edilip üst kısım atılmıştır. 100 µg/mL'lik lizostafinden 50 µl eklenip vortekslenildikten sonra 10 dakika 37°C'lik sıcak su banyosunda bekletilmiştir. Vortekslenildikten sonra üzerine 100 µg/mL'lik proteinaz K'dan 50 µl eklenmiştir. Tekrar vortekslenip 10 dakika 37°C'lik sıcak su banyosunda inkübe edilmiştir. Daha sonra kaynayan suda 20 dakika kaynadıktan sonra 10 dakika mikrosantrifüjde çevrilmiştir. Süpernatant, pellete dokunmadan alınarak yeni bir ependorf tüpe aktarılıp pellet atılmıştır. Hazırlanan bu DNA *mecA* geninin varlığının araştırılması için -20°C'de saklanmıştır.

2.2.9. *mecA* Gen Varlığının Araştırılması

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) protokolü için amplifikasyon karışımı ependorf tüpünde toplam hacim 50 µl olacak şekilde Çizelge 2.2.'de gösterildiği gibi hazırlanmıştır.

Çizelge 2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) protokol şeması

PZR Protokolü	Konsantrasyon (µg/ml)
Distile su	29.75
PZR tampon (10x)	5
25 mM MgCl ₂	5
dNTP mix 2 mM	4
<i>mecA1</i> (100 pmol/µl)	0.5
<i>mecA2</i> (100 pmol/ µl)	0.5
Taq DNA polimeraz (5U)	0.25
Total DNA'dan	5

mecA geni için *mecA1* ve *mecA2* olmak üzere iki adet primer kullanılmıştır.

mecA1: 5' GTTGTAGTTGTCGGGTTTG 3'

mecA2: 5' CCACCCAATTTGTCTGCCAGTTTCTCC 3'

Çizelge 2.3. Amplifikasyon programı

1	Lizis ve denatürasyon	94 °C	5 dakika
2	Denatürasyon	94 °C	30 saniye
3	Primer Bağlanması	55 °C	30 saniye
4	Primer Uzaması	72 °C	1 dakika

Bu üç döngü (Denatürasyon, Bağlanma, Uzama) 30 siklus olarak programlanmıştır (Çizelge 2.3). PZR tüplerine konulan örnekler Thermal Cycler (Teachne, England) cihazına yerleştirilmiş 2 saat 30 dakika sonunda PZR reaksiyonu sonlandırılmıştır.

2.2.10. Agaroz Jelin Hazırlanması ve Örneklerin Jele Uygulanması

Amplifikasyon sonunda PZR ürünleri % 2'lik agaroz (Sigma) jel elektroforezi ile analiz edilmiştir. 10 µl amplifikasyon ürünü yaklaşık 2 µl orange G ile karıştırılmış ve % 2'lik 1xTAE tampon ile hazırlanmış olan kuyucuklara mikropipet yardımıyla yüklenmiştir ve 5 µM Etidyum bromür (EtBr, Sigma) çözeltisi ile boyanmış jelde 100 Volt uygulanarak 1 saat boyunca elektroforez akımında yürütülmüştür. Separasyon zamanını sonlandırmak için, yükleme tamponunda bulunan brom fenol mavisinin jelde aldığı mesafe bize yol gösterir. Elektroforez işlemi sonucunda jel bir transilüminatör üzerine alınarak UV ışığı (~ 304 nm) altında fotoğraf çekildikten sonra amplifiye edilen DNA'nın molekül ağırlığı, moleküler ağırlık standardı (Gene Ruler 100 bp DNA Ladder marker) ile karşılaştırılarak yaklaşık olarak belirlenmiştir. 533 bp büyüklüğünde bant görülmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.7). Çalışmamızda Pozitif kontrol olarak 27-R *S. aureus* izolatı ve negatif kontrol olarak distile su kullanılmıştır.

3. ARAŞTIRMA BULGULARI

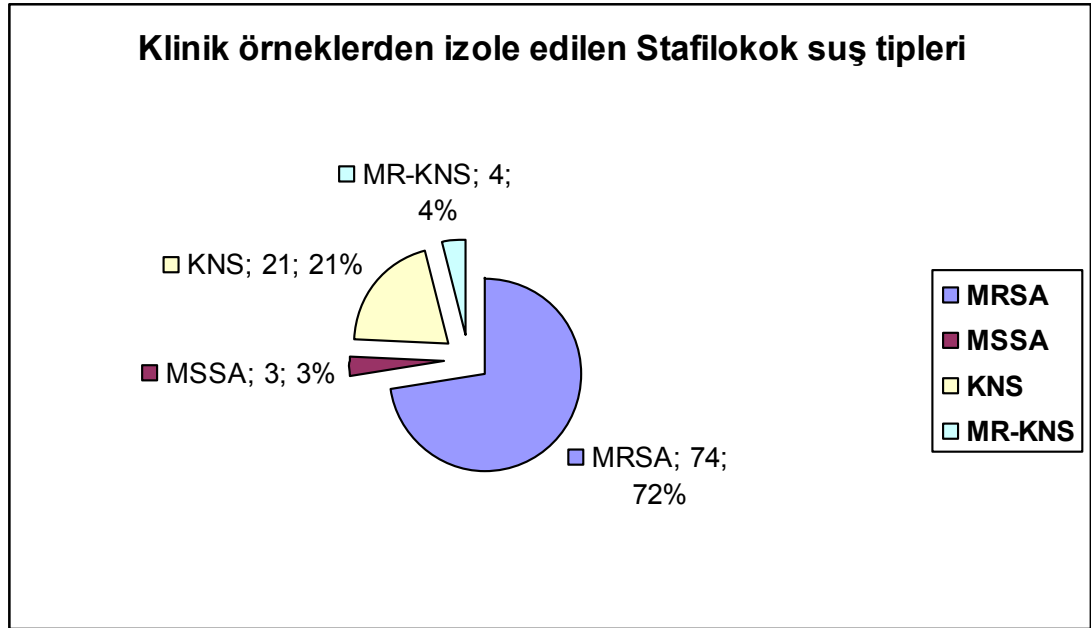
3.1. İzole Edilen Stafilokok Suş Değerlerinin Belirlenmesi

Bu çalışmaya çeşitli klinik örneklerden izole edilen 102 adet stafilokok suşu dahil edilmiştir. Stafilokokların izole edildiği örnek türlerine göre dağılımı incelendiğinde; 20 adet (% 19.6) suşun yara kültüründe, 63 adet (% 61.8) suşun kan kültüründe, 2 adet (% 2) suşun derin trakeal aspirasyon (DTA) kültüründe, 8 adet (% 7.8) suşun idrar kültüründe, 3 adet (% 2.9) suşun burun kültüründe, 6 adet (% 5.9) suşun diğer örnek kültürlerinde (balgam, beyin-omurilik sıvısı, kateter, göz kültürü, periton sıvısı) ürediği görülmüştür. Çizelge 3.1.'de Çeşitli kliniklerden izole edilen stafilokok suşlarının örneğin alındığı bölgeye göre dağılımları ve yüzdelik oranları gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. İzole edilen suşların örnek türlerine göre dağılımı [n(%)]

Örnek Tipi	MRSA	%	MSSA	%	KNS	%	MR-KNS	%	Toplam
Yara	12	(16.2)	0		8	(38.1)			20
Kan	55	(74.3)	0		4	(19)	4	(100)	63
T. aspirat	2	(2.7)	0		0				2
İdrar	2	(2.7)	3	(100)	3	(14.3)			8
Burun	0		0		3	(14.3)			3
Balgam	0		0		1	(4.8)			1
Abse	1	(1.4)	0		0				1
Diğer örnekler	2	(2.7)	0		2	(10)			4
Toplam	74		3		21		4		102

Ayrıca çeşitli kliniklerden izole edilen 102 adet stafilokok suşu MRSA, MSSA, KNS, MR-KNS olarak 4 gruba ayrılmış olup oransal olarak aşağıdaki şekilde gösterilmiştir. Oransal değerlere değinecek olursak; 74 adet metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) mevcut olup tüm stafilokok izolatları içinde % 72'lik bir orana sahip olduğu tespit edilmiştir. 3 adet metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA) mevcut olup tüm stafilokok izolatları içinde % 3'lük bir orana sahip olduğu saptanmıştır. 4 adet metisiline dirençli koagülaz negatif stafilokok (MR-KNS) mevcut olup tüm stafilokok izolatları içinde % 4'lik bir orana sahip olduğu belirlenmiştir. 21 adet koagülaz negatif stafilokok (KNS) mevcut olup tüm stafilokok izolatları içinde % 21'lik bir orana sahip olduğu tespit edilmiş ve pasta grafiğinde yüzdeler dağılım oranları sayısal olarak gösterilmiştir (Şekil 3.1).



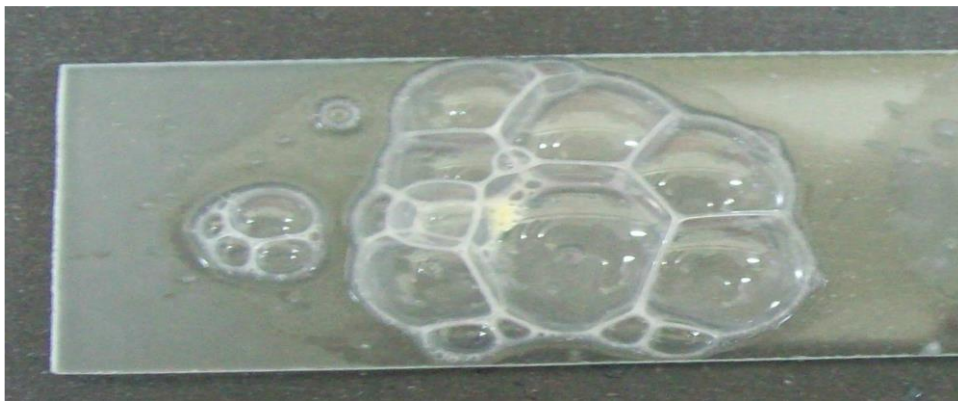
Şekil 3.1. Yapılan deneylerin sonuçlarına göre tespit edilen Stafilokok suş tiplerinin yüzdeler dağılımları

3.2. Fenotipik Tanımlama Test Sonuçları

Çalışmada, koloni morfolojisi, Gram boyama, mikroskopik görünüm, kanlı agarda hemoliz tipi, koagülaz ve katalaz deneyleri suşların tanımlanması için yapılmıştır.



