KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *Staphylococcus aureus* SUŞLARININ METİSİLİN DİRENÇLİLİK GENLERİNİN BELİRLENMESİ

Elif BAYTAROĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ŞUBAT 2012
ANKARA

Elif BAYTAROĞLU tarafından hazırlanan KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *Staphylococcus aureus* SUŞLARININ METİSİLİN DİRENÇLİLİK GENLERİNİN BELİRLENMESİ adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Zehra Nur YÜKSEKDAĞ ……
Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Yavuz BEYATLI …….
Biyoloji Anabilim Dalı, G.Ü

Doç. Dr. Zehra Nur YÜKSEKDAĞ ……
Biyoloji Anabilim Dalı, G.Ü

Yrd. Doç. Dr. Miraç YILMAZ …….....
Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı, H.Ü

Tarih: 16.02.2012

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

Prof. Dr. Bilal TOKLU …….
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Elif BAYTAROĞLU

KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *Staphylococcus aureus* SUŞLARININ METİSİLİN DİRENÇLİLİK GENLERİNİN BELİRLENMESİ
(Yüksek Lisans Tezi)

Elif BAYTAROĞLU

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Şubat 2012

ÖZET

Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) hem toplum hem de hastane kökenli enfeksiyonlardan izole edilen önemli bir patojendir. Antibiyotiklerin uzun süreli kullanımı ile birlikte, bu bakteri, farklı direnç mekanizmaları geliştirmiştir. Tedavisi ise oldukça güç ve maliyetlidir. *S. aureus* suşlarında metisilin direncinin doğru ve hızlı bir şekilde belirlenmesi, enfeksiyon kontrol önlemlerinde ve hastanede yayılımının önlenmesi açısından anahtar rol oynamaktadır. Çalışmanın amacı, klinik örneklerden izole edilen *S. aureus* suşlarının metisilin dirençlilik genlerinin belirlenmesidir. Bu çalışmada, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde tedavi olan hastalara ait çeşitli klinik örneklerden soyutlanan 48 *Staphylococcus aureus* suşu incelenmiştir. Suşların tanımlanması standart mikrobiyolojik yöntemler (koloni morfolojisi, Gram boyama, kanlı agarda hemoliz, DNaz, katalaz, koagülaz testleri ve mannitol fermentasyonu) kullanılarak gerçekleştirilmiş; metisilin direnci, "Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI)" önerileri doğrultusunda Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Bu suşlardan 39 tanesi metisiline duyarlı olmasına rağmen 9 tanesi (EB3, EB4, EB6, EB17, EB18, EB33, EB36, EB46, EB47) metisiline dirençli bulunmuştur. Stafilokoklarda heterojen dirençli suşlar nedeniyle metisilin direncinin fenotipik yöntemlerle gösterilmesi sıklıkla yanlışlıklara neden olduğundan, *Staphylococcus aureus*

izolatlarında metisilin direncinin gösterilmesinde en uygun yöntem polimeraz zincir reaksiyonu ile *mecA* geninin belirlenmesidir. Bu amaçla, disk difüzyon yöntemi ile metisiline dirençli olduğu belirlenen 9 *Staphylococcus aureus* suşlarından ve metisiline duyarlı 3 suşdan (EB5, EB9, EB12) kaynatma yöntemiyle DNA ekstraksiyonu yapılmış, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemiyle *mecA* geni araştırılmıştır. Disk difüzyon yöntemi ile duyarlı çıkan EB12 suşunun metisilin direnç geni içerdiği tespit edilmiştir. Bu çalışma metisilin direncinin tespitinde disk difüzyon tekniğinin moleküler yöntemlerle desteklenmesi gerektiğini göstermektedir.

Bilim Kodu : **203.1.023**
Anahtar Kelimeler : ***Staphylococcus aureus*, metisilin direnci**
Sayfa Adedi : **65**
Tez Yöneticisi : **Doç. Dr. Zehra Nur YÜKSEKDAĞ**

DETERMINATION OF METHICILLIN RESISTANCE GENES OF *Staphylococcus aureus* STRAINS ISOLATED FROM CLINICAL SPECIMENS

(M.Sc. Thesis)

Elif BAYTAROĞLU

GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

February 2012

ABSTRACT

Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is an important pathogen which is responsible for community acquired and nosocomial infections. With the long-term use of antibiotics this bacteria developed different resistance mechanisms. Treatment is extremely difficult and expensive. Rapid and accurate detection of methicillin resistance in *S. aureus* has become a key element on infection control measures and limiting the spread of this organism. The purpose of this study, determination of methicillin resistance genes of *S. aureus* strains isolated from clinical specimens. This study analyzed 48 *Staphylococcus aureus* strains isolated from the samples of the patients in Gazi University Medical Hospital. Identification of the strains was based on standart microbiological procedures (colony morphology, Gram stain, hemolysis on blood agar, DNase, catalase, coagulase reactions and mannitol fermentation) and methicillin resistance was determined by Kirby-Bauer disk diffusion method according to the suggestions of Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Although 39 of *S. aureus* strains were sensitive to methicillin (MSSA), 9 of them (EB3, EB4, EB6, EB17, EB18, EB33, EB36, EB46, EB47) were resistant to methicillin (MRSA). Detection of methicillin resistance in staphylococci by phenotypical methods often leads to false results. So, the most

appropriate method for detecting the methicillin resistance for *Staphylococcus aureus* isolates are detection of *mecA* gene by polymerase chain reaction. To this end, for 9 methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains determined by disk diffusion method and 3 methicillin sensitive *S. aureus* strains (EB5, EB9, EB12), DNA extraction was performed by the boiling method and *mecA* gene was investigated by polimeraze chain reaction (PCR) method. The EB12 sensitive strain by disk diffusion method methicillin resistance gene was found to contain. This study show that, disk diffusion technigue should be supported by moleculer methods for detection of methicillin resistance.

Science Code : 203.1.023
Key Words : *Staphylococcus aureus*, methicillin resistance
Page Number : 65
Adviser : Assoc. Prof. Dr. Zehra Nur YÜKSEKDAĞ

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, bilgi ve tecrübelerini eksik etmeyip yol gösteren, her zaman sonsuz ilgisi ve anlayışıyla yanımda olan sevgili hocam Doç. Dr. Zehra Nur YÜKSEKDAĞ' a sonsuz teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca verdikleri derslerle eğitimime katkıda bulunan hocam Prof. Dr. Yavuz BEYATLI' ya ve Prof. Dr. Belma Aslım' a, tez çalışmalarıma yardımcı olan tüm arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca sevgileri ve destekleriyle her zaman yanımda olan sevgili Annem'e, Ağabey'ime ve her zaman yanımda olan Murat SOYLU'ya çok teşekkür ederim.

Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi tarafından 05/2010-48 kodlu projeyle desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET……iv

ABSTRACT……..vi

TEŞEKKÜR……viii

İÇİNDEKİLER……..…ix

ÇİZELGELERİN LİSTESİ……xii

ŞEKİLLERİN LİSTESİ…….xiii

RESİMLERİN LİSTESİ…….xiv

SİMGELER VE KISALTMALAR…….xv

1. GİRİŞ…….....1

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI…….3

2.1. *Staphylococcus*' ların Tarihçesi…….3

2.2. *Staphylococcus*' ların Sınıflandırılması…….4

2.3. *Staphylococcus*' ların Görünüm ve Boyanma Özellikleri.……6

2.4. *Staphylococcus*' ların Üreme ve Biyokimyasal Özellikleri……...7

2.5. *S. aureus*' un Virülans ve Patojeniteleri……8

2.5.1. Hücre duvarı…….8

2.5.2. Toksinler……...9

2.5.3. Enzimler……..12

2.6. *S. aureus*' un Epidemiyolojisi……...14

2.7. *S. aureus*' un Oluşturduğu Enfeksiyonlar……16

2.8. Tanı……...16

2.8.1. Koloni morfolojisi……...17

Sayfa

2.8.2. Katalaz testi……17

2.8.3. Koagülaz testi……18

2.8.4. DNaz testi……...18

2.8.5. Mannitol fermentasyonu……18

2.9. Metisilin Dirençli *S. aureus*……20

2.9.1. *S. aureus*' ta metisilin direnci mekanizmaları……....21

2.9.2. Metisilin direncinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler……24

2.10. MRSA Tedavi Seçenekleri……28

3. MATERYAL VE METOT……..31

3.1. Materyal……31

3.1.1. Araştırmada kullanılan besiyerleri……..31

3.1.2. Bakterilerin muhafazası……..31

3.2. Metot……31

3.2.1. İzolatların klasik tanımlama testleri……31

3.2.2. Antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi……..34

3.2.3. Metisilin direnç geninin (*mecA*) belirlenmesi……35

4. DENEYSEL BULGULAR……..39

4.1. *Staphylococcus*' ların İzolasyonu……39

4.2. Fenotipik Tanımlama Test Sonuçları……41

4.3. Antibiyotik Duyarlılığı Test Sonuçları……44

4.4. Metisilin Direnç Geninin (*mecA*) Belirlenmesi……48

4.4.1. Genomik DNA izolasyon sonuçları……48

4.4.2. PZR sonuçları……49

Sayfa

5. TARTIŞMA VE SONUÇ……52

KAYNAKLAR……60

ÖZGEÇMİŞ……65

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 3.1. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institue) tarafından önerilen zon tablosu……...35

Çizelge 3.2. Primer sekansları, baz büyüklüğü ve optimal bağlanma sıcaklıkları……..…36

Çizelge 3.3. PZR reaksiyonunda kullanılan malzemelerin konsantrasyon ve miktarları…….37

Çizelge 3.4. PZR reaksiyonunun gerçekleştirildiği program……..37

Çizelge 4.1. Klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus* sp. izolatlarının çalışılan klinik örneklere göre dağılımı……..…39

Çizelge 4.2. Klinik örneklerden izole edilen bakterilerin izolasyon kaynağı ve kodları……...40

Çizelge 4.3. İzolatların tanımlama test sonuçları……43

Çizelge 4.4. *S. aureus*' ların antibiyogram sonuçları…….….45

Çizelge 4.5. *S. aureus'* ların antibiyotiklere karşı gösterdiği % duyarlılık oranları……..….46

Çizelge 4.6. DNA örneklerinin saflık ve miktar tayini…….……..48

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.1. *S. aureus'* ların antibiyotiklere karşı gösterdiği
% duyarlılık oranları.....47

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim **Sayfa**

Resim 2.1. *S. aureus*' un ışık mikroskobu görüntüsü (solda),
taramalı elektron mikroskop görüntüsü (sağda)……..6

Resim 4.1. EB3 suşunun kanlı agardaki hemoliz (+) görüntüsü (solda),
EB1 suşunun kanlı agarda hemoliz (-) görüntüsü (sağda)……..….41

Resim 4.2. EB1 suşunun katalaz (+) test görünümü…….…42

Resim 4.3. EB1 suşunun DNaz (+) test görünümü……...….42

Resim 4.4. EB1 suşunun mannitol fermentasyonu sonucu oluşan
renk değişimi görüntüsü…….……42

Resim 4.5. EB4 suşunun koagülaz (-) test görünümü (solda),
EB1 suşunun koagülaz (+) test görünümü (sağda)……...….43

Resim 4.6. *S. aureus* EB 1 ve EB 3 suşlarının antibiyotiklere karşı
duyarlılıkları (1; Oksasilin, 2; Gentamisin, 3; Rifampin,
4; Amoksisilin-Klavulonik asit, 5; Vankomisin)…….….46

Resim 4.7. Metisilin dirençli suşların (EB3, EB4, EB6, EB17, EB18,
EB33, EB36, EB46, EB47) genomik DNA' larının agaroz jel
elektroforez görüntüsü……..49

Resim 4.8. *mecA* (+) *S. aureus* izolatlarının elektroforez görüntüsü
M: Moleküler büyüklük belirteci, N: Negatif kontrol,
EB3-47: MRSA suşları…….50

Resim 4.9. *mecA* (+) ve *mecA* (-) *S. aureus* izolatlarının elektroforez ,
görüntüsü M: Moleküler büyüklük belirteci, N: Negatif kontrol,
EB33: MRSA suşu, EB5,9: MSSA suşları……50

Resim 4.10. *mecA* (+) ve *mecA* (-) *S. aureus* izolatlarının elektroforez görüntüsü
M: Moleküler büyüklük belirteci, N: Negatif kontrol,
EB33: Disk difüzyon yöntemi ile metisilin antibiyotiğine dirençli
suş EB12, EB5, EB9: Disk difüzyon yöntemi ile
metisilin antibiyotiğine duyarlı suşlar…….51

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	**Açıklama**
α	Alfa
pH	Asitlik değeri
bç	Baz çifti
β	Beta
≥	Büyük eşit
dk	Dakika
δ	Delta
rpm	Devir sayısı
γ	Gamma
g	Gram
H_2O_2	Hidrojen peroksit
HCl	Hidroklorik asit
kb	Kilobaz
kDA	Kilodalton
≤	Küçük eşit
l	Litre
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
ml	Mililitre
mm	Milimetre
M	Molar
ng	Nanogram
nm	Nanometre
-	Negatif

Simgeler	Açıklama
O_2	Oksijen
+	Pozitif
sn	Saniye
°C	Santigrat derece
cm	Santimetre
NaCl	Sodyum klorür
H_2O	Su
sp	Türleri
%	Yüzde

Kısaltmalar	Açıklama
ATCC	American Type Culture Collection
BORSA	Borderline resistant *S. aureus*
CRF	Coagulase-reacting factor
ET	Eksfoliyatif toksin
CLSI	Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü
MRSA	Metisilin dirençli *Staphylooccus aureus*
MSSA	Metisilin duyarlı *Staphylooccus aureus*
MİK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyon
MODSA	Moderately resistant *S. aureus*
MHA	Mueller-Hinton agar
MLST	Multilocus sequence typing
NA	Nutrient agar
PVL	Panton-Valentine leukocidin
PBP	Penisilin bağlayan protein
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PFGE	Pulsed-Field gel elektroforezi

Kısaltmalar	**Açıklama**
SCC*mec*	Staphylococcal casette chromosome
S. aureus	*Staphylococcus aureus*
TŞS	Toksik şok sendromu
TSST-1	Toksik şok sendromu toksini-1
KNS	Koagülaz negatif stafilokok
VRSA	Vankomisine dirençli *S. aureus*
VISA	Vankomisine duyarlı *S. aureus*

1. GİRİŞ

Stafilokoklar 100 yıldan uzun bir süredir önemli enfeksiyon etkenlerinden biri olup tıp dünyasında önemli bir yere sahiptir. İlk kez 1878 yılında Robert Koch tarafından tanımlanan ve 1881 yılında Alexander Ogston tarafından fare ve kobaylarda hastalık yaptığı gösterilen stafilokoklar; o dönemlerde insanlarda ağır seyreden, tedavisi güç, ölümcül enfeksiyonlara neden olmaktaydı. Alexander Fleming'in 1929 yılında penisilini bulması ve 1940 yılında da penisilinin klinik kullanıma girmesiyle birlikte stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde önemli başarılar sağlanmıştır. Bununla birlikte, penisilinin çok yaygın kullanılmasının sonucunda, penisilini parçalayan stafilokok suşları ortaya çıkmaya başlamıştır. Stafilokoklarda penisilin direnci 1940'lı yılların ortalarından itibaren gittikçe artmış, 1950'li yıllarda penisilinin yanı sıra tetrasiklin, eritromisin ve streptomisin gibi diğer antibiyotiklere de direnç gelişimi ortaya çıkmıştır [Haznedaroğlu, 2007].

1959 yılında metisilin, daha sonra da stafilokoklar tarafından üretilen, penisilini parçalayan enzimlere (penisilinaz) dayanıklı penisilin türevleri geliştirilmiştir. Bu sayede, stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde ikinci büyük başarı elde edilmiştir. Ancak bu başarının üzerinden henüz iki yıl geçmişken, stafilokoklarda metisilin direnci tanımlanmış ve 1970'li yılların sonu ile 1980'li yılların başlarından itibaren de metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşlarında çoklu antibiyotik direnci ortaya çıkmaya başlamıştır [Haznedaroğlu, 2007].

Stafilokoklar hem metisilin direncine, hem de çoklu ilaç direncine sahip olduklarından, antibiyotik kullanımının kontrolsüz olması ve tedavi seçeneklerinde yanlış tercihlerin yapılması direnç probleminin artmasına yol açmaktadır. Bu nedenle stafilokok enfeksiyonlarında özellikle MRSA' da çoklu direnç söz konusu olduğu için antibiyotik seçimi duyarlılık testlerine göre yapılmalıdır [Doğan ve ark., 2005].

