

**METİSİLİNE DİRENÇLİ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
KLİNİK İZOLATLARINDA MUTASYON
ORANLARININ SAPTANMASI**

DOKTORA TEZİ

EMİNE DURHAN

DOÇ. DR. S.ELİF KORCAN

PROF. DR. MUSTAFA ALTINDIŞ

BİYOLOJİ

OCAK, 2014

Bu tez çalışması 12.FEN.BİL.03 numaralı proje ile BAP tarafından desteklenmiştir.

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

MRSA KLİNİK İZOLATLARINDA MUTASYON
ORANLARININ SAPTANMASI

EMİNE DURHAN

I.DANIŞMAN: DOÇ. DR. S.ELİF KORCAN
II.DANIŞMAN: PROF. DR. MUSTAFA ALTINDİŞ

BİYOLOJİ

OCAK, 2014

TEZ ONAY SAYFASI

Emine DURHAN tarafından hazırlanan “MRSA Klinik İzolatlarında Mutasyon Oranlarının Saptanması” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 13/01/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji **Anabilim Dalı’nda DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. S. Elif KORCAN

İkinci Danışmanı : Prof. Dr. Mustafa ALTINDIŞ

| | | |
|---------------|---|------|
| Başkan | : Prof. Dr. Gül DURMAZ Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, | İmza |
| Üye | : Prof. Dr. Muhsin KONUK Üsküdar Üniversitesi Doğa Bilimleri Fakültesi, | İmza |
| Üye | : Prof. Dr. Cevdet UĞUZ Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi, | İmza |
| Üye | : Doç. Dr. Uğur C. ERİŞMİŞ Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen-Edb. Fakültesi, | İmza |
| Üye | : Yrd. Doç. Dr. Sevgi ULUKÜTÜK Afyon Kocatepe Üniversitesi Şuhut MYO, | İmza |
| Üye | : Yrd. Doç. Dr. S. Feyza ERDOĞMUŞ Afyon Kocatepe Üniversitesi Bayat MYO, | İmza |

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun
...../...../..... tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....
Prof. Dr. Mevlüt DOĞAN

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

MRSA KLİNİK İZOLATLARINDA MUTASYON ORANLARININ SAPTANMASI

Emine DURHAN

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

I.Danışman: Doç. Dr. S. Elif KORCAN

II.Danışman: Prof. Dr. Mustafa ALTINDIŞ

Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) tüm dünyada hızla yayılmaya devam eden önemli çoğul direnç gösteren patojenlerden biridir. Dolayısıyla antibiyotik direncinin özellikle çoklu direncin bu hızlı bir şekilde yayılması halk sağlığı açısından kaygı verici olarak görülmektedir. *S. aureus*' un identifikasyonunda konvansiyonel yöntemler uygulanmıştır. Oksasiline ve sefoksitin antibiyotiklerine olan dirençleri için Kirby-Bauer disk testleri kullanılmıştır. *S.aureus* suşlarının %59.34'ü oksasiline dirençli iken, %42.30'u ise sefoksitine dirençli olarak bulunmuştur. 50 izolatın qualitative rt-PZR ile *spa*, *SCCmec*, *mecA* genlerinin varlığı tespit edilmiştir. Fitness duyarlı ve dirençli suşlar arasında rekabet deneyleri yapılarak değerlendirilmiştir. Mevcut olan antibiyotikler ile hızla yayılım gösteren MRSA'lar ile mücadele gittikçe zorlaşmaktadır. Bu çalışmada antibiyotikli ortamda gelişen MRSA izolatlarının tekrar aynı antibiyotikle karşılaştıklarında, daha önce antibiyotikli ortamda gelişmeyen MRSA'lara göre gelişim kinetiklerinin daha iyi olduğu görülmüştür. Dirençli suş 3R'nin, duyarlı suş 27S'e göre rekabet deneylerinde antibiyotiksiz ortamda daha iyi üreme gösterdiği saptanmıştır. Dolayısıyla deneysel çalışmalar neticesinde elde

edilen veriler hastaneler arasında paylaşılmalıdır. Gelecekte sağlık açısından risk olarak görülen bilinçsiz antibiyotik kullanımı ile ilgili olarak önlemler alınmalıdır.

2014, xiv + 90 sayfa

Anahtar Kelimeler: MRSA, Oksasilin, Antibiyotik Duyarlılığı, *mecA* gen, Fitness cost

ABSTRACT

PhD Thesis

DETERMINATION OF MUTATION RATES IN CLINICAL ISOLATES OF MRSA

Afyon Kocatepe University

Emine DURHAN

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of BIOLOGY

I.Supervisor: Doç. Dr. S.Elif KORCAN

II.Supervisor: Prof. Dr. Mustafa ALTINDİŞ

Methicilline resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA), the most notorious multidrug-resistant hospital pathogen, has spread all over the world. Therefore, antimicrobial resistance has become one of the most serious public health concerns worldwide. Standard conventional methods were used for the isolation and identification of *S. aureus*. MRSA was identified by oxacillin (1µg) and cefoxitin (30µg) disk diffusion method. Antibiotic susceptibility test was done using Kirby-Bauer disk diffusion method and the interpretation of the results was done using CLSI guidelines. 59.34% of *S. aureus* strains were resistant to oxacillin, 42.30% to cefoxitin. 50 isolates were confirmed having *spa*, *SCCmec*, *mecA* genes by qualitative rt-PCR. Antibiotic resistance mechanisms are associated with a fitness cost. In the study we observed that isolates of MRSA, previously growing in antibiotic containing media, were better growth kinetic than isolates of MSSA, previously growing in antibiotic containing media, when growth antibiotic containing media. Resistant isolate 3R was better growth than susceptible isolate 27S in without antibiotic media at competition assays. Therefore further efforts are necessary in sharing the surveillance data among hospitals and

collecting more detailed data. The community on the health risks associated with the problem and benefits of prudent use of antimicrobials are some steps that can be taken to tackle the problem in the future.

2014, xiv + 90 pages

Key Words: MRSA, Antibiotic resistance, Oxacillin, *mecA* gene, Fitness cost

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince akademik anlayış ve tecrübe kazanmam için bilimsel temelli çalışma disiplini geliştirmemde, her türlü görüş ve önerileriyle desteğini esirgemeyen, tezimin planlanma aşamasından başlamak üzere oluşturulma safhalarının her kademesinde destek sağlamış olan tez danışmanım Doç. Dr. S. Elif KORCAN'a,

Çalışma konusunun belirlenmesinde katkı sağlayan Prof. Dr. Muhsin KONUK'a, Prof. Dr. Cevdet UĞUZ'a,

AKÜ Araştırma ve Uygulama Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nın olanaklarından faydalanmamı sağlayan Prof. Dr. Mustafa ALTINDIŞ'e,

Berber çalışma şansını yakaladığım, tez hazırlamam sırasında yardımlarını esirgemeyip, deneyim ve dostluklarını paylaşımaya açan AKÜ Araştırma ve Uygulama Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı çalışma arkadaşlarıma,

Çalışmamın istatistiksel analiz bölümünde, verilerin değerlendirilmesi esnasında katkı sağlayan Doç. Dr. U.Cengiz ERİŞMİŞ'e,

Yaşam serüvenimde varlıksal gayeme erişmem için beni hiçbir zaman yalnız bırakmamış olan, en büyük desteği gördüğüm, varlıklarıyla huzur ve mutluluk duyduğum fedakâr aileme,

Ayrıca; tez çalışmamı 12.FEN.BİL.03 no'lu proje ile destekleyen Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Emine DURHAN

AFYONKARAHİSAR, 2014

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

| | |
|--|------|
| ÖZET | i |
| ABSTRACT | iii |
| TEŞEKKÜR | v |
| İÇİNDEKİLER DİZİNİ | vi |
| SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ | ix |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | xi |
| RESİMLER DİZİNİ | xii |
| TABLolar DİZİNİ | xiii |
| GRAFİKLER DİZİNİ | xiv |
| 1.GİRİŞ | 1 |
| 2.LİTERATÜR BİLGİLERİ | 3 |
| 2.1 Stafilokok Türlerinin Genel Özellikleri..... | 3 |
| 2.2. <i>S.aureus</i> Genel Özellikleri | 4 |
| 2.3. <i>Staphylococcus aureus</i> ’ larda Antibiyotik Direncinin Tarihçesi | 7 |
| 2.4 Metisilin Direnci ve Penisilin Bağlayan Protein (PBP) | 9 |
| 2.4.1 Metisilin Direncini Etkileyen Faktörler..... | 17 |
| 2.4.1.1. Beta Laktamaz Plazmidi | 17 |
| 2.4.1.2. <i>Fem</i> Faktörleri | 18 |
| 2.4.1.3. Otolitik Aktivite | 19 |
| 2.4.2. Metisilin Direncini Etkileyen Eksternal Faktörler | 19 |
| 2.5. Toplumdan Kazanılmış MRSA ile Hastaneden Kazanılmış MRSA’lar | 20 |
| 2.6. Metisilin Direncinin Tespit Edilmesi | 23 |
| 2.6.1. Geleneksel Yöntemler (Fenotipik Yöntemler) | 24 |
| 2.6.1.1. Disk Difüzyon Yöntemi | 24 |
| 2.6.1.1.1. Oksasilin Disk Difüzyon Yöntemi..... | 24 |
| 2.6.1.1.2. Sefoksitin Disk Difüzyon Yöntemi | 24 |
| 2.6.1.2. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi | 25 |
| 2.6.1.3. Agar Tarama Yöntemi | 25 |
| 2.6.1.4. Epsilometrik (E-test) Yöntemi | 25 |
| 2.6.1.5. Lateks aglutinasyon Yöntemi | 26 |

| | |
|---|----|
| 2.6.1.6. Kromojenik Besiyerleri | 26 |
| 2.6.2. Moleküler Yöntemler | 26 |
| 2.6.2.1. DNA Hibridizasyonu | 27 |
| 2.6.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) | 27 |
| 2.7. Bakterilerde Antibiyotik Dirençliliğinin Transferi | 28 |
| 2.7. 1. Horizontal Gen Transfer Mekanizmaları | 29 |
| 2.7. 2. Yer Değiştirebilen Genetik Elemanlar..... | 29 |
| 2.8.Fitness Cost (Uyum Gücü) | 32 |
| 3. MATERYAL VE METOT | 34 |
| 3.1. Materyal | 34 |
| 3.1.1. Besiyerleri | 34 |
| 3.2. Metot | 37 |
| 3.2.1.Klinik Örneklerden <i>S.aureus</i> İzolasyonu ve İdentifikasyonu | 37 |
| 3.2.1.1.Katalaz Testi | 38 |
| 3.2.1.2.Koagülaz Testi | 38 |
| 3.2.1.3.Mannitol Tuz Agar (MTA) | 39 |
| 3.2.2. Bauer Kirby Disk Difüzyon Testi İle Antibiyotik Direncinin Belirlenmesi | 40 |
| 3.2.3.Metisiline Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> Suşlarının Geleneksel Yöntemlerle Belirlenmesi | 41 |
| 3.2.3.1. Oksasilin ve Siprofloksasin Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun Belirlenmesi | 41 |
| 3.2.3.2. Metisilin Direncinin CHROMagar Test Yöntemi ile Belirlenmesi..... | 42 |
| 3.2.4. Metisiline Dirençli <i>S.aureus</i> İzolatlarında <i>spa</i> , <i>SCC</i> , <i>mecA</i> genlerinin qualitative rt-PZR ile Belirlenmesi | 42 |
| 3.2.5. Uyum Gücü Deneyleri | 43 |
| 3.2.5.1. Suşların Gelişim Oranlarının Belirlenmesi | 43 |
| 3.2.5.2. MRSA ve MSSA' ların Gelişime Bağlı Rekabet Deneyleri | 45 |
| 3.2.6 Verilerin İstatiksel Değerlendirilmesi | 47 |
| 4. BULGULAR | 48 |
| 4.1. İzole Edilen <i>S. aureus</i> suşlarının Klinik Örneklerle Göre Dağılımı | 48 |
| 4.2. <i>S.aureus</i> İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıkları | 49 |
| 4.3. Geleneksel Yöntemlerle <i>S. aureus</i> Suşlarının Metisilin Direncinin Değerlendirilmesi | 51 |

| | |
|--|----|
| 4.3.1. <i>S.aureus</i> İzolatlarının Oksasiline ve Sefoksitine Olan Duyarlılıklarının Disk Difüzyon Yöntemi ile Belirlenmesi | 51 |
| 4.3.2. MRSA İzolatlarının CHROMagar Testi ile Değerlendirilmesi | 53 |
| 4.3.3. MRSA'ların Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun (MİK) Değerlendirilmesi | 53 |
| 4.4. Stafilokok protein A (<i>spa</i>), SCC, <i>mecA</i> genlerinin qualitative rt-PZR Sonuçlarının Değerlendirilmesi | 53 |
| 4.5. Uyum Gücü Deneylerinin Değerlendirilmesi | 56 |
| 4.5.1. MRSA Suşlarının Gelişim Oranlarının (Kinetiğinin) Değerlendirilmesi . | 56 |
| 4.5.2. MRSA ve MSSA'ların Gelişime Bağlı Rekabet Deneylerinin Değerlendirilmesi | 59 |
| 5. TARTIŞMA ve SONUÇ | 65 |
| 6. KAYNAKLAR | 73 |
| ÖZGEÇMİŞ | 90 |

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|---------|--|
| ABD | Amerika Birleşik Devletleri |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| BHIB | Brain Heart Infusion Broth |
| BORSA | Sınırdaki Oksasilin Direnci |
| CA-MRSA | Community –Associated Metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> |
| CLSI | Clinical and Laboratory Standards Institute |
| CCR | Kaset Kromozom Recombinaz |
| CFU | Colony Forming Units |
| DNaz | Deoksiribonükleaz |
| E | Epsilometrik testi |
| EDTA | Etilendiamin Tetraasetik Asit |
| FTS | Fizyolojik Tuzlu Su |
| J | Junkyard bölge |
| HK-MRSA | Hastane kaynaklı MRSA |
| HVR | Hyper variable region |
| KNS | Koagülaz Negatif Stafilokok |
| MİK | Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu |
| MLST | Multilocus Sequence Typing |
| MRSA | Metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> |
| MSSA | Metisilin duyarlı <i>Staphylococcus aureus</i> |
| MHA | Mueller-Hinton Agar |
| MHB | Mueller-Hinton Broth |
| MTA | Mannitol Tuz Agar |
| MRKNS | Metisilin dirençli koagülaz negatif Stafilokoklar |
| NCTC | National Collection of Type Cultures |
| NPB | Penisilinin Bağlanmadığı Bölge |
| NPD | Negatif Prediktif Değer |
| ORF | Open Reading Frame (Açık Okuma Çerçevesi) |
| PBP | Penisilin Bağlayan Protein |
| PFGE | Pulsed Field Gel Elektroforez |

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|--------------------|--|
| PPD | Pozitif Prediktif Değer |
| PVL | Panton-Valentine Leukocidin |
| PZR | Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| PCT | Polymerase Chain Reactions |
| SCC _{mec} | Stafilokokal Kaset Kromozom <i>mec</i> |
| VISA | Vancomycin-Intermediate <i>S. aureus</i> |
| VRSA | Vancomycin-Resistant <i>S. aureus</i> |
| TP | Transpeptidaz |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | Sayfa |
|--|-------|
| Şekil 2.1 <i>S. aureus</i> 8325 suşunun genetik haritası | 19 |
| Şekil 2.2 Penisilinin ve Metisilinin kimyasal yapısı..... | 22 |
| Şekil 2.3 S Mobil genetik elemanı Staphylococcal Cassette Chromosome <i>mec</i> bölgesi | 26 |
| Şekil 2.4 <i>ccr</i> ve <i>mecA</i> gen komplekslerinde görülen yapısal değişikliklere göre SCC <i>mec</i> Tipleri..... | 29 |
| Şekil 2.5 Hastane ve toplumsal kaynaklı MRSA'lar arasındaki fark | 34 |
| Şekil 2.6 MRSA da bulunan fakat MSSA da bulunmayan <i>mecA</i> geninin aktarımı..... | 43 |
| Şekil 2.7 F ⁺ hücreden F ⁻ hücreye Konjugasyon ile gen aktarımı ve Hfr hücre..... | 44 |
| Şekil 3.1 Replika Plate Yöntemi kullanılarak antibiyotik direnci kazanmış duyarlı bakterilerin seçimi | 60 |
| Şekil 4.1 1/1 oranında 27S ile 36R suşlarının karışık kültürlerinde dirençli bakteri sayısı ile toplam bakteri sayısının oranı..... | 74 |
| Şekil 4.2 1/100 oranında 36R ile 27S suşlarının karışık kültürlerinde dirençli bakteri sayısı ile toplam bakteri sayısının oranı | 74 |
| Şekil 4.3 100/1 oranında 36R ile 27S suşlarının karışık kültürlerinde dirençli bakteri sayısı ile toplam bakteri sayısının oranı | 75 |
| Şekil 4.4 I. Gün bakteri karışık kültürlerdeki Rt dönüşüm sayısı | 75 |
| Şekil 4.5 II. Gün bakteri karışık kültürlerdeki Rt dönüşüm sayısı | 76 |
| Şekil 4.6 III. Gün bakteri karışık kültürlerdeki Rt dönüşüm sayısı..... | 76 |