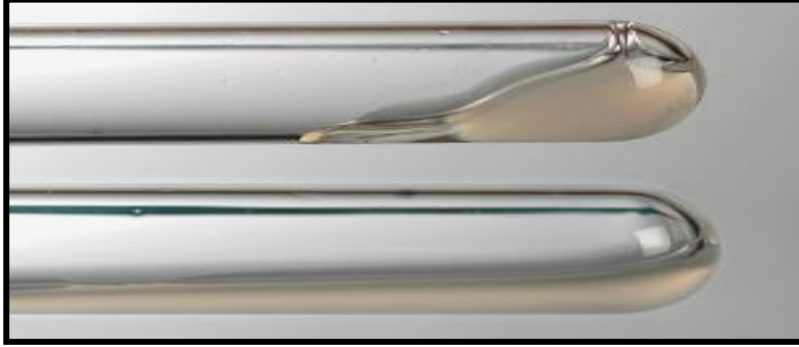
Şekil 3.2. *S. aureus*'un kanlı agarda hemoliz pozitif (+) görüntüsü (solda) ve hemoliz negatif (-) görüntüsü (sağda) [17]



Şekil 3.3. *S. aureus*'un lamda katalaz pozitif (+) test görüntüsü [17]



Şekil 3.4. *S. aureus*'un lam'da koagülaz negatif (-) test (solda) ve koagülaz pozitif (+) test görüntüsü (sağda) [17]



Şekil 3.5. *S. aureus*'un tüp'de koagülaz pozitif (+) test görüntüsü (üstte) ve koagülaz negatif (-) test görüntüsü (altta) [47]

3.3. Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçları

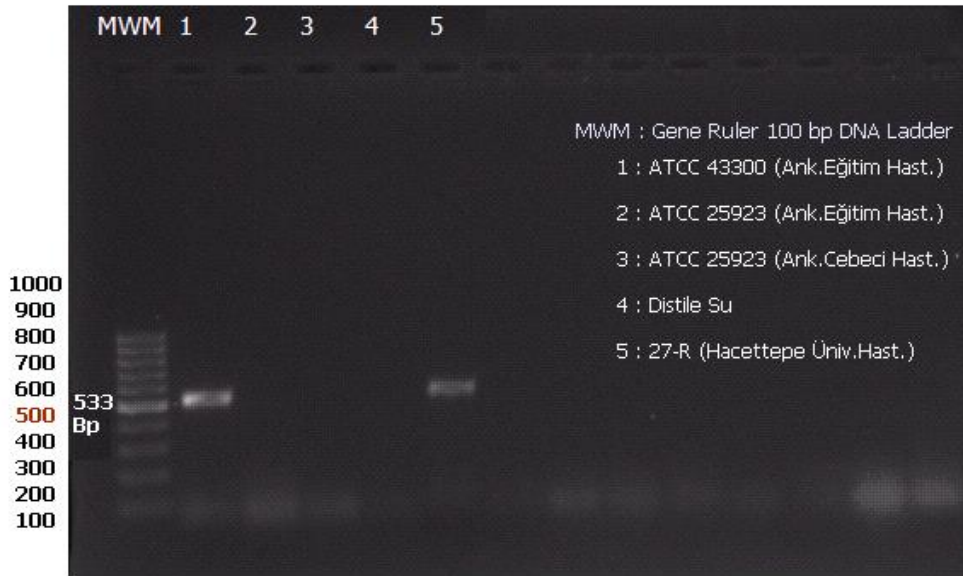
Çalışmamızda, seçmiş olduğumuz 14 adet antibiyotik diskleri CLSI (Clinical Laboratory Standarts Institute) önerileri doğrultusunda Mueller Hinton besiyerinde standartlara uygun olarak yapılmıştır. Öncelikle kontrol suşları üzerinde yapılan sefoksitin disk difüzyon duyarlılığı, kliniklerden alınan tüm stafilokok suşları üzerinde test edilmiştir. Çalışmada kullanılan antibiyotik duyarlılık profillerinin 102 adet stafilokok suşu üzerindeki sonuçları izolatların alındığı klinikler başlığı adı altında ayrı ayrı verilmiştir.



Şekil 3.6. Sefoksitin antibiyotik disk'in kontrol suşları olarak kullanılan, ATCC 25923 duyarlı *S. aureus* (solda) ve ATCC 43300 dirençli *S. aureus* (sağda) izolatlarına etki görüntüsü

3.4. Moleküler Yöntem İçin Kullanılan Standart Suşun Belirlenmesi

Moleküler çalışmamıza başlamadan önce kontrol suşları olarak Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nden temin edilen ATCC 43300 dirençli *S. aureus* ve ATCC 25923 duyarlı *S. aureus*, Ankara Üniversitesi Cebeci Hastanesi'nden temin edilen ATCC 25923 duyarlı *S. aureus*, negatif kontrol olarak distile su ve Hacettepe Üniversitesi Hastanesi'nden temin edilen 27-R pozitif kontrol standart suşlarıyla *mecA* varlığının gösterilmesi moleküler Weight Marker ile sağlanmıştır. İzole edilen 102 adet stafilocok suşlarının moleküler çalışmalarında aynı baz çifti değerlerine sahip olan bu kontrol suşlarından sadece pozitif kontrol olarak 27-R dirençli *S. aureus* standart suşu kullanılmıştır (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Moleküler Weight Marker, duyarlı ve dirençli standart *S. aureus* kontrol suşlarının PZR'daki (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) görüntüsü

3.5. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cebeci Hastanesi Suşlarının Biyokimyasal Test Analizi, Antibiyotik Dirençlilik Profilleri ve Kromozomal DNA Lokasyonunun Belirlenmesi

Çizelge 3.2.a ve Çizelge 3.2.b'de Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cebeci Hastanesi merkezi araştırma laboratuvarından temin edilen çeşitli Stafilokok izolatlarının biyokimyasal testlerle tanımlanmaları sağlandıktan sonra, Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle antibiyogramları yapılmıştır (Çizelge 3.3). Daha sonra bir moleküler yöntem olan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile suşların *mecA* gen varlığına bakılmış ve dirençlilik profil sonuçlarının doğru sonuç verip- vermemesi test edilmiştir (Şekil 3.8.a ve Şekil 3.8.b).

Çizelge 3.2.a. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cebeci Hastanesi 1-10AC kodlu suşların biyokimyasal test sonuçları

Suş No	Katalaz Testi	Lam Koagülaz Testi	Tüp Koagülaz Testi	<i>mecA</i> Varlığının Gösterilmesi	Tanımlanan Türler
1AC	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S. aureus</i> (MRSA)
2AC	(+)	(-)	(-)	(-)	<i>S. epidermidis</i> (KNS)
3AC	(+)	(+)	(-)	(-)	<i>S. epidermidis</i> (KNS)
4AC	(+)	(-)	(-)	(-)	<i>S. hominicus</i> (KNS)
5AC	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S. aureus</i> (MRSA)
6AC	(+)	(-)	(-)	(-)	<i>S. epidermidis</i> (KNS)
7AC	(+)	(+)	(-)	(-)	<i>S. hominis</i> (KNS)
8AC	(+)	(-)	(-)	(-)	<i>S. haemolyticus</i> (KNS)
9AC	(+)	(-)	(-)	(-)	<i>S. epidermidis</i> (KNS)
10AC	(+)	(-)	(-)	(-)	<i>S. hominis</i> (KNS)

(+); Pozitif sonuç, (-); negatif sonuç

Çizelge 3.2.b. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cebeci Hastanesi 11-19AC kodlu suşların biyokimyasal test sonuçları

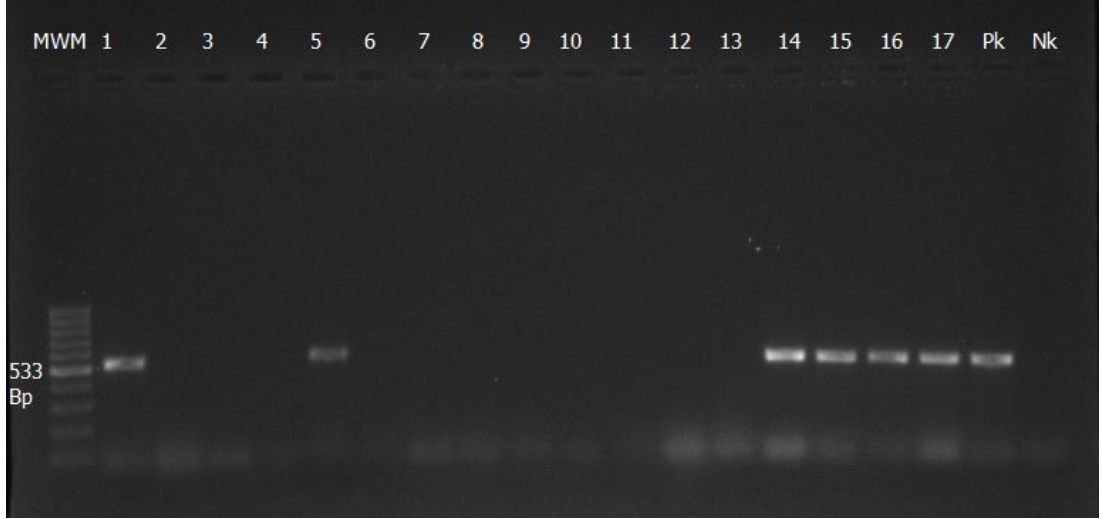
Suş No	Katalaz Testi	Lam Koagülaz Testi	Tüp Koagülaz Testi	<i>mecA</i> Varlığının Gösterilmesi	Tanımlanan Türler
11AC	(+)	(+)	(+)	(-)	<i>S. aureus</i> (MSSA)
12AC	(+)	(-)	(-)	(-)	<i>S. epidermidis</i> (KNS)
13AC	(+)	(-)	(-)	(-)	<i>S. hominis</i> (KNS)
14AC	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S. lugdunensis</i> (MR-KNS)
15AC	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S. aureus</i> (MRSA)
16AC	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S. aureus</i> (MRSA)
17AC	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S. aureus</i> (MRSA)
18AC	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S. aureus</i> (MRSA)
19AC	(+)	(-)	(+)	(-)	<i>S. aureus</i> (MSSA)

(+); Pozitif sonuç, (-); negatif sonuç

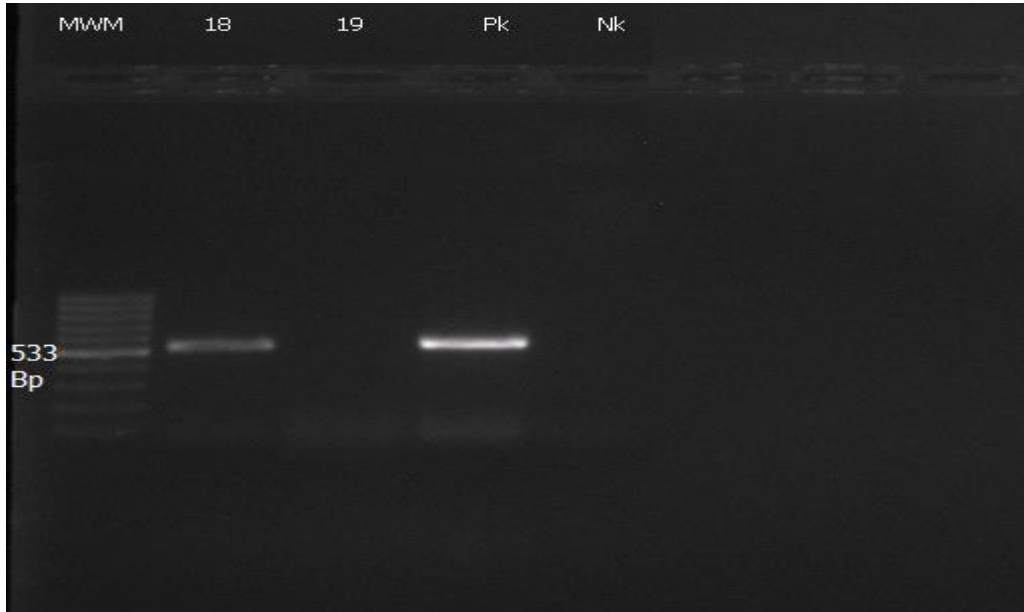
Çizelge 3.3. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cebeci Hastanesi suşlarının antibiyotik dirençlilik profilleri

Antibiyotikler (µg/disk)	Dirençlilik Profili (n)																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
P (10)	R	S	R	R	R	I	I	R	R	R	R	S	S	R	I	S	S	R	S
OX (1)	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	
GM (10)	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S	R
CIP (5)	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	R	R	S	S	I	S	I
FOX (30)	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	S
E (15)	S	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
CC (30)	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
INZ (10)	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S
TP (15)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
VA (30)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TE (30)	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R
TIG (15)	S	S	S	R	S	R	R	S	R	S	S	I	S	I	R	R	S	S	R
RA (5)	S	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S
SXT (25)	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	I

R; Dirençli (Resistant), S; Duyarlı (Susceptible), I; Orta duyarlı (Intermediate), n: Bakteri sayısı



Şekil 3.8.a. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cebeci Hastanesi 1-17AC kodlu suşların kromozomal DNA lokasyonu görüntüsü



Şekil 3.8.b. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cebeci Hastanesi 18-19AC kodlu suşların kromozomal DNA lokasyonu görüntüsü

3.6. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Suşlarının Biyokimyasal Test Analizi, Antibiyotik Dirençlilik Profilleri ve Kromozomal DNA Lokasyonunun Belirlenmesi

Çizelge 3.4.a ve Çizelge 3.4.b’de Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi merkezi araştırma laboratuvarından temin edilen çeşitli Stafilokok izolatlarının biyokimyasal testlerle tanımlanmaları sağlandıktan sonra, Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle antibiyogramları yapılmıştır (Çizelge 3.5). Daha sonra bir moleküler yöntem olan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile suşların *mecA* gen varlığına bakılmış ve dirençlilik profil sonuçlarının doğru sonuç verip-vermemesi test edilmiştir (Şekil 3.9).