Günümüzde direnç sorununun giderek yaygınlaşması ile birlikte MRSA tüm dünyada ve ülkemizde hastane enfeksiyonu salgınlarına yol açan çok ciddi bir sorun haline gelmiştir. MRSA suşu bir hastaneye girdikten sonra tedavisi çok zor hatta imkansız olabilmektedir [Beretta ve ark., 2004]. Bu nedenle hastanelerde izole edilen MRSA suşlarının epidemiyolojik tiplendirmesi, hastaneye yeni bir suş girdiğinde bu suşun farkına varılmasını sağladığından yayılmasını önlemek ve kontrol altına almak için çok önemli hale gelmiştir [Karabiber ve Mert Dinç, 2007]. Bu çalışmada, Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) önerileri doğrultusunda disk difüzyon yöntemi ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi kullanılarak; klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarının metisilin dirençlilik genlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Stafilokoklar, memelilerin deri ve muköz membranlarında normal flora elemanıdır. Genelde bulundukları yerde konakla iyi huylu ve simbiyotik bir ilişkiye sahiptirler. Ancak deri ve mukozal travma, enjeksiyon veya cerrahi müdahaleler ile dokuya girmesi sonucu patojen olabilirler [Temiz, 2008].

2.1. *Staphylococcus*' ların Tarihçesi

Stafilokoklar ilk olarak 1878 yılında Robert Koch tarafından tanımlanmış ve 1880 yılında Pasteur bu mikroorganizmaları sıvı besiyerinde üretmiştir. İlk *Staphylococcus* ismi 1881 de Alexander Ogston tarafından kullanılmıştır. Üremeleri esnasında birbirinden ayrılmayarak mikroskobik incelemede üzüm salkımına benzeyen, düzensiz kümeler oluşturmalarına bakılarak bu bakterilere bu ad uygun bulunmuştur. Stafilokoklar ilk kez Rosenbach (1884) tarafından hastalık örneklerinden soyutlanmıştır [Adams ve Moss, 2008].

İlk antibiyotik 1929 yılında *Penicillium* küfü ile kontamine agar plağında stafilokokların üremesinin inhibe olduğunu gözleyen Sir Alexander Fleming tarafından keşfedilmiştir. 1940 yılında Florey ve Chain tarafından penisilin üretiminin başarılması ile stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmıştır. Fakat çok geçmeden 1944' de Kirby tarafından *S. aureus* suşlarında penisilin direnci tanımlanmıştır [Bilgehan, 2008].

1959' da ilk semisentetik penisilinaza dirençli antimikrobiyal olan metisilin klinik kullanıma girmiş, fakat iki yıl sonra MRSA izolatları bildirilmiştir. 1980'li yıllarda ise MRSA suşlarında çoklu antibiyotik direnci ile karşılaşılmıştır [Turaç Biçer, 2009].

Çoklu direnç gösteren MRSA suşlarına bağlı enfeksiyonların artmasına paralel olarak stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde son 25 senedir vankomisin kullanılır

hale gelmiştir. Bununla birlikte ilk vankomisine dirençli *S. aureus* (VRSA) suşu, Haziran 2002 yılında ABD'de diyaliz tedavisi gören 40 yaşındaki bir erkek hastanın kateter ucundan izole edilmiştir. Direnç probleminin artmasıyla birlikte MRSA tüm dünyada nozokomiyal epidemilere yol açan ciddi bir sağlık sorunu haline gelmiştir [Turaç Biçer, 2009].

2.2. *Staphylococcus*'ların Sınıflandırılması

Önemli bir enfeksiyon etkeni olan *Staphylococcus* cinsi bakteriler *Micrococcaceae* ailesine aittir. *Micrococcaceae* ailesinde *Stomatococcus* ve *Planococcus* ile birlikte yer alan *Staphylococcus* ve *Micrococcus* cinslerinin üyeleri Gram pozitif, katalaz pozitif koklardır [Murray ve ark., 2009].

Mikrokokların zorunlu aerop olması, anaerop koşulda glikozu fermente etmemesi, oksidaz deneyinin pozitif sonuç vermesi, lisostafine dirençli, lizozime duyarlı olması, 0,4 μg/ml eritromisin varlığında gliserolden asit oluşturmaması, basitrasine duyarlı bulunması *Staphylococcus* cinsinden ayırt edilmesini sağlayan özellikleridir. Ayrıca DNA, rRNA hibridizasyon çalışmaları stafilokokların *Enterococcus*, *Bacillus* ve *Listeria* cinsleri ile benzer yapılara sahip olduğunu göstermiştir [Berkiten, 2005; Peacock, 2005].

Staphylococcus, Micrococcaceae ailesi içinde klinik açıdan en önemli gruptur. Stafilokoklar sıcak kanlı hayvanların ve insanların derileri üzerinde, normal flora ihtiva eden boğaz, burun gibi vücut bölgelerinde bulunurlar. Otuzdan fazla türü vardır ve bunların çoğu insanlarda kolonizasyon yapar. Sporsuz Gram pozitif koklar arasında en dayanıklı cinstir [Berkiten, 2005]. Bu cins içinde insanda en sık enfeksiyon etkeni olarak izole edilen Stafilokoklar; *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* ve *Staphylococcus saprophyticus*'dur. Bu türler içerisinde *Staphylococcus aureus* günümüzde kullanılan bir çok antibiyotiğe hızla direnç kazanması ve bu nedenle eskiye oranla enfeksiyonlarına daha sık rastlanmasıyla insan enfeksiyonlarında öncelikli patojen olarak yer alır [Tünger ve

ark., 2003; Aydın, 2008]. *S. aureus* dışındaki tüm stafilokok türleri genel olarak koagülaz negatif stafilokoklar (KNS) adı altında anılmaktadır. İnsanlarda patojen olan ve plazmayı pıhtılaştıran tek tür *S. aureus*'tur; bunu koagülaz negatif olan *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus* izler [Berkiten, 2005]. KNS' lar içerisinde klinik örneklerden en sık izole edilen tür bir deri flora üyesi olan *S. epidermidis'* tir [Alen ve ark., 2006; Aydın, 2008].

Staphylococcus cinsi içinde bugüne kadar 35 tür tanımlanmış olup, bunlardan 17 tanesi klinik örneklerden soyutlanmıştır. Stafilokok türleri DNA/DNA ilişkileri ve fenotipik özelliklerine göre en az dört grup altında toplanabilirler.

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

Staphylococcus saprophyticus grubunda; *S. saprophyticus, S. cohnii*, *S. xylosus* türleri.

Staphylococcus simulans grubunda; *S. simulans, S. carnosus* türleri.

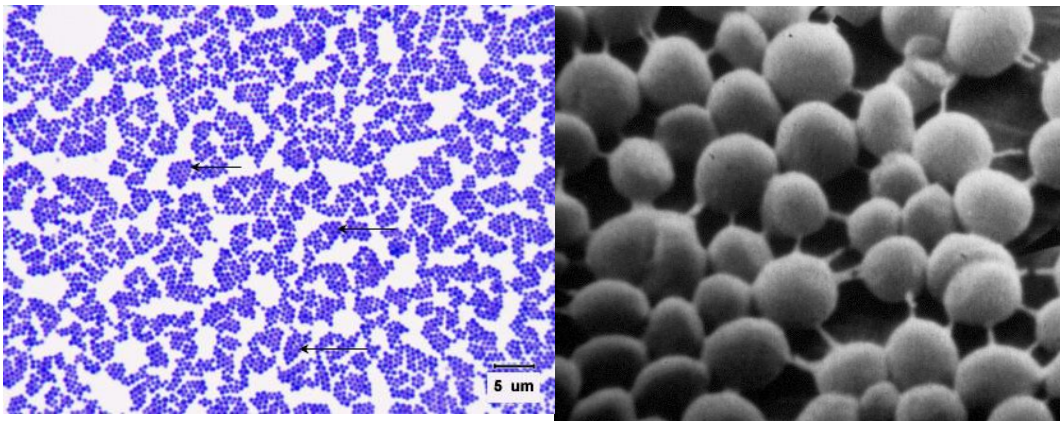
Staphylococcus sciure grubunda; *S. sciure*, *S. lentus* türleri yer almaktadır.

Staphylococcus aureus, *Staphylococcus auricularis*, *Staphylococcus intermedius, Staphylococcus hyicus* ve *Staphylococcus caseolyticus* herhangi bir gruba sokulamamışlardır.

İnsanlardaki stafilokok enfeksiyonlarında öncelikle patojen olarak *S. aureus* yer alır. Bundan başka fırsatçı patojenler olarak *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus* sıklıkla enfeksiyona sebep olurlar. Daha nadir olarak *S. haemolyticus, S. hominis, S. warneri*, *S. saccharolyticus, S. cohnii* ve *S. simulans*'ın fırsatçı enfeksiyonlarına rastlanılmaktadır [Murray ve ark., 2009].

2.3. *Staphylococcus*'ların Görünüm ve Boyanma Özellikleri

Genel karakterleri olarak stafilokoklar yuvarlak, 0,5-1,5 µm çapında, çoğu kez düzensiz kümeler, bazen tetrat, ikişerli kok ya da tek tek koklar şeklinde görülen Gram pozitif bakterilerdir. Hareketsiz, sporsuz, kapsülsüz bakterilerdir. Ancak *S. aureus*'un bazı suşları organizmadan ilk izole edildiklerinde kapsüllü olabilir. Katı besiyerinde bölünebilme özellikleri nedeni ile mikroskopta çoğunlukla düzensiz kümeler oluştururlar (Resim 2.1). İrinden ve sıvı besiyeri kültürlerinden yapılan preparatlarda bu kümeciklerin 3-5 koktan ibaret daha az taneli olarak oluştukları ve bazı kez ikişerli koklar halinde diplokoklara, ya da 3-4 bakteriden ibaret tetrat ve kısa zincirler şeklinde bulundukları saptanır. Burada kokların şeklinin tam yuvarlak ve bakterilerin birbirlerine benzer görünümde olması stafilokoklar için karakteristik ise de streptokoklarla bir arada bulundukları zaman ikisini görünümlerine göre ayırt etmek olanaksızdır. Tipik üzüm salkımı görünümü vermeyen stafilokokları benzer ve karışan görünümdeki streptokoklardan ayırt etmede kullanılan en yararlı yöntem katalaz testi olup stafilokoklarda deney pozitif olduğu halde streptokoklarda negatiftir [Bannerman, 2003; Peacock, 2005; Alen ve ark., 2006].



Resim 2.1. *S. aureus*' un ışık mikroskobu görüntüsü (solda) [2009], taramalı elektron mikroskop görüntüsü (sağda) [2000].

2.4. *Staphylococcus*'ların Üreme ve Biyokimyasal Özellikleri

Seçici olmayan kanlı agar, nutrient agar, triptik soy agar veya beyin kalp infüzyon agarda izole edilen stafilokok türlerinin çoğunluğu 24 saat içinde 1-3 mm çapında ve türe bağlı olmak üzere 34-37°C' de havada üç günlük inkübasyon sonrası 3-8 mm çapında koloni oluştururlar. İstisnalar *S. aureus* subsp. *anaerobicus*, *S. saccharolyticus, S. auricularis, S. equorum, S. vitulus* ve *S. lentus'*tur, ki bunlar daha yavaş ürerler ve genellikle kolonilerin saptanabilmesi için 24-36 saat gerekir. Tipik *S. aureus* kolonileri 24 saatte pigmentli (krem rengi, sarı-portakal rengi), düzgün, bütün, hafif kabarık ve rutin kanlı agarda hemoliz oluşturur. Belirgin kapsül oluşturan nadir suşlar parlak ve ıslak görünüme sahip olabilirler. Koloniler 3 günlük inkübasyon sonunda 6-8 mm çapına ulaşırlar [Murray ve ark., 2009].

Besiyerlerine glikoz, kan, serum gibi maddeler konularak zenginleştirilirse üreme daha çabuk ve kolay olur. Kanlı agar plaklarında üretilen stafilokokların çoğu kolonilerin etrafında tam hemoliz yaparlar. *S .aureus*'un kanlı besiyerinde küçük, pigmentsiz ve hemoliz oluşturmayan koloniler şeklinde üreyen küçük koloni varyantları da tanımlanmıştır [Proctor ve Peters, 1998; Looney, 2000; Bannerman, 2003; Moreillon ve ark., 2005; Murray ve ark., 2009].

Stafilokoklar başta glikoz olmak üzere bir çok karbonhidratları parçalar ve son ürün olarak laktik asit oluştururlar. Ancak şekerlerden mannitol üzerine olan etkileri özellik taşımakta olup bu karbonhidratı yalnız *S. aureus* parçalamaktadır. Bu nedenle mannitol fermentasyonu*, S. aureus*'u diğer stafilokoklardan ayırt etmekte kullanılan bir kriterdir. Bununla birlikte *S. aureus* koagülaz pozitiftir. Plazmayı pıhtılaştırma yeteneğini gösteren koagülaz deneyi, *S. aureus'*u diğer stafilokoklardan ayırt etmede en yaygın olarak kullanılan, en çok önem taşıyan ve genel olarak kabul gören tanımlama yöntemidir [Berkiten, 2005; Murray ve ark., 2009].

Bu tip tanımlama yöntemlerinin yanı sıra stafilokokları diğer bakteri türlerinden ayırd ederek üreten bazı özel besiyerleri geliştirilmiştir. Bu tip besiyerlerinde

refakatçi mikroorganizma çeşitli inhibitör maddelerle baskılanarak sadece stafilokok suşlarının üremesi sağlanmıştır. Aynı zamanda günümüzde MRSA'nın hızlı tanısı için bazı kromojenik besiyerleri de mevcuttur. Kromojenik besiyerleri *S. aureus*'un hem tanımlanmasında hem de metisilin direncinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bu besiyerleri MRSA tanımlanmasını direkt olarak yapabildiğinden ek testlere olan ihtiyacı azaltarak zaman ve fiyat açısından da önemli avantajlar sağlamaktadır [Özen ve ark., 2011].

2.5. *S. aureus'* un Virülans ve Patojeniteleri

S. aureus virülansı en yüksek olan stafilokok türüdür. Ancak enfeksiyon olup olmaması mikroorganizmanın virülansı ile konak savunma sisteminin oluşturacakları dengeye bağlıdır [Dündar ve Öztürk Dündar, 2008].

Stafilokokların, kapsül, protein A, peptidoglikan tabakası, teikoik asit gibi hücre duvarında bulunan maddeler, oluşturdukları enzimler ve toksinler patojenitesinde etkili olup, virülans faktörü olarak rol oynamaktadır. Koagülaz, hemolizinler, deoksiribonükleaz (DNaz), hyaluronidaz, fosfataz ve Protein-A virülansla ilgili bulunmuştur. Adezinler, kolonizasyonda rol oynarlar. Stafilokinaz ve diğer ekstraselüler enzimler (proteaz, lipaz, kollajenaz, elastaz) invazyonda; koagülaz, lökosidin ve kapsül yapısı fagositoza karşı direnci sağlamada etkilidir. Koagülaz immün cevaba karşı etkin bir savunma rolü üstlenirken, hemolizin ve lökosidin de sitotoksik etki gösterir. Lökosidin, ayrıca virülansı arttırmaktadır [Bannerman, 2003; Winn ve ark., 2006; Forbes ve ark., 2007].

2.5.1. Hücre duvarı

Hücre duvarı bakteriye şekil veren ve hücre içi osmotik basınca karşı hücreyi koruyan sağlam bir yapıdır. Stafilokokların hücre duvarı; peptidoglikan, teikoik asit ve protein-A olmak üzere üç ana bileşenden oluşur. Hücre duvarının toplam ağırlığının yaklaşık % 50-60' ını peptidoglikan (murein, mukopeptid, glikopeptid)

tabaka oluşturur. Peptidoglikan, N-asetilmuramik asit ve N-asetilglikozamin alt ünitelerinden oluşan bir polisakkarit polimeridir. Bu yapı bakteriye karakteristik şeklini verdiği gibi, hücreye esneklik ve sağlamlık da kazandırır [Bannerman, 2003; Winn ve ark., 2006].

Diğer önemli bileşik hücre duvarı ağırlığının yaklaşık % 40'ını oluşturan ve fosfat ihtiva eden bir polisakkarit olan teikoik asittir. Polisakkaritler türe özeldir. *S. aureus*'da ribitol teikoik asit bulunur. Peptidoglikan tabakası ve sitoplazma zarına bağlı olan teikoik asit, stafilokokların mukoza hücrelerinin yüzeylerindeki reseptörlere tutunmasını sağlayan özgül bölgelerdir [Berkiten, 2005]. 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. Ayrıca hücre duvarının sertliğini ve esnekliğini de destekler [Bannerman, 2003; Winn ve ark., 2006].

Hücre yüzeyinde peptidoglikan tabakasına bağlı bulunan diğer bir yapı Protein A'dır. Sahip olduğu antifagositik özelliklerle fagositozu önler. Aktif üreme safhasındaki kültürlerde, hücre dışına salgılanır ve yaklaşık 1/3'ü besiyeri içine dağılır. *S. aureus*'ların çoğunda özgül olarak bulunur, diğer türlerde ve mikrokoklarda bulunmaz. Bazı *S. aureus* suşlarında hücre duvarının etrafında bakteriyi fagositozdan koruyan polisakkarit yapıda bir kapsül bulunur. Bazı bakterilerin etrafında ise ancak elektron mikroskobu ile görülebilen ince mukoz, bir tabaka (slime) vardır. Daha çok klinik araç kullananlardan izole edilen suşlarda saptanan bu yapı, bakterinin kateter gibi yardımcı cihazlara tutunmasını sağlar [Berkiten, 2005].