RESİMLER DİZİNİ

Sayfa

| | |
|--|-----------|
| Resim 3.1 Qualitative real-time PZR cihazı ve çalışma kitinin görüntüsü..... | 56 |
| Resim 3.2 Microplatelerin absorbans değerlerinin ölçüldüğü spektrofotometre cihazı. | 57 |
| Resim 4.1 Klinik örnekler izolatlarının geleneksel yöntemlerle identifikasyonu..... | 61 |
| Resim 4.2 Oksasiline dirençli 3R ve duyarlı 27S <i>S. aureus</i> izolatlarının plak üzerindeki görünümü | 64 |
| Resim 4.3 3R ile 36R MRSA izolatlarının CHROMagar görüntüsü | 66 |

TABLolar DİZİNİ

Sayfa

| | |
|--|-----------|
| Tablo 2.1 Bakterilerde Horizontal Gen Transfer Mekanizmaları | 30 |
| Tablo 2.2 Bakterilerde Horizontal Gen Transfer Mekanizmaları | 42 |
| Tablo 4.1 İzole edilen <i>S. aureus</i> suşlarının klinik örneklere göre dağılımı..... | 62 |
| Tablo 4.2 <i>S.aureus</i> suşlarının disk difüzyon yöntemi ile çoklu antibiyotik duyarlılık sonuçları..... | 63 |
| Tablo 4.3 <i>S.aureus</i> suşlarının oksasiline olan duyarlılıkları..... | 65 |
| Tablo 4.4 <i>S.aureus</i> suşlarının sefoksitine olan duyarlılıklarının örneklere göre dağılımı | 65 |
| Tablo 4.5 <i>S.aureus</i> izolatlarının MİK değerleri ile ortalama relative gelişim oranlarının karşılaştırılması | 72 |

GRAFİKLER DİZİNİ

Sayfa

| | |
|--|-----------|
| Grafik 4.1 4R izolatının Qualitative real-time PZR ile <i>spa</i> , <i>SCC</i> , <i>mecA</i> genlerinin varlığının grafiksel olarak gösterimi | 67 |
| Grafik 4.2 3R suşunun qualitative real-time PZR <i>spa</i> , <i>SCC</i> , <i>mecA</i> genlerinin varlığının grafiksel olarak gösterimi..... | 68 |
| Grafik 4.3 36R suşunun qualitative real-time PZR ile <i>spa</i> , <i>SCC</i> , <i>mecA</i> genlerinin varlığının grafiksel olarak gösterimi | 68 |
| Grafik 4.4 27S suşunun qualitative real-time PZR ile <i>spa</i> varlığının grafiksel olarak gösterimi | 69 |
| Grafik 4.5 3R izolatına ait gelişim kinetiklerinin karşılaştırılması | 69 |
| Grafik 4.6 3R izolatının 27S izolatına göre relative gelişim oranları..... | 70 |
| Grafik 4.7 36R izolatına ait gelişim kinetiklerinin karşılaştırılması | 71 |
| Grafik 4.8 36R izolatının 27S izolatına göre relative gelişim oranları | 71 |
| Grafik 4.9 1/1 oranından elde edilen Rt' nin <i>mec</i> geninin geçişini göstermektedir | 73 |
| Grafik 4.10 100/1 oranından elde edilen Rt' nin <i>mec</i> geninin geçişini göstermektedir | 73 |
| Grafik 4.11 1/1 oranında karışık kültürdeki rekabet indeksi (CI) | 77 |
| Grafik 4.12 1/100 oranında karışık kültürdeki rekabet indeksi (CI) | 77 |
| Grafik 4.13 100/1 oranında karışık kültürdeki rekabet indeksi (CI) | 77 |

1.GİRİŞ

Normal insan florasında bulunan *Staphylococcus aureus*, gram pozitif bir bakteridir. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ise *Staphylococcus aureus*'un (*S. aureus*) bir suşudur. MRSA'ların penisilinaz enzimine dirençli tüm penisilinlere (metisilin, oksasilin, nafsilin, kloksasilin ve dikloksasilin), sefalosporinlere, ayrıca klindamisin, eritromisin, tetrasiklin ve aminoglikozidler gibi daha birçok antibiyotiğe dirençli olması bu önemini arttırır. Metisilinin ısıya oldukça duyarlı bir antibiyotik olması, bu nedenle antibiyotik duyarlılık testi esnasında 2°C'lik bir ısı değişimi, test sonuçlarının yanlış değerlendirilmesine yol açabilmektedir. Metisilin direncinin doğru olarak belirlenmesi için metisilin yerine, aynı amacı karşılayan ve daha stabil bir antibiyotik olan oksasilin kullanılmaktadır. Uygun laboratuvar koşullarında test edildiğinde *S. aureus*'daki oksasilin direnci bu izolatın MRSA olduğunu gösterir.

Stafilokoklar 100 yıldan uzun bir süredir en önemli enfeksiyon etkenlerinden biri olarak tıp dünyasını meşgul etmektedir. İlk kez 1878 yılında Robert Koch tarafından tanımlanan ve 1881 yılında Alexander Omgston tarafından fare ve kobaylarda hastalık yaptığı gösterilen stafilokoklar; 19. yüzyılda insanlarda çok ağır seyreden, tedavisi güç, ölümcül enfeksiyonlara neden olmaktadır. 1928 yılında Alexander Fleming'in penisilini bulmasını takiben 1940'lı yıllarda bu antibiyotiğin klinik kullanıma girmesi ile stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde çok önemli bir adım atılmıştır. Ancak penisilinin yaygın kullanılması, penisilini parçalayan stafilokok suşlarının ortaya çıkmasına yol açmıştır. Stafilokoklarda penisilin direnci 1940'lı yılların ortalarından itibaren artmış, 1950'li yıllara gelindiğinde ise penisilinin yanısıra tetrasiklin, eritromisin ve streptomisin gibi diğer antibiyotiklere de direnç gelişimini gözlenmeye başlanmıştır. Bu durumu takiben 1960 yıllarında, penisilinaza dayanıklı penisilin türleri geliştirmiştir. Bu sayede, stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde büyük bir başarı kazanıldığı düşünülürken, 1961 yılında stafilokoklarda metisilin direnci tanımlanmış ve 1970 ile 1980'lerde yılların başlarından itibaren de MRSA suşlarında çoğul antibiyotik direnci ortaya çıkmaya başlamıştır.

Günümüzde direnç sorununun giderek yaygınlaşması ile birlikte MRSA tüm dünyada hastane enfeksiyonu salgınlarına yol açan çok ciddi bir sorun haline gelmiştir. Bindoküzyüz doksanlı yılların başlarından itibaren MRSA enfeksiyonlarının hastane ortamında yayılmasının önlenmesindeki zorluklar fark edilmeye başlanmıştır. Bunun üzerine; söz konusu enfeksiyonların kontrol altında tutulması ve hastane ortamında yayılmasının en aza indirilmesine yönelik yoğun çalışmalar başlatılmıştır (İnt. Kyn.1).

Bu çalışmada, i) Ocak 2012-Mayıs 2013 tarihleri arasında, Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında, çeşitli klinik örneklerden izole edilen *S. aureus*'ların antibiyotik dirençlerinin saptanması, ii) metisilin direncinin geleneksel ve moleküler yöntemler ile tespit edilmesi, iii) seçilen duyarlı ve dirençli izolatların gelişime bağlı rekabet deneyleri ile izolatlar arasında direnç geni aktarımının hangi sıklıkla gerçekleştiğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2.LİTERATÜR BİLGİLERİ

2.1 Stafilokok Türlerinin Genel Özellikleri

Staphylococcus, *Eubacteriales* takımının *Micrococcaceae* familyası içinde yer almaktadır (Howard and Kloos 1987). Doğada; tozda, toprakta, eşyaların üzerinde, insan ve hayvanların derisinde, burun mukozasında, ağız ve nazofarinks florasında yaygın olarak bulunurlar (Kloos and Bannerman 1995, Öner 1996). *S. aureus subs. anaerobius* ve *S.saccarolyticus* dışındaki türler fakültatif anaerobdur. Bu iki tür anaerob ortamlarda üreyebilir ve fakültatif anaerob olan diğer türlerin aksine çoğunlukla katalaz negatiftir (Waldvogel 2000, Bannerman 2003, Peacock 2005). Stafilokoklar, glikoz gibi birçok karbonhidratı parçalar ve son ürün olarak laktik asit oluştururlar fakat gaz oluşturmazlar. Mannitol üzerine olan etkileri, koagülaz testi ile *S. aureus'* u ayırt etmede kullanılan en önemli testlerdendir (Baird *et al.* 1996, Bilgehan 2004). Bazı Stafilokoklarda polisakkarit yapılı bir kapsül ya da mukus tabakası bulunabilir. Kokların şeklinin yuvarlak ve bakterilerin birbirine benzer görünümde olması stafilokoklar için karakteristiktir (Bilgehan 1994). Hücre çeperleri Gram pozitif (+) yapıda olup, peptidoglikan, teikoik asit ve türe özgü presipitinojen protein birimlerini içerir (Baron *et al.* 1994).

Sporsuz olmalarına rağmen kuruluğa karşı dayanıklıdırlar. Fakat kristal viyole ve malaşit yeşili gibi boyaların düşük konsantrasyonların da bozulmaktadır. Stafilokoklar antijen özellikte 30'dan fazla maddeye sahiptirler. En önemli antijenik maddelerinden birisi hücre duvarlarında yerleşim gösteren ve aşırı duyarlılık reaksiyonlarında rol oynayan teikoik asittir. Stafilokokların kültür süzüntülerinden, eritrosit ve çeşitli hücreleri parçalayan ve deney hayvanları üzerinde öldürücü etkisi olan ekzotoksin niteliğinde maddeler de izole edilmiştir (Bilgehan 1994).

Hücre zarlarında bulunan ve keratenoid yapısında olan pigmentleri sayesinde, altın sarısı renkten, porselen beyazı rengine kadar değişebilen koloniler oluşturabilirler. Pigment oluşumu için oksijen gereklidir. Besiyerinde görünümleri ise yuvarlak, opak keskin kenarlı, yaklaşık 4mm çapında, düz (S) koloni şeklindedirler (Baron *et al.* 1994,

Waldvogel 2000). Stafilokoklar, optimum 37°C ve pH 7,4'te üreme gösterirler ki, ayrıca fakültatif anaerob olmalarına karşın (yalnız *S.saccharolyticus* anaeroptur) oksijenli ortamda üremeyi tercih ederler. Fakat az miktarda hatta tamamen oksijensiz ortamda bile üreyebilmektedirler (Baird *et al*, 1996). Basit besiyerlerinde de üremelerine karşın kanlı besiyerinde üremeleri daha iyidir (Kloos *et al*, 1995). Lipit ve %10 NaCl içeren ortamda ve 18 – 40 °C' ler arasında üreme özelliği gösterirler (Howard and Kloos 1987, Wenzel *et al*. 1998, Bilgehan 2004).

Stafilokokların genomu yaklaşık 2000-3000 kbp bir kromozom ile profajlar, plazmidler ve transpozonlardan oluşur. Stafilokokların DNA'larında ki G+C oranı %30-39 moldür (Peacock 2005).

2.2. *S. aureus* Genel Özellikleri

Stafilokoklar içerisinde en patojen tür *S. aureus* olarak kabul edilmektedir ve enfeksiyonlar sıralamasında da ilk sırada yer almaktadır. Staphylococcus cinsi içinde 35 tür tanımlanmıştır ve bu türlerden 17 tanesi klinik örneklerden izole edildiği bildirilmiştir (Alen *et al*, 2006). *S. aureus* fakültatif anaerop türler, fakat çoğunlukla aerop üreyen, koagülaz ve Beta-hemoliz pozitif, mannitol, sükröz, maltoz ve trehaloz'dan asit yapabilme yeteneğine sahiptirler (Moreillon, 2005). %10 NaCl'de üreyebilirler ve alfa toksin oluştururlar. Novobiocin'e duyarlı, sporsuz ve hareketsizlerdir, lizozime karşı dirençlidirler. *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. hyicus* ve *S. schleiferi* subsp. koagülaz pozitif türler olarak tanımlanmıştır (Bannerman 2003). Diğer tüm Stafilokoklar koagülaz negatif (KNS) stafilokoklar olarak adlandırılmaktadır (Bilgehan 1990). *S. aureus*'u diğer stafilokok türlerinden ayırmak için koagülaz, mannitol fermentasyonu ve deoksiribonükleaz (DNaz) testleri uygulanmaktadır ki bu testlerin pozitif sonuç vermesi, bakterinin *S. aureus* olduğuna işaret eder.

Kok şeklindeki *S. aureus* yaklaşık 1µm çapında olup morfolojileri üzüm salkımı kümeler şeklindedir. Klinik örneklerden alınan materyallerde 35°C'de 16-18 saat içinde gözle görülebilir koloniler oluştururlar (Bannerman 2003). *S. aureus*'un mukoid türlerinde polisakkarid yapıda bir mikro kapsül bulunmaktadır (Peacock 2005).

S. aureus'un genomunun uzunluğu yaklaşık olarak 2.8 mega baz çifti olarak bulunmuştur (Salmenlinna 2002, Peacock 2005). Bu gen uzunluğu da yaklaşık olarak 2500 geni kodladığı düşünölmektedir. Genomun %84,5'ini oluşturan 2600 Açık Okuma Çerçevesi (ORF) bulunmaktadır. Tek bir kromozomdan, profajlar, plazmidler ve transpozonlardan oluşan *S. aureus* genomu, G+C içeriği ise yaklaşık %32 moldür (Peacock 2005).

Protein A, peptidoglikan yapının en dışında bulunur ve sadece *S. aureus*'ta bulunmaktadır. Hücre duvarının yaklaşık %7'sini oluşturmaktadır. Bu molekülün bir kısmı peptidoglikan yapıya kovalan bağlı olarak bulunurken, diğer kısmıda hücre dışı ortama salınmaktadır. En önemli özelliği, IgG3 dışındaki tüm IgG ve IgA2 ile bazı IgM'lerin Fc reseptörleri ile birleştiktirler ve böylece *S. aureus*'u fagositoza karşı korurlar. Hücre dışına salgılanan protein A aynı reseptörlere bağlanarak komplemanın aktive olmasına neden olur (Waldvogel 2000, Ünal 2004).

Eskülini hidrolize etmeyen *S. aureus* D-mannitol, D-mannoz, sükröz, maltoz ve trehalozu fermente ederler. Stafilokoklar çeşitli hastalandırıcı etkinlikleri olan birçok toksin ve enzim üretirler. Bunlar, koagülaz (Fibrinojeni pıhtılaştırın enzim olup tüm *S. aureus* suşları bu enzimi üretir), hemolizin (Eritrositleri eriten enzimdir ve tüm *S. aureus* suşları bu enzimi üretir), hyaluronidaz (Bağ dokusunun önemli bir yapı taşı olan hiyalüronik asidi parçalayan enzimdir) (Tünger 2004), lökosidin (Lökositleri tahrip eden enzimdir), Lipaz (Yağ asitlerini tahrip eden enzimdir), enterotoksin (*S. aureus*'un besin zehirlenmesine neden olan toksinidir) (Waldvogel 2000), nükleaz (Nükleik asitleri tahrip eden enzimdir), ekfoliyatin (Derinin yüzey tabakalarının dökölmesine neden olan maddedir) olarak sıralanırlar (Bilgehan 2000).

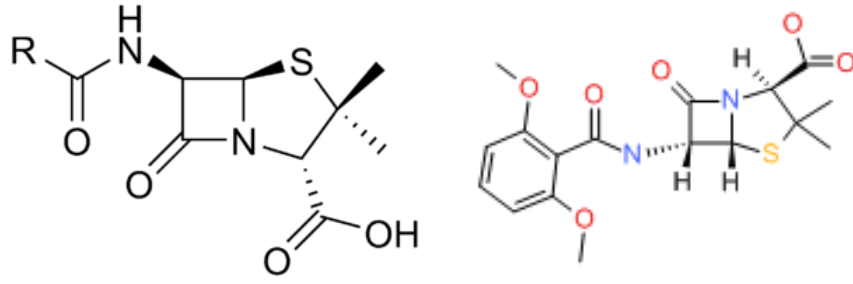
Stafilokok enfeksiyonlarının ana bulgusu süpürasyondur (irinlenmedir). İrin dolu apse oluştururlar. Bazı stafilokok hastalıkları sadece toksin etkisinin bir sonucu olarak ki bunlar Stafilokoklara bağlı haşlanmış deri sendromu, stafilokoklara bağlı besin zehirlenmeleri ve toksik şok sendromu gibi, diğer bazıları ise bakterilerin çoğalıp yayılması ile apse gelişimi ve doku yıkımına bağlı olarak deri enfeksiyonları, endokardit, pnömoni, ampiyem, osteomyelit, septik artrit gibi gelişim gösterirler

(Cengiz 2003).