Çizelge 3.4.a. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi 1-9AE kodlu suşların biyokimyasal test sonuçları

Suş No	Katalaz Testi	Lam Koagülaz Testi	Tüp Koagülaz Testi	<i>mecA</i> Varlığının Gösterilmesi	Tanımlanan Türler
1AE	(+)	(-)	(-)	(-)	<i>S. epidermidis</i> (KNS)
2AE	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S. aureus</i> (MRSA)
3AE	(+)	(-)	(-)	(-)	<i>S. epidermidis</i> (KNS)
4AE	(+)	(-)	(-)	(-)	<i>S. hominis</i> (KNS)
5AE	(+)	(-)	(-)	(-)	<i>S. epidermidis</i> (KNS)
6AE	(+)	(-)	(-)	(-)	<i>S. epidermidis</i> (KNS)
7AE	(+)	(-)	(-)	(-)	<i>S. epidermidis</i> (KNS)
8AE	(+)	(-)	(+)	(-)	<i>S. aureus</i> (MSSA)
9AE	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S. aureus</i> (MRSA)

(+); Pozitif sonuç, (-); negatif sonuç

Çizelge 3.4.b. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi 10-17AE kodlu suşların biyokimyasal test sonuçları

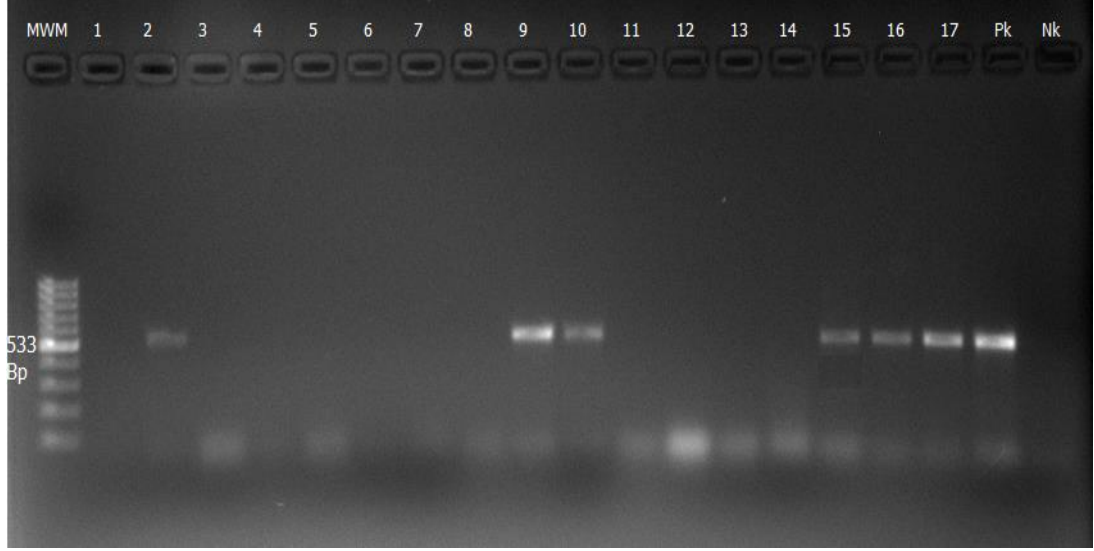
Suş No	Katalaz Testi	Lam Koagülaz Testi	Tüp Koagülaz Testi	<i>mecA</i> Varlığının Gösterilmesi	Tanımlanan Türler
10AE	(+)	(+)	(-)	(+)	<i>S. hominis</i> (MR-KNS)
11AE	(+)	(-)	(-)	(-)	<i>S. hominis</i> (KNS)
12AE	(+)	(+)	(+)	(-)	<i>S. lugdunensis</i> (KNS)
13AE	(+)	(-)	(-)	(-)	<i>S. epidermidis</i> (KNS)
14AE	(+)	(-)	(-)	(-)	<i>S. hominis</i> (KNS)
15AE	(+)	(+)	(+)	(-)	<i>S. lugdunensis</i> (KNS)
16AE	(+)	(+)	(-)	(+)	<i>S. haemolyticus</i> (MR-KNS)
17AE	(+)	(-)	(-)	(+)	<i>S. epidermidis</i> (MR-KNS)

(+); Pozitif sonuç, (-); negatif sonuç

Çizelge 3.5. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi suşlarının antibiyotik dirençlilik profilleri

Antibiyotikler (µg/disk)	Dirençlilik Profili (n)																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
P (10)	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	I	S	R	I
OX (1)	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
GM (10)	S	S	S	I	I	I	R	R	S	S	S	S	S	S	S	I	I
CIP (5)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	I	I	S
FOX (30)	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R
E (15)	S	S	R	S	S	S	S	S	I	R	R	I	S	S	S	R	S
CC (30)	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	R	S	S	S	R	S
INZ (10)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TP (15)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
VA (30)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TE (30)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TIG (15)	I	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	I	I	S	S	R	I
RA (5)	S	I	R	R	R	S	S	S	S	I	I	R	S	S	S	R	I
SXT (25)	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	R

**R; Dirençli (Resistant), S; Duyarlı (Susceptible), I; Orta duyarlı (Intermediate),
n: Bakteri sayısı**



Şekil 3.9. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi 1-17AE kodlu suşların kromozomal DNA lokasyonu görüntüsü

3.7. Ankara Numune Hastanesi Suşlarının Biyokimyasal Test Analizi, Antibiyotik Dirençlilik Profilleri ve Kromozomal DNA Lokasyonunun Belirlenmesi

Çizelge 3.6.'da Ankara Numune Hastanesi merkezi araştırma laboratuvarından temin edilen Stafilokok izolatlarının biyokimyasal testlerle tanımlanmaları sağlandıktan sonra, Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle antibiyogramları yapılmıştır (Çizelge 3.7). Daha sonra bir moleküler yöntem olan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile suşların *mecA* gen varlığına bakılmış ve dirençlilik profil sonuçlarının doğru sonuç verip-vermemesi test edilmiştir (Şekil 3.10).

Çizelge 3.6. Ankara Numune Hastanesi suşlarının biyokimyasal test sonuçları

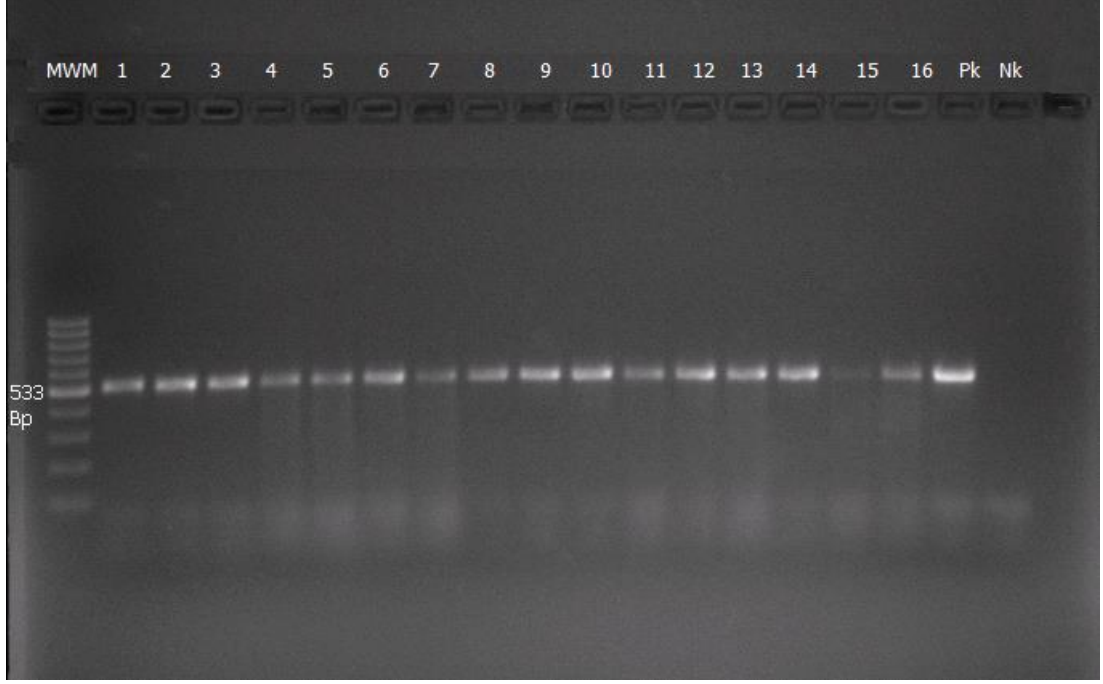
Suş No	Katalaz Testi	Lam Koagülaz Testi	Tüp Koagülaz Testi	<i>mec A</i> Varlığının Gösterilmesi	Tanımlanan Tür
1AN	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
2AN	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
3AN	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
4AN	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
5AN	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
6AN	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
7AN	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
8AN	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
9AN	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
10AN	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
11AN	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
12AN	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
13AN	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
14AN	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
15AN	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
16AN	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)

(+); Pozitif sonuç, (-); negatif sonuç

Çizelge 3.7. Ankara Numune Hastanesi suşlarının antibiyotik dirençlilik profilleri

Antibiyotikler (µg/disk)	Dirençlilik Profili (n)															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
P (10)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
OX (1)	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
GM (10)	S	S	S	S	S	R	I	R	R	S	R	R	R	I	R	R
CIP (5)	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
FOX (30)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E (15)	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S
CC (30)	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
INZ (10)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TP (15)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
VA (30)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TE (30)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TIG (15)	S	S	S	S	S	S	S	S	R	I	R	I	S	I	S	S
RA (5)	S	S	S	R	S	I	I	I	R	S	R	R	S	R	S	S
SXT (25)	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	R	R	S	S	R	S

**R; Dirençli (Resistant), S; Duyarlı (Susceptible), I; Orta duyarlı (Intermediate),
n: Bakteri sayısı**



Şekil 3.10. Ankara Numune Hastanesi 1-16AN kodlu suşların kromozomal DNA lokasyonu görüntüsü

3.8. Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Suşlarının Biyokimyasal Test Analizi, Antibiyotik Dirençlilik Profilleri ve Kromozomal DNA Lokasyonunun Belirlenmesi

Çizelge 3.8’de Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarından temin edilen Stafilokok izolatlarının biyokimyasal testlerle tanımlanmaları sağlandıktan sonra, Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle antibiyogramları yapılmıştır (Çizelge 3.9). Daha sonra bir moleküler yöntem olan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile suşların *mecA* gen varlığına bakılmış ve dirençlilik profil sonuçlarının doğru sonuç verip-vermemesi test edilmiştir (Şekil 3.11).