2.5.2. Toksinler

S. aureus, enfeksiyonlardaki semptomlardan sorumlu çeşitli toksinler salgılar. Sitolitik toksin (alfa, beta, gamma, delta toksin ve lökosidin), eksfoliatif toksin,

toksik şok sendromu toksini-1 ve farklı tiplerde enterotoksin üretir [Bannerman, 2003; Forbes ve ark., 2007].

Sitolitik toksinler

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

Hemolizinlerin belirli hayvan eritrositlerini eritmelerine göre alfa, beta, gamma ve delta olmak üzere çeşitli tipleri vardır. Alfa tavşan; beta koyun, öküz; gamma tavşan, insan, koyun; delta insan, koyun, tavşan ve maymun eritrositlerini eritir [Berkiten, 2005].

Alfa (α) hemolizin, *S. aureus* suşlarının ana hemolizinidir. Bakteriyel kromozomlarda ve plazmidlerde kodlanır. İnsan makrofaj ve trombosit hücre membranları üzerinde litik etkiye sahiptir fakat monositlere etkisizdir. Hemolitik, dermonekrotik ve sitolitik etkileri vardır [Peacock, 2005; Moreillon ve ark., 2005; Alen ve ark., 2006].

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 [Berkiten, 2005]. Toksinin en önemli özelliği sıcak-soğuk lizis yapabilme yeteneğidir. Bu toksinin hemolitik aktivitesinin 37°C' de inkübasyondan sonra +4^{o}C'de tutulduğunda arttığı gözlemlenmiş ve buna bağlı olarak sıcak-soğuk toksin olarak adlandırılmıştır. Eritrositler üzerindeki etkisi soğukla artar [Peacock, 2005; Moreillon ve ark., 2005; Alen ve ark., 2006].

Delta (δ) hemolizin, *S. aureus* suşlarının % 97 'si tarafından üretilmektedir. Koagulaz negatif stafilokokların da % 50-70'inin bu toksini ürettiği belirtilmektedir. Geniş bir sitolitik aktiviteye sahiptir. Hücre membranını deterjan benzeri bir etkiyle parçaladığı düşünülmektedir [Bannerman, 2003; Forbes ve ark., 2007].

Gamma (γ) hemolizin, insan, koyun, tavşan gibi farklı türlerin eritrositlerini ve ayrıca insan lenfoblastik hücrelerini parçalayabilme yeteneğine sahiptir. *S. aureus* suşlarının hemen hepsi tarafından üretilebilmektedir. Belirgin hemolitik aktivitesi olmasına rağmen etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir [Bannerman, 2003; Forbes, 2007].

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 meydana gelmiştir. Gamma toksin (hemolizin) ile sinerjist etki gösterir ve antijeniktir. Lökosidin etkisinde kalmış lökositlerin katyon permeabilitesi değiştiğinden hücre hareketini kaybederek şişer ve granüllü, yuvarlak bir şekle dönüşerek parçalanır [Berkiten, 2005].

Eksfoliyatif toksin (Eksfoliyatin)

Ciltte yaygın büller ve cildin soyulmasıyla karekterize bir klinik tablo olan stafilokokal haşlanmış deri sendromu (staphylococcal scalded skin syndrome; SSSS)' na yol açan toksindir. Özellikle yeni doğan epidermisinde ciddi sonuçlara yol açar [Berkiten, 2005].

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, ikisini de salgılamayabilir [Berkiten, 2005; Winn ve ark., 2006].

Toksik şok sendromu toksini-1 (TSST-1)

Bir çok *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 [Berkiten, 2005].

Isıya ve proteolitik enzimlere karşı dirençlidir. *S. aureus* suşlarının % 5-25'i TSST-1 geni taşır. TSST-1' in *S. aurues* dışındaki türlerde varlığı halen tartışma konusudur. Ancak, KNS' ların ve A grubu streptokokların da TŞS' na yol açabildikleri bilinmektedir [Iwatsuki ve ark., 2006; Winn ve ark., 2006; Tristan ve ark., 2007].

Enterotoksin

S. aureus suşlarının yaklaşık üçte biri çeşitli enterotoksinler üretir. Kimyasal ve immünolojik olarak farklı 6 (A, B, C, D, E, G) tipi vardır. Bir suş bu toksinden yalnız birini veya bir kaçını oluşturabilir. Enterotoksinler ısıya ve gastrointestinal enzimler tarafından hidrolize karşı dirençlidir. Besin zehirlenmesine neden olur. 100ºC de 30 dakika kaynatılmaya dayanabilirler. Bu nedenle enterotoksin üreten stafilokoklar besin ürünlerini kontamine eder ve toksinlerini salgılarsa, yiyeceğin yeniden ısıtılması koruyucu olmaz. İnsanda en sık A tipi hastalık yapar [Berkiten, 2005; Winn ve ark., 2006].

2.5.3. Enzimler

Katalaz

Tüm stafilokoklar tarafından salgılanan bu enzim, hidrojen peroksiti (H_2O_2) su (H_2O) ve oksijene (O_2) parçalayarak etkisiz hale getirir. 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. Eritrositlerde de katalaz enzimi bulunduğundan dolayı, test kan içermeyen besiyerlerinde üretilmiş bakterilerde yapılır [Bannerman, 2003; Winn ve ark., 2006; Forbes ve ark., 2007].

$$H_2O_2 \xrightarrow{\text{katalaz}} H_2O+1/2O_2$$

Koagülaz (prokoagülaz)

S. aureus ve insanda patojen olmayan bazı türler tarafından salgılanan, kan plazmasını pıhtılaştıran ekstrasellüler bir proenzimdir. Bakterinin patojenliğini belirler. *S. aureus* suşları serbest ve hücreye bağlı olmak üzere iki çeşit koagülaz üretir. Serbest koagülaz plazmada bulunan CRF (coagulase-reacting factor) ile reaksiyona girerek pıhtılaşmaya neden olur. Hücreye bağlı olan koagülaz, kümeleşme faktörü (clumping factor) 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 stafilokokların üzerinde oluşan fibrin tabakası bakteriyi fagositoza karşı koruyarak patojenitesini artırır [Bannerman, 2003; Winn ve ark., 2006; Forbes ve ark., 2007].

Stafilokinaz (fibrinolizin)

S. aureus suşlarının çoğu tarafından plazminojeni aktive eden stafilokinaz adı verilen bir madde salgılanır. Plazmadaki plazminojeni aktive ederek plazmine (fibrinolizin) dönüşmesini ve dolayısıyla fibrin erimesine neden olur. Stafilokinaz, fibrini eriten proteolitik bir enzim olduğundan bakterinin dokular arasında yayılmasını sağlar [Berkiten, 2005].

Hiyalüronidaz

Hücre aralarında bulunan hiyaluronik asidi depolimerize ederek bakterinin yayılmasını sağlar. Antijeniktir ve özgül antikorları ile nötralize olur [Berkiten, 2005].

Beta laktamaz (penisilinaz)

Beta laktam antibiyotikleri etkisiz hale getirerek bakterinin bu grup antibiyotiklere direnç kazanmasına ve dolayısıyla tedavinin başarısız sonuç vermesine yol açar. Çoğu, plazmitler tarafından kodlanır [Berkiten, 2005].

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 yardım eder [Berkiten, 2005].

Deoksiribonükleaz (DNaz)

DNA' yı hidrolize eden ve ısıya dirençli olan DNaz enzimi *S. aureus* suşlarının % 90'dan fazlası tarafından üretilmektedir [Alen ve ark., 2006].

2.6. *S. aureus*'un Epidemiyolojisi

Toplum ve hastane kökenli 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 toplum kökenli MRSA enfeksiyonları da giderek önem kazanmaya başlamıştır [Dündar ve Sönmez Tamer, 2009].

S. aureus sporsuz bakteriler içerisinde en dayanıklılarındandır. 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 [Aydın, 2008].

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 personelinde 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 [Aydın, 2008].

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 olanlarla yakınlık da kolonizasyon ve enfeksiyonu kolaylaştırır [Aydın, 2008].

Stafilokoklarda metisilin direnç oranları ülkeler, bölgeler, hastaneler ve hatta aynı hastanenin servisleri arasında 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; İzlanda (% 0,5), Danimarka (% 0,6), Hollanda (% 0,6), İsveç (% 0,8) ve Estonya (% 0,9) metisilin direncinin en düşük olduğu ülkeler olarak bildirilmiştir [Tiemersma ve ark., 2004]. 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 [Borg ve ark., 2007]. Çeşitli çalışmalarda da Türkiye'de % 14-73,8 arasında değişen metisilin direnç oranları

bildirilmektedir. Dündar ve Sönmez Tamer; 2005, 2006, 2007 yılları arasında yaptıkları çalışmada klinik örneklerden izole edilen *S. aureus* suşlarında 2005 yılında % 34, 2006 yılında % 14, 2007 yılında ise % 21 oranında metisilin direnci saptamışlardır [Dündar ve Sönmez Tamer, 2009].

2.7. *S. aureus'* un Oluşturduğu Enfeksiyonlar

S. aureus toplum kökenli sepsislerin en önemli nedenidir ve en önemli nozokomiyal patojendir. 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, prostetik eklemler, vasküler greftler gibi protezlere bağlı enfeksiyonlar şeklinde görülen hastane enfeksiyonlarıdır [Murray ve ark., 2009].

2.8. Tanı

Stafilokokların laboratuvar tanısında koloni morfolojisi, boyanma özelliği, pigment üretimi, hemoliz, mannitol fermantasyonu, yüksek tuz konsantrasyonlu ortamda üreme gibi özelliklerine bakılarak değerlendirilir. 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 [Berkiten, 2005]. *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 [Murray ve ark., 2009].

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 [Aydın, 2008].

2.8.1. Koloni morfolojisi

Seçici olmayan kanlı agar, nutrient agar, triptik soy agar veya beyin kalp infüzyon agarda izole edilen stafilokok türlerinin çoğunluğu 24 saat içinde 1-3 mm çapında ve türe bağlı olmak üzere 34-37°C' de aerop koşullarda üç günlük inkübasyon sonrası 3-8 mm çapında koloni oluştururlar. Tipik *S. aureus* kolonileri 24 saatte krem, sarı-portakal renginde, düzgün, bütün, hafif kabarık ve rutin kanlı agarda hemoliz oluşturur. Belirgin kapsül oluşturan nadir suşlar parlak ve ıslak görünüme sahip olabilir. Koloniler 3 günlük inkübasyon sonunda 6-8 mm çapına ulaşır. *S. aureus'* un kanlı besiyeri gibi rutin besiyerlerinde küçük, pigmentsiz ve hemoliz oluşturmayan koloniler şeklinde üreyen küçük koloni varyantları tanımlanmıştır. *S. aureus'* un bu kolonilerinin görülebilmesi için en az 48 saat inkübasyon gerekebilir [Murray ve ark., 2009].

2.8.2. Katalaz testi

Katalaz testi, katalaz enziminin varlığının gösterilmesi için yapılır [Temiz, 2008]. *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 [Berkiten, 2005].

2.8.3. Koagülaz testi

Koagülaz testi, *S. aureus'* un diğer stafilokok türlerinden ayrımında kullanılan bir yöntemdir. İnsanlarda patojen olan ve plazmayı pıhtılaştıran tek tür *S. aureus'* tur; bunu koagülaz negatif olan *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus* izler [Berkiten, 2005].

S. aureus için patojenliğin en önemli ölçütü koagülaz enziminin varlığıdır ve iki türlü koagülaz enzimi ürettiği bilinmektedir. Bunlardan bir tanesi hücre duvarına bağlı olarak kalmakta, diğeri ise hücre dışına salgılanmaktadır. Koagülaz testi tüpte veya lamda olmak üzere iki şekilde yapılabilmektedir [Temiz, 2008].

Lamda koagülaz testiyle; hücre duvarı yüzeyinde bulunan bağlı koagülaz (clumping faktör), tüpte koagülaz testiyle salgılanmış ekstraselüler koagülaz araştırılır [Winn ve ark., 2006].

Nadir olarak *S.aureus* suşları koagülaz negatif olabilir ve özellikle metisiline dirençli suşlarda, lam deneyi ile koagülazın negatif olarak bulunabileceği belirtilmektedir [Cengiz, 1999; Brown Derek, 2005; Winn ve ark., 2006].

2.8.4. DNaz testi

Bu test DNA' yı hidrolize eden DNaz enziminin varlığını araştırmak amacıyla yapılır. Koagülaz deneyinde zayıf reaksiyon veren stafilokokların durumunun incelenmesi için koagülaz sonuçlarını destekleyici deneydir. DNaz varlığı, birkaç koloni alınıp DNaz test besiyerine yoğun bir ekim yapılarak araştırılır [Bilgehan, 2004].

2.8.5. Mannitol fermentasyonu

İnsan kaynaklı koagülaz pozitif olan *S. aureus* mannitolü fermente edebilirken buna karşılık koagülaz negatif stafilokokların pek çoğu mannitolü fermente

edememektedir. Bu test için kullanılan besiyeri "mannitol salt agar" dır. Besiyeri yüksek tuz konsantrasyonu içeriğinden dolayı diğer mikroorganizmaların üremesini inhibe ederek, stafilokoklar için selektif bir besiyeridir. Mannitolden asit üretiminin göstergesi olan, izole edilen kolonilerin çevresindeki sarı renkli zonun varlığı ile *S. aureus* tespit edilir [Winn ve ark., 2006].

Stafilokok türlerinin tanısında ticari biyokimyasal veya nükleik asit test sistemleri de kullanılmaktadır. Şu an için mevcut tanımlama sistemlerinden bazıları şunlardır:

Rapidec Staph (Bio Merieux-Vitec); *S. aureus*, *S. epidermidis ve S. saprophyticus*' u ayırt etmek için kullanılan ve 2 saatte sonuç veren bir kittir.

API STAPH-IDENT (Bio Merieux-Vitec); on adet biyokimyasal testin incelenmesiyle onyedi stafilokok türü ve alt türünü tanımlamaya yarayan hazır kittir.

API STAPH (Bio Merieux-Vitec); mikrokok ve stafilokokların tanımlanmaları için 18-24 saatte sonuç veren bir striptir.

ID 32 STAPH (Bio Merieux); bu strip ile *Micrococcaceae*'lerin tanımlanmaları 24 saatte elde edilebilir.

MİNİTEK GRAM POSİTİVE PANEL (BD Microbiology System); mikrokok, stafilokok ve streptokokların tanımlanmalarında kullanılan ve çeşitli test substratlarına bandırılmış kuru disklerden oluşan bir sistemdir [Bilgehan, 2004; Murray ve ark., 2009].

Tiplendirme sistemleri, enfeksiyon gruplarında görülen benzer bakteri türlerinin suşları arasındaki ilişkiyi incelemek veya hastaneler ve üniteler arasındaki MRSA suşlarının yayılımını taramak için kullanılır. Bu bilgi enfeksiyon kontrolünün etkili uygulamasının temelidir. Bu açıdan MRSA enfeksiyon gruplarında tiplendirme büyük önem taşımaktadır [Murray ve ark., 2009].

Çok çeşitli tiplendirme teknikleri tanımlanmıştır, fakat tüm dünyada kullanılan en yaygın teknik Pulsed-Field gel elektroforezidir (PFGE). Bu özellikle lokal salgınların incelenmesinde uygundur. Hem laboratuvar içinde, hem de laboratuvarlar arasında tekrarlanabilirlik eksikliği bunu engellese de, PFGE merkezler arasında *S. aureus* band paternlerinin karşılaştırılmasında kullanılabilir. Multilocus sequence typing (MLST) oldukça tekrarlanabilme avantajı olan sekans bazlı bir tekniktir. MLST ve PFGE' in mikroepidemiyolojik karşılaştırılmalarında benzer ayrım kabiliyetine sahip oldukları görülmüştür. MLST kullanımı daha yaygınlaşmakla birlikte, günümüzde daha çok araştırma amaçlı kullanılmaktadır [Murray ve ark., 2009].

Diğer tiplendirme teknikleri RiboPrinter mikrobiyal karakterizasyon sistemi (Qualicon) ve "random amplified polymorphic DNA" gibi otomatize sistemlerin kullanıldığı ribotiplendirme teknikleridir. PZR amplifikasyon metodu, 16S ile 23S rRNA "intergenic spacer" bölgesinin analizi, coa gen bölgesinin (koagülazı kodlar) restriksiyon enzimi ile kesilmesi veya sekanslanması, spa gen bölgesinin (protein A'yı kodlar) sekanslanmasını içerir [Murray ve ark., 2009].