2.3. *Staphylococcus aureus*' larda Antibiyotik Direncinin Tarihçesi

Alexander Fleming'in 1928 yılında penisilini (Şekil 2.2) bulması ve 1940 yılında Forey ve Chain tarafından penisilin üretimi ile birlikte stafilokokal enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaya başlanması halk sağlığı açısından önemli bir aşama olarak kaydedilmiştir (Ünal *et al.* 1992, Shopsis vand Kreiswirth 2001). Dolayısıyla literatürlerde morbidite ve mortalitenin çok kısa bir sürede azalttığı bildirilmiştir. *S. aureus* 'larda antibiyotik direnci ilk kez 1930'lu yıllarda klinik kullanıma giren sülfonamid grubu antibiyotiklerle başlamış ve günümüzde linezolid, daptomisin gibi yeni antibiyotiklere kadar uzanmıştır. 1941 yılında kullanılmaya başlayan penisilin G ile *S. aureus* enfeksiyonlarında azalma görülmüş olmasına rağmen bu durum uzun sürmemiş kısa bir süre sonra penisilinaz (beta-laktamaz) enzimi sentezleyen izolatların ortaya çıkması sonucunda penisilin direnci görülmeye başlanmıştır. İlk kez 1944 yılında İngiltere'de, beta-laktamaz üretimine bağlı penisilin direnci bildirilmiştir. Alternatif olarak kullanılan tetrasiklin, makrolid, sülfonamid gibi antibiyotiklere de kısa sürede direnç gelişiminin gözlenmesi, tedavi açısından sorunlara yol açmıştır (Hiramatsu and Kuroda 2001, Hiramatsu *et al.* 2002, İto *et al.* 2003, Ünal 2004).

1950' li yıllarda, günümüzde ST30-CA-MRSA-IV olarak adlandırılan penisiline dirençli faj tip 80-81 *S. aureus* klonu, tüm dünyada gerek hastane kaynaklı gerekse toplum kaynaklı enfeksiyonlara yol açmıştır. Bu durum *S. aureus*'da direnç gelişiminde ilk dalga olarak bilinir (Deurenberg *et al.* 2007, Stefani *et al.* 2010). Penisilinaz enziminin amid bağına ulaşımını engellemek amacıyla, benzilpenisilindeki fenoksi grubunun yerine metoksi grubunun eklenmesiyle 1959 yılında metisilin (Şekil 2.2) elde edilmiştir (Kuroda *et al.* 2001, Hiramatsu *et al.* 2002, İto *et al.* 2003, Ünal 2004, Swenson and Tenover 2005).



Şekil 2.2. Penisilinin (İnt.Kyn.3) ve Metisilinin (İnt.Kyn.4) kimyasal yapısı

1960 yılında metisilinin ve daha sonra da diğer penisilinaza dirençli penisilinlerin kullanıma girmesiyle birlikte, hastanede yatan düşük dirençli bireylerde ve toplumdaki sağlıklı bireylerde enfeksiyon oluşturma yeteneğinde olan bu patojenin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde ikinci önemli aşama kaydedilmiştir (Ünal *et al.* 1992, Shopsis and Kreiswirth 2001). Fakat klinik kullanımdan kısa bir süre sonra, 1961 yılında İngiltere'de COL izolatı olarak adlandırılan ilk MRSA izolatı tanımlanmıştır (Li *et al.* 2012). Önceleri "Archaic" klonları olarak adlandırılan ve COL izolatından köken alan MRSA klonları CC8 olarak bilinen genetik soyda yer alır. Archaic klonu 1970 ve 1980' li yıllarda İngiltere ve Avrupa'da önemli salgınlara yol açmıştır.

Bunu takip eden yıllarda yeni Stafilokokal Kaset Kromozom *mec* (SCC*mec*) klonlarının kazanılmasıyla ortaya çıkan ve çoğul ilaç direnci gösteren değişik MRSA klonları hem hastane kaynaklı hem de toplum kaynaklı enfeksiyonlara neden olmuştur (Hiramatsu *et al.* 2002, İto *et al.* 2003, Swenson and Tenover 2005, IWG-SCC 2009, Stefani and Goglio 2010). 2000'li yıllara gelindiğinde ise penisilinaz enzimi pozitif saptanan izolatların oranı %90-95'lere ulaşmıştır (Deurenberg *et al.* 2007, Stefani *et al.* 2010). Günümüzde MRSA enfeksiyonlarının tedavisinde en sık kullanılan ilaçlar glikopeptid grubu antibiyotiklerdir (vankomisin ve teikoplanin). Glikopeptidlerin yanı sıra linezolid, daptomisin ve tigesiklin gibi yeni antibiyotikler de kullanılmaktadır. Ancak ne yazık ki stafilokoklarda antibiyotiklere karşı görülen hızlı direnç gelişimi hem glikopeptid grubu ilaçlara hem de yeni geliştirilen ilaçlara karşı da ortaya çıkmıştır. 1996 yılında Vancomycin-Intermediate *S. aureus* (VISA) izolatları ve 2002 yılında da Vancomycin-Resistant *S. aureus* (VRSA) izolatları görülmeye başlanmıştır. Yeni antibiyotiklerden

linezolid ilk kez 2000 yılında klinik kullanıma girmiş ve bundan bir yıl gibi çok kısa bir süre sonra ilk linezolidde dirençli MRSA izolatı tanımlanmıştır (Tsiodras *et al.* 2001). Buna benzer bir şekilde daptomisin ilk kez 2003 yılında klinik kullanıma girmiş ve bundan iki yıl sonra bu ilaca karşı da direnç ortaya çıkmıştır (Stefani and Goglio 2010).

S. aureus suşlarının antimikrobiyal duyarlılıklarında birçok değişiklik son kırk yılda ortaya çıkmıştır. Bu dirençlilik durumlarından *S. aureus* suşlarındaki metisilin direnci en önemlilerinden biri olarak görülmektedir (Sakoulas 2001). Stafilokoklarda metisilin direnci 1961 yılında tanımlandıktan sonra 1970'li yıllardan itibaren MRSA suşları yaygın olarak kullanılan birçok antibiyotiğe karşı dirençli hale gelmeye başladığı gözlenmiştir. Çoğul antibiyotik direncinde metisilin yanı sıra kinolonlar, klindamisin, makrolid grubu antibiyotikler, kloramfenikol, tetrasiklinler, aminoglikozidler, trimetoprim-sulfametoksazol, rifampisin gibi antibiyotiklerin kullanıma başlanmasıyla birlikte direnç gelişimleri gözlenmeye başlanmıştır. Bundan dolayı tedavi güçlüğü ve (tik işareti var) nozokomiyal epidemilere yol açabilen bir patojen haline gelmiştir (Cookson 1995) bu tür direnç gelişimleri MRSA' nın artık tüm dünyada ciddi bir sağlık sorunu haline gelmesine neden olmuştur (Poulsen *et al.* 2012).

Günümüzde MRSA prevelansı ülkeler arasında farklılıklar gösterebilir tüm dünyada yaygın olarak görülmektedir. Kuzey Avrupa ülkelerinde MRSA prevelansı %1'den düşük iken Güney Avrupa ülkelerinde, Amerika'da ve bazı Asya ülkelerinde bu oran % 50' leri aşmış durumdadır (Appelbaum 2007, Shorr 2007). Yine Türkiye'de ve dünyada hastane enfeksiyonu oluşturan mikroorganizmalar arasında MRSA suşlarının en önemli kaynağı hastane personeli, aile bireyleri ya da bu suşlarla enfekte veya kolonize olan hastalardır (Sobayo 1991, Çetin 1993).

2.4. Metisilin Direnci ve Penisilin Bağlayan Protein (PBP)

Metisilin duyarlı *S. aureus*'larda (MSSA), 5 tane penisilin bağlayan protein (PBP) bulunmaktadır. MRSA izolatlarında ise bunlara ek olarak PBP2a veya PBP2' olarak adlandırılan farklı bir PBP sentezlenmektedir (Thong *et al.* 2011). PBP2a, beta-laktam

yapısındaki antibiyotiklere karşı düşük afiniteye sahiptir (Xiong *et al.* 2012). Bu nedenle beta-laktam grubu antibiyotiklerin varlığında, yüksek afiniteli PBP'lerin fonksiyonunu görerek peptidoglikan sentezini devam ettirmektedir (Sancak 2011). PBP'ler peptidoglikan öncüllerini sentezlenmekte olan hücre duvarına taşıyarak bağlamakla görevlidirler. Bu proteinlerin bir kısmı iki fonksiyonlu olup hem transglikozidaz hem de transpeptidaz aktivitesine sahiptir (Ghuysen 1994). *S. aureus* sadece bir adet iki-fonksiyonlu PBP (PBP2) ve üç adet tek-fonksiyonlu PBP'e sahiptir (PBP 1,3 ve 4) (Guignard *et al.* 2005). Transpeptidasyon (peptidoglikanın çapraz bağlanması), prekürsörün D-ala-D-ala terminalinde gerçekleşen reaksiyondur. Metisiline duyarlı olan stafilokok izolatlarında betalaktamlar, bu transpeptidasyon basamağını inhibe etmektedirler. Duvar prekürsörleri ile rekabet halinde olan PBP enziminin aktif bölgesine bağlanırlar. Ancak doğal prekürsörden farklı olarak bu bağlanma geriye dönüşümlü değildir. Böylece PBP aktivitesi kalıcı olarak bloke edilir ve bakteriyel ölüm gerçekleşir (Lencastre *et al.*, 1994). Bu PBP normal stafilokok suşlarında bulunan PBP-1,2 ve 3 den farklı olmasından dolayı, penisilin bağlayan protein2a (PBP-2a ya da PBP2') olarak adlandırılır (Chambers 1997, Sancak 2012).

PBP-2a'nın 78 kDa molekül ağırlığında ve 2,1 kb lık DNA segmentine lokalize olan *mecA* geni tarafından şifrelenen proteindir (Wong *et al.* 2010, Thong *et al.* 2011). PBP2a, iki domainden oluşmaktadır ki bunlar; non-penicillin binding domain (NPB-penisilin bağlanmadığı bölge) ve transpeptidase (TP) binding domain (transpeptidazın bağlandığı bölge). PBP-2a'nın NBP bölgesi hücre zarına demirlenmiş olup TP bölgesi, hücre duvarının iç yüzeyine bakan aktif bölgenin periplazmasında yerleşim gösterir. Aktif bölge ser403 kısımda serin residüelerini içerir ki, ser403 pentaglisin çapraz bağlantılarıyla peptidoglikan zincirlerinin çapraz bağlanmasını katalizler (Sancak 2012).

mecA geninin ekspresyonu *mecR1* ve *mecI* genleri tarafından kontrol edilir. *mecR1* geni, sinyal dönüştürücü (signal transducer) bir protein olan MecR1'i, *mecI* geni de represör bir protein olan MecI'yi şifrelemektedir. Beta-laktam grubu antibiyotikler ortamda bulunmadığında MecI, hem *mecA* hem de *mecR1* genlerinin transkripsiyonunu inhibe eder (Deurenberg and Stobberingh 2008, IWG-SCC 2009, Corrigan *et al.* 2012, Sancak 2012).

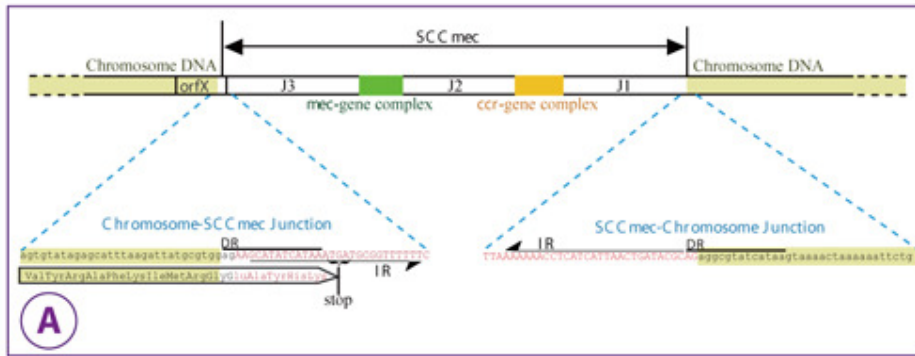
MecR1, transmembran yerleşim gösteren bir proteindir. Ortamda bulunan beta-laktam yapısındaki antibiyotikleri, hücre dışı yerleşim gösteren penisilin bağlayan protein domaini ile algılandıktan sonra parçalanır. Bunun sonucunda sitoplazmik yerleşim gösteren metalloproteaz domaini aktif hale dönüşür. Metalloproteaz, *mecA* geninin operatör bölgesine bağlı bulunan MecI'yı parçaladıktan sonra *mecA* geninin operatör bölgesine bağlanır. Bağlanmadan sonra *mecA*'nın transkripsiyonuna neden olur. Hem *mecR1* ve *mecI* geni, IS1272 veya IS431 insersiyon dizilerinden dolayı delesyona uğrayabilirler. Bu tür bir mutasyon *mecA* geni üzerindeki baskının ortadan kalkması ile sonuçlanabilir (Eady 2003, Deurenberg Stobberingh 2008, IWG-SCC 2009, Sancak 2012).

mecA geni, bakteri kromozomunda stafilokokal kaset kromozomu *mec* (*Staphylococcal Cassette Chromosome mec*; *SCCmec*) üzerinde yer alır (Wong *et al.* 2010, Corrigana *et al.* 2012, Hiramatsu *et al.* 2013). *S. aureus* izolatlarında *SCCmec* kaseti, her zaman *attB_{scc}* (*bacterial chromosomal attachment site*) olarak adlandırılan kromozomal bölgeye entegre olarak yerleşim gösterir. *attB_{scc}*, fonksiyonu bugün için tanımlanmamış olan *orfX* (*open reading frame X*)'in 3' ucunda yerleşim gösterir (Turlej *et al.* 2011, Sancak 2012).

SCCmec kasetinin büyüklükleri 20 kb'dan, 67 kb'a kadar değişkenlik gösterir. *mecA* ise yaklaşık olarak 2kb büyüklüğünde olup *SCCmec* elementinin az bir bölümünü oluşturmaktadır. Mobil genetik elemanı *Staphylococcal Cassette Chromosome mec*; *mec* gen kompleksi, *ccr* gen kompleksi (rekombinaz geni), junkyard (J) bölge (*junk* veya *joining*) ve önemsiz genleri içerdiği ve fonksiyonları tam olarak bilinmediği düşünülen bir bölge bulunmaktadır. *ccr* gen kompleksi, *SCCmec* gen bölgesinin mobilizasyonunu sağlayan bölgeye özgü olan rekombinazların şifrelenmesinde görevlidir (Katayama *et al.* 2000). PBP-2a enzim ve regülatör proteinleri, MRSA suşlarında bulunan *mecA* geni tarafından kodlanır ve *SCCmec* olarak adlandırılan kaset bölgesinde yerleşim gösterir (Şekil 2.3).

SCCmec kasetinin büyüklüğü 20 kb > 60 kb arasındadır. *mec* geni yapısal bir protein olan *mecA* ve genin ekspresyonunu kontrol eden *mecR1* ve *mecI* regülatör proteinden

oluştugu yukarıda anlatılmıştır. Bu iki genin görevi *mecA* transkripsiyonun regülasyonunu sağlamaktır. Beta-laktamaz genleri olan *blaI*, *blaRI*, *blaZ*, *mecR1-mecI* genleri ile sekans benzerliği göstermektedirler ki, bu genler *mecA* gen transkripsiyonunun down-regülasyonunu kontrol etmektedirler (Zhang *et al.* 2001). *SSCmec* elementi, MSSA genomuna integre olarak bakteriyi MRSA'ya dönüştürebilmektedir (Hiramatsu *et al.* 2002). *mecA* geni tarafından bakterinin metisiline direnç kazanması ile tüm beta-laktam antibiyotiklere karşı, çapraz dirence de neden olabilmektedir. Beta-laktam direncinin yanında, transpozon ve plazmidlerin de *SSCmec* elementine integre olmasıyla diğer direnç genleri de kazanılmış olmaktadır. Bunlar arasında eritromisin, spektinomisin, tetrasiklin, kanamisin gibi direnç genleri sayılabilmektedir.