Çizelge 3.8. Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi suşlarının biyokimyasal test sonuçları

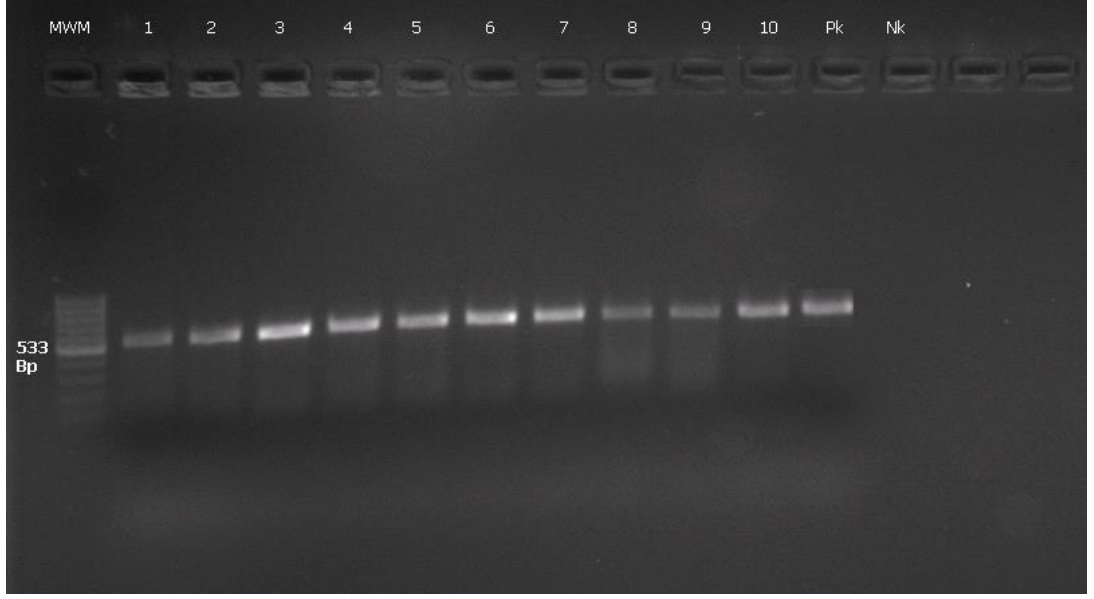
Suş No	Katalaz Testi	Lam Koagülaz Testi	Tüp Koagülaz Testi	<i>mecA</i> Varlığının Gösterilmesi	Tanımlanan Tür
1KK	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
2KK	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
3KK	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i>
4KK	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
5KK	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
6KK	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
7KK	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
8KK	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
9KK	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
10KK	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)

(+); Pozitif sonuç, (-); negatif sonuç

Çizelge 3.9. Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi antibiyotik dirençlilik profilleri

Antibiyotikler (µg/disk)	Dirençlilik Profili (n)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
P (10)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
OX (1)	R	R	R	R	I	R	R	I	R	R
GM (10)	S	S	S	I	S	I	I	R	S	S
CIP (5)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
FOX (30)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E (15)	S	I	I	R	R	R	I	R	S	S
CC (30)	S	S	S	S	S	I	S	R	S	S
INZ (10)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TP (15)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
VA (30)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TE (30)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
TIG (15)	S	S	I	S	I	R	S	S	S	S
RA (5)	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R
SXT (25)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

**R; Dirençli (Resistant), S; Duyarlı (Susceptible),
I; Orta duyarlı (Intermediate), n: Bakteri sayısı**



Şekil 3.11. Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi 1-10KK kodlu suşların kromozomal DNA lokasyonu görüntüsü

3.9. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Suşlarının Biyokimyasal Test Analizi, Antibiyotik Dirençlilik Profilleri ve Kromozomal DNA Lokasyonunun Belirlenmesi

Çizelge 3.10.a, Çizelge 3.10.b ve Çizelge 3.10.c’de Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarından temin edilen Stafilokok izolatlarının biyokimyasal testlerle tanımlanmaları sağlandıktan sonra, Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle antibiyogramları yapılmıştır (Şekil 3.11.a, Şekil 3.11.b ve Şekil 3.11.c). Daha sonra bir moleküler yöntem olan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile suşların *mecA* gen varlığına bakılmış ve dirençlilik profil sonuçlarının doğru sonuç verip-vermemesi test edilmiştir (Şekil 3.12.a, Şekil 3.12.b ve Şekil 3.12.c).

Çizelge 3.10.a. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi 1-17HÜ kodlu suşların biyokimyasal test sonuçları

Suş No	Katalaz Testi	Lam Koagülaz Testi	Tüp Koagülaz Testi	<i>mecA</i> Varlığının Gösterilmesi	Tanımlanan Tür
1HÜ	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
2HÜ	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
3HÜ	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
4HÜ	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
5HÜ	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
6HÜ	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
7HÜ	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
8HÜ	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
9HÜ	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
10HÜ	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
11HÜ	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
12HÜ	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
13HÜ	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
14HÜ	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
15HÜ	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
16HÜ	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
17HÜ	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)

(+); Pozitif sonuç, (-); negatif sonuç

Çizelge 3.10.b. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi 18-30HÜ kodlu suşların biyokimyasal test sonuçları

Suş No	Katalaz Testi	Lam Koagülaz Testi	Tüp Koagülaz Testi	<i>mecA</i> Varlığının Gösterilmesi	Tanımlanan Tür
18HÜ	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
19HÜ	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
20HÜ	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
21HÜ	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
22HÜ	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
23HÜ	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
24HÜ	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
25HÜ	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
26HÜ	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
27HÜ	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
28HÜ	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
29HÜ	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
30HÜ	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)

(+); Pozitif sonuç, (-); negatif sonuç

Çizelge 3.10.c. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi 31-40HÜ kodlu suşların biyokimyasal test sonuçları

Suş No	Katalaz Testi	Lam Koagülaz Testi	Tüp Koagülaz Testi	<i>mecA</i> Varlığının Gösterilmesi	Tanımlanan Tür
31HÜ	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
32HÜ	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
33HÜ	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
34HÜ	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
35HÜ	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
36HÜ	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
37HÜ	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
38HÜ	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
39HÜ	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)
40HÜ	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>S.aureus</i> (MRSA)

(+); Pozitif sonuç, (-); negatif sonuç

Çizelge 3.11.a. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi 1-15HÜ kodlu suşların antibiyotik dirençlilik profilleri

Antibiyotikler (µg/disk)	Dirençlilik Profili (n)														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
P (10)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
OX (1)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
GM (10)	S	S	R	S	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S
CIP (5)	R	S	S	R	S	S	R	S	R	S	S	S	R	S	S
FOX (30)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E (15)	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
CC (30)	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
INZ (10)	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
TP (15)	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S
VA (30)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TE (30)	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S
TIG (15)	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S
RA (5)	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	I	S	R	S
SXT (25)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

R; Dirençli (Resistant), S; Duyarlı (Susceptible), I; Orta duyarlı (Intermediate),
n: Bakteri sayısı

Çizelge 3.11.b. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi 16-27HÜ kodlu suşların antibiyotik dirençlilik profilleri

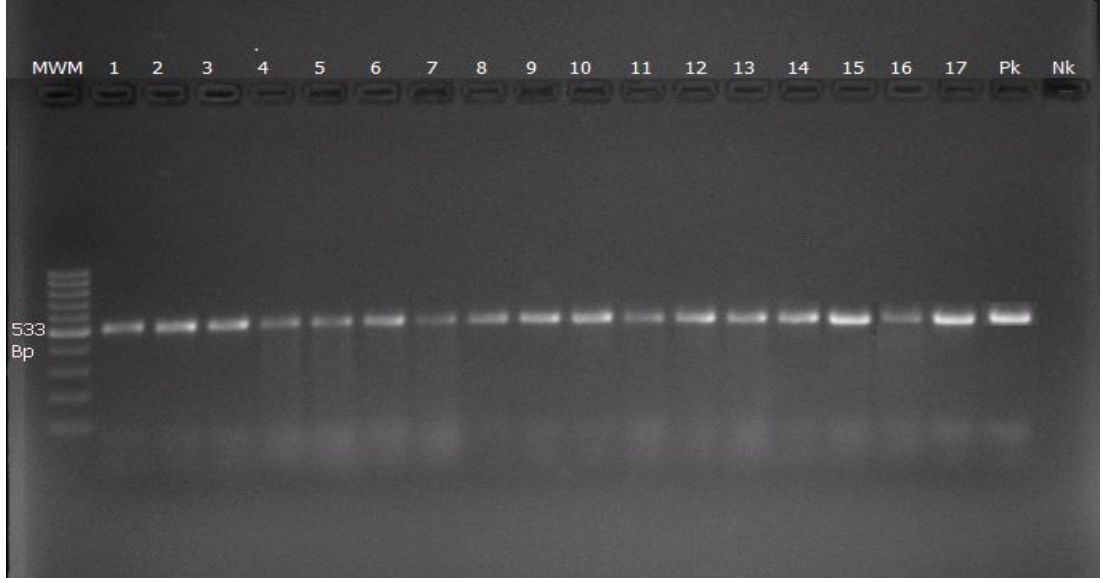
Antibiyotikler (µg/disk)	Dirençlilik Profili (n)											
	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
P (10)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
OX (1)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
GM (10)	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	R
CIP (5)	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R
FOX (30)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E (15)	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
CC (30)	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R
INZ (10)	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R
TP (15)	S	S	I	I	S	S	S	I	S	I	S	I
VA (30)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TE (30)	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
TIG (15)	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
RA (5)	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S
SXT (25)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

R; Dirençli (Resistant), **S;** Duyarlı (Susceptible), **I;** Orta duyarlı (Intermediate),
n: Bakteri sayısı

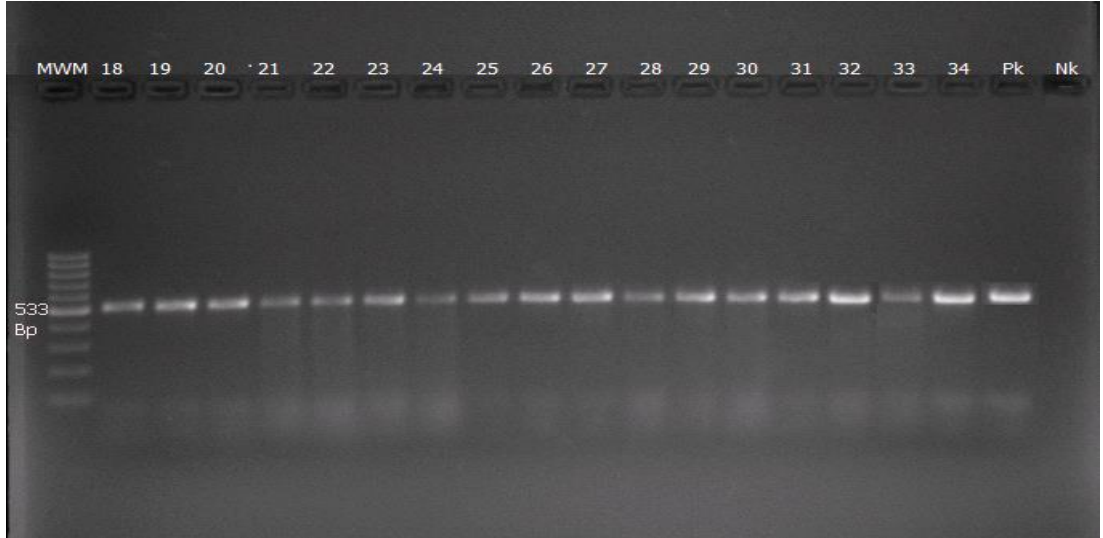
Çizelge 3.11.c. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi 28-40HÜ kodlu
suşların antibiyotik dirençlilik profilleri

Antibiyotikler (µg/disk)	Dirençlilik Profili (n)												
	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
P (10)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
OX (1)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
GM (10)	S	S	R	S	S	S	R	S	R	S	R	S	S
CIP (5)	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S
FOX (30)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E (15)	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R
CC (30)	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R
INZ (10)	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R
TP (15)	I	S	I	S	S	I	I	S	I	S	I	S	S
VA (30)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TE (30)	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S
TIG (15)	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S
RA (5)	S	R	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S
SXT (25)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