2.9. Metisilin Dirençli *S. aureus*

S. aureus'a bağlı gelişen enfeksiyonlar, 1941 yılında penisilinin klinikte kullanıma girmesinden sonra azalma göstermiş, ancak bundan kısa bir süre sonra penisiline direnç gösteren *S. aureus* suşları ortaya çıkmıştır. Bunu takip eden 20 yıl içinde hastane ve toplum kaynaklı *S. aureus* izolatlarının yaklaşık % 80'i penisiline dirençli hale gelmiştir. Beta laktamaz (penisilinaz) enziminin yol açtığı bu direnç sorunu, 1959 yılında beta laktamaz enzimine dayanıklı semisentetik bir penisilin olan metisilinin klinikte kullanımının başlamasıyla aşılmıştır. Ancak, metisiline dirençli suşların ortaya çıkışı metisilinin klinik uygulamalarda kullanımından kısa bir süre sonra başlamıştır. Bunu 1970' lerin ortasında bir çok ülkede tek bir epidemik suşun neden olduğu ve hastaneler arasında yayılan MRSA enfeksiyon salgını izlemiştir. Hastanelerde MRSA tablosu; şimdilerde geniş bir sahada yer alan suşların neden

olduğu gerek epidemik gerekse sporadik enfeksiyonlardan biridir. MRSA nozokomiyal patojen olmasının yanı sıra toplum patojeni haline gelmiştir. Toplumda, intravenöz ilaç kullananlar, altta yatan ciddi hastalık tablosu olan bireyler, antimikrobiyal tedavi alanlar ve yakın zamanda hastaneden taburcu olanların yer aldığı yüksek risk grupları MRSA enfeksiyonu için ilk rapor edilen olgular içinde yer alır. Cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları toplum kökenli MRSA' nın yer aldığı en sık rapor edilen hastalıklardır ve özellikle ıslah evleri, spor müsabakası katılımcıları, acemi askerler, hastane bakım ve doğum ünitelerinde rastlanılır. Toplum kaynaklı MRSA' ların moleküler epidemiyolojisi hastane kaynaklı MRSA' lardan oldukça farklıdır. Hastane kökenli MRSA'lar, genellikle tip 1, 2 veya 3 "staphylococcal casette chromosome (SCC*mec*)" genetik elemanını bulundururlar. Bu gen bölgesi bakterinin tüm beta laktam yapısındaki antibiyotiklere ve hatta klindamisin, gentamisin ve florokinolon gibi diğer ilaçlara karşı da direnç göstermesini sağlamaktadır. Toplum kökenli MRSA izolatlarında ise sıklıkla tip 4 SCC*mec* genetik elemanı ve bakterinin virülansında rol oynayan bir toksini kodlayan "Panton-Valentine leukocidin (PVL)" geni bulunmaktadır [Sancak, 2007; Murray ve ark., 2009].

2.9.1. *S. aureus'* ta metisilin direnci mekanizmaları

Beta laktamaz enzimiyle hidrolize olmayan beta laktam antibiyotiklere (metisilin, oksasilin, nafsilin, kloksasilin, dikloksasilin) karşı olan direnç metisilin direnci olarak adlandırılır [Sancak, 2007].

<u>İntrensek (kromozomal) metisilin direnci</u>

En sık rastlanılan bu direnç yeni bir penisilin bağlayan protein (PBP) sentezi ile oluşur. PBP' ler bakteri hücre membranında bulunan beta laktam antibiyotiklerin bağlandığı hedef proteinlerdir. Bu proteinler bakteriyel hücre duvarının sentezi sırasında 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 ağırlıkta 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 yeteneğine sahip 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 [Sancak, 2007].

PBP 2a'yı kodlayan gen, 2,1 kb büyüklüğünde olan ve *mecA* olarak adlandırılan bir gendir. Tüm MRSA'lar bu gene sahipken metisiline duyarlı olan suşlarda bu gen bulunmamaktadır. *mecA* geni, bakteri kromozomunda SCC*mec* kaseti üzerinde yer alır. SCC*mec* 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 ve regülatuar genler ile rekombinaz genlerini içerir. Bu alt tiplerde, transpozon elemanları ve beta laktam antibiyotik dışındaki antibiyotiklere dirençten sorumlu olan genler bulunmamaktadır [Sancak, 2007].

Metisilin 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 [Sancak, 2007].

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* genini taşımalarına rağmen bu topluluğun sadece belirli bir kısmında direnç açığa çıkar [Sancak, 2007].

MRSA suşları sıklıkla beta laktam grubu antibiyotiklere heterojen direnç gösterir, diğer bir deyişle 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 başarılı bir şekilde tespitinde, direçli 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 [Murray ve ark., 2009].

Sınırda (borderline) metisilin direnci

Aşırı beta laktamaz üretimine bağlı olarak gelişen dirençtir. Bu suşlar metisiline sınırda bir direnç gösterdiği için bunlara "borderline resistant *S. aureus*" (BORSA) denmektedir. Penisilinaza dirençli penisilinler aslında stafilokokların penisilinaz enzimlerinin hidrolitik etkilerine dayanıklıdırlar. Ancak bazı suşlar aşırı miktarda penisilinaz oluşturarak metisilin ve oksasilini yavaş fakat önemli ölçüde parçalar. BORSA suşları PBP2a oluşturmamaları ile MRSA'lardan farklıdır. MRSA izolatlarının, sınırda oksasilin direnci gösteren *S. aureus* suşlarından ayrımındaki zorluklardan dolayı, standart metot olarak PZR' yi rutin olarak kullanmayan klinik laboratuvarlar için MRSA' nın tespiti sorun oluşturabilir. Bununla birlikte, günümüze kadar bu organizmalar ile oluşan enfeksiyon olgularında penisilinaz dirençli penisilinlerle yapılan tedavilerde bildirilmiş olumsuzluk yoktur [Willke, 1992; Murray ve ark., 2009].

Mevcut PBP' lerde beta laktam antibiyotik afinitesinde azalma ile oluşan metisilin direnci

Modifiye PBP' lere bağlı metisiline duyarlılık azalmasıyla gelişen 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 [Willke, 1992; Rice ve ark., 2003; Ünal, 2004; Peacock, 2005].

2.9.2. Metisilin direncinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler

MRSA, hastane kaynaklı enfeksiyonların en önemli etkenlerinden biridir. MRSA'larda tüm beta laktam yapısındaki antibiyotiklere ve aynı zamanda diğer grup antibiyotiklere olmak üzere çoklu ilaç direnci görülmektedir. Bu nedenden dolayı, metisilin direncinin en kısa sürede doğru olarak saptanmasının bu enfeksiyonların kontrol altına alınmasında ve tedavide doğru antibiyotiğin seçilmesinde büyük önem taşımaktadır [Sancak, 2007].

Günümüzde metisilin direncinin saptanmasında *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. Bu nedenden dolayı klinik laboratuvarlarda *S. aureus* izolatlarında metisilin direncinin saptanmasında çeşitli yöntemler kullanılmaktadır [Sancak, 2007; Murray ve ark., 2009].

Disk difüzyon yöntemi

Laboratuvarlarda en sık kullanılan yöntemdir.

Oksasilin disk difüzyon yönteminde MRSA izolatlarının saptanması amacıyla 1 µg oksasilin 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 Institude) 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 [Sancak, 2007].

Yüksek miktarda beta laktamaz enzimi oluşturan bazı *S. aureus* suşları disk difüzyon testiyle metisiline sınırda dirençli olarak saptanırlar. Bu nedenle 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 arttırabilir ve duyarlı suşların dirençli olarak saptanmasına yol açabilir [Sancak, 2007].

Son yıllarda metisilin direncinin saptanmasında sefoksitin disk difüzyon yönteminin kullanılması gündeme gelmiştir. Yapılan çalışmalarda, oksasilin disk difüzyon yöntemiyle elde edilen sonuçlara göre bu yöntemin duyarlılık ve özgüllüğünün 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 30 µg sefoksitin 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 yöntemi için CLSI tarafından belirlenen direnç sınır değerlerine göre inhibisyon zon çapı ≤ 21 mm olan izolatlar dirençli, ≥ 22 mm olan izolatlar ise duyarlı olarak kabul edilmektedir [Sancak, 2007; Murray ve ark., 2009].

Sıvı mikrodilüsyon yöntemi

Bu yöntemde % 2 NaCl içeren Mueller-Hinton sıvı besiyeri kullanılmaktadır. CLSI, testte kullanılacak olan inokulum miktarının $5x10^5$ 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 ≤ 2 μg/ml olan izolatlar duyarlı, ≥ 4 μg/ml olan izolatlar ise dirençli olarak kabul edilmektedir [Sancak, 2007].

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 özgüllüğü oldukça yüksektir [Sancak, 2007].

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 olarak belirlenir [Sancak, 2007; Turaç Biçer, 2009].

Lateks aglütinasyon testi

Oldukça kısa bir sürede sonuç veren lateks aglütinasyon testi, PBP2a saptanmasını temel alan bir yöntemdir. Koloni süspansiyonlarından PBP2a ekstraksiyonu yapıldıktan sonra lateksle kaplanmış olan PBP2a monoklonal antikorlarla aglütinasyon saptanır. *S. aureus* için testin duyarlılık ve özgüllüğü oldukça yüksektir [Sancak, 2007]. Bununla birlikte lateks aglütinasyon testini kullanarak sınırda oksasilin dirençli *S. aureus*' un MRSA' dan doğru ayrımının yapılabildiği raporlanmıştır [Murray ve ark., 2009].

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 [Sancak, 2007; Murray ve ark., 2009].

Moleküler yöntemler

MRSA izolatlarının saptanmasında *mecA* geninin polimeraz zincir reaksiyonu temelli yöntemlerle araştırılması önemli bir standart olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte, *mecA* geni bulunan ancak bunu eksprese etmeyen duyarlı suşların bulunabileceği unutulmamalıdır [Sancak, 2007].

PZR, nükleik asitlerin in vitro şartlarda replikasyonu için geliştirilmiş, bir test tüp sistemidir. Hedef DNA' nın selektif olarak amplifikasyonuna olanak verir. Bir test tüpü içerisinde gerçekleştirilen PZR' da DNA polimeraz enzimi yardımıyla genomun tamamı değil, spesifik bölgelerin kopyalanması gerçekleştirilir. PZR çalışmalarında reaksiyonun gerçekleşmesi için küçük miktarda hedef DNA (1-100 ng kadar) içeren örnek, çalışma solüsyonu içerisine ilave edilir. Daha sonra örnekteki hedef çift sarmal DNA' nın, tek sarmal DNA'ya dönüştürülmesi sağlanır (denatürasyon). Tek sarmal DNA iplikçiklerinin karşıtı, 20-30 baz çifti (bç) uzunluğundaki sentetik oligonükleotit diziler kullanılır. Spesifik bir bölgenin amplifikasyonu için hedefi sınırlamak amacıyla ikinci primer kullanılır. Primerlerden biri tek sarmal DNA zincirinde başlatıcı bölgeyi oluştururken, ikincisi de diğer zincir üzerinde sonlandırıcı bölgeye bağlanır (annealing). Taq DNA polimeraz enziminin yardımıyla, primerlerin bağlandığı bölgeden itibaren tek sarmal DNA zincirinin komplementeri oluşturulur (extension). Böylece iki adet çift sarmal DNA oluşur. Oluşan DNA' lar yeni amplifikasyon için kalıp görevini üstlenirler. PZR temel olarak tekrarlayan üç aşamalı bir yöntemdir.

Denatürasyon, çift iplikli DNA' nın birkaç saniye 94-96°C ısı ile tek iplikli DNA'ya ayrılmasıdır. Bağlanma (annealing), örnek bir kaç dakika 30-60°C' de tutularak primerin (spesifik sentetik oligonükleotitler) tek sarmal DNA' daki hedef bölgelere hibridizasyonu sağlanır. Bu, hidrojen bağları ile olur. Bağlanma ısısı, primerlerin yapısı ve Tm derecelerine göre hesaplanarak optimize edilebilirse de, yaklaşık olarak 20 bç uzunluğuna sahip primerlerin kullanılması halinde 54°C olarak belirlenmesi optimal sonuçları vermektedir. Uzama (extension), polimeraz enzimi yardımı ile tek sarmal DNA kalıplarına bağlanan primerlerin 5'→3' yönde uzatılmasıdır. DNA zincirinin komplementerinin sentezlenmesi için 65-72°C' de birkaç dakika beklenir. Taq DNA polimeraz optimal uzama ısısında yani 72-78°C arasında 2000 nükleotid/dakika hızında çalışır. Bağlanma sikluslarını takiben, orijinal DNA segmenti yeni komplementer DNA' lar ve yeni kalıp DNA' lar oluşturur. Böylece her PZR siklusunda mevcut spesifik DNA miktarı iki katına çıkmaktadır. Bu işlem 30 defa tekrarlanarak milyardan fazla hedef DNA eldesi mümkün hale gelir. Amplifikasyondan sonra PZR ürünleri genellikle agaroz jel elektroforezi yöntemiyle belirlenir.

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 plazmid DNA parçası hatta bir IS elementinin DNA parçası da olabilir [Köksal, 2001; Bilgehan, 2008].

2.10. MRSA Tedavi Seçenekleri

Stafilokok türlerinde metisilin direnç artışı ile birlikte diğer antibiyotikler bu tür bakterilerce oluşmuş ciddi enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır. Bir glikopeptid olan vankomisin, metisilin dirençli stafilokoklara bağlı enfeksiyonların tedavisinde tercih edilen ilaçtır. Fakat son yıllarda vankomisine bağlı direnç

görülmesi nedeniyle vankomisinin dikkatli kullanımı gereklidir [Murray ve ark., 2009].

İlk kez 1996 yılında Japonya'dan Hiramatsu ve arkadaşları, vankomisine azalmış duyarlılık gösteren ilk MRSA klinik izolatını tanımlamışlardır. Bu izolatın vankomisin minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değeri, mikrodilüsyon yöntemi ile 8 mg/l 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, "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" 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 yılında Hiramatsu ve arkadaşları, "heterojen VISA (hVISA)" olarak adlandırılan yeni bir vankomisin direnç tipi tanımlamışlardır. Mu 3 olarak adlandırılan ilk hVISA izolatı, 64 yaşında pnömoni tanısı almış ve vankomisin tedavisine yanıt vermeyen bir hastadan izole edilmiştir. Bugüne kadar değişik ülkelerden ve değişik oranlarda olmak üzere hVISA izolatları bildirilmiştir. Vankomisin MİK değeri 2 µg/ml olarak saptanan hVISA izolatları CLSI kriterlerine göre duyarlı olarak kabul edilmektedir. Ancak 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 [Sancak, 2007].

MRSA enfeksiyonları için son yıllarda tek tedavi seçeneği gibi gözüken glikopeptid antibiyotikler için MİK yükselmesi ve giderek direnç gelişiyor olması gibi nedenlerle klinik başarısızlıkların ortaya çıkması, yeni antibiyotik arayışlarına sebep olmuş ve bazı yeni antibiyotikler bu amaçla klinik kullanıma girmiştir [Ünal, 2009]. Bu yüzden 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 [Murray ve ark., 2009].

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Bu çalışmada, Nisan-Temmuz 2010 tarihleri arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinin değişik kliniklerinde tedavi olan hastalardan yara, kan, trakeal aspirat, idrar, burun, abse gibi klinik örneklerden izole edilen 48 adet *Staphylococcus* sp. izolatı kullanılmıştır.

3.1.1. Araştırmada kullanılan besiyerleri

Staphylococcus' ların izolasyonu için kanlı agar, aktifleştirilmesi için nutrient broth (Merck), tanımlanmalarında mannitol salt agar, DNaz test agar (Merck) ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi için Mueller-Hinton agar (Merck) hazır besiyerleri kullanılmıştır.

3.1.2. Bakterilerin muhafazası

Çeşitli klinik örneklerden izole edilen bakteriler, nutrient sıvı besiyerinde ard arda iki kez aktifleştirilmiştir. 300 µl gliserol (Merck) vida kapaklı tüplere ilave edilerek, 121°C' de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. Aktif kültürden 600 µl alınarak steril gliserol içeren ortama ilave edilip -80°C' de muhafaza edilmiştir. Muhafazaya alınan stoklar altı ayda bir yenilenmiştir.

3.2. Metot

3.2.1. İzolatların klasik tanımlama testleri

İzolatların koloni morfolojisi, kanlı agarda hemoliz, Gram boyası, mannitol fermantasyonu, DNaz testi, katalaz ve koagülaz testi sonuçlarına göre tanımlamaları yapılmıştır. Çalışmada kontrol suşu olarak *S. aureus* ATCC 25923 kullanılmıştır.

Kanlı agarda hemoliz

Klinik örneklerden alınan *Staphylococcus* sp. izolatları tanımlama amacıyla önce, kanlı agara tek koloni ekim yapılmıştır ve izolatlar koloni morfolojileri, pigmentasyonu ve hemoliz tipine bakılarak değerlendirilmiştir.

İzolatlar, hazır olarak temin edilen % 5 koyun kanlı besiyerine ekim yapılarak 37ºC' de bir gece boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası bakteri kolonileri etrafında oluşan şeffaf zon, hemoliz pozitif olarak değerlendirilmiştir. 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 oluşturmayan koloniler şeklinde üreyen küçük koloni varyantları da bulunmaktadır [Temiz, 2008; Murray ve ark., 2009].