Şekil 2.3. S Mobil genetik elemanı Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* bölgesi (Hiramatsu *et al.* 2013)

Kaset kromozom rekombinaz (cassette chromosome recombinases; *ccr*) ve *mecA* gen komplekslerinde görülen yapısal değişikliklere göre bugün için tanımlanmış 11 farklı (Tip I-XI) SCCmec tipi bulunmaktadır (Şekil 2.4) (Sancak 2012). Bunlar arasında sadece SCCmec tip II ve III, çoğul antibiyotik direncine yol açan plazmit (pUB110, pI258, pT181) ve transpozonları (Tn554, Ψ Tn554) içermektedir. pUB110 plazmidi, ant(4') genini taşır ve kanamisin, tobramisin ve bleomisin antibiyotiklerine karşı direnci sağlarken; pI258, penisiline ve civa gibi ağır metallere karşı dirençten sorumludur. pT181 ise tetrasiklin direncine yol açar. Tn554 transpozonu *ermA* genini taşır ve konstitütif ve indüklenbilir makrolid, linkozamid ve streptogramin direncinden sorumludur. Ψ Tn554 transpozonu, kadmiyum direncinden sorumludur (Deurenberg et

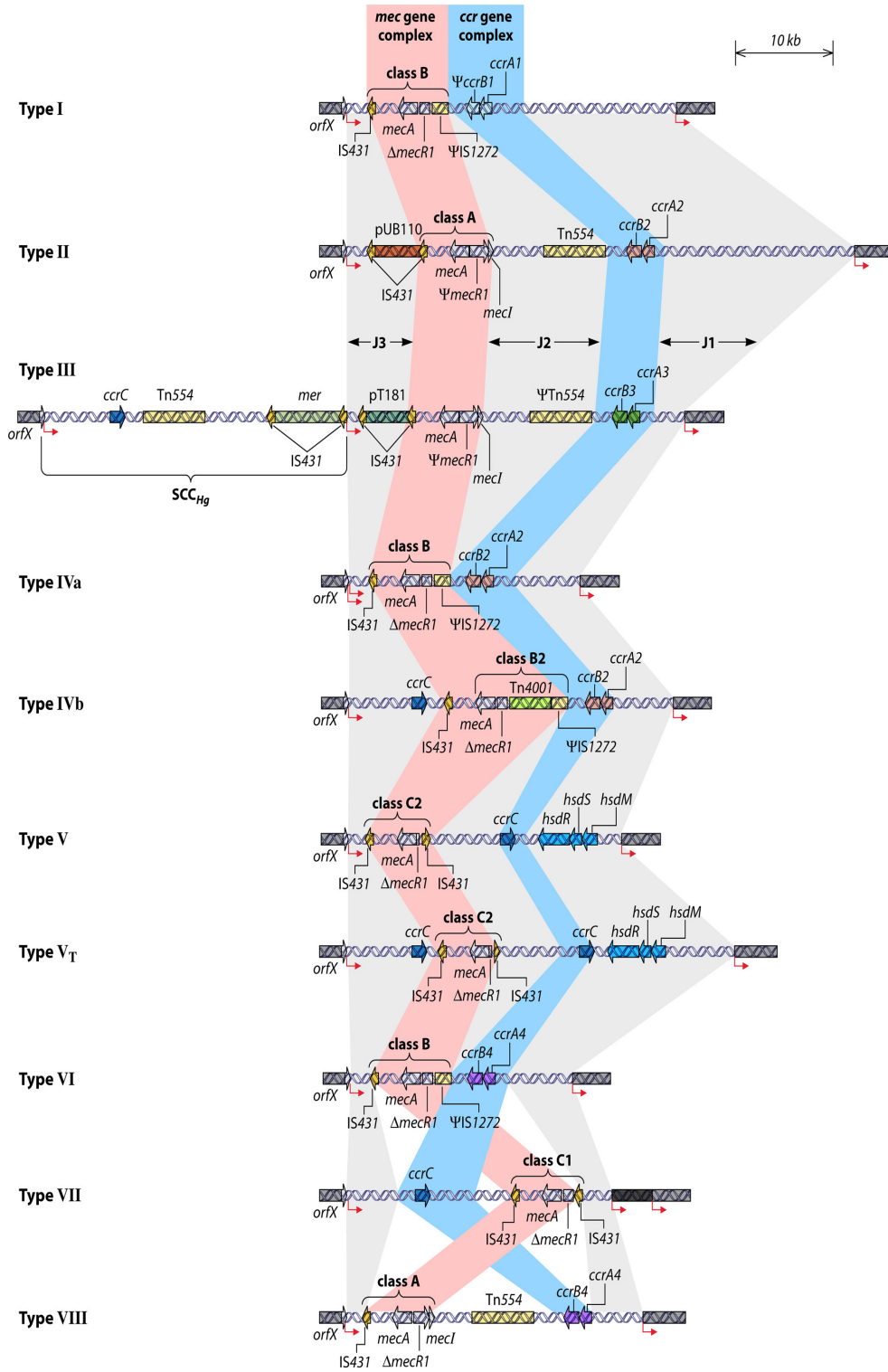
al. 2007, Deurenberg and Stobberingh 2008, Campanile et al. 2010, Sancak 2012).

S. aureus'larda tanımlanan SCCmec elemanlarının büyük bir bölümü (orfX) J3-mec-J2-ccr-J1 şeklinde kompozisyon gösterir. SCCmec tip VII ve tip IX bu durumun dışında kalır. SCCmec tip VII'de ccr gen kompleksi J3 ile J2 arasında bulunur, SCCmec tip IX'da ise mec gen kompleksi J2 ve J1 arasında yerleşim gösterdiği tespit edilmiştir. SCCmec kasetleri ccr gen kompleksi ve mec gen kompleksi farklılıklarına göre tiplere ve ayrıca J bölgesindeki farklılıklara göre de alttiplere ayrılmaktadır (Campanile et al. 2010, Turlej et al. 2011, Sancak 2012). SCCmec kasetinde bulunan ccr genleri, *S. aureus* genomuna SCCmec entegrasyonundan ve ayrılmasından sorumludur. *S. aureus* genomunda open reading frame'in 3' ucuna SCCmec kasetinin entegrasyonunu sağlar. *S. aureus* izolat-larında ccrA, ccrB ve ccrC olmak üzere 3 farklı ccr geni bulunmaktadır. DNA dizi analizleri % 50 benzerlik gösterir. ccr gen kompleksleri, tanımlandıkları tarih sırasına göre numaralandırılırlar. Bugüne kadar iki farklı grup tanımlanmıştır. Bunların birisi ardışık ccrA ve ccrB genlerini içerirken diğer grup ccrC genini içermektedir. ccr genlerinde görülen allel farklılıklarına göre tip1 (ccrA1B1), tip2 (ccrA2B2), tip3 (ccrA3B3), tip4 (ccrA4B4), tip7 (ccrA1B6), tip8 (ccrA1B3) ve tip5 (ccrC) olmak üzere 7 farklı allotip tanımlanmıştır (Enright et al. 2002, Turlej et al. 2011).

mec gen kompleksi ise *mecA* ve onun regülatör genleri ile insersiyon dizilerinden tik işareti var meydana gelir. Sınıf A *mec* gen kompleksi (*mecI- mecR1-mecA-IS431*) prototipi oluşturur ve *mecA*, *mecR1*, *mecI* genleri ile *mecA* geninin aşağısında bulunan değişken bölge [hypervariable region (HVR)] ve *IS431* adlı insersiyon dizisini içerir. Sınıf A *mec* gen kompleksi ve diğer *mec* gen kompleksleri arasındaki fark, *IS1272* ve *IS431* IS elemanlarının *mecA* regülatuar genlerinin bulunduğu bölgeye insersiyonları sonucunda *mecI*'nin tamamıyla delesyona uğraması ve *mecR1*'in ise kısmi delesyona uğraması sonucunda ortaya çıkar. Sınıf B *mec* gen kompleksi (*IS1272-ΔmecR1-mecA-IS431*), sınıf A *mec* gen kompleksinden farklı olarak *mecA* geninin yukarisına *IS1272*'nin insersiyonu sonucunda delesyona uğramış *mecR1* genini bulundurmaktadır. Sınıf C *mec* gen kompleksi (*IS431-ΔmecR1-mecA-IS431*), ise *mecA* geninin yukarisına *IS431*'nin insersiyonu sonucunda delesyona uğramış *mecR1* genini içerir. Bugüne kadar C1 ve C2 olmak üzere 2 farklı sınıf C *mec* kompleksi tanımlanmıştır. Sınıf C1 *mec* gen

kompleksinde *mecA* geninin yukarisına yerleşim gösteren IS431, *mecA* geninin aşağısında yer alan IS431 ile aynı yönde bulunur. Sınıf C2 *mec* gen kompleksinde ise *mecA* geninin yukarisında bulunan IS431, *mecA* geninin aşağısında yer alan IS431 ile ters yönde yerleşim gösterir. Sınıf D *mec* gen kompleksi sadece *S.caprae*'de bulunur. Son olarak 2010 yılında sığırdan izole edilen LGA251 adlı *S. aureus* izolatının DNA dizi analizi sonucunda *blaZ-mecALGA251-mecR1LGA251-mecILGA251* yapısı gösteren Sınıf E *mec* gen kompleksi tanımlanmıştır (Deurenberg *et al.* 2007, Campanile *et al.* 2010, Turlej *et al.* 2011).

SCCmec elemanları *mec* ve *ccr* gen kompleksleri dışında junkyard ya da joining regions olarak adlandırılan J bölgelerini içerir. Bu bölgede antimikrobiyal direnç determinantları bulunabilmektedir. J1, sağ kromozomal bağlantısı ile *ccr* gen kompleksi arasında, J2, *ccr* gen kompleksi ile *mec* gen kompleksi arasında ve J3, *mec* gen kompleksi ile sol kromozomal bağlantısı arasında yer alır. J bölgelerinde yer alan farklılıklara göre *SCCmec* alttipleri tanımlanmaktadır (Deurenberg *et al.* 2007, Campanile *et al.* 2010). Günümüzde *SCCmec* kaynağı hâlâ bilinmemektedir. *S. aureus*'un *S.sciuri*'den bu elementi kazandığı düşünülmektedir. Hayvanlarda kommensal olarak bulunan *S.fleuretti*'den kazanıldığına dair görüşler de bulunmaktadır. *S.sciuri*'de *mecA* geni bulunur ancak gen ekspresyonu gerçekleşmediği için metisilin duyarlıdır. *S.fleuretti* metisilin dirençlidir ve MRSA N315 izolatı ile % 99,8 oranında nükleotit benzerlik göstermektedir. Bu son bulgular *mecA* kaynağının *S.sciuri*'den ziyade *S.fleuretti* olabileceğini düşündürmektedir (Tsubakishita *et al.* 2010, Turlej *et al.* 2011).



Şekil 2.4. *ccr* ve *mecA* gen komplekslerinde görülen yapısal değişikliklere göre SCC_{mec} Tipleri (David and Daum 2010).

Metisilin direncinin fenotipik olarak ortaya konması bakteriler arasında değişkenlik göstermektedir. MRSA suşlarının hepsi PBP2a oluşturmalarına rağmen, metisilin direnci değişik derecelerde ortaya çıkmaktadır ya da bir başka şekilde ifade etmek gerekirse, metisilin direnci, homojen ve heterojen olmak üzere iki farklı fenotip olarak görülmektedir (Chambers 1997, Sancak 2000, Lowy 2003, Chongtrakool 2006). Stafilokollarda beta-laktam direnç fenotipleri Tablo 2.1' de verilmiştir.

Tablo 2.1. Stafilokollarda beta-laktam direnç fenotipleri

| Mekanizma | Penisilin G Aminopenisilin | Beta-laktamaz inhibörlü beta laktamlar | Penisilnaz Dirençli Penisilinler | Sefalosporinler-Karbapenemler |
|--------------------|----------------------------|--|----------------------------------|-------------------------------|
| Doğal | S | S | S | S |
| Penisilnaz | R | S | S | S |
| <i>mecA</i> (MRSA) | R | R | R | R ^a |
| BORSA | R | S/R | R | S |

a: Bu ajan in vitro duyarlı gözükebilir, ancak tedavi sonuçları olduğu için dirençli olarak bildirilmektedir. BORSA: Sınırda oksasilin direnci, R: Dirençli, S: Duyarlı

Homojen dirençte koloniyi oluşturan tüm bakteriler *mecA* genini taşırlar. Hepsinde de *mecA* geni eksprese olmuştur ve yüksek düzeyde direnç gelişim gerçekleşmiştir. Direnç gelişimi, ortamın pH'ı, sıcaklığı, tuz konsantrasyonu, inkübasyon süresi gibi çevresel faktörlerden etkilenmez. Ancak klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında izole edilen stafilokokların az bir kısmında homojen metisilin direnci görülmüştür (Lowy 2003, Chongtrakool 2006, Sancak 2012).

Heterojen dirençte ise, kolonide bulunan tüm hücreler metisilin direnci için gerekli *mecA* genini taşımalarına rağmen bu bakterilerden bazılarında direnç durumları farklı bir şekilde açığa çıkar göstermektedir. Bu yüzden *mecA* geni taşıdığı halde metisiline olan farklı düzeylerde dirençli ve ilginç bir şekilde duyarlı *S. aureus* suşları bulunabilmektedir. Dolayısıyla bu suşlar arasında *mecA* geninin fenotipik ekspresyonu farklılık göstermektedir (Sancak 2012). Bu durum *mecA* geninin fonksiyonunu kontrol ettiği düşünölen metisilin direncinin ekspresyonu için esansiyel faktör (*femA*), faktör X veya *mecR*, *mecI* gibi kontrol genlerine bağlı olarak ortaya çıktığı düşünölmektedir (Lowy 2003, Chongtrakool 2006). Bu direnç tipini gösteren MRSA'lar, %99,9 veya daha fazlasında metisilin düşük konsantrasyonlarına (1-5 µg/mL) duyarlı iken, 10⁻² ile 10⁻⁸ sıklıkta olmak üzere hücrelerin bir kısmı yüksek metisilin konsantrasyonlarına (≥

50 µg/mL) direnç göstermektedir (Sancak 2007, Sancak 2012). Heterojen direnç, klinik uygulamada daha sık görülmesine rağmen, tespit edilmesi güç olan direnç tipidir.

Heterojen direnç gösteren suşlar, NaCl veya sukrozlu besiyeri kullanılması, düşük derecede inkubasyon gibi bazı özel kültür koşullarının sağlanması durumunda homojen direnç gösterir hale gelirler. Değişik kültür koşullarına göre direncin ortaya konulmasında meydana gelen bu değişiklik geçicidir ve tamamen fenotipiktir (Oliveira *et al.* 2006).

Ayrıca *mecA* geninin olmasına rağmen, metisilin minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) düzeylerinin düşük olduğu izolatlarında olduğu bildirilmiştir ki, Pre-MRSA isimlendirilmişlerdir. Bu izolatlarda *mecI-mecRI* düzenleyici genleri fonksiyoneldir. Heterojen dirençli izolatların belirlenmesinde *mecR1* için ideal bir indükleyici olan sefoksitin kullanılması ve otolizinlerin etkisini azaltılmasında, besiyerine %2-4 oranında NaCl eklenmesi önerilmektedir. *MecA* gen ekspresyonunun artırılması için düşük ısıda uzun süreli inkübasyonun etkili olduğu belirtilmiştir (Peacock 2005, Ünal 2004).

Farklı ortam koşullarına göre direncin ortaya konulmasında meydana gelen bu değişiklik, geçicidir ve tamamen fenotipiktir. Bu durumdan da anlaşılacağı gibi, metisilin direncinin fenotipik olarak ortaya konulmasının regülasyonu oldukça karışıktır (Sancak 2012).

2.4.1. Metisilin Direncini Etkileyen Faktörler

2.4.1.1. Beta Laktamaz Plazmidi

Beta-laktamaz enzimi, *blaZ* adlı gen tarafından kodlanır. *blaZ*, *blaR1* ve *blaI* olmak üzere iki gen tarafından kontrol edilir. *blaI* geni, beta-laktamaz geninin transkripsiyonunu inhibe eden BlaI proteinini kodlar. *blaR1* geni ise transmembran yerleşim gösteren BlaR1 proteininin sentezinden sorumludur. BlaR1, beta-laktam yapısındaki bir antibiyotiğin ortamda bulunması durumunda ona bağlanır ve hücre dışından hücre içine sinyal iletimini sağlayarak beta-laktamaz enziminin sentezinin

başlamasına yol açar. Yani beta-laktamaz enzimiyle ortaya çıkan direnç indüklenebilir bir dirençtir. *blaZ-blaR1-blaI* sistemi *mecA-mecR1-mecI* sistemiyle benzerlik gösterir. Dolayısıyla, *blaR1* ve *blaI* genlerinin, aynı zamanda metisilin direncinin fenotipik olarak ortaya konmasında da rol aldığı düşünülmektedir. Beta-laktam yapısındaki antibiyotik ile indüksiyon yapıldığında, *blaR1-blaI* sisteminin uyarılması, *mecR1-mecI* sisteminden daha hızlı olmaktadır (Beta-laktamaz ekspresyonu 15 dakika, *PBP2a* yapımı 48 saat). Yani beta-laktam yapısındaki antibiyotik ortamda bulunduğu *PBP2a*'nın eksprese edilmesi çok yavaş olmaktadır (Chambers 1997, Stapleton 2002, Sancak 2012).