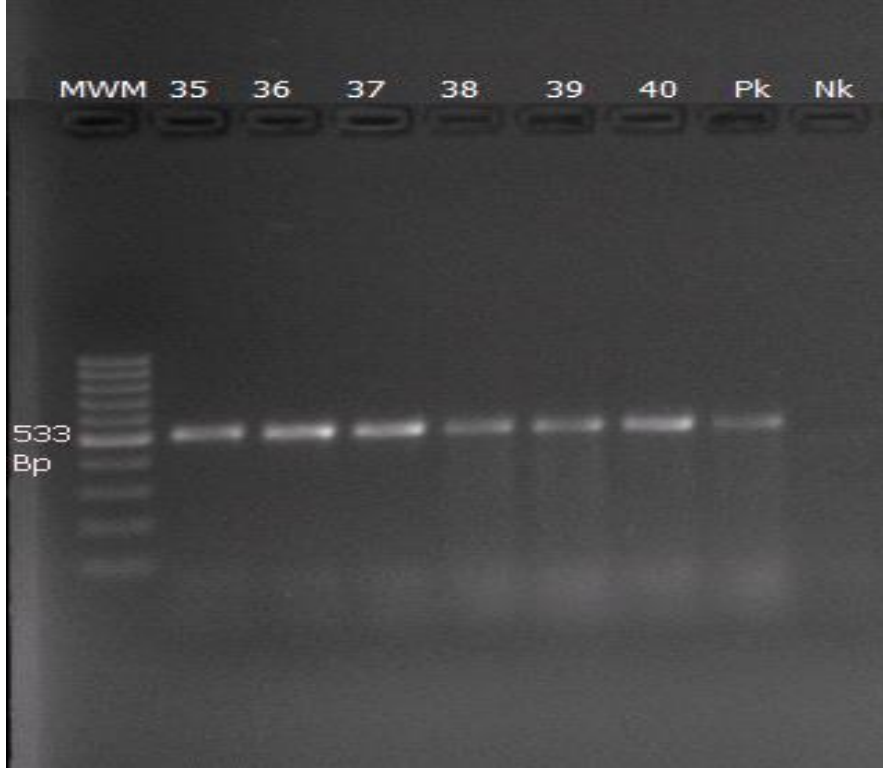
R; Dirençli (Resistant), **S;** Duyarlı (Susceptible), **I;** Orta duyarlı (Intermediate),
n: Bakteri sayısı



Şekil 3.12.a. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi 1-17HÜ kodlu suşların kromozomal DNA lokasyonu görüntüsü



Şekil 3.12.b. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi 18-34HÜ kodlu suşların kromozomal DNA lokasyonu görüntüsü



Şekil 3.12.c. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi 35-40HÜ kodlu suşların kromozomal DNA lokasyonu görüntüsü

Birbiriyle çelişen sonuçların varlığı nedeniyle farklılıklarının işlemsel hatalardan kaynaklanmadığını göstermek için bu izolatların tüm testleri bir kez daha tekrarlanmış ve aynı sonuçlar elde edilmiştir.

4. TARTIŞMA – SONUÇ

Tıp dünyasında sağlanan gelişmeler sonucu, bir taraftan insanoğlunun yaşam kalitesi uzarken, diğer yandan tanı ve tedavi amacıyla uygulanan girişimler, yoğun antibiyotik kullanımı gibi faktörlerin faturası “hastane enfeksiyonları” ve “antibiyotiklere dirençli bakteriler” olarak karşımıza çıkmaktadır [15].

Alexander Fleming’in ilk antibiyotik maddeyi bulması insanlık tarihinin şüphe götürmez en büyük buluşlarından birisidir. Bu başarı hikayesinin çoğu zaman atlanan önemli bir detayı bizzat Fleming tarafından Nobel ödülü konuşmasında dile getirilmiştir. Fleming konuşmasında, özellikle düşük doz kullanılarak yapılan tedavilerde kısa zamanda bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç kazandığının önemini belirterek ciddi bir soruna değinmiştir. Gerçekten de günümüze gelene kadar üretilen bütün antibiyotiklere karşı mikroorganizmalar çok kısa zamanda direnç kazanmışlar ve böylece çoğu antibiyotik, direnç probleminden dolayı kısıtlı kullanılabilir duruma gelmiştir [48]. Antibiyotiklerin kullanılmasıyla milyonlarca insanın hayatını tehdit eden bakteri kökenli hastalıklar artık tedavi edilebilir olmuşlardır. Ancak bakteriler kısa süre içinde tıbbın kullanımına sunulmuş her antibiyotik ilaca karşı direnç kazanmışlar ve bu nedenden dolayı özellikle hastane kökenli bakterilerden kaynaklanan bazı hastalıkların tedavisi neredeyse imkansız duruma gelmiştir. Örneğin; metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) gibi bakteriler çoğu zaman hiçbir ilaca cevap verememekte ve bu durumlarda son çare olarak cerrahi müdahalelere başvurulmaktadır [17].

Stafilokoklar, günümüzde hem toplum kökenli hem de hastane kökenli patojenler arasında ilk sıralarda yer almaktadır. Metisilin dirençli suşlar genetik direnç aktarımı sırasında diğer antibiyotik direnç genlerinin de beraber aktarımı nedeniyle çoğunlukla makrolidler, klindamisin, aminoglikozidler, kloromfenikol, florokinolon ve ko-trimoksazol gibi birçok antibiyotiğe de dirençli suşlardır.

S. aureus geçmişte önce penisilin, sonrasında penisilinaza dirençli antibiyotiklerin kullanıma girmesinden kısa bir süre sonrasında her iki antibiyotik grubuna da hızla

direnç geliştiren cilt ve yumuşak doku enfeksiyonu, osteomyelit, bakteremi ve endokardit gibi hayatı tehdit eden enfeksiyonlara neden olan bir bakteridir. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) başlangıçta sadece hastane ortamında tanımlanmişken zaman içerisinde toplum kaynaklı enfeksiyonlardan da izole edilmeye başlanmıştır [49,50].

Günümüzde *S. aureus* izolatlarında görülen en önemli problem, giderek artan oranlarda görülen metisilin direncidir. MRSA, bir kez hastaneye girdikten sonra tedavisi oldukça zor ve pahalıdır. Bundan dolayı hastanelerde MRSA izolatlarının saptanması, yayılımının incelenmesi, özellikle hemodiyaliz ve cerrahi hastaları gibi yüksek risk taşıyan hasta gruplarında MRSA kolonizasyonunun ortadan kaldırılması büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle modern laboratuvarlar için en önemli nokta MRSA'nın izolasyonu ve tanımlanmasıdır. Direnç belirleme amaçlı tercih edilen yöntemin rutin laboratuvarlarda kolay uygulanabilir, güvenilir ve çabuk sonuç vermesi son derece önemlidir. Metisilin direncinin en doğru şekilde saptanması her laboratuvarın görevidir. Standart fenotipik antibiyotik duyarlılık testleri hem maliyet/etkin olmaları, hem de kolay uygulanabilirlikleri nedeniyle rutin laboratuvarlarda tercih edilir [3,38]. Bu çalışmanın amaı çeşitli klinik örneklerden temin edilen stafilokok şüpheli izolatların metisilin dirençliliğinden sorumlu olan *mecA* gen varlığının araştırılması olmuştur.

Bu amaçla, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cebeci Hastanesi, Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nin değişik kliniklerinde tedavi olan hastalardan toplam 102 adet stafilokok suşu izole edilmiştir. İzolatların öncelikli olarak koloni morfolojisi, kanlı agarda hemoliz, katalaz ve koagülaz deneyleri ile biyokimyasal tanımlanmaları yapılmıştır. Sonra Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle antibiyotik direnç profilleri belirlenmiş, daha sonrasında ise PZR yöntemiyle genotipik tanımlama yapılmıştır. Tüm bu işlemlerin sonucunda izolatların 77 tanesi *S. aureus* (MRSA ve MSSA) , 25 tanesi (KNS ve MR-KNS) koagülaz negatif stafilokok (KNS) olarak tanımlanmıştır.

Metisilin direnci saptamada karşılaşılan sorunlar nedeniyle genetik direnci, fenotipik yöntemlerle en iyi gösteren test veya yöntem arayışı sürmektedir. Heterojen dirence sahip stafilokoklarda, sefoksitin metisilin direncini oksasilinden daha iyi gösterdiğini kanıtlayan birçok yayın bulunmaktadır. Bunun nedeni sefoksitin PBP 2a üretimini güçlü bir şekilde indüklemesidir. Bunun yanında sefoksitin stafilokokal PBP4'e de yüksek afinite gösterir. Yapılan çalışmalarla stafilokoklarda metisilin direnci gelişmesinde PBP2 ile PBP4'ün arasında yakın ilişki olduğu gösterilmiştir. Birçok çalışmada, sefoksitin disklerinin stafilokoklarda heterojen metisilin direncini ortaya koymada yüksek duyarlılık (% 97-100) ve seçicilik (% 99-100) gösterdiği belirtilmiştir. Bu yüzden CLSI (Clinical Laboratory Standarts Institute) 2004 yılından bu yana stafilokoklarda metisilin direncini göstermede oksasilin disk difüzyon ile birlikte sefoksitin disk difüzyon yönteminin de kullanılmasını önermektedir [34].

Çalışmamızda biz de bu durumu göz önünde bulundurarak, Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi vasıtasıyla Mueller Hinton Agar'da oksasilin diski ile birlikte sefoksitin diski kullanılmış ve suşların antibiyotik direnç profillerinin tespit edilmesi sağlanmıştır.

Fenotipik yöntemlerle tanımlanan suşların seçilen 14 antibiyotiğe (penisilin, oksasilin, gentamisin, siprofloksasin, sefoksitin, eritromisin, klindamisin, linezolid, teikoplanin, vankomisin, tetrasiklin, tigesiklin, rifampisin ve trimeth/sulfa) dirençlilikleri disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir (Çizelge 2.1). Çalışmada suşların % 85.3 penisilin, % 66.7 oksasilin, % 26.5 gentamisin, % 28.4 rifampisin, % 30.4 siprofloksasin, % 74 sefoksitin, % 15.7 klindamisin, % 9.8 linezolid, % 20.6 tigesiklin, % 19.6 tetrasiklin, % 18.6 eritromisin, % 15.7 trimetoprim/sulfametaksazol dirençli tespit edilmiştir. Teikoplanin ise % 12.7 orta duyarlı (Intermediate) olarak tespit edilmiştir. Metisiline dirençli *S. aureus* suşları tüm penisilinler, beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörü kombinasyonları, aminoglikozidler, makrolidler, klindamisin, tetrasiklin gibi ajanlara da dirençlidir. Bu yüzden, stafilokoklarda çoklu direnç saptanması metisilin direncini düşündürmelidir. Konuya ilişkin olarak yapılan çalışmalar MRSA'ların diğer antimikrobiyal gruplarına direnç oranlarının MSSA'lara göre daha yüksek olduğunu göstermiştir

[3,51]. Ayrıca bu çalışmada vankomisine dirençli suş saptanmamıştır. MRSA enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan vankomisine karşı dirençli suşun saptanmaması sevindirici bir durumdur. Çünkü bu enfeksiyonların tedavisinde kullanılan glikopeptit grubu antibiyotikler içerisinde yer alan vankomisin tedavide son seçenek olarak kullanılmaktadır.

S. aureus taşıyıcılığı, incelenen topluma göre değişmekte olup yaş gruplarına göre farklılıklar gösterir. Örneğin, yenidoğanda % 90'a varabilen burun taşıyıcılığı, bağışıklık sisteminin gelişmesiyle birlikte ilk iki yılda % 20'lere gerilemektedir. Genel popülasyonda burunda *S. aureus* taşıyıcılık oranları % 10-40 arasında değişirken, sağlık personelinde % 50-70'lere varabilmektedir [52].

MRSA ile kolonize ya da enfekte hastalar, hastane dışı kazanılmış olgular (uzun süreli bakım üniteleri, huzur evleri), daha önceden MRSA tanısı almış olan ve tekrar hastaneye kabul edilen hastalar, kolonize sağlık personeli ve hastane ortamı bu mikroorganizma ile meydana gelen enfeksiyonlar için en önemli kaynakları oluşturmaktadır. Kolonize ve enfekte hastalar, MRSA'nın başlıca kolonize olduğu vücut bölgeleri burun, aksilla, cerrahi ya da yanık yaraları, dekübitüs ülserleri, perine veya rektum, trakeostemi ya da gastrostomi bölgeleridir. MRSA, en sık sağlık çalışanlarının elleriyle bir hastadan diğerine doğrudan temas yoluyla geçer. Mikroorganizma, sağlık personelinin ellerinde kısa süre kalabildiği gibi, uzun süre de taşınabilmektedir. Sağlık çalışanlarının elleri, enfekte yara pansumanı sırasında kontamine olmakta ve inokülasyondan üç saat sonrasında bile ellerden MRSA saptanabilmektedir [38].