Gram boyama

Kanlı agarda hemoliz pozitif olarak değerlendirilen kolonilerden lam üstüne alınarak serum fizyolojik ile homojen hale getirilmiştir. Tespit işleminin ardından Gram boyama tekniği ile boyandıktan sonra ışık mikroskobunda 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 [Temiz, 2008; Murray ve ark., 2009].

Koagülaz testi

Çalışmada koagülaz varlığı lam deneyi ile araştırılmıştır. Temiz bir lamın iki ucuna birer damla saf su damlatılıp, bakterinin kanlı agardaki taze kültüründen 2-3 koloni öze yardımıyla alınarak bu iki damlaya karıştırılıp homojen süspansiyon elde edilmiştir. Süspansiyonlardan birinin üzerine bir damla plazma damlatılıp 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 [Bilgehan, 2004].

Katalaz varlığının saptanması

Sıvı veya katı bakteri kültürlerine H_2O_2 ilave edildiğinde, serbest oksijenin gaz kabarcıkları halinde gözlenir hale gelmesi, hidrojen peroksitin ayrışmasını dolayısıyla da katalazın varlığını göstermektedir. Çalışmada, Nutrient agar (NA) (Merck) besiyerinde 24 saat geliştirilmiş izolatlardan öze ile küçük miktarda lam üzerine örnek alınarak, distile su ile süspanse edilmiştir. Bunun üzerine 2-3 ml % 30' luk H_2O_2 ilave edilip karıştırıldığında, hava kabarcıklarının çıkışı pozitif olarak değerlendirilmiştir [Temiz, 2008]. Çalışmada negatif kontrol olarak *Streptococcus thermophilus* ATCC 14425 suşu kullanılmıştır.

DNaz testi

Koagülaz sonuçlarını destekleyici deney olup *S. aureus*' un *S. epidermidis*' ten ayrılması amacıyla kullanılmaktadır. DNaz testi için saf kültür olarak izole edilen suşlar DNaz agar besiyerinin ortasına çizilerek ekilmiştir. 37°C' de 24 saat inkübasyona tabi bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra plak yüzeyine yüzeyi kapatacak şekilde 1M HCl damlatılmıştır. HCl, DNA ile presipite olmaktadır. DNaz enziminin varlığı ile ekim çizgisi etrafındaki DNA parçalandığından diğer bölgeler mat iken ekim çizgisinin etrafında şeffaf bir zon oluşmaktadır. Şeffaf zon görülen suşlar DNaz pozitif kabul edilmiştir [Bilgehan, 2004].

Mannitol fermentasyonu

Bu test için mannitol salt agar besiyeri kullanılmıştır. Bu besiyeri stafilokokların karışık bakteri florası içeren materyallerden izole edilmesi için kullanılan ayırt edici ve seçici bir besiyeridir. *S. aureus'* un mannitolü fermente etmesi sonucu oluşan asit, besiyerinin içerdiği fenol kırmızısı ayracını kırmızı renkten sarıya dönüştürmektedir.

Mannitol salt agara inoküle edilen suşlar 37°C' de 18-24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda ekim çizgisi etrafında sarı zon varlığı *S. aureus* olarak değerlendirilmiştir [Bilgehan, 2002].

Mannitol salt agar	
Maddeler	g/l
Pepton	10,0
Meat ekstrakt	1,0
NaCl	75,0
D-Mannitol	10,0
Fenol kırmızısı	0,025
Agar	15,0

3.2.2 Antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi

Hücre duvarına etkili amoksisilin-klavulonik asit (20/10 µg), oksasilin (1 µg), penisilin G (10 ünite), ampisilin-sulbaktam (10/10 µg), vankomisin (30 µg); protein sentezini inhibe eden eritromisin (15 µg), gentamisin (10 µg), streptomisin (10 µg), tetrasiklin (30 µg); nükleik asit sentezini engelleyen rifampin (5 µg) (Oxoid) antibiyotiklerinin *S. aureus* bakterileri üzerinde inhibisyon etkileri Kirby-Bauer disk diffüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Metisilin direncini belirlemede, saklama sırasında parçalanmaya daha dayanıklı olduğundan ve heterodirençli stafilokok suşlarını belirleme olasılığı daha fazla olduğundan çalışmada oksasilin antibiyotiği kullanılmıştır. Antibakteriyel duyarlılıkları incelenecek suşların taze kültüründen 0,5 McFarland standardına (10^8 bakteri/ml) göre süspansiyonu hazırlanmıştır. Bu süspansiyondan yüzeye yayma yöntemiyle Mueller-Hinton Agar (MHA) (Merck) besiyerinin yüzeyine drigalski özesi yardımıyla homojen olarak yayılmıştır. Ekim yüzeyi kuruduktan sonra antibakteriyel ajan içeren diskler pens yardımıyla kenarlardan en az 1,5 cm ve birbirlerinden en az 2-2,5 cm uzaklıkta olacak şekilde dizilmiştir. 35°C' de 24 saatlik inkübasyondan sonra oluşan inhibisyon zonları değerlendirmeye alınmış ve zon çapları ölçülerek CLSI' nın önerdiği sınırlara göre

direçli, duyarlı, orta duyarlı olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.1) [CLSI, 2005; Bilgehan, 2008; Temiz, 2008].

Çizelge 3.1. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institue) tarafından önerilen zon tablosu (CLSI, 2005).

Antibiyotik adı	**Disk içeriği**	**Zon çapı (mm)**		
		R	**I**	**S**
Amoksisilin-Klavulonik Asit (AMC)	20/10 µg	≤19	12-14	≥20
Eritromisin (E)	15 µg	≤13	14-22	≥23
Gentamisin (CN)	10 µg	≤12	13-14	≥15
Oksasilin (OX)	1 µg	≤10	11-12	≥13
Penisilin (P)	10 ünite	≤28	12-14	≥29
Rifampin (RD)	5 µg	≤16	17-19	≥20
Streptomisin (S)	10 µg	≤11	12-14	≥15
Ampisilin –Sulbaktam (SAM)	10/10 µg	≤11	12-14	≥15
Tetrasiklin (TE)	30 µg	≤14	15-18	≥19
Vankomisin (VA)	30 µg	≤9	10-11	≥12

S: Duyarlı (Susceptible), I: Orta duyarlı (Intermediate), R: Dirençli (Resistant)

3.2.3. Metisilin direnç geninin (*mecA*) belirlenmesi

Genomik DNA izolasyonu

Kaynatma yöntemi kullanılarak, metisilin dirençli ve duyarlı suşların DNA' sı izole edilmiştir. Öncelikle 1000 µl Tris-EDTA (TE) pH 8,0 içine öze dolusu koloniler toplanmıştır. 5 dakika 6500 rpm' de santrifüj yapılarak üstteki sıvı dökülmüştür. Bu yıkama işlemi 3-4 kez tekrar edilmiştir. En son kalan pelletin üzerine 200 µl TE koyularak vortekslenmiştir. 20 dakika 95°C' de bekletilerek bakterilerin parçalanıp, DNA' nın açığa çıkması sağlanmıştır. Daha sonra 6500 rpm' de 5 dakika santrifüj edilip üst sıvı alınarak yeni ependorfa aktarılmıştır [Çatar Kırca, 2008].

TE TAMPONU

10mM Tris (Merck) 0,1214 g
1mM EDTA (Sigma) 0,0372 g
Maddeler tartılıp 100 ml saf suyla tamamlanarak hazırlanmıştır.

İzole edilen DNA' ların agaroz jel elektroforezinde gösterilmesi

İzole edilen DNA' ların varlığı % 1' lik agaroz jelde 30 dakika 80 Volt elektrik akımında yürütülerek gösterilmiştir.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

mecA geninin amplifikasyonu amacıyla *mecA*1 ve *mecA*2 primerleri kullanılarak PZR reaksiyonu Cuny ve Witte (2005)' nin yaptığı çalışmada bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir [Cuny ve Witte, 2005]. Çalışmada kullanılan primerler Çizelge 3.2' de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Primer sekansları, baz büyüklüğü ve optimal bağlanma sıcaklıkları

Primer	Sekans (5'- 3')	Baz	Bağlanma sıcaklığı (Tm)
*mecA*1 (F)	ACTGCTATCCACCCTCAAAC	20	55 ^{O}C
*mecA*2 (R)	CTGGTGAAGTTGTAATCTGG	20	55 ^{O}C

İzole edilen DNA' lardan kalıp DNA olarak 2 µl alınarak PZR karışımına eklenmiştir. Ayrıca bu karışıma 10X PZR tamponu (300 mM Tris-HCl pH 9,0), 300 mM K^+ ve NH_4 tuzları), 25 mM $MgCl_2$, 10 mM dNTP, 0,5 µM ileri ve geri primeri, Taq DNA polimeraz ve önceden hesaplanarak belirlenen miktarda distile su, son hacim 50 µl olacak şekilde ilave edilmiştir. Bu reaksiyonda kullanılan malzemelerin konsantrasyon ve miktarları Çizelge 3.3' de verilmiştir. Örnekler termal döngü cihazında ilk denatürasyon için 94°C' de 4 dakika bekletildikten sonra, her bir döngü sırasıyla 95ºC' de 30 saniye, 55ºC' de 30 saniye ve 72ºC' de 30 saniye olacak

şekilde, 35 döngü çalışılmıştır. Son olarak örnekler 72ºC' de 10 dakika bekletilerek PZR sonlandırılmıştır. PZR reaksiyonunun gerçekleştirildiği program Çizelge 3.4' de verilmiştir.

Çizelge 3.3. PZR reaksiyonunda kullanılan malzemelerin konsantrasyon ve miktarları

PZR reaksiyonu	Reaksiyonda kullanılan miktar
Kalıp DNA	∞ 350 ng
10 X PZR tamponu	5 µl
25 mM $MgCl_2$	5 µl
10 mM dNTP (her biri 2,5 mM)	5 µl
0,5 µM ileri primeri (F)	2,5 µl
0,5 µM geri primeri (R)	2,5 µl
Taq DNA Polimeraz (5 u/ µl)	0,25 µl
Toplam hacim	50 µl

Çizelge 3.4. PZR reaksiyonunun gerçekleştirildiği program

PZR Programı	Süre	
94°C (ön denatürasyon)	4 dk	
95°C (denatürasyon)	30 sn	35 döngü
55°C (bağlanma)	30 sn	
72°C (uzama)	30 sn	
72°C (final uzama)	10 dk	

Çalışmada negatif kontrol olarak PZR karışımına genomik DNA yerine su konularak çalışılmıştır. Pozitif kontrol olarak da daha önceden çalışılmış MRSA olduğu bilinen bir suş kullanılmıştır.

Amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforeziyle görüntülenmesi

Amplifiye ürününün değerlendirilmesi amacıyla 5 µl PZR ürünü, 1 µl yükleme solüsyonu (6X Fermentas DNA Loading Dye) ile süspanse edilerek, 1X TAE (Tris-Asetat-EDTA) tamponu ile hazırlanan % 2' lik agaroz jelde 1 saat 80 Volt elektrik akımında yürütülmüştür. Elektroforezden sonra jel Etidyum Bromür (Sigma) ile boyanarak UV transillüminatörde değerlendirilmiştir.

5X TAE TAMPONU: 24,2 g Tris 50 ml distile su içerisinde çözüldükten sonra 10 ml 0,5 M EDTA (pH: 8) ve 5,71 ml glasiyel asetik asit eklenerek toplam hacim 100 ml olacak şekilde distile su ilave edilerek hazırlanmıştır. Çalışmada 5X TAE tamponu seyreltilerek kullanılmıştır.

PZR ve amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforeziyle görüntülenmesi çalışmaları Gazi Üniversitesi Moleküler Biyoloji Araştırma ve Uygulama Merkezinde (MOBAM) yapılmıştır.

4. DENEYSEL BULGULAR

4.1. *Staphylococcus*' ların İzolasyonu

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinin değişik kliniklerinde tedavi olan hastalardan 16' sı kan, 12' si yara, 11' i trakeal aspirat, 6' sı idrar, 2' si abse ve 1' i burun kaynaklı olmak üzere toplam 48 adet *Staphylococcus* sp. izole edilmiştir. Klinik örneklerden izole edilen bakterilerin izolasyon kaynağı, klinik örnek çeşidine göre izolat sayısı ve kodları Çizelge 4.1 ve 4.2' de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus* sp. izolatlarının çalışılan klinik örneklere göre dağılımı

Çalışılan klinik örnek çeşidi	İzolat sayısı
Kan	16
Yara	12
Trakeal aspirat	11
İdrar	6
Abse	2
Burun	1

Çizelge 4.2. Klinik örneklerden izole edilen bakterilerin izolasyon kaynağı ve kodları

Bakteri kodu	İzolasyon kaynağı		Bakteri kodu	İzolasyon kaynağı	
	Cinsiyet	Örnek türü		Cinsiyet	Örnek türü
EB 1	E	Yara	**EB 25**	E	Abse
EB 2	K	Kan	**EB 26**	E	Yara
EB 3	E	T. aspirat	**EB 27**	K	İdrar
EB 4	K	İdrar	**EB 28**	E	Kan
EB 5	E	T. aspirat	**EB 29**	E	Kan
EB 6	E	Kan	**EB 30**	K	Yara
EB 7	K	Kan	**EB 31**	E	Kan
EB 8	K	Burun	**EB 32**	K	Kan
EB 9	K	Kan	**EB 33**	K	T. aspirat
EB 10	K	T. aspirat	**EB 34**	E	Yara
EB 11	E	Kan	**EB 35**	K	T. aspirat
EB 12	K	Kan	**EB 36**	K	Yara
EB 13	E	Kan	**EB 37**	K	Kan
EB 14	K	İdrar	**EB 38**	K	Abse
EB 15	E	Kan	**EB 39**	E	Yara
EB 16	K	İdrar	**EB 40**	K	Kan
EB 17	E	Yara	**EB 41**	K	Yara
EB 18	K	T. aspirat	**EB 42**	E	T. aspirat
EB 19	E	Yara	**EB 43**	K	Kan
EB 20	E	Kan	**EB 44**	E	İdrar
EB 21	K	T. aspirat	**EB 45**	E	İdrar
EB 22	E	Yara	**EB 46**	K	T. aspirat
EB 23	E	Yara	**EB 47**	K	T. aspirat
EB 24	K	T. aspirat	**EB 48**	E	Yara

K: Kadın, E: Erkek

4.2. Fenotipik Tanımlama Test Sonuçları

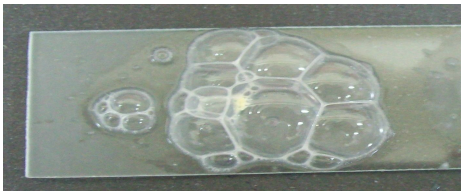
Çalışmada, koloni morfolojisi, Gram boyama, mikroskobik görünüm, kanlı agarda hemoliz tipi, lam koagülaz deneyi, katalaz deneyi, DNaz deneyi ve mannitol fermentasyonu deneyi suşların tanımlanması amacıyla yapılmıştır. Tanımlama testleri Bölüm 3.2.1' de anlatıldığı gibi yapılmıştır.

İzole edilen 48 adet suşun, 10 tanesi (EB1, EB4, EB19, EB31, EB35, EB37, EB38, EB40, EB44, EB45) kanlı agarda küçük, pigmentsiz ve hemoliz oluşturmayan koloniler şeklinde üreyen küçük koloni varyantları olarak tanımlanırken, 38 suşun kanlı agarda hemoliz oluşturduğu belirlenmiştir (Resim 4.1).

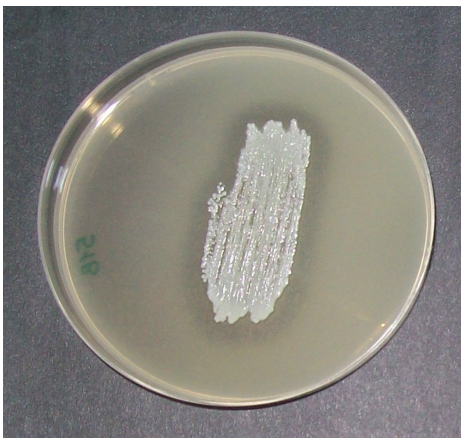


Resim 4.1. EB3 suşunun kanlı agardaki hemoliz (+) görüntüsü (solda), EB1 suşunun kanlı agarda hemoliz (-) görüntüsü (sağda)

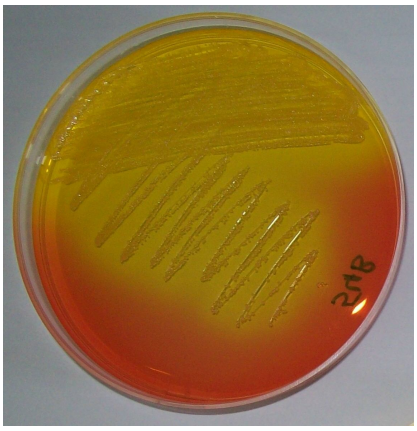
İzole edilen tüm suşların katalaz (Resim 4.2) ve DNaz (Resim 4.3) üretimi gerçekleştirdiği belirlenmiştir. Ayrıca tüm suşların mannitol fermentasyonu pozitif sonuç vermiştir (Resim 4.4).