Metisilin dirençli *S. aureus*'ların çoğunda *blaZ*-regülatör sistemini taşıyan plazmidin bulunması ve *mecR1-mecI* sisteminin defektif olması nedeniyle *mecA* geninin esas olarak *blaZ*-regülatuar sistemiyle indüklendiği düşünülmektedir. Ancak beta-laktamaz genlerini taşıyan plazmit, alıcı hücreye verildiğinde *PBP2a* yapımı konstitütif halden indüklenebilir hale geçmekle birlikte, *PBP2a* konsantrasyonu ya da direncin indüklenebilir olma durumu ile direnç profili arasında bir ilişki kurulamamıştır. *PBP2a* sentezi konstitütif olabilir ama suş heterojen direnç gösterebilir. Bu da metisilin direncinin fenotipinin belirlenmesinde başka faktörlerin de yer aldığını göstermektedir (Stapleton 2002, Sancak 2012).

2.4.1.2. Fem Faktörleri

Konstitütif ya da indüklenebilir olsun olmasın, *PBP2a* miktarı ile ortaya çıkan metisilin direnç fenotipi (homojen-heterojen) arasında bir ilişkinin gösterilememesi metisilin direncinin ortaya konulmasını etkileyen olası diğer faktörlerin arayışına girilmesine yol açmıştır. Transpozonlarla inaktivasyon yoluyla metisilin dirençli suşlardan duyarlı suşlar elde edilmesi, *mec* dışındaki genlerin tanımlanmasına yolaçmıştır. *mec* bölgesi dışında bulunan bu genler, “auxiliary” veya “factors essential for the expression of methicillin resistance” ya da kısaca “*fem*” genleri olarak tanımlanmıştır. *fem* faktörleri, *mec A* geninden farklı olarak hem duyarlı hem de dirençli suşlarda bulunmaktadır. Bugüne kadar *femX (fmhB)*, *femA*, *femB*, *femC*, *femD*, *femE* ve *femF* olmak üzere farklı *fem* genleri tanımlanmıştır. Günümüzde *femE* dışındaki genlerin fonksiyonları

belirlenmiştir. *fem* faktörleri, hücre duvar sentezinin değişik basamaklarında rol alırlar. Örneğin *femA*, *femB* ve *femX (fmhB)* çapraz bağlarda yer alan pentaglisin oluşumunda görev alırlar. Pentaglisin zincirine, FemX ilk glisini, FemA 2 ve 3. glisini, FemB de 4 ve 5.glisini ekler. Dolayısıyla *fem* mutantlarında hücre duvarının peptidoglikan yapısında değişiklikler meydana gelir (Chambers 1997, Berger-Bächi and Rohrer 2002, Stapleton 2002, Sancak 2012).

2.4.1.3. Otolitik Aktivite

Homojen metisilin direnci gösteren izolatların heterojen direnç gösterenlere kıyasla daha düşük otolitik aktivite gösterdiği görülmüştür. Bugün için fonksiyonu tanımlanmamış, 38 kDa büyüklüğünde bir protein sentezleyen *llm* geninin inaktivasyonu sonucunda otolizde artış görülmektedir. Yapılan çalışmalarda *llm* mutant suşlarda metisilin direncinde azalma olduğu saptanmıştır (Chambers 1997, Stapleton 2002, Sancak 2012).

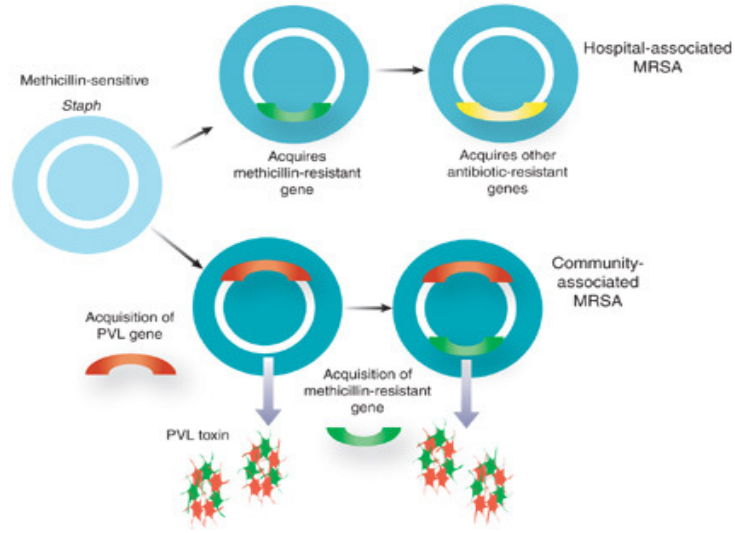
2.4.2. Metisilin Direncini Etkileyen Eksternal Faktörler

Eksternal faktörler arasında yer alan tuz konsantrasyonu, pH, ortam kompozisyonu, ozmolarite ve ortamın sıcaklığı metisilin direncini etkilemektedir. NaCl konsantrasyonunun yüksek (%6,5) olması ile inkübasyon sıcaklığının düşük (30-35°C) olması metisilin direncini artışının sebep ya da sebepleri bilinmemektedir. İnkübasyon süresinin 18 saat yerine, 24 saate uzatılmasının da metisiline dirençli olan suşlar saptamanın daha kolay olduğu da bilinmektedir (Ünal 2004, Sancak 2012).

Direncin ortaya çıkmasını arttıran koşulların hücre otolizisindeki değişikliklerle ilişkili olduğu görülmüştür. Örneğin; ortama %4'lük NaCl'un eklenmesi, PBP2a miktarını arttırmamasına rağmen, direncin eksprese edilmesini arttırmaktadır. NaCl hücredeki görev otolizisi inhibe etmektir. 30°C'de inkübasyon da NaCl gibi, antibiyotik ile tetiklenmiş olan otoliziz aktivitesini inhibe eder. Bu etki, sadece dirençli olan suşlara özgül olmamakla birlikte, PBP2a varlığında direncin artmasına yol açar (Chambers *et al.* 1987, Sancak 2012).

2.5. Toplumdan Kazanılmış MRSA ile Hastaneden Kazanılmış MRSA'lar

MRSA 2 farklı şekilde gelişim gösterir ki; bunlar hastane kökenli ve toplum kökenlidir (Şekil 2.5). Hastane kökenlerinin topluma taşınarak temas yolu ile kişiden kişiye geçerek yayılması ile ortaya çıkması söz konusu iken, toplumdaki MSSA kökenlerinin “de novo” olarak metisilin direnç geninin aktarılması ile ortaya çıkmaktadır (Salgado *et al.* 2003).



Şekil 2.5. Hastane ve toplumsal kaynaklı MRSA'lar arasındaki fark (İnt. Kyn.5).

TK-MRSA infeksiyonları artış göstererek, Hastane kaynaklı MRSA (HK-MRSA) ile birlikte önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya başlamıştır (Cheung *et al.* 2008). TK-MRSA'ların sebep olduğu infeksiyonları konusunda oldukça fazla sayıda çalışmanın yapılmış olmasına rağmen TK-MRSA'yı kavram olarak aydınlatılamamıştır. Bazı HK-MRSA infeksiyonları TK-MRSA'dan kaynaklanabilmekte iken bunun aksi olan TK-MRSA, HK-MRSA'dan kaynaklandığı görülmüştür (Gerberding ve Chambers. 2001). TK-MRSA ile ilgili olarak dikkati çeken konu hastanelerde son yıllarda yayılmaya başlamasından dolayı tanımlama konusu tartışılmaktadır (Millar *et al.* 2007). Mikrobiyolojik ve moleküler veriler olmaksızın sadece epidemiyolojik bilgiye dayalı CDC kriterleri tek başına TK-MRSA'yı tanımlamada yeterli olamamaktadır. Bundan dolayı klinik, epidemiyolojik ve mikrobiyolojik bilginin sentezi TK-MRSA'nın tanımlanmasında kullanılmalıdır (Millar *et al.* 2007).

Amerika Birleşik Devletleri (ABD) de, çeşitli infeksiyonlarından izole edilen MRSA oranı %50'lerin üzerine çıktığı bildirilirken, TK-MRSA'ların ilaçlara direnç oranlarının artış göstermesi, yeni coğrafi alanlara yayılımı da dikkat çekicidir. Dolayısıyla TK-MRSA ların neden olduğu salgınlarla ilgili yayınlanan raporlar, erken tanının ve acil kontrol önlemlerinin önem konusumda fikir birliğindedirler (Navarro *et al.* 2008).

TK-MRSA'ların moleküler mikrobiyolojisi ile ilgili bilgiler HK-MRSA'lardan farklı olduğu yapılan çalışmalar neticesinde ortaya çıkmıştır. Örneğin TK-MRSA suşlarında tespit edilen SCCmec kaset genler, HK-MRSA suşlarından evrimsel olarak bağımsız olduğunu göstermektedir. Bu durum, TK-MRSA suşlarının HK-MRSA suşlarından bağımsız olarak geliştiğini ve toplum kaynaklı *S. aureus* suşlarının transformasyonu sonucu ortaya çıktığını düşündürmektedir (De Lencastre 2007, Kılıç 2008). Bu durumu örneklendirmek gerekirse, tip IV SCCmec kaset gen bölgesi 1970'li yıllarda *S. epidermidis* suşlarında tespit edilmiş olmasına rağmen, *S. aureus* da ise 1980 yılında ilk kez da bulunduğu belirtilmiştir. Bu bağlamda, 1980'li yıllarda SCCmec IV'ün *S. epidermidis*'den *S. aureus*'a vertikal olarak aktarılmış olabileceğini düşündürmektedir (Katayama 2001, Ito 2003).

SCCmec tip II ve tip III taşıyan HK-MRSA izolatlarında metisilin direncinin yanında makrolid, klindamisin, streptogramin B ve tetrasiklin antibiyotiklerine karşı da direnç göstermekte iken, TK-MRSA izolatları klindamisin, trimetoprim-sülfametoksazol, tetrasiklin, gentamisin, florokinolonlar ve kloramfenikol antibiyotiklerine karşı duyarlı olduğu belirlenmiş (Shorr 2007; Deurnberg *et al.* 2007). İzolatların antibiyotiklere olan direnç durumlarındaki farklılığın sebebi, direnç genlerini taşıyan SCCmec kaset bölgesindeki tiplerine göre de değişiklik göstermesi ile de ilişkili olduğu düşünülmektedir. Örneğin, tip II ile tip III SCCmec kaset gen bölgeleri, direnç genlerinin yerleşim gösterdiği J (J1, J2 ve J3) gen bölgelerine sahip olmalarına rağmen, hâlbuki tip IV SCCmec kaset genlerinin yapısının daha kısa ve daha basit olduğu bulunmuştur. Büyüklük olarak ele alındığında ise 20-24 kb arasında değişen farklı tip IV kaset olduğu yapılan çalışmalara sonucunda bildirilmiştir (De Lencastre 2007, Kılıç 2008).

HK-MRSA suşlarında, genellikle tip I, II veya III *SCCmec* gen bölgelerinin bulunduğu tespit edilmiş. TK-MRSA izolatlarında ise tip IV, tip V veya tip VII *SCCmec* gen bölgesinin bulunmuştur (Daum *et al.* 2002, Ma *et al.* 2002, Deurnberg *et al.* 2007). Yine TK-MRSA'larda virülans etkin olarak rol oynayan önemli bir toksini kodlayan "Panton-Valentine leukocidin (PVL)" geni bulunmaktadır. PVL, invaziv deri ve yumuşak doku enfeksiyonları ve nekrotizan pnömoni ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Shorr 2007, Deurnberg *et al.* 2007).

TK-MRSA izolatlarının *SCCmec* tipleri, Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) yöntemindeki bulgular ile Multilocus sequence typing (MLST) ve Staphylococcal protein A (SPA) profillere bakıldığında HK-MRSA'lardan farklılık gösterdiği dikkat çekmiştir. TK-MRSA ile HK-MRSA'lar arasındaki bu genetik farklılıkların yanında oluşturmuş oldukları enfeksiyonlar açısından da farklılık göstermektedir. TK-MRSA'lar deri ve yumuşak doku enfeksiyonları (apse, follikülit vb.) ile pnömoniyeye neden olur ve invaziv, hızlı ilerleyen nekrotizan pnömoni, ağır sepsis, nekrotizan fasiit (? Var ama doğru) gibi hastalık tablolarına da neden olabilirler. Ayrıca fulminant purpura ve yaygın damariçi koagülopatisine (DIC) de yol açabilirler (Katayama 2001, Ito 2003, Kılıç 2006) HK-MRSA'lar ise solunum yolu enfeksiyonları, kan akışı enfeksiyonları ve cerrahi yara enfeksiyonları gibi farklı klinik bulgulara neden olurlar. Son yıllarda TK-MRSA'lar acil servis yoğun bakım ünitelerinde, yenidoğan yoğun bakım ünitelerinde, askeri kışlalarda ve hapisanelerde meydana gelen enfeksiyonların önemli bir etkeni haline geldiği de bildirilmiştir (Rehm and Tice, 2010).

HK-MRSA klonlarının çoğunluğu tip I, II veya III *SCCmec* taşırken TK-MRSA suşları çoğunlukla tip IV *SCCmec* taşımaktadır. *SCCmec* Tip V ilk olarak 2004 yılında Avustralya'da izole edilmiş ve TK-MRSA suşunda tanımlanmıştır (WIS suşu). Bulunan yeni elementin sınıf C *mec* gen kompleksi ile daha önceden tanımlanmamış *ccr* gen kompleksi taşıdığı gösterilmiştir. Bu yeni *ccr* gen kompleksi *ccrC* olarak adlandırılmıştır. *SCCmec* Tip V, 28 kb'lık küçük bir element olup *mecA* dışında direnç geni taşımamaktadır. Ancak diğer *SCCmec* tiplerinden farklı olarak elementin kromozomda stabilizasyonunu sağladığı düşünülen birtakım yabancı genler içermektedir (Ito *et al.* 2004).

2.6. Metisilin Direncinin Tespit Edilmesi

Oksasilinin MİK'nun 4 µg/ml'nin üzerinde olması halinde metisilin direncinden bahsedilmektedir (Dündar 2000, Ünal 2004). MRSA direncinin belirlenmesinde en ideal yöntem *mecA* geninin veya PBP2a proteininin elde edilmesi olarak gösterilmektedir. Ancak bu yöntemler, her laboratuarda uygulanması çok olası görünmemektedir (Onorato *et al.* 1996, Wenzel, 1998). Bu nedenle fenotipik testlerin uygulanması daha kolaydır ki; bu testler disk difüzyon, broth mikrodilüsyon, Epsilometrik (E) test oksasilin MİK test, oksasilin agar tarama, Sefoksitin disk difüzyon test, Chromogenic media-MRSA, PBP2a latex agglutination kit, agar dilüsyon yöntemleridir (Sridhar 2009).

Oksasilin; metisilin direncinin belirlenmesinde Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) önerilerine göre, diğer penisilinaza dirençli olan penisilinlere göre daha stabil bir molekül olmasının yanında, özgülüğünün yüksek olması nedeniyle uygulanmaktadır (CLSI 2006). Fakat direncin heterojen olması durumunda, oksasilin kullanılarak yapılan duyarlılık testlerinde, dirençli ve duyarlı olarak sonuçların ortaya çıkışı ve bunların ayırımında zorluklara neden olabilmektedir (Ünal, 1996, Felten *et al.* 2002). Bundan dolayı sonuçların güvenilirliğini artırmak amacıyla, inokulum miktarının artırılması, daha düşük sıcaklıkta inkübe edilmesi, sodyum klorür içeren oksasilin tarama testi veya inkübasyonun uzatılması gibi önerilerde bulunulmuştur (Mackenzie *et al.* 1995, Atay *et al.* 2002).

Agar tarama testi, sadece *S. aureus* için önerilmektedir ki, heterojen olan suşlarda değerlendirme zor olmaktadır (Atay *et al.* 2002). Bir sefamisin türevi olan sefoksitin *mecA* genini diğer penisilinlere göre daha iyi eksprese olmasını uyardığı gösterilmiştir (Swenson *et al.* 2001). Bazı araştırmacılara göre, sefoksitin disk difüzyon testinin oksasilin disk difüzyon testinden daha yararlı olduğunu, *mecA* gen varlığı ile daha iyi uyum gösterdiğini ifade etmişlerdir (Felten *et al.* 2002, Boutiba-Ben Boubaker *et al.* 2004). CLSI antibiyotik duyarlılık testleri alt komitesi CLSI yayını M100-S17'de hem disk difüzyon hem de dilüsyon bölümlerindeki stafilokok tablosunda sefoksitin disk difüzyon yöntemini yeni test olarak ilave etmiştir (CLSI 2006).