Dirençli *S. aureus* enfeksiyonlarından korunmak için öncelikle el hijyenine büyük önem verilmelidir. Ayrıca kolonize hastaya temas izolasyonu yapılmalı, hasta ve ortama dekolonizasyon işlemleri uygulanmalıdır. Taşıyıcılık araştırması için rutin kültür önerilmemekle birlikte salgın durumlarında kaynağın saptanması için yapılabilir. Son altı ay içinde antibiyotik kullanmış, uzun süre hastanede yatmış, diyabetik ve diyaliz hastaları gibi yüksek riskli hastalarda aktif sürveyansı öneren kılavuzlar bulunmaktadır. MRSA kolonize hastanın başka bir merkeze naklinde ya

da yeniden hastaneye kabulünde durumu denetlenmeli ve gerekirse temas önlemleri alınmalıdır [53].

Stafilokoklarda metisilin direnci kromozomal *mecA* geni tarafından kodlanmaktadır. Bu gen sadece metisiline dirençli izolatlarda bulunmaktadır ve bu genetik bilgi dirençli suşlardan duyarlı suşlara transdüksiyon yoluyla aktarılabilmektedir. Metisilin direnci homojen ve heterojen direnç olarak iki gruba ayrılmaktadır. Heterojen dirençli *S. aureus* suşlarında *mecA* geni eksprese olmamakta ve dirençli olması gereken bakteri rutin duyarlılık testlerinde duyarlı olarak saptanıp yanlış tedavi uygulanmaktadır. Bu direnç ortam koşullarında farklı değişiklikler yapılarak ortaya çıkarılabilmektedir. Ancak, en güvenilir sonuç polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile *mecA* geninin varlığının gösterilmesidir. Çalışmalarda *mecA* gen probe yöntemi ile paralel olarak uygulanan oksasilin agar tarama yöntemi arasında uyumlu sonuçlar alınmış ve çok örnekle çalışılan büyük merkezlerde metisilin direncinin bu yöntem ile araştırılmasının uygun ve ekonomik olduğu vurgulanmıştır [6].

Stafilokoklarda metisilin direnç oranları ülkeler, bölgeler, hastaneler ve hatta aynı hastanenin servisleri arasında bile farklılık göstermektedir. Ülkemizdeki çeşitli hastanelerden bildirilmiş MRSA oranlarında bu farklar görülmektedir. Yapılan çalışmalarda MRSA oranları; Marmara Üniversitesinde 2000 yılında % 67, 2001 yılında % 60 [54]; Gazi Üniversitesinde 2001 yılında % 73, 2002 yılında % 77 olarak bildirilmektedir [55]. Sipahi ve arkadaşlarının [56], yapmış olduğu çalışmada metisilin direnci 2001 yılında % 73.8 iken 2005 yılında % 55.3 olarak bulunmuştur. Gürsoy ve arkadaşlarının [57], yaptığı çalışmada *S. aureus* suşlarında % 32 oranında metisilin direnci saptanmıştır. İnönü Üniversitesi Hastanesi Enfeksiyon Kontrol Komitesinin yoğun bakım ünitelerinde yapmış olduğu sürveyans çalışma sonuçlarına göre; tüm klinik örneklerdeki nozokomiyal *S. aureus*'larda metisilin direnç oranları 2005 yılında % 77.7, 2006 yılında % 64.7 ve 2007 yılında % 83 olarak bulunmuştur ve sonuç olarak yaptıkları çalışmada MRSA bakteriyemileri özellikle yoğun bakım ünitesi gibi invaziv girişim uygulanan kliniklerde daha fazla rastlanmış, MRSA suşlarında vankomisin dışındaki tedavide alternatif olarak kullanılacak diğer antibiyotiklere de yüksek oranda direnç saptanmıştır. Bu çalışmalara ek olarak Türk Dağı ve arkadaşlarının [58], kan kültürlerinden izole ettikleri *S. aureus* suşlarında

metisilin direncini % 42.5; Kurutepe ve arkadaşlarının [59], çeşitli klinik örneklerden izole ettikleri *S. aureus* suşlarında metisilin direncini % 32.4 oranında bulmuşlardır. Yapılan bu çalışmalar sonucunda MRSA suşlarında MSSA suşlarına göre yüksek oranda direnç saptanmış ve metisilin direncinin sadece hastane kökenli (HK-MRSA) suşlarda değil toplum kökenli (TK-MRSA) suşlarda da giderek artan oranda karşılaşılabileceği düşüncesiyle *S. aureus* suşlarının direnç paternlerinin dikkatle izlenmesi ve tedavi planlanırken bunların güncel değerlerinin göz önüne alınması gerektiğinin kanaatine varılmıştır.

Akdeniz ülkelerini kapsayan ve ülkemizden de çeşitli laboratuvarların katıldığı bir çalışmada kan kültürlerinden izole edilen *S. aureus* izolatlarında MRSA oranı 2003 yılında % 43, 2004 yılında % 40 ve 2005 yılında % 35 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca metisiline direnç ile birlikte çoklu antibiyotik direncinin görülmesi nedeniyle tüm merkezlerin kendi direnç profilini belirleyerek uygun antibiyotik politikalarının oluşturulması üzerinde durulmuştur.

Yurt dışında yapılan çalışmalarda *S. aureus* suşlarında metisilin direnci Tayvan'da % 33.7, Fransa'da % 36, Avrupa'da % 27.7, Amerika'da ise % 32.4 olduğu tespit edilmiştir. Ülkeler ve hastaneler arasındaki bu farklı sonuçlar yerel sürveyans çalışmalarının önemini bir kez daha göstermektedir. Bununla birlikte direnç durumlarının düzenli olarak incelenmesi hastanelerdeki ampirik tedavi seçimleri açısından da önem taşımaktadır [17].

MRSA oranı ile ilgili yapılan çalışmalarda ülkemizde bu oranın değişmekle birlikte % 50'nin üzerinde olduğu bildirilmektedir [60]. Çalışmamızda, hastane kaynaklı 102 adet stafilokok suşunda % 74 oranında metisilin direnci tespit edilmiştir.

Metisilin direncinin doğru olarak belirlenmesi uygun antibiyotiğin kullanılması açısından önem taşımaktadır. Mikrobiyoloji laboratuvarlarında stafilokokların metisiline direncini saptamak için, oksasilin disk difüzyon, oksasilin agar tarama, mikrodilüsyon, agar dilüsyon, sefoksitin disk difüzyon, otomatize duyarlılık testleri, DNA hibridizasyon ve polimeraz zincir reaksiyonu teknikleri kullanılmaktadır. MRSA tespitinde önemli standart *mecA* geninin PZR ile belirlenmesine rağmen rutin

olarak laboratuvarlarda kullanımı yaygın değildir. Özel laboratuvar ortamı gerektirmesi, deneyimli personel ihtiyacı ve pahalı olması gibi nedenlerle çok tercih edilmemektedir [60]. Metisilin direncini saptamak için laboratuvarlarda kullanılan fenotipik ve genotipik yöntemlerin avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Metisiline direncin heterojen olması durumunda fenotipik yöntemler yetersiz kalmakta ve direncin tespitinde problemler olabilmektedir. Bu çalışmada da *S. aureus* olarak tanımlanan suşların metisilin dirençlilikleri disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiş ve 71 suşun metisiline dirençli olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca metisiline dirençli 4 adet suşun MR-KNS (metisiline dirençli koagülaz negatif) olduğu tespit edilmiştir. MRSA tespitinde son yıllarda disk difüzyon yönteminin yetersiz olduğu vurgulanmaktadır. Bu bakış açısıyla birlikte bu çalışmada disk difüzyon yöntemiyle metisiline dirençli bulunan 75 adet suşun ve disk difüzyon yöntemiyle metisiline duyarlı saptanan 27 suşun PZR yöntemiyle metisilin direnç geni (*mecA*) araştırılmıştır.

MRSA suşları sıklıkla beta-laktam grubu antibiyotiklere heterojen direnç gösterirler, diğer bir ifadeyle popülasyondaki her bir organizma direnç için genetik bilgi taşıyabilir, ancak invitro test ortamında sadece küçük bir bölümü dirençli fenotipi gösterir. Dirençli alt popülasyon genellikle duyarlı popülasyona göre çok yavaş ürer ve laboratuvar taramalarında atlanabilir. Heterojen dirençli suşların başarılı bir şekilde tespitinde; nötral pH, daha düşük ısılar (30-35°C), ortamda NaCl bulunması ve inkübasyon süresinin 48 saate kadar uzatılması gibi faktörler dirençli alt popülasyonun üremesine büyük oranda katkı sağlar. Bununla birlikte MRSA izolatlarının, sınırda oksasilin direnci gösteren *S. aureus* suşlarından ayırımındaki zorluklardan dolayı standart metot olarak PZR'yi rutin olarak kullanmayan klinik laboratuvarlar için MRSA'nın tespiti sorun oluşturabilir. Çünkü sınırda dirence sahip olan suşlarda direncin belirlenmesinde fenotipik yöntemler yetersiz kalmaktadır ve PZR yöntemiyle *mecA* geninin saptanması önemli bir standart olarak kabul edilmektedir [37].

Çalışmada disk difüzyon tekniğiyle metisiline dirençli saptanan 75 adet suşun (1AC, 5AC, 14AC, 15AC, 17AC, 2AE, 10AE, 16AE, 17AE, 1AN, 2AN, 3AN, 4AN, 5AN, 6AN, 7AN, 8AN, 9AN, 10AN, 11AN, 12AN, 13AN, 14AN, 15AN, 16AN, 1KÜ,

2KÜ, 3KÜ, 4KÜ, 5KÜ, 6KÜ, 7KÜ, 8KÜ, 9KÜ, 10KÜ, 1HÜ, 2HÜ, 3HÜ, 4HÜ, 5HÜ, 6HÜ, 7HÜ, 8HÜ, 9HÜ, 10HÜ, 11HÜ, 12HÜ, 13HÜ, 14HÜ, 15HÜ, 16HÜ, 17HÜ, 18HÜ, 19HÜ, 20HÜ, 21HÜ, 22HÜ, 23HÜ, 24HÜ, 25HÜ, 26HÜ, 27HÜ, 28HÜ, 29HÜ, 30HÜ, 31HÜ, 32HÜ, 33HÜ, 34HÜ, 35HÜ, 36HÜ, 37HÜ, 38HÜ, 39HÜ, 40HÜ kodlu izolatlar) polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemiyle de *mecA* geni içerip içermediği araştırılmış ve yapılan işlemler sonucu 533 baz çiftlik *mecA* genine sahip oldukları saptanmıştır. Aynı şekilde 16AC, 18AC ve 9AE kodlu izolatlar ise metisiline duyarlı olarak saptanmış olup yapılan PZR yöntemiyle *mecA* pozitif olduğu bulunmuştur. Bu suşların disk difüzyon yöntemi ile metisilin direncinin belirlenememesinin nedeni olarak, bu izolatların heterojen direnç göstermesi olabileceği tahmin edilmiştir (Bkz. Çizelge 3.3, Çizelge 3.5 ve Çizelge 3.7, Çizelge 3.9, Çizelge 3.11.a, Çizelge 3.11.b, Çizelge 3.11.c, Şekil 3.8.a, Şekil 3.8.b, Şekil 3.9, Şekil 3.10, Şekil 3.11, Şekil 3.12.a, Şekil 3.12.b, Şekil 3.12.c).