Resim 4.2. EB1 suşunun katalaz (+) test görünümü



Resim 4.3. EB1 suşunun DNaz (+) test görünümü



Resim 4.4. EB1 suşunun mannitol fermentasyonu sonucu oluşan renk değişimi görüntüsü

Lamda koagülaz deneyi ile EB4 suşu dışındaki tüm suşlar pozitif sonuç vermiştir (Resim 4.5).



Resim 4.5. EB4 suşunun koagülaz (-) test görünümü (solda), EB1 suşunun koagülaz (+) test görünümü (sağda)

Fenotipik tanımlama ile tüm suşlar *S. aureus* olarak tanımlanmıştır (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. İzolatların tanımlama test sonuçları

İzolatlar	Gram boyama	Kanlı agarda hemoliz	Katalaz varlığı	Koagülaz varlığı	Mannitol fermenasyonu	Dnaz üretimi	TÜR DÜZEYİNDE TANIMLAMA
EB 1	P	-	+	+	+	+	*S. aureus*
EB 2	P	+	+	+	+	+	*S. aureus*
EB 3	P	+	+	+	+	+	*S. aureus*
EB 4	P	-	+	-	+	+	*S. aureus*
EB 5	P	+	+	+	+	+	*S. aureus*
EB 6	P	+	+	+	+	+	*S. aureus*
EB 7	P	+	+	+	+	+	*S. aureus*
EB 8	P	+	+	+	+	+	*S. aureus*
EB 9	P	+	+	+	+	+	*S. aureus*
EB 10	P	+	+	+	+	+	*S. aureus*
EB 11	P	+	+	+	+	+	*S. aureus*
EB 12	P	+	+	+	+	+	*S. aureus*
EB 13	P	+	+	+	+	+	*S. aureus*
EB 14	P	+	+	+	+	+	*S. aureus*
EB 15	P	+	+	+	+	+	*S. aureus*
EB 16	P	+	+	+	+	+	*S. aureus*
EB 17	P	+	+	+	+	+	*S. aureus*
EB 18	P	+	+	+	+	+	*S. aureus*
EB 19	P	-	+	+	+	+	*S. aureus*
EB 20	P	+	+	+	+	+	*S. aureus*
EB 21	P	+	+	+	+	+	*S. aureus*
EB 22	P	+	+	+	+	+	*S. aureus*
EB 23	P	+	+	+	+	+	*S. aureus*
EB 24	P	+	+	+	+	+	*S. aureus*
EB 25	P	+	+	+	+	+	*S. aureus*
EB 26	P	+	+	+	+	+	*S. aureus*
EB 27	P	+	+	+	+	+	*S. aureus*
EB 28	P	+	+	+	+	+	*S. aureus*
EB 29	P	+	+	+	+	+	*S. aureus*
EB 30	P	+	+	+	+	+	*S. aureus*
EB 31	P	-	+	+	+	+	*S. aureus*
EB 32	P	+	+	+	+	+	*S. aureus*
EB 33	P	+	+	+	+	+	*S. aureus*
EB 34	P	+	+	+	+	+	*S. aureus*

Çizelge 4.3. (Devam) İzolatların tanımlama test sonuçları

EB 35	**P**	**-**	+	+	+	+	***S. aureus***
EB 36	**P**	+	+	+	+	+	***S. aureus***
EB 37	**P**	**-**	+	+	+	+	***S. aureus***
EB 38	**P**	**-**	+	+	+	+	***S. aureus***
EB 39	**P**	+	+	+	+	+	***S. aureus***
EB 40	**P**	**-**	+	+	+	+	***S. aureus***
EB 41	**P**	+	+	+	+	+	***S. aureus***
EB 42	**P**	+	+	+	+	+	***S. aureus***
EB 43	**P**	+	+	+	+	+	***S. aureus***
EB 44	**P**	**-**	+	+	+	+	***S. aureus***
EB 45	**P**	**-**	+	+	+	+	***S. aureus***
EB 46	**P**	+	+	+	+	+	***S. aureus***
EB 47	**P**	+	+	+	+	+	***S. aureus***
EB 48	**P**	+	+	+	+	+	***S. aureus***

P: Gram pozitif, +: Pozitif sonuç, -: Negatif sonuç

4.3. Antibiyotik Duyarlılığı Test Sonuçları

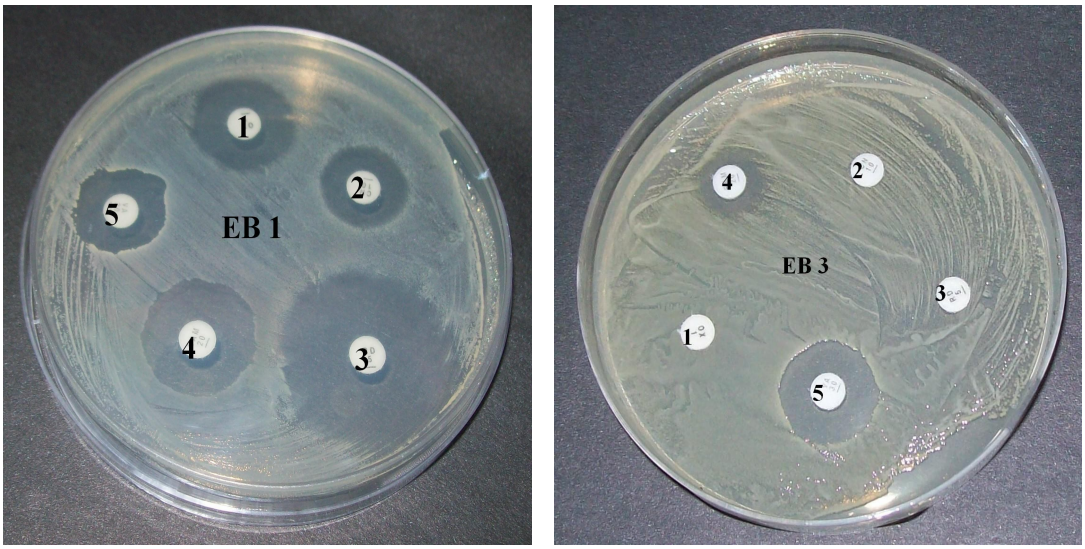
Çalışmada suşların, seçilen 10 antibiyotik (amoksisilin-klavulonik asit, eritromisin, gentamisin, oksasilin, penisilin G, rifampisin, streptomisin, ampisilin-sulbaktam, tetrasiklin, vankomisin) için dirençlilikleri disk difüzyon yöntemi ile CLSI önerileri dikkate alınarak, Mueller Hinton Agar (Merck) besiyerinde, standartlara uygun olarak yapılmıştır. Çalışmada kullanılan antibiyotiklerin 48 adet *S. aureus* suşu üzerindeki sonuçları Çizelge 4.4' de verilmiştir. Bu sonuçlara göre, 9 suş (EB3, EB4, EB6, EB17, EB18, EB33, EB36, EB46, EB47) metisiline dirençli bulunmuştur. Vankomisine dirençli suş saptanmamıştır.

Çizelge 4.4. *S. aureus*' ların antibiyogram sonuçları

Suş no	Amoksisilin -Klavulonik asit (AMC)	Eritronmisin (E)	Gentamisin (CN)	Tetrasiklin (TE)	Rifampin (RD)	Penisilin G (P)	Vankomisin (VA)	Streptomisin (S)	Ampisilin-Sulbaktam (SAM)	Oksasilin (OX)
EB1	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S
EB2	S	S	S	S	S	**R**	S	I	S	S
EB3	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	S	**R**	**R**	**R**
EB4	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	S	**R**	**R**	**R**
EB5	S	S	S	S	S	**R**	S	S	S	S
EB6	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	S	**R**	**R**	**R**
EB7	S	S	S	I	S	**R**	S	I	S	S
EB8	S	S	S	S	S	**R**	S	I	S	S
EB9	S	S	S	S	S	**R**	S	I	S	S
EB10	S	**R**	S	S	S	**R**	S	I	S	S
EB11	S	I	S	S	S	**R**	S	I	S	S
EB12	S	S	S	S	S	**R**	S	I	S	S
EB13	S	S	S	S	S	**R**	S	I	S	S
EB14	S	**R**	S	S	S	**R**	S	I	S	S
EB15	S	S	S	S	S	**R**	S	I	S	S
EB16	S	I	S	S	S	**R**	S	I	S	S
EB17	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	S	**R**	**R**	**R**
EB18	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	S	**R**	**R**	**R**
EB19	S	I	S	S	S	**R**	S	**R**	S	S
EB20	S	S	S	S	S	**R**	S	**R**	S	S
EB21	S	S	S	S	S	**R**	S	I	S	S
EB22	S	S	S	S	S	**R**	S	I	S	S
EB23	S	S	S	S	S	**R**	S	I	S	S
EB24	S	I	S	S	S	**R**	S	I	S	S
EB25	S	I	S	S	S	**R**	S	I	S	S
EB26	S	S	S	S	S	**R**	S	I	S	S
EB27	S	I	S	S	S	**R**	S	I	S	S
EB28	S	I	S	S	S	**R**	S	I	S	S
EB29	S	S	S	**R**	S	S	S	I	S	S
EB30	S	S	S	S	S	**R**	S	I	S	S
EB31	S	S	S	S	S	S	S	**R**	S	S
EB32	S	**R**	I	**R**	S	**R**	S	**R**	S	S
EB33	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	S	**R**	**R**	**R**
EB34	S	I	S	S	S	**R**	S	I	S	S
EB35	S	I	S	S	S	**R**	S	I	S	S
EB36	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	S	**R**	**R**	**R**
EB37	S	I	S	S	S	**R**	S	I	S	S
EB38	S	I	S	S	S	**R**	S	**R**	S	S
EB39	S	I	S	S	S	S	S	**R**	S	S
EB40	S	S	S	S	S	**R**	S	**R**	S	S
EB41	S	I	I	S	S	S	S	**R**	S	S
EB42	S	I	S	S	S	**R**	S	I	S	S
EB43	S	I	S	S	S	**R**	S	I	S	S
EB44	S	I	S	S	S	S	S	**R**	S	S
EB45	S	S	S	S	S	**R**	S	I	S	S
EB46	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	S	**R**	**R**	**R**
EB47	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	**R**	S	**R**	**R**	**R**
EB48	S	I	S	S	S	**R**	S	I	S	S

S: Duyarlı (Susceptible), I: Orta duyarlı (Intermediate), R: Dirençli (Resistant)

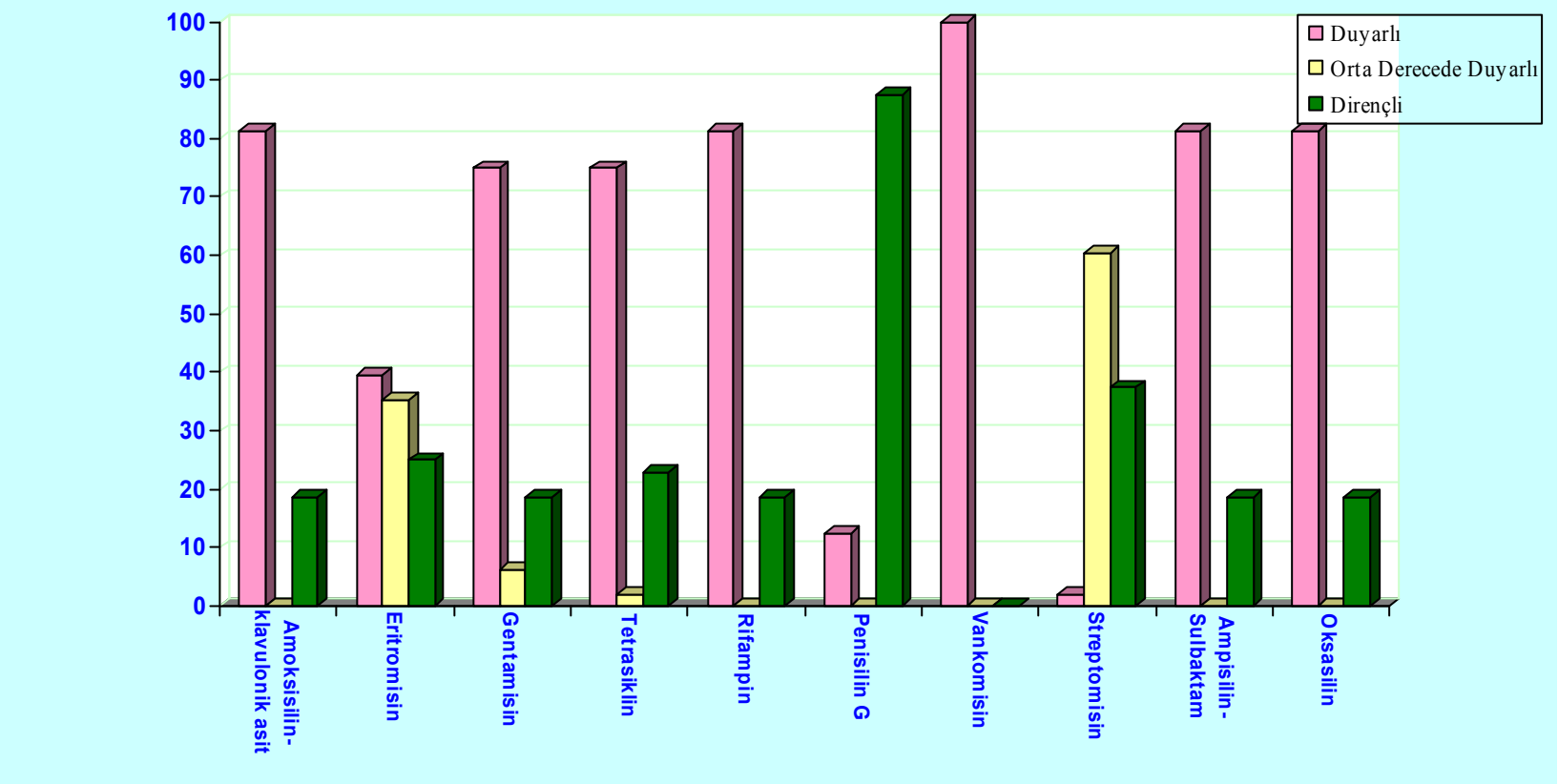
Resim 4.6' da *S. aureus* EB1 ve EB3 suşlarının antibiyotiklere karşı duyarlılıkları gösterilmiştir. *S. aureus'* ların test edilen antibiyotiklere karşı gösterdiği % duyarlılık oranları Çizelge 4.5 ve Şekil 4.1' de verilmiştir.



Resim 4.6. *S. aureus* EB 1 ve EB 3 suşlarının antibiyotiklere karşı duyarlılıkları (1; Oksasilin, 2; Gentamisin, 3; Rifampin, 4; Amoksisilin-Klavulonik asit, 5; Vankomisin)

Çizelge 4.5. *S. aureus'* ların antibiyotiklere karşı gösterdiği % duyarlılık oranları

Antibiyotik Adı	Duyarlı	Orta Derecede Duyarlı	Dirençli
Amoksisilin-Klavulonik asit	**81,25**	**0**	**18,75**
Eritromisin	**39,60**	**35,4**	**25**
Gentamisin	**75**	**6,25**	**18,75**
Tetrasiklin	**75**	**2,08**	**22,92**
Rifampin	**81,25**	**0**	**18,75**
Penisilin G	**12,50**	**0**	**87,50**
Vankomisin	**100**	**0**	**0**
Streptomisin	**2,08**	**60,42**	**37,50**
Ampisilin-Sulbaktam	**81,25**	**0**	**18,75**
Oksasilin	**81,25**	**0**	**18,75**



Şekil 4.1. *S. aureus'* ların antibiyotiklere karşı gösterdiği % duyarlılık oranları

Çalışmada oksasiline direnç oranı % 18,75 olarak bulunmuştur. Kullanılan antibiyotikler içerisinde en yüksek direnç % 87,5 olmak üzere penisilinde tespit edilmiştir. Bununla birlikte oksasiline dirençli bulunan suşların (EB3, EB4, EB6, EB17, EB18, EB33, EB36, EB46, EB47) vankomisin hariç diğer tüm antibiyotiklere dirençli olduğundan çoklu direnç gösterdiği tespit edilmiştir.