2.6.1. Geleneksel Yöntemler (Fenotipik Yöntemler)

2.6.1.1. Disk Difüzyon Yöntemi

2.6.1.1.1. Oksasilin Disk Difüzyon Yöntemi

Yöntemde MRSA izolatlarının saptanması amacıyla 1 µg oksasilin içeren antibiyogram diskleri kullanılmaktadır. CLSI tarafından belirlenen direnç sınır değerlerine göre inhibisyon zonunun çap 10 mm olan izolatlar dirençli, 11-12 mm olan izolatlar orta düzeyde duyarlı, 13 mm olan izolatlar ise duyarlı olarak kabul edilmektedir (Wikler 2007).

2.6.1.1.2. Sefoksitin Disk Difüzyon Yöntemi

Sefalosporinler de son yıllarda, indikatörü metisilin direnç olarak üzerinde çalışılan bir diğer önemli antibiyotik grubunu oluşturmaktadır. Moksalaktam ve sefoksitin diskleri kullanılarak yapılan disk difüzyon testleri, MRSA ayırımında oldukça yüksek duyarlılığa ve özgüllüğe sahiptir. Ayrıca, sefoksitin disk difüzyon yönteminin değerlendirilmesinin, oksasilin disk difüzyon yöntemine göre daha kolay olduğu bildirilmiştir. Bu yöntemde 30 µg sefoksitin içeren antibiyogram diskleri kullanılmaktadır. CLSI tarafından belirlenen direnç sınır değerlerine göre inhibisyon zon çap 21 mm olan izolatlar dirençli, 22 mm olan izolatlar ise duyarlı olarak kabul edilmektedir (Wikler 2007).

2.6.1.2. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi

Bu yöntemde %2 NaCl içeren Mueller-Hinton sıvı besiyeri kullanılmaktadır. Antibiyotik olarak oksasilin tercih edilmektedir. CLSI tarafından belirlenen direnç sınır değerlerine göre MİK değeri 2 µg/ml olan izolatlar duyarlı, 4 µg/ml olan izolatlar ise dirençli olarak kabul edilmektedir (Wikler 2007).

2.6.1.3. Agar Tarama Yöntemi

Agar tarama yönteminde, kullanılan besiyeri MHA 6 µg/mL oksasilin ve %4 NaCl içermektedir. Bakteri süspansiyonu 0.5 McFarland bulanıklığa ayarlanmış bakteri süspansiyonundan ekim yapılarak 24 saat 37°C’de inkübasyona bırakılır. Besiyerinde üremesi durumunda hedef suşun metisiline dirençli olduğu kabul edilmektedir. Metisilin direnci açısından değerlendirilmesi yapıldığında uygulanan yöntemin duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek olduğu düşünülmektedir (CLSI 2009).

2.6.1.4. Epsilometrik (E-test) Yöntemi

Epsilometrik yöntemi (AB Biodisk, Solna, İsvec) mikrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemlerine benzerlik göstermesinin yanında alternatif bir yöntem olarak önerilmektedir. İstenilen antimikrobiyal ajanın duyarlılığını test etmek amacıyla ince plastik şeklinde olan test stripleri (şeritleri) kullanılmaktadır. Üst yüzeyinde konsantrasyon indeksi veya ölçek ile işaretleri bulunurken. Striplerin alt yüzeyinde ise antimikrobiyal ajanların farklı konsantrasyonları bir dizilenmiş halde olarak bulunur. E-test yönteminde hedef bakteri 0.5 McFarland yoğunluğa ayarlanılarak Muller Hinton agar yüzeyine steril bir eküvyonla yayılır. Agar yüzeyine, belli bir antibiyotik gradienti içeren E-test stripleri yerleştirilir. Plaklar 18-24 saat süreyle 35-37°C’de inkübasyon sonrası MİK değeri belirlenmektedir. MİK değeri strip etrafında oluşan inhibisyon elipsinin strip üzerindeki ölçekle kesiştiği noktadır. (Mahon 2007).

2.6.1.5. Lateks aglutinasyon Yöntemi

Lateks aglutinasyon testlerindeki prensip PBP2a’nın lateks ile kaplanmış monoklonal antikolar ile reaksiyon verip vermemesi temeline dayanmaktadır. Diğer yöntemler göre daha kısa sürede sonuç alınabilmektedir. (Sancak 2007).

2.6.1.6. Kromojenik Besiyerleri

Staphylococcus aureus'ların metisiline olan dirençli olup olmadıklarının belirlenmesi amacıyla birçok kromojenik besiyeri bulunmaktadır. Bu tür besiyerleri hem seçici hem de ayırt edici olmalarından dolayı tercih edilmektedir. İçerisinde bulunan ayıraçlar sayesinde farklı kolonilerin farklı renkleri oluşturmasından dolayı tür ayırımına gidilebilmektedir. Kromojenik besiyerlerinin bazıları seçici antibiyotik olarak sefoksitin içerirken, diğerlerinde oksasilin bulunmaktadır. Oksasilin antibiyotiğinin bozulabilmesinde dolayı çok fazla tercih edilmemektedir. Sefamisin antibiyotiğinin PBP2a'yı daha iyi indüklediği düşünüldüğünden sefoksitin içeren besiyerleri daha çok kullanılmaktadır. Besiyerine ekim yapıldıktan 24 saat sonra MRSA kolonileri renkli olmaları sebebiyle diğer koloni türlerinde kolayca ayırt edilebilmektedir. Özgüllüğü yüksek olan kromojenik besiyerlerinde üreyen MRSA kolonilerin doğrulama yapılmasına çok fazla gerek duyulmamaktadır (Gülay 2009).

2.6.2. Moleküler Yöntemler

Metisiline dirençli olan izolatları, özellikle *S. aureus*'ların moleküler yöntemler ile tespitinde en duyarlı ve güvenilir yöntemler olarak görülmektedir. Moleküler yöntemler arasında DNA hibridizasyon ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) sayılmaktadır. Her iki yönteminde *S. aureus*'larda metisiline direnç geni *mecA* varlığını tespitinde duyarlılığı ve özgüllüğü %100 olarak kabul edilmektedir. Yöntemlerin uygulama kolaylığı dikkate alındığında PZR tercih edilme oranı yüksek olmasından dolayı günümüzde altın standart olarak kabul görmüştür (Nolte and Caliendo 2003).

Dolayısıyla MRSA tespitinde PZR'na dayanan farklı testler bulunmaktadır. PZR yöntemleri PBP2a'yı kodlayan *mecA* geni ile *S. aureus*'a özgü *nuc* (nükleaz), *coa* (koagulaz), *sa442*, *femA*, *femB* gibi genlerinin varlığını belirleyen multipleks PZR yöntemleri bulunmaktadır. Metisilin direncinin doğrulanması ve kan kültürlerinden MRSA saptanmasını hedefleyen PZR yöntemleri rutin olarak işleyen mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılmaktadır (Gülay 2009).

2.6.2.1. DNA Hibridizasyonu

DNA hibridizasyon yönteminde özgül DNA bölgelerine bağlanabilen enzim ya da radyoaktif işaretli proplar kendi bölgelerine özgül farklı yöntemlerle denatüre edilebilen DNA veya RNA ile hibridize olabilen stabil bir çift iplik sentezlerler. Böylelikle hibridize olan DNA'lar çeşitli yöntemlerle tespit edilebilmektedirler (Podzorski and Persing 1995). MRSA' lar için *mecA*'yı tespitinde elde edilen veriler ile hibridizasyon sonuçları bu yöntemin %100 duyarlı ve özgül bir yöntem olduğu belirlenmiştir (Kolbert *et al.* 1998). Hibridizasyon yöntemlerinin dezavantajı ise uygulama zorluğunun yanında PZR'a göre daha fazla miktarlarda DNA gerekli olmasından dolayı çok tercih edilen bir yöntem değildir (Ünal *et al.* 1992).

2.6.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Nükleik asitlerin invitro olarak çoğaltılmasını sağlayan yöntem belirli bir nükleotid dizisini içeren DNA bölgesinin çoğaltılması esasına dayanır. Çoğaltılan DNA bölgesi (20-30 bazlık nükleotid bölgesi) özgül olduğu için identifikasyon amaçlı kullanılan hızlı bir yöntemdir. Çoğaltılmak istenen DNA bölgesinin iki ucuna özgül olan ve bu bölgenin baz dizilerini tamamlayıcı bir çift sentetik oligonükleotid primerler kullanılmaktadır. İstenilen DNA bölgesi bu iki primer arasında çoğaltma işlemi yapılır. Isıya dayanıklı olan Taq DNA polimeraz enzimi kullanılmaktadır (Bannerman 2003).

Üç farklı kademe farklı sıcaklık aralıklarının olduğu bir döngü halinde tekrarlar şeklinde devam etmektedir. İlk kademe denatürasyon olarak adlandırılmakta ve 94°C'de DNA'daki hidrojen bağlarının birbirinden ayrılması gerçekleşmektedir. Annealing (birleşme) olarak adlandırılan ikinci kademe sıcaklık düşürülerek primerler kendilerine özgül olan baz dizileri ile hidrojen bağları kurup bağlanırlar. Üçüncüsü ise uzama kademesidir. DNA polimerazın çalıştığı sıcaklıkta primerlere bağlanmış olan enzim sentezlenmekte olan DNA'nın 3' ucuna, nükleotidleri ekleyerek DNA sentezi gerçekleşmiş olur. Bu üç ve birbirinden farklı olan basamakların her tekrarında iki primer arasında kalan özgül DNA bölgesinin her iki zincirinin de birer kopyası çıkarılmış olur. Sentez işlemi için, primerler, DNA polimeraza ve deoksiniükleotid

trifosfatlara (dATP, dCTP, dGTP dTTP), DNA polimerazın çalışması için gerekli tampon görevi yapacak tuzlara ve ayrıca Mg^{++} a ihtiyaç duyulmaktadır (Bannerman 2003).

Çoğaltılan hedef DNA'nın görüntülenmesinde yaygın olarak kullanılan yöntem agaroz jel elektroforezidir. PZR ile elde edilen ampliconlar bu yöntemle ayrıştırıldıktan sonra DNA zincirleri etidyum bromidle boyanmasıyla ultraviyole ışığı altında görünür hale getirilebilmektedir. Elde edilen bantlar moleküler büyüklük belirleyicileri ile karşılaştırılarak doğruluğu hakkında karar verilir (Podzorski and Persing 1995).

2.7. Bakterilerde Antibiyotik Dirençliliğinin Transferi

Antibiyotiklere dirençlilik genlerini taşıyan plazmidler, transpozonlar ve integronlar aracılığıyla konak hücre bölünmesi sırasında vertikal olarak geçtiği gibi, karışık bakteriyel populasyonlardaki aynı veya farklı tür ve soylardaki patojen veya apatojen bakteriler arasında transdüksiyon, konjugasyon veya transformasyon aracılığı ile horizontal olarak da geçebilmektedir (Büyükkaya ve Dinçer 2012).

2.7. 1. Horizontal Gen Transfer Mekanizmaları

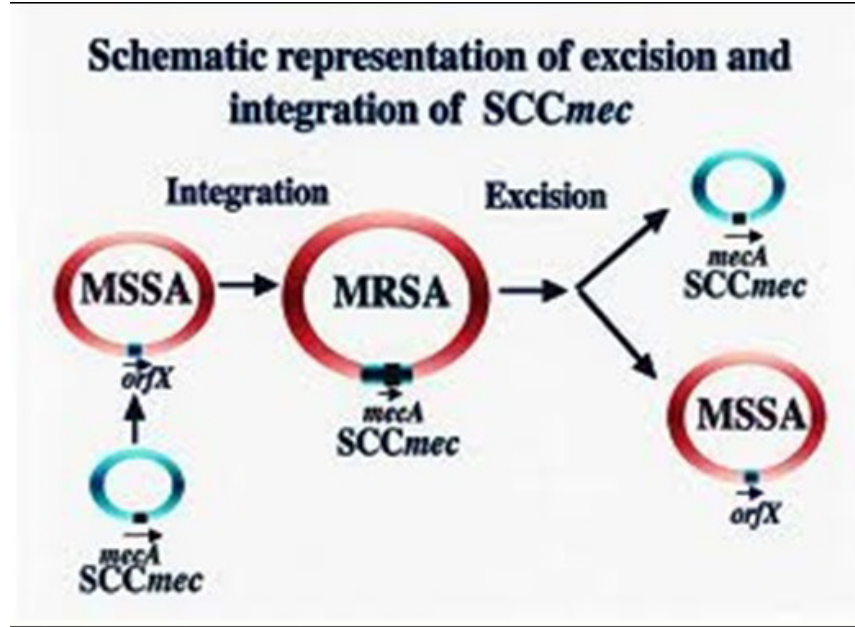
Tablo 2.2'de Horizontal Gen Transfer Mekanizmaları verilmiştir

Tablo 2.2. Bakterilerde Horizontal Gen Transfer Mekanizmaları

| Transfer şekli | Gerçekleşen Olay | Olaya Katılan Hücre | Transfer Edilen Yapı |
|-----------------------|--|--------------------------|---|
| Konjugasyon | Bir bakteriden diğerine DNA transferi | Prokaryotik | Kromozom veya plazmid alınır |
| Transdüksiyon | Bir hücreden diğerine virüs aracılığıyla DNA transferi | Prokaryotik | Genel transdüksiyonla herhangi bir gen alınımı veya özelleşmiş transdüksiyonla bazı genlerin alınması |
| Transformasyon | Çıplak DNA parçalarının hücre tarafından alınımı | Prokaryotik Ökaryotik | Herhangi bir DNA alınır. Kompetans belirleyicidir. |

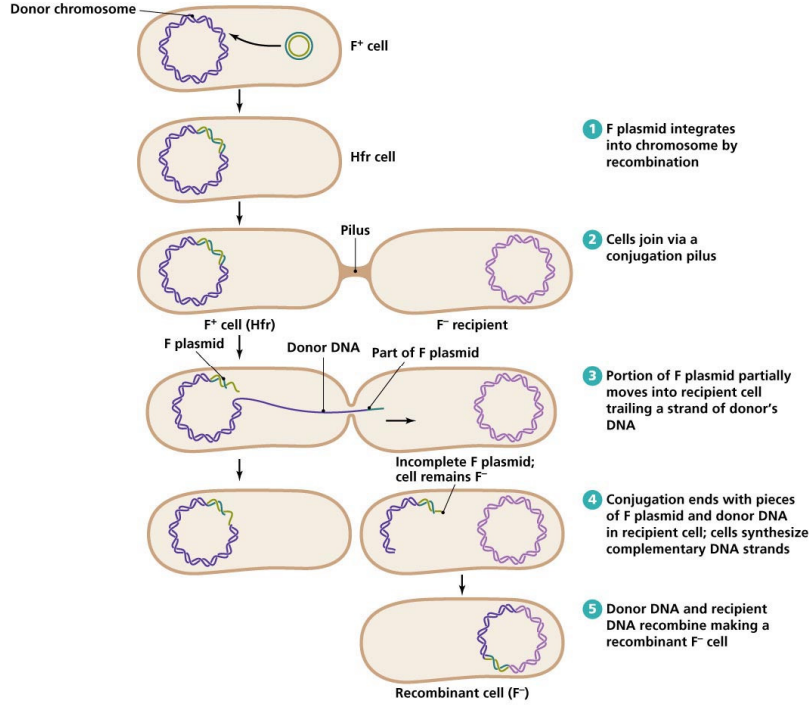
2.7. 2. Yer Değiştirebilen Genetik Elemanlar

Antibiyotik dirençliliği, insan ve hayvanlarda önem arz eden bakteri cinsleri arasında hızlı bir şekilde yayılmasından sorumludurlar. Bu elementler kromozomlar arasında, aynı kromozom üzerindeki farklı bölgeler arasında, kromozomdan plazmide veya iki plazmid arasında yer değiştirebilen, kendi transferini gerçekleştirebilen, küçük, lineer, çift iplikli DNA dizilimleridir (Frost *et al.* 2005. Büyükkaya 2012). Ekstra kromozomal elemanlar adı verilen bu plazmidler, transpozonlar ve integronlar, yeni antibiyotik direnç genleri kazandıran, hareketli elemanlardır (Kuyucu 2007, Büyükkaya 2012). SCC*mec*'in MSSA genomuna integrasyonu Şekil 2.6'de gösterilmiştir. Antibiyotik duyarlı bir bakteriye antibiyotik uygulandığında, mutasyonlar veya Yatay gen transferi sonucu bu antibiyotiğe direnç kazanmış az sayıdaki dirençli bakteri duyarlı bakterilere karşı rekabet avantajı kazanır ve doğal seleksiyon ile dirençli bakteri sayısında direnç kromozomuna sahip bakteri popülasyonunda artış görülür.



Şekil 2.6. MRSA da bulunan fakat MSSA da bulunmayan *mecA* geninin aktarımı (İnt. Kyn.6)

R-plazmidleri diğer duyarlı bakterilere transdüksiyon, transformasyon ve konjugasyon (Şekil 2.7) olaylarıyla geçerek direnç gen paketini aktarır ve böylece direncin yayılmasına neden olurlar (Büyükkaya 2012).



Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Şekil. 2.7. F⁺ hücreden F⁻ hücreye Konjugasyon ile gen aktarımı ve Hfr hücre (İnt. Kyn.7)

Özellikle kısa süre içerisinde çok antibiyotik dirençli (multiple-drug resistance) suşların ortaya çıkıp yayılmasında transpozonların rolleri bulunmaktadır (Öztürk 2002). İntegronlar spesifik bir yere yerleşmiş olan bir veya daha fazla direnç genini ve mobil elementlerdeki (gen kasetleri) direnç genlerini yakalayabilen hareketli DNA elemanlarıdır (Büyükkaya 2012). İntegronlara, bağımsız olarak plazmidlerde veya transpozon (Tn21) ailesinin bir bölümü olarak rastlanmaktadır. İntegronlar bölgeye spesifik rekombinasyon için gerekli enzimleri kodlayan 5' ucunda bir integras gen (int), onun yanında gen kasetleri için bir reseptör geni ve gen kasetlerinin ekspresyonu için bir promotörden oluşurlar. Gen kasetleri ise bir veya daha fazla gen ve her bir genin 3' ucunda 57-141 baz çiftlik integras spesifik rekombinasyon bölgesi içeren yapılardır. İntegronlar içerisindeki korunmuş kaset dizilimleri, farklı plazmidlerdeki integronlar arasında kaset değişimine neden olabildiklerinden direnç gelişiminde önemli rol oynarlar (Kuyucu 2007, Büyükkaya 2012).

2.8.Fitness Cost (Uyum Gücü)

Günümüzde antibiyotiklere dirençli mikroorganizmalar gittikçe artış göstermektedir. Direnç ya intrinsik olarak kromozomal gendeki mutasyonlardan ya da eksojen genlerin genetik materyallerindeki direnç belirleyicilerin kazanılması sonucu ortaya çıkmaktadır. Antibiyotiklere direnç sıklıkla antibiyotik yokluğunda bakterinin ortama uyumunu (fitness) azaltır; buda direncin cost'u (bedeli) olarak ifade edilir (Spratt 1996). Bir başka deyişle antibiyotik direnç genleri taşıyan organizmalar optimum koşulların bulunduğu ortamlarda direnç genleri taşımayan türlerine oranla daha az gelişim gösterirler. Bunun nedeni ekstra taşıdıkları direnç genlerinin replikasyonu için fazladan ATP'ye ihtiyaç duymalarıdır.

Evrimsel biyolojide fitness, tüm doğal seleksiyon teorisi ile ilgili bir terim olup Darwin'in hayatta kalmayı başaran en uygun ve verimli bireyleri tanımlamak için kullandığı terimdir. Fitness'ı ve bileşenleri anlamak evrimsel değişimi anlamının anahtarıdır. Mutasyon oluşumu bakteriye direnç kazandırabilmektedir ki, böylece hücrede normal fizyolojik süreçlerin bazılarında bozulmalara sebep olabilir. Böylece zararlı olan yan etkiler meydana gelebilir. Direnç fonksiyonunu şifreleyen genler plazmidler ile aktarılmaktadır. Bu durumda bakteriler ekstra nükleik asit ve protein sentezlemek durumunda kalmaktadırlar, dolayısıyla bu sentez enerjetik bir yük getirmektedir ve ürünler hücrenin fizyolojisini etkileyebilir. Dirençli olan bakteriler antibiyotik yokluğunda duyarlı genotiplere rakiptir. Bu durumda, direncin yayılması için yeni bir strateji ile dirençli genotiplerin frekansı düşürmek için antibiyotik kullanımı ertelenmelidir. Bu stratejinin etkinliği kısmen de olsa bakterinin antibiyotiğe olan costuna bağlıdır. Antibiyotik tedavisi sırasında bazı duyarlı bakterilerin de yaşadığı varsayıldığında (ya da tedavi sonrası kolonize durumunda), dirençli bakterileri azaltmak için gerekli zaman direncin costu ile ters orantılıdır. Örneğin, %10 olan direncin costu ile %1 olan direncin costu karşılaştırıldığında, dirençli bakteri popülasyonunu elimine etmek için gerekli olan zaman 10 katı kadardır. Bu nedenle antibiyotik kullanımının ertelenmesi ile antibiyotik direncin yayılmasındaki kontrolü, antibiyotik yokluğundaki duyarlı ve dirençli genotiplerin relative fitnessa bağlıdır (bağımlıdır).

Çalışmada, bakterilerin açısından antibiyotik direncinin costu değerlendirilmesi ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Temel bulgular iki yönlüdür. Antibiyotik direncinin costu gelişebilir ve doğal seleksiyonla zaman içerisinde azalma eğilimin gösterir. Farklı bir ifadeyle, dirençli bakteriler sıklıkla antibiyotik yokluğunda duyarlılar ile rakip halindedir. Ne yazık ki, bu eğilim dirençli suşların yayılımının zamanla kontrolünün daha da zorlaşacağı anlamına gelmektedir.

Antibiyotik kullanımının azalması ilaca olan direnç oranını genellikle düşürür fakat kaybetmez. Yapılan çalışmalarda doğrudan seçici etkinin yani antibiyotiğin yokluğunda direnç oranları stabil olarak gözlemlenmiştir. Seçici etkiyi koruyan düşük düzeydeki antibiyotik kontaminasyonu, antibiyotikler dışındaki diğer yollarla seçimin gerçekleşmesinin ve dirençli genlerin stabilitesinin buna yol açabileceği düşünülmektedir.

Antibiyotiklere olan bakteriyel adaptasyon iki adımda kazanılır. İlki direnç mekanizmasının kazanılması ile uyumun azalması, sonra bakterilerde buna ek olarak direnç kaybı olmaksızın telafi edici mutasyonların kazanılması ile direnç mekanizmasının varlığına adaptasyon sağlanır. Son çalışmalar ikinci basamağın farklı genlerde ya da etkilenen hedef geninin gen amplifikasyonunda oluşabileceğini göstermiştir (Sandegren and Anderson, 2009).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Ocak 2012-Mayıs 2013 tarihleri arasında, Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında, çeşitli klinik örneklerden; koloni morfolojisi, Gram boyama, katalaz, tüp koagülaz, mannitol ve oksasilin disk difüzyon testlerinin sonucunda, MRSA olarak saptanan 364 adet *S. aureus* suşu incelenmeye alınmıştır.

3.1.1. Besiyerleri

Kanlı Agar (Oxoid, CM0055B)

| | |
|----------------------|-----|
| Et ekstraktı | 10g |
| Pepton | 10g |
| Sodyum klorid (NaCl) | 5g |
| Agar | 15g |

Kanlı agar hazırlamak için, 40 g toz halindeki besiyeri, balon joje içerisinde bir litre distile su eklenerek sıcak su banyosunda eritilmiştir. Daha sonra pH 7,3' e ayarlanarak 121°C de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. Besiyeri 45-50°C ye kadar soğumaya bırakılarak, içerisine 50 ml defibrine steril insan kanı ilave edilmiştir. Daha sonra karıştırılarak uygun sıcaklıkta ve aseptik koşullarda 4 mm kalınlığında petri kutularına aktarılmış. Aktarılma işleminden sonra soğumaya bırakılmıştır. Kültür örneklerinden Stafilokokların ilk izolasyonu için kullanılmıştır.

Mannitol Tuz Agar (MTA) (Oxoid, CM0085B)

| | |
|-----------------|-----|
| Sığır ekstraktı | 1g |
| Pepton | 10g |
| D-Mannitol | 10g |
| Agar | 15g |

| | |
|----------------------|---------|
| Sodyum klorid (NaCl) | 75,000g |
| Fenol kırmızısı | 0,025g |

Toz halindeki besiyerinden 111 g tartıp balon joje içerisinde bir litre distile suda eritilerek, pH 7,4' e ayarlanmış. Sterilize olması için 121°C de 15 dakika otoklava bırakılmıştır. Uygun sıcaklıkta, aseptik koşullarda 4 mm kalınlığında petri kutularına aktararak soğumaya bırakılmıştır. Mannitol Tuz Agar (MTA), *S. aureus* izolasyonu için selektif besiyeri olmasından dolayı koagülaz negatif stafilokoklardan ayrıştırılmasında kullanılmıştır.

Mueller-Hinton Agar (MHA) (Oxoid, CM337B)

| | |
|-------------------|---------|
| Sığır ekstraktı | 300,00g |
| Kazein hidrolizat | 17,50g |
| Nişasta | 1,50g |
| Agar | 17,00g |

Toz haldeki hazır besiyeri karışımından 38 g tartılıp 1000 ml distile su içinde çözünmesi sağlanmıştır. pH'sı 7,3'e ayarlandıktan sonra otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Uygun sıcaklıkta, aseptik koşullarda 4 mm kalınlığında petri kutularına aktarılma işleminden sonra soğumaya bırakılmıştır. Kullanılan antimikrobiyal ajan ya da ajanların *S. aureus*'a karşı in-vitro etkinliğini saptamak amacıyla uygulanmıştır.

Mueller-Hinton Broth (MHB) (Oxoid, CM0405B)

| | |
|-------------------|---------|
| Sığır ekstraktı | 300,00g |
| Kazein hidrolizat | 17,50g |
| Nişasta | 1,50g |

38 g toz halindeki besiyeri bir litre distile suda eritilmiş. pH'ı 7,3'e ayarlanarak 121°C de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. Uygun sıcaklık, aseptik koşullarda 4 mm kalınlığında petri kutularına aktararak soğumaya bırakılmıştır. Antimikrobiyal ajanın

S. aureus' un üremesini inhibe etmek veya öldürmek için gerekli olan minimum konsantrasyonunu belirlemek için uygulanmıştır.

Brain Heart Infusion Broth (BHIB) (Oxoid, CM1135B)

| | |
|---------------------|--------|
| Beyin infüzyon | 12,5g |
| Sığır kalp infüzyon | 5,00g |
| Glukoz | 2,00g |
| Disodyum fosfat | 2,50g |
| Proteoz pepton | 10,00g |
| Sodyum klorid | 5,00g |

37g dehidrate besiyeri balon içerisinde bir litre distile suda eritilmiş, pH 7,4'e ayarlanmıştır. 121°C de 15 dakika otoklavda sterilize edilmesi sağlanmıştır. Uygun sıcaklıkta ve aseptik koşullarda 4 mm kalınlığında petri kutularına aktarılmıştır. Saklama besiyerindeki izolatların canlandırılması ile geleneksel yöntemlerle birlikte identifikasyon amacıyla kullanılmıştır.

CHROMagar-MRSA Besiyeri (PREMED)

| | |
|---------------------|---------|
| Pepton ve maya agar | 40,0g/l |
| Tuz | 25,0g/l |
| Kromojenik mix | 2,5g/l |
| Agar | 15,0g/l |

82,5 g dehidrate besiyeri balon içerisinde bir litre distile suda eritilmiş, pH 6,9'a ayarlanarak hazırlanmıştır. 121°C de 15 dakika otoklavda sterilize edilerek, uygun sıcaklıkta sağlanmıştır. Aseptik koşullarda 4 mm kalınlığında petri kutularına aktarılmıştır. CHROMagar-MRSA besiyeri, MRSA identifikasyonu için kullanılmıştır.

Saklama Besiyeri (%16 lık Gliserollü Buyyon)

| | |
|----------------------------|------|
| Tripton soy broth dekstroz | 1g |
| Gliserol | 10ml |

Kimyasallar 40 ml distile su içerisinde tamamen çözülünceye kadar manyetik karıştırıcı da karıştırılmıştır. pH 7,2'ye ayarlanarak 121°C de 15 dakika otoklav ile sterile edilmesi sağlanmıştır. Steril şartlarda, yaklaşık 1,5 ml'lik ependorf tüplerine dağıtılmıştır. Saf koloni kültürlerinin canlı kalmasının yanında mümkün olduğu kadar genetik, fizyolojik değişikliklere uğramaması amacıyla saklama besiyerleri kullanılmıştır.

Kullanılan Antibiyotik Diskleri

İzole edilen suşların antibiyotik duyarlılıklarını belirlemek için Oksasilin (OX-1µg, Oxoid), Penisilin (P-10U, Oxoid), Sefepim (FOX-30µg, Oxoid), Trimetoprim-Sulfametoksazol (SXT-25µg, Oxoid), Ampisilin-Sulbaktam (SAM-20µg, Oxoid), Seftriakson (CAZ-30µg, Oxoid), Vankomisin (VA-30µg, Oxoid), Teicoplanin (TEC-30µg, Oxoid), Linezolid (LZD-30µg, Oxoid), Sefotaksim (CTX-30µg, Oxoid), Siprofloksasin (CIP-5µg, Oxoid) diskleri kullanılmıştır. Ayrıca çalışmada MİK hesaplanması hem de uyum gücü deneyleri için Oxacillin (Sigma, 28221-1G) antibiyotiği kullanılmıştır.

3.2. Metot

Çalışma için Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulunun 06.09.2012 tarihinde, 2012/5 toplantı numaralı 42 sayılı kararı ile söz konusu araştırmanın yapılmasında etik açıdan sakınca olmadığına dair onay alınmıştır. Tüm hastaların çalışma ile ilgili bilgilendirilmesi yapılmıştır.

3.2.1.Klinik Örneklerden *S. aureus* İzolasyonu ve İdentifikasyonu

Yara, kan, trakeal aspirat, idrar, balgam, burun, beyin omurilik sıvısı (BOS), bronş

lavajı örnekleri ve diğerklinik örnekler %5 kanlı agar besiyerine ekimleri yapılmıştır. Ekim sonrası 35-37°C'de, 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İdentifikasyonun yapılması amacıyla Gram boyama yapıldıktan sonra Gram pozitif (+) koklara katalaz, tüp ve lam koagülaz, mannitol tuz agar gibi konvensiyonel yöntemler uygulanmıştır.

İzolatların saf kültürleri %16 gliserollü buyyona inoküle edildikten sonra yapılması planlanan çalışmalar için -20°C de saklanmıştır.

3.2.1.1.Katalaz Testi

Hidrojen peroksidi (H₂O₂) parçalayarak su ve oksijene dönüştüren enzim katalazdır (Gültekin, 1999). İzolasyonu yapılan *S. aureus* suşlarında katalaz aktivitesini araştırmak için; petri kabından alınan bir koloni, temiz bir lam üzerinde bir damla fizyolojik tuzlu su (FTS) içerisinde süspanse edilmiştir. Koloni ve FTS nin üzerine 1-2 damla taze hazırlanmış %3'lük H₂O₂ damlatılmıştır. Reaksiyon sonunda oksijen kabarcıklarının oluşması testin pozitif olduğu anlamına gelir. Eritrositlerde de katalaz enzimi bulunduğundan dolayı, test edilecek bakteri kan içermeyen bir besiyerinden alınmasına dikkat edilmiştir. *Staphylococcus* türleri katalaz pozitif, *Streptococcus* türleri ise katalaz negatiftir. Pozitif kontrol olarak *S. aureus* ATCC 29213 suşu kullanılmıştır (Forbes *et al.* 2007).

3.2.1.2.Koagülaz Testi

Lam deneyinde, kültür filtratına geçmeyen ve bakteri hücresi yüzeyinde bulunan bağlı koagülaz (clumping factor = kümeleştirici faktör) araştırılması yapılmıştır. Bakteri yüzeyindeki faktörün plazmadaki fibrinojeni pıhtılaştırılması bakterilerin kümeleşmesine yol açmaktadır. Lam testinde temiz bir lamın uç kısımlarına birer damla distile su damlatılmış, kolonilerinden öze ile bir miktar alınarak homojen süspanسیونlar elde edilmiştir. Elde edilen bu süspanسیونların birisinin üzerine bir damla etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)'lı kan plazması, diğerkinin üzerine bir damla FTS damlatılmıştır. Negatif kontrol olarak kullanılan FTS de kümeleşmenin olmaması beklenir. Tavşan plazması damlatılan tarafta 5-10 saniye içerisinde gözle görülür kümelerin oluşması

testin pozitif olduğunu göstermiştir. Çalışmada kontrol olarak *S. aureus* ATCC 29213 suşu kullanılmıştır (Koneman *et al.* 2006, Forbes *et al.* 2007).

Lamda koagülaz deneyi sonrası elde edilen veriler doğrultusunda, yalancı pozitif veya yalancı negatif sonuçların doğrulanması amacıyla şüpheli görülen suşlara tüpte koagülaz deneyi yapılmıştır. Bu amaçla; steril olan bir deney tüpü içerisine 1 ml fizyolojik tuzlu su ile 1:5 oranında hazırlanmış sitratlı insan plazması eklenmiştir. 37°C de 24 saat kanlı agarda inkübe edilerek üreyen saf stafilokoklardan bir koloni, steril öze ile alınarak plazma içerisinde süspanse edilmiştir. Daha sonra 37°C de etüve inkübasyon için bırakılmıştır. Dördüncü saat sonunda negatif çıkan suşlar oda ısısında 18-24 saate kadar inkübe edilmiştir. Süre sonunda koagülaz görülen tüpler pozitif olarak değerlendirilmeye alınmıştır. Kontrol olarak *S. aureus* ATCC 29213 kullanılmıştır (Bilgehan 1995, Winn *et al.* 2006).