Çalışmamızda yapılan testler sonucunda çeşitli kliniklerden izole edilen stafilocoklar, biyokimyasal test, antibiyogram ve *mecA* gen varlığı sonuçlarına göre tiplendirilip yüzdelik oranları belirlenmiştir. Sonuç olarak % 21 KNS (koagülaz negatif stafilocok), % 4 MR-KNS (metisiline dirençli koagülaz negatif stafilocok), % 72 MRSA (metisiline dirençli *S. aureus*), % 3 MSSA (metisiline duyarlı *S. aureus*) oranlarına sahip stafilocok çeşitliliği belirlenmiş ve pasta grafiği ile gösterilmiştir (Bkz. Şekil 3.1).

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cebeci Hastane'sinden alınan 19 adet stafilocok izolatlarında yapılan deneyler sonucunda 14AC kodlu (Kan kateteri) izolatın metisiline dirençli olduğu belirlenmiş, biyokimyasal testlerde koagülaz pozitif stafilocok olduğu tespit edilmiştir. Bu izolat sefoksitine dirençli olup, oksasiline ise duyarlı olduğu saptanmıştır, ancak günümüz şartlarında sefoksitin disk sonucu önemli olduğu için dirençli olarak kabul edilmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile de *mecA* geni taşıdığı saptanmıştır. Sonuç olarak bu izolatın metisiline dirençli koagülaz negatif stafilocok (MR-KNS) olduğu belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 3.2.b, Çizelge 3.3, Şekil 3.8.a).

Ankara Eğitim ve Araştırma Hastane'sinden alınan 17 adet stafilocok izolatlarında yapılan deneyler sonucunda 10AE, 16AE ve 17AE kodlu izolatların metisiline dirençli olduğu belirlenmiş, ancak biyokimyasal testlerde koagülaz negatif stafilocok olduğu tespit edilmiştir. Bu izolatlar sefoksitine dirençli olup, oksasiline duyarlı olduğu saptanmıştır, ancak günümüz şartlarında sefoksitin disk sonucu önemli olduğu için dirençli olarak kabul edilmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile de *mecA* geni taşıdığı saptanmıştır. Bu izolatların metisiline dirençli koagülaz negatif stafilocok (MR-KNS) olduğu belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 3.4.b, Çizelge 3.5, Şekil 3.9).

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cebeci Hastane'sinden ve Ankara Eğitim ve Araştırma Hastane'sinden alınan 14AC, 10AE, 16AE ve 17AE kodlu MR-KNS suşlarının oluşmasında etken olarak metisiline dirençli *S. aureus*'larda var olan *mecA* geninin transdüksiyon yoluyla KNS'lere aktarılmış olabileceği kanısına varılmıştır (Bkz. Çizelge 3.2.b, Çizelge 3.3, Şekil 3.8.a, Çizelge 3.4.b, Çizelge 3.5, Şekil 3.9).

Peksel [3], yapmış olduğu çalışmada *S. aureus* dışında koagülaz testi pozitif olan türlerin *S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. lugdunensis*, *S. schleiferi* olabileceğini belirtmiş ancak, bu dört türün çok nadir olarak klinik örneklerden soyutlanabileceğini ve koagülaz pozitif olmalarına rağmen gerek yerleşimleri, gerek mikrobiyolojik özellikleri gerekse oluşturdukları enfeksiyonlar açısından daha çok koagülaz negatif stafilocoklar içerisinde incelendiğini belirtmiştir. Ayrıca *S. lugdunensis* ve *S. schleiferi* kümeleştirici faktör (clumping factor) oluşturmaları ve termostabil DNaz üretebilmeleri nedeniyle *S. aureus*'a benzer olduğunu belirtmiştir. Ancak *S. lugdunensis* ve *S. schleiferi*'nin enfeksiyon oluşturmalarındaki patojenik mekanizmaları henüz bilinmemekle beraber virulans determinantlarını *S. aureus* ile paylaştıklarının düşünüldüğünü ifade etmiştir. Çalışmamızda, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cebeci Hastane'sinden ve Ankara Eğitim ve Araştırma Hastane'sinden temin ettiğimiz 14AC (Kan kateteri, MR-KNS, *S. lugdunensis*), 12AE (İdrar kateteri, KNS, *S. lugdunensis*) ve 15AE (Kan kateteri, KNS, *S. lugdunensis*), kodlu izolatların aslında KNS oldukları fakat koagülaz test sonucunun ise pozitif olduğu

saptanmıştır (Bkz. Çizelge 3.2.b, Çizelge 3.3, Şekil 3.8.a ve Çizelge 3.4.b, Çizelge 3.5, Şekil 3.9).

Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastane'sinden alınan 16 adet stafilocok suşunun yapılan tüm deneyler sonucunda hepsinin metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) olduğu saptanmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile de *mecA* gen varlığının doğruluğu tespit edilmiştir (Bkz. Çizelge 3.6, Çizelge 3.7, Şekil 3.10).

Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastane'sinden alınan 10 adet stafilocok suşunun yapılan tüm deneyler sonucunda hepsinin metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) olduğu saptanmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile de *mecA* gen varlığının doğruluğu tespit edilmiştir (Çizelge 3.8, Çizelge 3.9, Şekil 3.11).

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastane'sinden alınan 40 adet stafilocok izolatlarının yapılan deneyler sonucunda tüm izolatlar metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) olarak saptanmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile de doğruluğu saptanmıştır (Bkz. Çizelge 3.10.a, Çizelge 3.10.b, Çizelge 3.10.c, Çizelge 3.11.a, Çizelge 3.11.b, Çizelge 3.11.c, Şekil 3.12.a, Şekil 3.12.b, Şekil 3.12.c).

Stafilocokların neden olduğu enfeksiyonların kontrol ve tedavisinde uygun antibiyotiğin seçilmesi bir hayli önemlidir. Çoklu direnç ile öne çıkan MRSA'larda doğru antibiyotik tercihi için öncelikle metisilin dirençli suşlarının hızlı ve doğru olarak tanımlanması gereklidir [61]. Yukarıda belirttiğimiz 3 adet (16AC, 18AC ve 9AE) stafilocok izolatı gibi heterojen direnç gösteren suşların direnç tespitinde doğru sonuçların alınması için fenotipik yöntemlerin, genotipik yöntemlerle desteklenmesi doğru sonuçların alınmasını sağlayacaktır.

Sebebi her ne olursa olsun fenotipik karakterlere bağlı direnç çalışmalarında yanlış negatiflikler ya da pozitiflikler söz konusu olabilmektedir. Bu nedenle fenotipik görünüm önemli olmadığı aynı zamanda heterojen suşlarda da sorun oluşturmayan PZR tabanlı çalışmalar yaygınlaştırılmalıdır [6].

Fenotipik yöntemler içerisinde de özellikle metisiline dirençli suşlarda tüp deneyi ile koagülazın negatif olarak bulunabileceği belirtilmektedir [27,31]. Bu çalışmada 10AE ve 16AE kodlu suşların lam deneyi ile pozitif, tüp deneyi ile koagülaz negatif olduğu bulunmuş, disk difüzyon yöntemiyle sefoksitine dirençli ve *mecA* genine sahip olduğu tespit edilmiştir (Bkz. Çizelge 3.4.b).

Sonuç olarak klinik örneklerden izole edilen MRSA suşlarının tiplendirilmesi, hastaneler veya üniteler arasındaki suşların yayılımını taramak ve suşlar arasındaki ilişkiyi incelemek için kullanılan, hastanelerde enfeksiyon kontrolünün etkili uygulamasının temelini oluşturmaktadır. Ayrıca hastaneye yeni bir suş geldiğinde bunun farkına varılmasını ve gereken önlemlerin alınmasını sağlamaktadır.

S. aureus antimikrobiyal ajanlara karşı direnç geliştirme konusunda oldukça başarılı bir bakteridir. Antibiyotiklerin uygunsuz ve gelişigüzel kullanımı ile birlikte de kısa sürede birden çok ilaca karşı direnç geliştirmektedir. Çalışmada da metisiline dirençli suşlarda, kullanılan tüm antibiyotiklere (vankomisin hariç) direnç saptanmış olması nedeniyle hastanelerin *S. aureus* suşlarının direnç paternlerini düzenli olarak dikkatle izlenmesi ve tedavide uygun ve etkin antibiyotiğin kullanımının sağlanması gerektiğine inanılmıştır. Bu çalışmada disk difüzyon yöntemi ile metisiline duyarlı olarak tespit edilen suşlar moleküler yöntemlerle metisilin direnç geni taşıdığı saptanmıştır. Bu sonuç nedeniyle disk difüzyon tekniği ile duyarlı olarak belirlenen suşların hepsinde de *mecA* geninin araştırılması gerektiği saptanmıştır. Bu sonuçlar bize metisilin direnci tespitinde disk difüzyon tekniğinin yetersiz olduğunu, direncin belirlenmesinde mutlaka moleküler teknikler kullanılması gerektiğini göstermektedir. Bu düşünceye sahip olmamızda bize örnek teşkil eden 16AC, 18AC ve 9AE kodlu izolatlarının iyi bir örnek teşkil ettiğini ve yapılacak bilimsel çalışmalara bu açıdan katkısı olacağını düşünmemize neden olmuştur.

KAYNAKLAR

- [1] Sultan, N., İmir, T., Aybay, C., Özkan S., Stafilocokkal Protein A ve Endotoksinin Değişik Konsantrasyondaki Kombinasyonlarının Kanserli hastaların NK ve LAK Hücreleri üzerine olan etkisi. TÜBİTAK, Proje No: SBAG 1677, 4-5, Ankara, 1998.
- [2] Gülbandılar, A., Kütahya Yöresinde Burun Mukozasındaki *Staphylococcus aureus* Taşıyıcılığının ve Antibiyotik Duyarlılığının Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Dumlupınar Üniversitesi, Kütahya, 2009.
- [3] Peksel, H., Hastane., Hastane Kökenli Koagülaz Negatif Stafilocok Suşlarında Oksasilin Direncinin Moleküler ve Geleneksel Yöntemlerle Araştırılması. Uzmanlık Tezi. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir, 2006.
- [4] Ağalar, C., Göçmen, S. J., Kılıç, D., Kaygusuz, S., Karabıçak, Ç., Üçüncü Basamak Bir Referans Hastanesinde İzole Edilen Metisilin Dirençli Stafilocok Suşlarında Duyarlılık. Journal of Clinical and Experimental Investigations (JCE). 3 (1): 71-74, 2012.
- [5] Çelik, İ., Cihangiroğlu, M., Sevim, E., Çabalak, M., Akbulut, A., Sağlık Çalışanlarının Burunlarından İzole Edilen Koagülaz Pozitif ve Negatif Stafilocoklarda Metisilin Direnci ve Slime Pozitifliği. Fırat Tıp Dergisi. 10 (3): 123-126, 2005.
- [6] Çiftci, İ. H., Altındış, M., Çetinkaya, Z., Aşık, G., Aktepe, O. C., Klinik Örneklerden İzole Edilen Stafilocoklarda *mecA* Varlığının Araştırılması. Kocatepe Tıp Dergisi (The Medical Journal of Kocatepe). 10: 17-20, 2009.

- [7] Telli, M., Sümerkan, B., Eşel, D., *Staphylococcus aureus*'ta Metisilin Direncinin Belirlenmesinde Sefoksitin Disk, Oksasilin Disk, Oksasilin Agar Tarama ve PBP2a Lateks Testlerinin Karşılaştırılması. *İnfeksiyon Dergisi* (Turkish Journal of Infection). 20 (2): 93-96, 2006.
- [8] Çıtak, S., Karaçocuk, E., Hastane ve Toplum Kaynaklı Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* Suşlarının Çeşitli Antibiyotiklere Duyarlılığı. *Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 26 (1): 13-17, 2004.
- [9] Cirit, O. S., Yıldırım, T., Çoban, A. Y., *Staphylococcus aureus* Klinik İzolatlarında Panton-Valentin Lökosit Varlığının Araştırılması. *Trakya University Faculty of Medicine, Balkan med J* 28: 119-124, 2011.
- [10] Temiz, A., Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri, 4. baskı, Hatiboğlu Yayınevi, Ankara, 82-93, 118-140, 216-232, 2008.
- [11] Bayhün, S., Klinik ve Gıda Kaynaklı Örneklerden İzole Edilen *Staphylococcus aureus*'un Antibiyotik Dirençliliklerinin Karşılaştırılması ve Beta Laktamaz Aktivitelerinin Değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi, Ankara, 2008.
- [12] Güneş, H., Metisiline Dirençli Stafilokoklarda Glikopeptid Antibiyotiklere Duyarlılık Durumunun Araştırılması. Uzmanlık Tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Isparta, 2008.
- [13] Aydın, A., Bostan, K., Harsa, Ş., Okuklu, B., Muratoğlu, K., Gıda ve İlişkili Kaynaklardan İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarının Bazı Patojenite Özelliklerinin Belirlenmesi ve Filogenetik İlişkilerinin Araştırılması. TÜBİTAK, Proje No: 107 T 266, İstanbul, 2009.