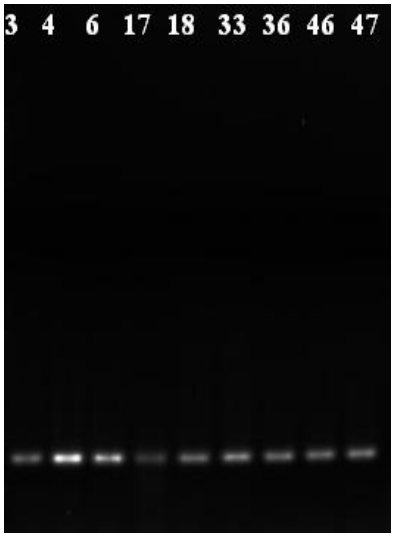
4.4. Metisilin Direnç Geninin (*mecA*) Belirlenmesi

4.4.1. Genomik DNA izolasyon sonuçları

Disk difüzyon yöntemi ile MRSA olarak tespit edilen 9 suş ve duyarlı olarak belirlenen suşlar arasından seçilen 3 suşdan (EB5, EB9, EB12) izole edilen DNA örneklerinin saflık (nanodrop ile 260/280 nm'de okunan değer) ve ng/µl olarak miktarları Çizelge 4.6' da, MRSA suşlarının genomik DNA' larının agaroz jel elektroforez görüntüsü Resim 4.7' gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. DNA örneklerinin saflık ve miktar tayini

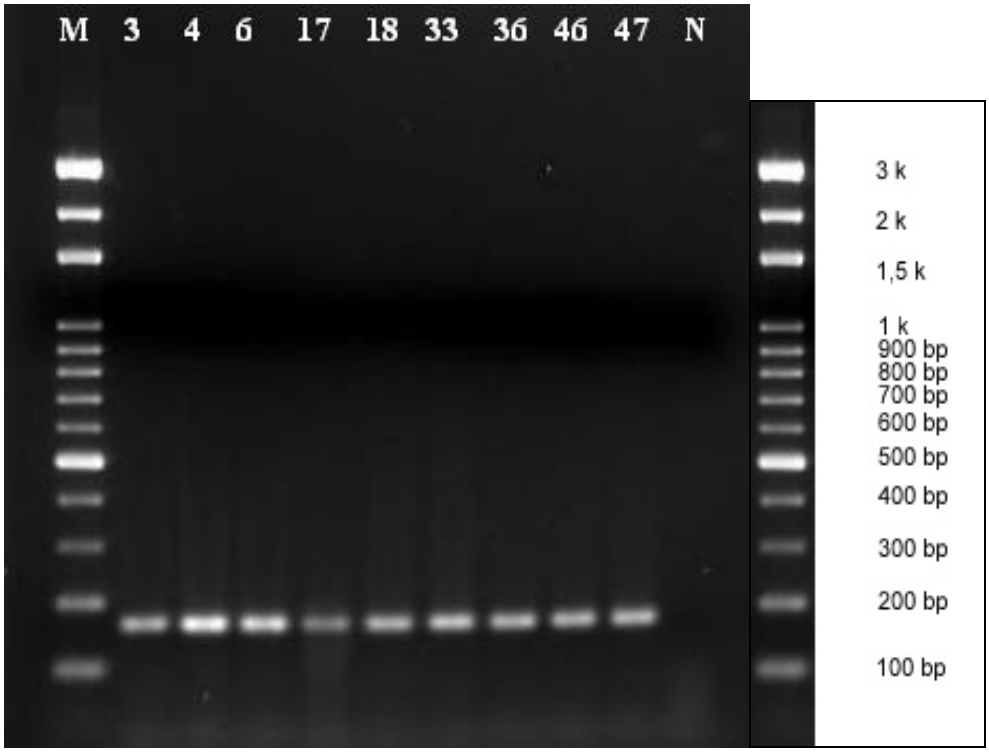
Örnek	260	280	260/280	ng/µl
EB 18	0,094	0,042	2,21	88,0
EB 17	0,124	0,052	2,39	119,6
EB 3	0,197	0,106	1,86	171,8
EB 4	0,251	0,110	2,27	236,5
EB 6	0,138	0,054	2,52	134,2
EB 33	0,159	0,060	2,64	156,6
EB 36	0,237	0,093	2,53	230,0
EB 46	0,100	0,038	2,57	97,80
EB 47	0,272	0,126	2,15	252,2
EB 12	0,187	0,087	2,15	187,0
EB 5	0,134	0,067	2,00	134,4
EB 9	0,275	0,131	2,10	275,0



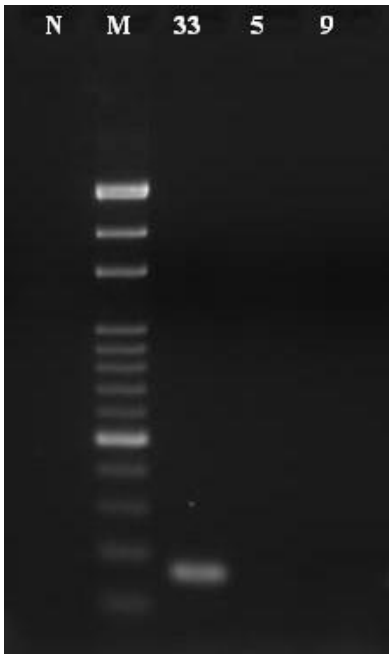
Resim 4.7. Metisilin dirençli suşların (EB3, EB4, EB6, EB17, EB18, EB33, EB36, EB46, EB47) genomik DNA' larının agaroz jel elektroforez görüntüsü

4.4.2. PZR sonuçları

Fenotipik yöntemlerle *S. aureus* olarak tanımlanan, disk difüzyon yöntemiyle metisiline dirençli olarak bulunan suşlarda ve duyarlı olarak tespit edilen suşlar arasından seçilen 3 suşda (EB12, EB5, EB9) PZR yöntemiyle *mecA* geni aranmıştır. Bu amaçla, disk difüzyon yöntemiyle metisiline dirençli bulunan suşlar (EB3, EB4, EB6, EB17, EB18, EB33, EB36, EB46, EB47) PZR yöntemiyle de dirençli saptanmıştır. Çalışmada metisiline dirençli olarak saptanan 9 suşun PZR yöntemiyle *mecA* geni çoğaltılmış ve çoğaltılan ürünlerin değerlendirilmesi agaroz jel elektroforeziyle yapılmıştır (Resim 4.8, 4.9).

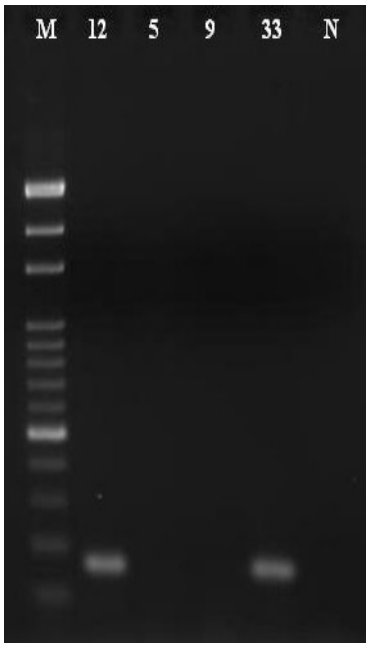


Resim 4.8. *mecA* (+) *S. aureus* izolatlarının elektroforez görüntüsü
M: Moleküler büyüklük belirteci, N: Negatif kontrol, EB3-47: MRSA suşları



Resim 4.9. *mecA* (+) ve *mecA* (-) *S. aureus* izolatlarının elektroforez görüntüsü
M: Moleküler büyüklük belirteci, N: Negatif kontrol, EB33: MRSA suşu, EB5,9: MSSA suşları

Disk difüzyon yöntemiyle duyarlı olarak tespit edilen suşlar arasından EB12, EB5 ve EB9 suşları tesadüfen seçilerek bu suşlarda direnç geni PZR yöntemiyle kontrol amacıyla taranmıştır. Disk difüzyon yöntemiyle metisilin duyarlı olarak tespit edilen EB12 suşunun *mecA* geni içerdiği belirlenmiştir (Resim 4.10). EB5 ve EB9 suşlarının ise metisilin direnç geni içermediği tespit edilmiştir.



Resim 4.10. *mecA* (+) ve *mecA* (-) *S. aureus* izolatlarının elektroforez görüntüsü
M: Moleküler büyüklük belirteci, N: Negatif kontrol,
EB33: Disk difüzyon yöntemi ile metisilin antibiyotiğine dirençli suş
EB12, EB5, EB9: Disk difüzyon yöntemi ile metisilin antibiyotiğine duyarlı suşlar

Bu çalışma metisilin direncinin belirlenmesinde disk difüzyon tekniğinin yeterli olmadığını, bir suşun metisilin duyarlı olup olmadığının söylenebilmesi için moleküler yöntemlerle desteklenmesi gerektiğini göstermektedir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Alexander Fleming' in ilk antibiyotik maddeyi bulması insanlık tarihinin şüphe götürmez en büyük buluşlarından birisidir. Bu başarı hikâyesinin çoğu zaman atlanan önemli bir ayrıntısı bizzat Fleming tarafından Nobel ödülü konuşmasında dile getirilmiştir. Fleming, bu konuşmasında bakterilerin özellikle düşük doz kullanılarak yapılan tedavilerde kısa bir süre içinde antibiyotiklere karşı direnç kazandığını vurgulayarak çok önemli bir tehlikeye işaret etmiştir. Gerçekten de günümüze gelene kadar üretilen bütün antibiyotiklere karşı mikroorganizmalar kısa süre içinde direnç kazanmışlar ve böylece çoğu antibiyotik, direnç problemi yüzünden kısıtlı kullanılabilir hale gelmiştir [Martinez ve ark., 2009; Lee ve ark., 2010]. Antibiyotiklerin kullanılmasıyla milyonlarca insanın hayatını tehdit eden bakteri kökenli hastalıklar artık tedavi edilebilir olmuşlardır. Fakat bakteriler kısa süre içinde tıbbın kullanımına sunulmuş her antibiyotik ilaca karşı direnç kazanmışlar ve bu sebepten bilhassa hastane kökenli bakterilerden kaynaklanan bazı hastalıkların tedavisi imkânsız hale gelmiştir. Mesela metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) gibi bakteriler çoğu zaman hiçbir ilaca cevap vermemekte ve bu durumlarda son çare olarak cerrahi müdahalelere başvurulmaktadır [Martinez ve ark., 2009].

S. aureus geçmişte önce penisilin, sonrasında penisilinaza dirençli antibiyotiklerin kullanıma girmesinden kısa süre sonrasında her iki antibiyotik grubuna da hızla direnç geliştiren ve cilt ve yumuşak doku enfeksiyonu, osteomiyelit, bakteremi ve endokardit gibi hayatı tehdit eden enfeksiyonlara neden olan bir bakteridir. MRSA başlangıçta yalnız hastane ortamında tanımlanmışken ilerleyen zaman içerisinde toplum kaynaklı enfeksiyonlardan da izole edilmeye başlanmıştır [Ippolito ve ark., 2010].

Günümüzde *S. aureus* izolatlarında görülen en önemli sorun, giderek artan oranlarda görülen metisilin direncidir. MRSA, bir kez hastaneye girdikten sonra tedavisi oldukça zordur. Bu nedenle hastanelerde MRSA izolatlarının saptanması,

yayılımının incelenmesi, özellikle hemodiyaliz ve cerrahi hastaları gibi yüksek risk taşıyan hasta gruplarında MRSA kolonizasyonunun ortadan kaldırılması büyük önem taşımaktadır [Sancak, 2007]. Bu yüzden modern laboratuvarlar için en önemli nokta MRSA'nın izolasyonu ve tanımlanmasıdır. Bu çalışmanın amacı klinik örneklerden izole edilen *S. aureus* suşlarının metisilin dirençlilik genlerinin belirlenmesi olmuştur.

Bu amaçla Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinin değişik kliniklerinde tedavi olan hastalardan toplam 48 adet *Staphylococcus* sp. izole edilmiştir. İzolatların öncelikli olarak koloni morfolojisi, kanlı agarda hemoliz, mannitol fermentasyonu, DNaz testi, katalaz ve koagülaz deneyleri ile biyokimyasal tanımlamaları yapılmıştır. Fenotipik tanımlama sonucunda izolatların tamamı *S. aureus* olarak tanımlanmıştır (Bkz. Çizelge 4.3).

Fenotipik yöntemlerle tanımlanan suşların seçilen 10 antibiyotiğe (penisilin, amoksisilin-klavulonik asit, eritromisin, gentamisin, oksasilin, vankomisin, tetrasiklin, rifampin, streptomisin ve ampisilin-sulbaktam) dirençlilikleri disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Çalışmada suşların % 87,50' si penisiline, % 37,50' si streptomisine, % 25,0' i eritromisine, % 22,92' si tetrasikline dirençli olarak tespit edilmiştir. Gentamisin, amoksisilin-klavulonik asit, rifampin, ampisilin-sulbaktam ve oksasilin antibiyotiklerine ise % 18,75 oranında direnç görülmüştür. Metisiline dirençli *S. aureus* suşları tüm penisilinler, beta laktam/beta laktamaz inhibitörü kombinasyonları, aminoglikozitler, makrolidler, klindamisin, tetrasiklin gibi ajanlara da dirençlidir. Bu nedenle, stafilokoklarda çoğul dirençlilik saptanması metisilin direncini düşündürmelidir. Konuya ilişkin olarak yapılan çalışmalar MRSA' ların diğer antimikrobiyal gruplarına direnç oranlarının MSSA' lara göre daha yüksek olduğunu göstermiştir [Ekşi ve ark., 2008]. Buna paralel olarak bu çalışmada da metisilin dirençli suşlarda (EB3, EB4, EB6, EB17, EB18, EB33, EB36, EB46, EB47), kullanılan diğer antibiyotiklere (penisilin, amoksisilin-klavulonik asit, eritromisin, gentamisin, tetrasiklin, rifampin, streptomisin ve ampisilin-sulbaktam) karşı da direnç gözlenmiştir. Bununla birlikte 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.

Staphylococcus aureus taşıyıcılığı, incelenen topluma göre değişmekte olup yaş gruplarına göre de farklılıklar gösterir. Örneğin, yenidoğanda % 90' a varabilen burun taşıyıcılığı, ilk iki yılda % 20' lere gerilemektedir. Genel popülasyonda burunda *S. aureus* taşıyıcılık oranları % 10-40 arasında değişirken, sağlık personelinde % 50-70' lere varabilmektedir [Ergün Arabacı ve Oldacay, 2008]. Bu çalışmada da metisilin direnci gösteren 9 suştan 3' ü erkeklerden 6' sı kadınlardan izole edilmiştir. Bununla birlikte 9 metisilin dirençli suştan 5' i trakeal aspirat kaynaklı olduğu görülmektedir.

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 hastane içindeki en önemli rezervuarını oluşturmaktadır. MRSA'nın başlıca kolonize olduğu vücut bölgeleri burun, aksilla, cerrahi ya da yanık yaraları, dekübitüs ülserleri, perine veya rektum, trakeostomi 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 sonraya dek ellerden MRSA saptanabilmektedir [Sancak, 2007].

Dirençli *S. aureus* enfeksiyonlarından korunmak için öncelikle el hijyenine büyük önem verilmelidir. Ek olarak 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 [Hızel, 2011].

Stafilokoklarda metisilin direnç oranları ülkeler, bölgeler, hastaneler ve hatta aynı hastanenin servisleri arasında bile farklılık göstermektedir. Ülkemizde çeşitli hastanelerden bildirilmiş MRSA oranlarında bu farklar görülmektedir. Yapılan çalışmalarda MRSA oranları; Marmara Üniversitesinde 2000' de % 67, 2001' de % 60 [Korten, 2003]; Gazi Üniversitesinde 2001' de % 73, 2002' de % 77 olarak bildirilmektedir [Kaçmaz ve ark., 2002]. Sipahi ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, metisilin direnci 2001' de % 73,8 iken 2005' de % 55,3 olarak bulunmuştur [Sipahi ve ark., 2007]. Gürsoy ve arkadaşlarının 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' da % 64,7 ve 2007' de % 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 kullanılabilecek diğer antibiyotiklere de yüksek oranda direnç saptanmıştır [Gürsoy ve ark., 2009]. Bu çalışmalara ek olarak Türk Dağı ve arkadaşlarının kan kültürlerinden izole ettikleri *S. aureus* suşlarında metisilin direncini % 42,5 [Türk Dağı ve ark., 2011]; Kurutepe ve arkadaşlarının çeşitli klinik örneklerden izole ettikleri *S. aureus* suşlarında metisilin direncini % 32,4 oranında bulmuşlardır [Kurutepe ve ark., 2007]. Yapılan bu çalışmalarda sonuç olarak MRSA suşlarında MSSA suşlarına göre yüksek oranda direnç saptanmış ve metisilin direncinin sadece hastane kökenli suşlarda değil toplum kökenli suşlarda da giderek artan oranda karşılaşılacağı düşüncesiyle *S. aureus* suşlarının direnç paternlerinin

dikkatle izlenmesi ve tedavi planlanırken bunların güncel değerlerinin göz önüne alınması gerektiği kanısına varılmıştır [Kurutepe ve ark., 2007].

Akdeniz ülkelerini kapsayan ve ülkemizden de çeşitli laboratuvarların katıldığı bir çalışmada kan kültürlerinden izole edilen *S. aureus* suşlarında MRSA oranı 2003 yılında % 43, 2004 yılında % 40 ve 2005 yılında % 35 olarak tespit edilmiştir [Borg ve ark., 2007]. Ayrıca metisiline direnç ile birlikte çoklu antibiyotik direncinin görülmesi sebebiyle tüm merkezlerin kendi direnç profilini belirleyerek uygun antibiyotik politikalarının oluşturulması üzerinde durulmuştur [Türk Dağı ve ark., 2011].