- [14] Spyridon, S. M., Weight-For-Age Percentile and Its Association to Community Acquired Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Among Pediatric Patients. Master of Science, The University of Texas, Houston, 2013.
- [15] Kutlu, B. S., Çeşitli Klinik Materyallerden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarında Metisilin Direnci ve E-Test İle Vankomisin MIC Değerlerinin Araştırılması. Uzmanlık Tezi. Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul, 2006.
- [16] Yıldırım, İ., Milci, S., Çiğ ve Pastörize Sütten Üretilen Beyaz Peynirlerin Üretimi ve Olgunlaşma Döneminde Stafilokokkal Enterotoksin Miktarının Belirlenmesi. TUBİTAK, Proje No: 106O793, Antalya, 2007.
- [17] Baytaroğlu, E., Klinik Örneklerden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarının Metisilin Dirençlilik Genlerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi, Ankara, 2012.
- [18] Bilgehan, H., Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. 243-265. Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları, Bornova, İzmir, 1993.
- [19] Çavuşoğlu, Z. B., Klinik Örneklerden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarından Elde Edilen Bakteriyajlarda Bulunan Scin, Chips, Sei, Sek Toksin Genlerinin Varlığının PZR ve Southern Blot Yöntemi İle Kıyaslanması. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, Ankara, 2012.
- [20] Çay, M., Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus*'un PZR İle Hızlı Tanısı. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi, Ankara, 2006.
- [21] Bannerman, T.L., *Staphylococcus, Micrococcus* and Other Catalase Positive Cocci that Grow Aerobically. Manual of Clinical Microbiology, Ed: Murray, P. R., Baron, E. J., Tenover, M.A., Tenover, J. H., ASM Press, Washington DC, 384-404, 2003.

- [22] Forbes, B.A., Sahm, D.F., Weissfeld, A.S., *Staphylococcus, Micrococcus and Similar Organisms*. Bailey and Scott's Diagnosttic Microbiology, 12th Ed: Mosby, USA, 254-263, 2007.
- [23] Berkiten, R., Gram Pozitif Koklar. Tıbbi mikrobiyoloji, Emel Bozkaya, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 1-29, 2005.
- [24] Peacock, S.J., *Staphylococcus*. Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, 10th, Ed: Borriello, P., Murray, P., Funke, G., Arnold, H., London, United Kingdom, 771-832, 2005.
- [25] Moreillon, P., Que, Y., Glauser, M.P., *Staphylococcus aureus (Including Staphylococcal Toxic Shock)*, Principles and Practice of Infectious Disease, 6th, Ed: Mandel, G.L., Bennett, J.E., Dolin, R., Churchill Livingstone, NewYork, 2321-2351, 2005.
- [26] Alen, S., Koneman, E., Janda, W., Schreckenberger, P., Winn, W., Woods, G., Procop, G., The Gram-Positive Cocci Part 1 Staphylococci and Related Organism. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 5th, Ed: Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, 539-576, 2006.
- [27] Winn, w.c., Allen, S.D., Janda, W.M., Koneman, E.W., Procop, G.W., Schreckenberger, P.C., Woods, G.L., Gram-Positive Cocci Part 1 Staphylococci and related Gram-Positive Organisms, Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 6, Ed: Darcy, P., Lippincott Williams Wilkins, Baltimore, 623-671, 2006
- [28] Iwatsuki, K., Yamasaki, O., Morizane, S., Oono, T., Staphylococcal Cutaneous Infections: Invasion, Evasion and Aggression, Journal of Dermatological Science, 42: 203-214, 2006.

- [29] Tristan, A., Ferry, T., Durand, G., Dauwalder, O., Bes, M., Lina, G., Vandenesch, F., Etienne, J., Virulence Determinants in Community and Hospital Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, Journal of Hospital Infection, 62: 105-109, 2007.
- [30] Cengiz, A.T., *Staphylococcus*. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Ustaçelebi, S., Güneş Kitabevi, Ankara, 339-346, 1999.
- [31] Brown Derek, F.J., Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). J Antimicrob Chemother, 56: 1000-1018, 2005.
- [32] Dündar, D., Sönmez T. G., Klinik Örneklerden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarının Antimikrobiyal Duyarlılıkları: Üç Yıllık Değerlendirme. Aknem Dergisi, 23(1): 8-12, 2009.
- [33] Aydın, M.D., Stafilokok İnfeksiyonları. Tıbbi Mikrobiyoloji 3, Ed: Gürler, B., Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 42-48, 2008.
- [34] Akoğlu, H., Hacettepe Üniversitesi Erişkin Hastanesinde 2004-2005 Yıllarında Hastane Kaynaklı İnfeksiyonlardan İzole Edilen Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) Suşlarının Moleküler Tiplendirilmesi. Uzmanlık Tezi. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara, 2007.
- [35] Tiemersma, E.W., Bronzwaer, S.L., Lyytikäinen, O., Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe 1999-2002, Emerg Infect Dis., 10(9): 1627-1634, 2004.
- [36] Borg, M.A., De Kraker, M., Scicluna, E., Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in invasive isolates from southern and eastern Mediterranean countries, J Antimicrob Chemother, 60(6): 1310-1315, 2007.

- [37] Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Landry, M.L., Pfaller, M.A., Manual of Clinical Microbiology, Ed: Başustaoğlu, A., Atlas Kitapçılık, Ankara, 9. baskı (cilt 1), 390-411, 2009.
- [38] Sancak, B., *Staphylococcus aureus*'ta Metisilin ve Vankomisin Direnci. Hacettepe Tıp Dergisi, 38: 127-134, 2007.
- [39] Sancak, B., MRSA Direnç Mekanizmaları: Dünyada ve Türkiye'de Epidemiyolojisi. Aknem Dergisi, 26 (2): 38-47, 2012.
- [40] Willke, A., Stafilokoklarda Metisiline Direnç Mekanizmaları ve Belirlenmesi. Ankem Dergisi, 6 (2): 288-291, 1992.
- [41] Rice, L.B., Salman, D., Bonomo, R.A., Mechanism of Resistance to Antimicrobial Agents. Manual of Clinical Microbiology, 8th, Ed: Murray, p.r., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Pfaller, M.A., Tenover, R.H., ASM Pres, Washington DC, 1074-1101, 2003.
- [42] Ünal, S., *Staphylococcus aureus*: Direnç Mekanizmaları. Gram Pozitif Bakteri İnfeksiyonları, Ulusoy, S., Usluer, G., Ünal, S., Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 23-38, 2004.
- [43] Turaç Biçer, A., Hastane İzolatı *Staphylococcus aureus* ve Koagülaz Negatif *Staphylococcus* Suşlarında Metisilin Direncinin Farklı Yöntemlerle Araştırılması. Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Adana, 2009.
- [44] Köksal, F., Nükleik Asit Çoğaltma Yöntemleri. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji, Ed: Durmaz, R., Nobel Tıp Kitabevi, Adana, 15-34, 2001.
- [45] Bilgehan, H., Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi. 12. baskı, Barış Yayınları, İzmir, 227-251, 153-188, 2008.

- [46] Ünal, S., MRSA Problemi. *Aknem Dergisi*, 23 (2): 1-12, 2009.
- [47] Anonim, Klinik Örneklerden *Staphylococcus aureus* Tanımlaması ve Metisilin Direncinin Belirlenmesi İçin Laboratuar Standart Uygulama Prosedürleri. (Erişim tarihi: 10.05.2013)
- [48] Lee, H. H., Molla, M. N., Cantor, C. R., Collins, J. J., Bacterial charity work leads to population-wide resistance. *Nature medicine*, 467 (7311): 82-85, 2010.
- [49] Martinez, J.L., Fajardo, A., Garmendia, L., Hemandez, A., Linares, J. F., Martinez Solano, L., Sanchez, M. B., A global view of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev*, 33 (1): 44-65, 2009.
- [50] Ippolito, G., Leone, S., Lauria, F.N., Nicastrì, E., Wenzel, R.P., Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the superbug. *Int J Infect Dis*, 14 (4):7-11, 2010.
- [51] Ekşi, F., Gayyurhan, E. D., Bayram, A., Gaziantep Üniversitesi Hastanesinde İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarının Antimikrobiyal Duyarlılıkları. *Aknem Dergisi*. 22 (4): 203-208, 2008.
- [52] Ergün Arabacı, F., E., Oldacay, M., Sağlık Çalışanlarının Burun Kültürlerinden İzole Edilen Stafilokoklarda Metisilin Direnci ve Slime Pozitifliği. *İnfeksiyon Dergisi*. 22 (3): 165-168, 2008.
- [53] Hızel, K., Dirençli Gram Pozitif Kok İnfeksiyonlarının Tedavi ve Yöntemi. *Ankem Dergisi*. 25 (2): 50-53, 2011.
- [54] Korten, V., Hastane Enfeksiyonlarına Yol Açan Bakterilerde Direnç Sorunu. Gram Pozitif Kok Enfeksiyonları Sorunlar ve Çözümler immunsuprese Hastalar, Ed: Uzun, Ö., Güneş Kitabevi, Ankara, 23-26, 2003.

- [55] Kaçmaz, B., Akça, G., Sultan, N., Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde elde edilen *Staphylococcus aureus*'larda metisilin direnç oranı, XXX. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Antalya, 1-38, 2002.
- [56] Sipahi, O.R., Pullukçu, H., Aydemir, Ş., Taşbakan, M., Tunger, A., Arda, B., Yamazhan,, T., Ulusoy, S., Mikrobiyolojik Kanıtlı Hastane Kökenli *Staphylococcus aureus* Bakterilerinde Direnç Paternleri: 2001-2005 yıllarının değerlendirilmesi. *Aknem Dergisi*. 21 (1): 1-4, 2007.
- [57] Gürsoy, N.C., Ersoy, Y., Günal, S., Kuzucu, Ç., Kan Kültürlerinden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarının Antibiyotiklere Direnç Durumlarının Değerlendirilmesi. *Aknem Dergisi*. 23 (1): 26-29, 2009.
- [58] Türk Dağı, H., Arslan, U., Tuncer, İ., Kan Kültürlerinden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarının Antibiyotiklere Duyarlılıkları. *Ankem Dergisi*. 25 (2): 84-88, 2011.
- [59] Kurutepe, S., Sürücüoğlu, S., Gazi H., Teker, A., Özbakkaloğlu, B., Metisiline Dirençli ve Duyarlı *Staphylococcus aureus* suşlarının Antibiyotiklere direnç oranları. *İnfeksiyon Dergisi*. 21 (4):187-191, 2007.
- [60] Vural, A., Afşar, İ., Kurultay, N., Demirci, M., *Staphylococcus aureus*'da Metisilin Direncinin Saptanmasında Disk Difüzyon, Oksasilin Agar Tarama, Mikrodilüsyon ve PBP2a Lateks Aglutinasyon Testlerinin Karşılaştırılması. *Aknem Dergisi*. 25 (3): 145-149, 2011.
- [61] Cengiz, A.T., *Staphylococcus*, Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ed: Ustaçelebi, S., Güneş Kitabevi, Ankara, 339-346, 1999.