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 [Türk Dağı ve ark., 2011]. Bununla birlikte direnç durumlarının düzenli olarak incelenmesi hastanelerdeki ampirik tedavi seçimleri açısından da önem taşımaktadır.

MRSA oranı ile ilgili yapılan çalışmalarda ülkemizde bu oranın değişmekle birlikte % 50' nin üzerinde olduğu bildirilmektedir [Vural ve ark., 2011]. Çalışmada, hastane kaynaklı 48 adet *S. aureus* suşunda % 18,75 oranında metisilin direnci bulunmuştur. Bu çalışmada sadece Nisan ve Temmuz ayları arasında örnekler alınmıştır. Ancak farklı yıllara ve dönemlere dağılan zamanlarda da örnekler alınarak metisilin dirençliliklerinin ve *mecA* genlerinin belirlenmesi sonuçların daha doğru yorumlanmasını sağlayacaktır.

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 belirlenmesi olmasına rağmen rutin olarak laboratuvarlarda kullanımı yaygın değildir. Özel laboratuvar ortamı gerektirmesi, deneyimli personel ihtiyacı ve pahalı olması gibi nedenlerle çok tercih edilmemektedir [Vural ve ark., 2011]. 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 9 suşun (EB3, EB4, EB6, EB17, EB18, EB33, EB36, EB46, EB47) metisiline dirençli 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 9 suşun ve disk difüzyon yöntemiyle metisiline duyarlı saptanan 3 suşun (EB5, EB9, EB12), PZR yöntemiyle metisilin direnç geni (*mecA*) araştırılmıştır.

MRSA suşları sıklıkla beta laktam grubu antibiyotiklere heterojen direnç gösterirler, diğer bir deyişle popülasyondaki her bir organizma direnç için genetik bilgi taşıyabilir, fakat invitro test ortamında sadece küçük bir bölümü dirençli fenotipi gösterir. Dirençli alt popülasyon genellikle duyarlı popülasyona göre çok daha 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 direçli 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 [Murray ve ark., 2009].

Çalışmada disk difüzyon tekniği ile metisiline duyarlı olarak saptanan suşlardan seçilen EB5, EB9 ve EB12 suşlarının PZR yöntemi ile *mecA* geni içerip içermediği belirlenmiştir. Bu suşlardan EB12 suşu disk difüzyon yöntemiyle metisiline duyarlı olarak saptanmasına rağmen PZR yöntemiyle *mecA* genine sahip olduğu bulunmuştur (Bkz. Resim 4.10). EB12 suşunun disk difüzyon yöntemi ile metisilin direncinin belirlenememesinin nedeni olarak, bu suşun heterojen direnç göstermesi olabileceği düşüncesindeyiz. Bununla birlikte EB12 suşu çalışmada kullanılan penisilin ve streptomisin antibiyotikleri dışında kullanılan tüm antimikrobiyal ajanlara duyarlı bulunmuştur. Metisilin direncini düşünmemize olanak veren çoklu antibiyotik direnci de bu suşda saptanmamıştır. Bu durum toplum kökenli MRSA izolatlarının tipik olarak çeşitli antimikrobiyal ajanlara duyarlı olmalarından kaynaklanabilir. Buna bağlı olarak da metisilin direncinin belirlenmesindeki hatalar klinik sorunlara neden olmaktadır. Dirençli suşların duyarlı çıkması tedavide yetersizliğe ve MRSA suşlarının yayılmasına, duyarlı suşların dirençli çıkması glikopeptit grubu antibiyotiklerin aşırı kullanımı ve gereksiz izolasyon tedbirleri nedeniyle aşırı maliyetle sonuçlanmaktadır. Bunun için metisilin direncinin doğru tanımlanması gerekmektedir [Telli ve ark., 2006]. EB12 suşu gibi heterojen direnç gösteren MRSA' ların direnç tespitinde doğru sonuçların alınması için fenotipik yöntemlerin, genotipik yöntemlerle desteklenmesi doğru sonuçların alınmasını sağlayacaktır.

Fenotipik yöntemler içerisinde de özellikle metisiline dirençli suşlarda lam deneyi ile koagülazın negatif olarak bulunabileceği belirtilmektedir [Cengiz, 1999; Brown Derek, 2005; Winn ve ark., 2006] ve çalışmada EB4 suşu lam deneyi ile koagülaz negatif (Bkz. Resim 4.5) olarak tespit edilmiş, disk difüzyon yöntemiyle oksasiline dirençli (Bkz. Çizelge 4.4) ve *mecA* genine sahip olduğu tespit edilmiştir (Bkz. Resim 4.8).

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 girdiğinde 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 inanmaktayız. Bu çalışmada disk difüzyon yöntemi ile metisiline duyarlı olarak tespit edilen 3 suş tesadüfen seçilmiş ve seçilen metisiline duyarlı suşlardan EB12 suşunun metisilin direnç geni içerdiği tespit edilmiştir. Bu sonuç nedeniyle disk difüzyon tekniği ile duyarlı olarak belirlenen suşların hepsinde de *mecA* geninin araştırılması gerektiği düşüncesindeyiz. Bu sonuçlar bize metisilin direnci tespitinde disk difüzyon tekniğinin yetersiz olduğunu, direncin belirlemesinde mutlaka moleküler teknikler kullanılması gerektiğini göstermektedir. Bu yönde EB12 suşunun iyi bir örnek olduğunu ve literatüre bu açıdan katkısının olacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

Adams, M.R., Moss, M.O., "Bacterial Agents of Foodborne Illness *Staphylococcus aureus*", Food Microbiology, 3rd ed., ***The Royal Society of Chemistry***, UK., 252-257 (2008).

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).

Aydın, M.D., "Stafilokok infeksiyonları", Tıbbi mikrobiyoloji 3, Bülent Gürler, ***Nobel Tıp Kitabevleri***, İstanbul, 42-48 (2008).

Bannerman, T.L., "*Staphylococcus, Micrococcus* and Other Catalase Positive Cocci that Grow Aerobically", Manual of Clinical Microbiology, 8th ed, Murray, P.R., Baron, E.J., Pfaller, M.A., Jorgensen, J.H., Yolken, R.H., ***ASM Press***, Washington DC, 384-404 (2003).

Beretta, A.L., Trabasso, P., Stucchi, R.B., Moretti, M.L., "Use of molecular epidemiology to monitor the nosocomial dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital from 1991 to 2001", ***Braz J Med Biol Res***, 37(9):1345-51 (2004).

Berkiten, R., "Gram pozitif koklar", Tıbbi mikrobiyoloji 2, Emel Bozkaya, ***Nobel tıp kitabevleri,*** İstanbul, 1-29 (2005).

Bilgehan, H., "Klinik mikrobiyolojik tanı 3. baskı", ***Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi,*** İzmir 425-54;649-712 (2002).

Bilgehan, H., "Klinik Mikrobiyolojik Tanı 4. baskı", ***Fakülteler Kitabevi,*** İzmir, 495-506 (2004).

Bilgehan, H., "Temel mikrobiyoloji ve bağışıklık bilimi, 12. baskı", ***Barış Yayınları***, İzmir, 227-251, 153-188 (2008).

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):1310-5 (2007).

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).

Cengiz, A.T., "Staphylococcus", Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Ustaçelebi, S., ***Güneş Kitabevi***, Ankara, 339-346 (1999).

Clinical and Laboratory Standards Institue, "Antimikrobik duyarlılık testleri için uygulama standartları: Onbeşinci bilgi eki", M100-S15, ***CLSI***, Wayne, Pa, (2005).

Cuny, C., Witte, W., "PCR for the identification of methicillinresistant Staphylococcus aureus (MRSA) strains using a single primer pair specific for SCCmec elements and the neighbouring chromosome-borne orfX", ***European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases,*** 11, 834–855 (2005).

Çatar Kırca, F., "*Staphylococcus aureus* suşlarında metisilin direnci tanısında kullanılan bazı fenotipik yöntemlerin karşılaştırılması", Uzmanlık Tezi, ***Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı***, Ankara, 44-48 (2008).

Doğan, Ö., Yalınay Çırak, M., Engin, D., Türet, S., "Klinik örneklerden izole edilen stafilokoklarda metisilin direnci ve çeşitli antibiyotiklere in-vitro duyarlılıkları", ***Ankem Derg.***, 19(1): 39-42 (2005).

Dündar, V., Öztürk Dündar, D., "Stafilokok İnfeksiyonları", Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 3. Baskı, Willke Topçu, A., Söyletir, G., Doğanay, M., ***Nobel Tıp Kitapevleri***, İstanbul, 2065-2077 (2008).

Dündar, D., Sönmez Tamer, G., "Klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarının antimikrobiyal duyarlılıkları:üç yıllık değerlendirme", ***Ankem Derg***., 23(1) :8-12 (2009).

Ekşi, F., Gayyurhan, E. D., Bayram, A., "Gaziantep Üniversitesi Hastanesinde İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarının Antimikrobiyal Duyarlılıkları", ***Ankem Derg***., 22(4):203-208 (2008).

Ergün Arabacı, F., Oldacay, M., "Sağlık çalışanlarının burun kültürlerinden izole edilen stafilokoklarda metisilin direnci ve slime pozitifliği", ***İnfeksiyon Dergisi,*** 22(3):165-168 (2008).

Forbes, B.A., Sahm, D.F., Weıssfeld, A.S., "*Staphylococcus, Micrococcus* and Similar Organisms", Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology, 12th ed, ***Mosby***, USA, 254-263 (2007).

Gürsoy, N. C., Ersoy, Y., Günal, S., Kuzucu, Ç., "Kan kültürlerinden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarının antibiyotiklere direnç durumlarının değerlendirilmesi", ***Ankem Derg***., 23(1):26-29 (2009).

Hızel, K., "Dirençli gram pozitif kok infeksiyonlarının tedavi ve yönetimi", ***Ankem Derg***., 25(ek 2):50-53 (2011).

Ippolito, G., Leone, S., Lauria, F.N., Nicastri, E., Wenzel, R.P., "Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the superbug", ***Int J Infect Dis***, 14(4):7-11 (2010).

Iwatsuki, K., Yamasaki, O., Morizane, S., Oono, T., "Staphylococcal Cutaneous Infections: Invasion, Evasion and Aggression", ***Journal of Dermatological Science***, 42: 203-214 (2006).

İnternet: Tunçer Haznedaroğlu, GATA İnfeksiyon Kontrol Komitesi "Metisilin Dirençli *S.aureus* (MRSA), Korunma ve Kontrol", http://www.gata.edu.tr/infkom/MRSA.pdf (2007).

İnternet: University of Maryland "Pathogenic microbiology-*Staphylococcus* Summary" http://www.life.umd.edu/classroom/bsci424/pathogendescriptions/Staphylococcus.htm (2000).

İnternet: The Community College of Baltimore County "Staphylococcus aureus" http://faculty.ccbcmd.edu/courses/bio141/labmanua/lab15/gpstaph.html (2009).

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).

Karabiber, N., Mert Dinç, B., "Çeşitli klinik örneklerden izole edilen MRSA suşlarının antibiyotiplendirilmesi ve eritromisin zon içi üreme gösteren MRSA suşları" , ***Ankem Derg.***, 21(1):50-58 (2007).

Korten, V., "Hastane enfeksiyonlarına yol açan bakterilerde direnç sorunu", Gram Pozitif Kok Enfeksiyonları Sorunlar ve Çözümler immunsuprese Hastalar, Uzun, Ö., ***Güneş Kitabevi***, Ankara, 23-6, (2003).

Köksal, F., "Nükleik asit çoğaltma yöntemleri", Uygulamalı moleküler mikrobiyoloji, Durmaz, R., ***Nobel tıp kitabevleri***, Adana, 15-34 (2001).

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).

Lee, H. H., Molla, M. N., Cantor, C. R., Collins, J. J., "Bacterial charity work leads to population-wide resistance", ***Nature***, 467(7311):82-85 (2010).

Looney, W. J., "Small colony variants of *Staphylococcus aureus*", ***Br J Biomed Sci***, 57: 317-322 (2000).

Martinez, J. L., Fajardo, A., Garmendia, L., Hernandez, A., Linares, J. F., Martínez-Solano, L., Sánchez, M. B., "A global view of antibiotic resistance", ***FEMS Microbiol Rev***, 33(1): 44-65 (2009).

Moreillon, P., Que, Y., Glauser, M.P., "*Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock)", Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th ed., Mandell, G.L., Bennett, J.E., Dolin, R., ***Churchill Livingstone,*** NewYork, 2321-2351 (2005).

Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Landry, M.L., Pfaller, M.A., "Manual of Clinical Microbiology, 9. baskı (cilt 1)" , Ahmet Başustaoğlu, ***Atlas kitapçılık***, Ankara, 390-411 (2009).

Özen, N.S., Dağlar, D., Özhak Baysan, B., Yıldırım, Ç., Yazısız, H., Öğünç, D., Öngüt, G., Çolak, D., Gültekin, M., "Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarının saptanmasında MRSA ID kromojenik besiyerinin değerlendirilmesi", ***Ankem Derg***., 25(1):31-34 (2011).

Peacock, S.J., **"***Staphylococcus*", Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, 10th ed., Peter Borriello, Patrick Murray, Guido Funke, ***Hodder Arnold***, London, United Kingdom, 771-832 (2005).

Proctor, R.A., Peters, G., "Small colony variants in staphylococcal infections: diagnostic and therapeutic implications", ***Clin Infect Dis***, 27: 419-423 (1998).

Rice, L.B., Sahm, 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., Yolken, R.H., ***ASM Press***, Washington DC, 1074-1101 (2003).

Sancak, B., " *Staphylococcus aureus'* ta metisilin ve vankomisin direnci", ***Hacettepe Tıp Dergisi,*** 38:127-134 (2007).

Sipahi, O.R., Pullukçu, H., Aydemir, Ş., Taşbakan, M., Tunger, A., Arda, B., Yamazhan, T., Ulusoy, S., "Mikrobiyolojik kanıtlı hastane kökenli *Staphylococcus aureus* bakteremilerinde direnç paternleri: 2001-2005 yıllarının değerlendirilmesi", ***Ankem Derg***., 21(1):1-4 (2007).

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,*** 20 (2): 93-96 (2006).

Temiz, A., "Genel mikrobiyoloji uygulama teknikleri, 4. baskı", ***Hatiboğlu Yayınevi***, Ankara, 82-93, 118-140, 216-232 (2008).

Tiemersma, E.W., Bronzwaer, S.L., Lyytikäinen, O., "Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Europe 1999-2002", ***Emerg Infect Dis***.,10(9):1627-34 (2004).

Tristan, A., Ferry, T., Durand, G., Dauwalder, O., Bes, M., Lina, G., Vandenesch, F., Etienne, J., "Virulence Determinants in Community and Hospital Meticillin-Resistant *Staphylococcus aureus*", ***Journal of Hospital Infection*****,** 62: 105-109 (2007).

Turaç Biçer, A., "Hastane izolatı *Staphylococcus aure*us ve koagülaz negatif *Staphylococcus* suşlarında metisilin direncinin farklı yöntemlerle araştırılması", Uzmanlık Tezi, ***Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi,*** Adana, 2-3,31 (2009).

Tünger, A., Çavuşoğlu, C., Korkmaz M., "Mikrobiyoloji", ***Asya Tıp Yayıncılık***, İzmir, 41-50 (2003).

Türk Dağı, H., Arslan, U., Tuncer, İ., "Kan kültürlerinden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları", ***Ankem Derg***., 25(2):84-88 (2011).

Ünal, S., **"***Staphylococcus aureus:* Direnç mekanizmaları", Gram pozitif bakteri infeksiyonları, Ulusoy, S., Usluer, G., Ünal, S., ***Bilimsel Tıp Yayınevi***, Ankara, 23-38 (2004).

Ünal, S., "MRSA problemi", ***Ankem derg.***, 23(Ek2):1-12 (2009).

Vural, A., Afşar, İ., Kurultay, N., Demirci, M., "Staphylococcus aureus'da metisilin direncinin saptanmasında disk difüzyon, oksasilin agar tarama, mikrodilüsyon ve PBP2a lateks aglütinasyon testlerinin karşılaştırılması", ***Ankem derg.***, 25(3):145-149 (2011).

Willke, A., " Stafilokoklarda metisiline direnç mekanizmaları ve belirlenmesi", ***Ankem Derg.***, 6(2) : 288-291 (1992).

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, 6th ed , Darcy, P., ***Lippincott Williams Wilkins***., Baltimore, 623-671: (2006).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : BAYTAROĞLU, Elif

Uyruğu : T.C.

Doğum tarihi ve yeri : 15.06.1985 Muğla

Medeni hali : Bekar

Telefon : 0 (312) 260 90 02

e-mail : elif_baytaroglu@hotmail.com

Eğitim

Derece	**Eğitim Birimi**	**Mezuniyet tarihi**
Lisans	Gazi Üniversitesi/ Biyoloji Bölümü	2008
Lise	Eryaman Yabancı Dil Ağırlıklı Lise	2003

Yabancı Dil

İngilizce