3.2.1.3.Mannitol Tuz Agar (MTA)

Stafilokokların glukozu parçalaması fermentasyon ile gerçekleşirken son ürün olarak da laktik asit oluştururlar. Laktoz, sükroz, mannoz, trehaloz ve maltoz gibi karbonhidratları da fermente edebilirler. Fakat mannitolü ise Stafilokoklardan sadece *S. aureus* fermente eder (Cengiz 2003). *S. aureus*, ayırt edici besiyeri olan mannitol tuz agarda yüksek yoğunluktaki tuz varlığında gelişim gösterir. Mannitolu fermente ederek, koloniler etrafındaki sarı renk oluşturmasıyla diğer Stafilokoklardan ayrılır. Fakat diğer bazı stafilokoklar (örn. *S.saprophyticus*) da mannitolu fermente ederek benzer koloniler oluşturabilir. Mannitol tuz agar ve diğer ayırt edici besiyerlerinde üremenin belirlenmesi için 48–72 saat inkübasyon gerekli olabilir (Tünger 2004).

Mannitol fermentasyon testi için, saf kültür olarak izole edilen suşlar MTA' a inoküle edilmiştir. Aerob ortamda 37°C de 18-24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Mannitolü fermente eden suşlar besiyerinde sarı-turuncu renginde koloniler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Koneman 2006, Forbes 2007).

3.2.2. Bauer Kirby Disk Difüzyon Testi İle Antibiyotik Direncinin Belirlenmesi

Antibiyotik duyarlılık testlerinde Müeller-Hinton Agar kullanılarak Kirby-Bauer Disk Difüzyon yöntemi ile CLSI' nin önerileri doğrultusunda uygulanmıştır (Qoronfleh and Wilkinson 1986, Wikler *et al.* 2007).

Bauer Kirby disk difüzyon testinde Oksasilin (OX), Sefepim (FOX), Penisilin (P), Trimetoprim-Sulfametoksazol (SXT), Ampisilin-Sulbaktam (SAM), Seftriakson (CAZ), Vankomisin (VA), Teicoplanin (TEC), Linezolid (LZD), Sefotaksim (CTX), Siprofloksasin (CIP) antibiyotik diskleri kullanılmıştır.

Metisilin dirençli *S. aureus* izolatlarının saptanması amacıyla 1 µg oksasilin diski ile 30 µg sefoksitin diski kullanılmıştır. 0,5 Mc Farland bulanıklığa ayarlanmış olan bakteri süspansiyonundan Mueller Hinton agara (MHA) 1 ml ekim yapıp steril eküvyonla besiyerinin yüzeyine yayılması sağlanmıştır. Daha sonra pensetle kenardan 1,5 cm ve birbirlerinden 1,5 cm olacak şekilde oksasilin ve sefepim disklerinin yerleştirilmeleri sağlanmıştır. Plaklar 35°C' de 24 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda disk etrafında oluşan zon çapı ölçülerek duyarlı ya da dirençli olarak değerlendirilmiştir (CLSI 2012). Standart suş olarak ATCC 29213 kullanılmıştır.

S. aureus için oksasilin zon çapı ≤ 10 mm olanlar dirençli, 11-12mm olanlar orta duyarlı, ≥ 13 mm olanlar ise duyarlı olarak kabul edilmiştir (CLSI 2012).

S. aureus için sefoksitin zon çapı; ≥ 22 mm olanlar duyarlı, ≤ 21 mm olanlar ise dirençli olarak kabul edilmiştir (CLSI 2012).

Stafilokokların 0,5 Mc Farland değerindeki buyyon kültürlerinden plak besiyerinin yüzeyine her tarafa eşit şekilde yayılacak şekilde ekimleri yapılmıştır. Ekim yüzeyinin kuruması için birkaç dakika beklenildikten sonra antibiyotik disklerin ucu alevden geçirilerek steril edilmiştir. 35°C de 28-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası antibiyotik disklerinin çevresindeki oluşan inhibisyon zonları değerlendirmeye alınmıştır (CLSI 2012).

3.2.3. Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* Suşlarının Geleneksel Yöntemlerle Belirlenmesi

3.2.3.1. Oksasilin ve Siprofloksasin Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Mikroorganizmanın antibiyotiklere olan duyarlılığını belirlemek amacıyla dilüsyon teknikleri geliştirilmiştir. Dilüsyon tüp serilerinde madde dilüsyonları hazırlanarak kültürün ilave edilir. Antimikrobiyal ajan ile mikroorganizma etkileşimi gerçekleştirilmektedir. İnkübasyon sonrası test edilen antimikrobiyal ajanın, kullanılan mikroorganizmaya karşı hangi konsantrasyonda etkili olduğu üremenin varlığına veya yokluğuna göre belirlenebilmektedir. Üremenin varlığı ya da yokluğu bulanıklık tayiniyle yapılmaktadır. Şayet üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon değeri, MİK değeri olarak tanımlanmaktadır (Cowan 1999).

Yapılmış olan çalışmada oksasilin'in *S. aureus*'a olan MİK değerini belirlemek amacıyla makrobroth dilüsyon tekniği kullanılmıştır. Bu amaçla, Mueller-Hinton buyyonunda ticari olarak hazırlanan oksasilin'in dilüsyonları hazırlanmıştır. Gittikçe azalan yoğunlukta dilüsyonlar için oksasilin, 1 ml'de 256 µg'dan başlayarak, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,12 µg/ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Üzerlerine, *S. aureus*'un 24 saatlik sıvı besiyeri kültüründen 0,1 ml ekimi yapılmıştır. Karıştırma işlemi yapılarak 24 saat 37 °C' de inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda tüplerdeki üreme durumu değerlendirilmiştir. Üremenin olmadığı en küçük dilüsyon oksasilin MİK değeri olarak belirlenmiştir. Ancak, bu noktanın kesin olması için, test iki paralel olarak çalışılmıştır. Kontrol suşu olarak dirençli *S.aureus* standart suşu kullanılmıştır.

Oksasilin için yapılan MİK belirleme testi siprofloksasin antibiyotiği içinde uygulanmıştır.

3.2.3.2. Metisilin Direncinin CHROMagar Test Yöntemi ile Belirlenmesi (PREMED)

Son yıllarda, MRSA identifikasyonunda kullanılmak üzere geliştirilen, yaygın olarak kullanılan selektif ile diferansiyel katı besiyerlerinden de yararlanılmaktadır. Kromojenik besiyerleri hem aranan çoğul dirençli patojenin seçilmesini sağlayan hem de içerdikleri diğer ayraçlar sayesinde farklı koloni renkleri oluşturarak tür ayırımına olanak veren besiyerleridir. MRSA için kullanılan kromojenik besiyerlerinin bir kısmında seçici antibiyotik olarak sefoksitin bulunmaktadır. Chromagar MRSA bu tip besiyeridir (Van *et al.* 2007).

MRSA olarak tanımlanan 50 suş için bu test yöntemi uygulanmıştır. Bu amaçla, 0,5 Mc Farland bulanıklığa ayarlanmış olan bakteri süspansiyonundan steril bir eküvyon yardımıyla chromagar plağına homojen bir şekilde yayılması sağlanmıştır. Daha sonra plak 37 °C de 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kromojenik agarda üreyen eflatun renkli koloniler MRSA olarak tanımlanmıştır.

3.2.4. Metisiline Dirençli *S. aureus* İzolatlarında *spa*, SCC, *mecA* genlerinin qualitative rt-PZR ile Belirlenmesi

spa, SCC, *mecA* genleri Xpert MRSA/SA PZR yöntemi TM kullanılarak, qualitative rt-PZR (Cepheid) cihazı (Resim 3.1) araştırılmıştır.



Resim 3.1. qualitative rt-PZR cihazı ve çalışma kitinin görüntüsü.

Qualitative PZR, belirli bir hedef sekansın varlığını ya da yokluğunu tespit etmede kullanılmaktadır. Aynı zamanda farklı splaying formlarında, farklı olan tek nükleotid polimorfizmler arasında ve vahşi tip ile mutant tiplerin ayırımında kullanılan bir tekniktir. İki alel için farklı floroforlar (fluorophore) kullanılır, florofor sinyallerinin oranı diğeri ile karşılaştırıldığında bir formun miktarı ile ilişkili olur. En yaygın kullanılan multipleks reaksiyon, qualitative PZR yöntemidir.

Çalışmada geleneksel yöntemlerle MRSA olarak tanımlanan, hem oksasiline hem de sefoksitine dirençli olup oksasiline olan MİK değeri en yüksek olan 50 suş *GeneXpert MRSA/SA PZR yöntemi*TM ile *spa*, *SCC*, *mecA* genlerinin varlığı araştırılmıştır. Bu yöntem bir multipleks PZR yöntemi olup, *spa*, *SCC* ve *mecA* genleri birlikte çalışılmaktadır.

Kan kültür örnekleri için geliştirilmiş bu yöntemde modifikasyonlar yapılarak izolatların 0,5 Mc Farland süspansiyonu steril distile su içerisinde yapılmıştır. 0,5 Mc Farland süspansiyonlardan suşların 1/1000 oranında yine steril distile su kullanılarak dilüsyonları hazırlanmıştır. Bu dilüsyonlardan 100 µl alınarak kitin içindeki elution reagent tüpüne eklenmiştir. Vorteksleme işlemi yapılarak homojen dağılımı sağlanmıştır. Bu tüpten yaklaşık olarak 910 µl alınarak kartuşun sıvı bölümüne ilave edilmiştir. Yapılan bu işlemler sonrası kartuşun barkodu okutularak cihaza yüklenmesi ile birlikte kayıtları yapılmıştır. Böylelikle çalışma başlatılmıştır. Oluşan piklere göre *spa*, *SCC* ve *mecA* gen bölgeleri tanımlanmıştır.

3.2.5. Uyum Gücü Deneyleri

3.2.5.1. Suşların Gelişim Oranlarının Belirlenmesi

Qualitative real-time PZR ile *spa*, *scc* ve *mecA* genlerinin varlığı saptanan 2 MRSA (3R, 36R) ile aynı yöntemle MSSA olduğu belirlenen 1 izolat (27S) Uyum gücü deneyleri için seçilmiştir.

İzolatların gelişim oranları microplate'da 600 nm'de spektrofotometrede absorbansları

belirlenmiştir (Resim 3.2) (Johnsen et al. 2002). Yöntemde oksasilin MİK değeri belirlenen suşlardan en dirençli olan iki suş kullanılmıştır. Bu suşların MİK değerlerinin 1/50 oranında oksasilinli ve oksasilinsiz olarak BHI brothda kültürleri hazırlanmıştır. 37°C de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası kültürler, BHI broth besiyerinde yine oksasilinli ve oksasilinsiz olarak 1/20 oranında dilüe edilmiştir. 37°C çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakılmıştır.



Resim 3.2. Microplatelerin absorbans değerlerinin ölçüldüğü spektrofotometre cihazı.

Kültürler, durgun fazın başlangıcında, 200 µl BHI broth da yaklaşık 10^5 olması için 1/1000 oranında dilüe edilmiştir. Hazırlanan bu kültürden 200µl 96' lık mikroplatlerin kuyucuklarına eklenerek 37°C çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra 600 nm de 15-20 dakika aralıklarla absorbans değerleri kaydedilmiş (Foucault *et al.* 2009). Gelişim oranları aşağıdaki formül kullanılarak matematiksel olarak hesaplanmıştır. Hesaplamalarda 600 nm de optik densitenin 0,1 ve 0,2 olduğu aralık kullanılmıştır.

$$\mu = [\ln(N_t) - \ln(N_0)] / (t - t_0)$$

N: populasyon yoğunluğu

µ: gelişim oranı

t: zaman

MSSA ve MRSA izolatlarından elde edilen populasyon yoğunluğu değerleri karşılaştırılarak relative gelişim oranları hesaplanmıştır (Foucault *et al.* 2009).

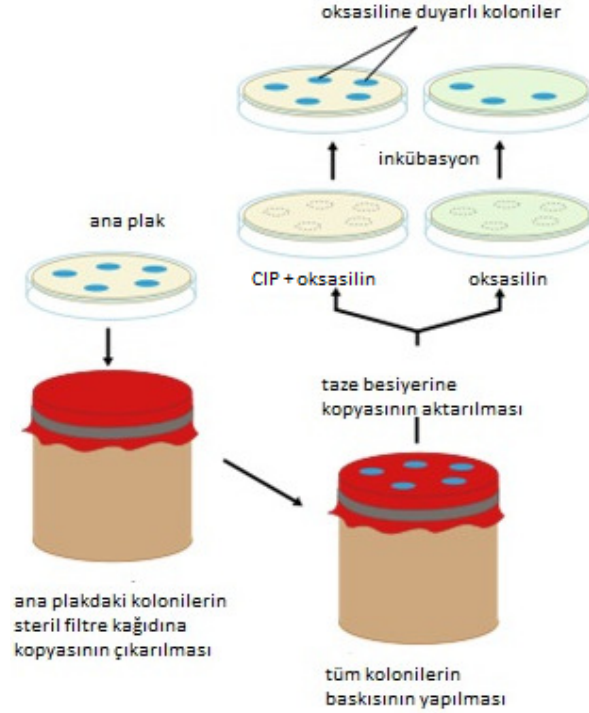
3.2.5.1.MRSA ve MSSA' ların Gelişime Bağlı Rekabet Deneyleleri

Fitness, metisiline dirençli (transkonjugant-3R) ve metisiline duyarlı (alıcı-27S) olan *S. aureus* suşları arasında rekabete bağlı olan deneylerde 1:1, 1:100 ve 100:1 oranlarında kültürler hazırlanarak belirlenmiştir. Kùltürler tüm deneyler taze olarak hazırlanmış BHI broth besiyeri ile yapılmıştır. Deneylere başlamadan önce dirençli ve duyarlı olan suşlar BHI broth besiyerinde 37°C gelişime bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası etüvden çıkarılan her bir kültürden 600 nm de ölçüm yapılmış, absorbans değeri 1 olana kadar BHI broth da 37°C de gelişime bırakılmıştır. Absorbans değeri 1 olan kültürler 1000 kat dilüe edildikten sonra, transkonjugat suşların her biri alıcı 27S izolatu ile her biri 5×10^5 CFU/ml olacak şekilde 2 ml BHI broth besiyerinde karıştırılarak hazırlanmıştır. İzolatların 5×10^5 CFU/ml hazırlamak için 18-24 saatlik taze kültürden koloniler alınarak 0,5 Mcfarland'a ayarlanmıştır. 15 dakika BHI besiyerinde bekletilmiş ve sonraki işlemler için 96 kuyucuklu platerler kullanılmıştır. 0,5 Mcfarland olarak hazırlanan süspansiyon (1×10^8 CFU/ml) 1/10 oranında dilüe edilmiştir. Dilüsyon sonucunda ise 10^7 CFU/ml elde edilmiştir. Kuyucukta bulunan 100 µl besiyerine 10^7 ' den 5 µl eklenerek istenen 5×10^5 CFU/ml elde edilmiştir.

1:1, 1:100 ve 100:1 oranlarında hazırlanan karışık kültürler üç gün süresince inkübe edilerek yaklaşık 8 saatte bir örnek alınarak replika plate tekniğı kullanılarak dirençli duyarlı ve transforme olan (Rt) duyarlı bakterilerin sayımı yapılmıştır. Replika plate tekniğinin uygulaması kısaca şu şekilde gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1). İnkübasyona bırakılan karışık kültürlerin. ekim için iki farklı besiyeri kullanılmıştır. İlk besiyeri hem antibiyotiğıe duyarlı hemde dirençli izolatların geliştiğı, içeriğinde oksasilin bulunmayan besiyeri, ikincisi ise sadece oksasiline dirençli izolatların gelişebildiğı minimum antibiyotik konsantrasyonu olan 4µg/ml oksasilin bulunan besiyeridir. 37°C de bir gece inkübasyon sonrası hem oksasilinli hem de oksasilin içermeyen plaklar üzerindeki kolonilerin sayımı yapılarak kaydedilmiştir. Daha sonra oksasilinli besiyerinden steril filtre kağıdı kullanılarak ana plak üzerindeki tüm kolonilerden örnek alınarak hem oksasilin hem de siprofloksasin içeren besiyerine kopyası aktarılmıştır. 37°C de bir gece inkübasyon sonrası plak üzerindeki koloniler sayılarak başlangıçtaki dirençli bakteriler ile Rt'lerin ayrımı yapılarak koloni sayıları kaydedilmiştir. Elde edilen veriler Log10

tabanına göre cfu/ml (1 ml içerisinde koloni oluşturacak bakteri sayısı) hesaplanmıştır. Relative fitness competition indeks (CI) olarak ifade edilmiştir. Dirençli ve duyarlı suşların t1 ve t0 zamanlarındaki CFU oranların karşılaştırılması ile aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Björkman and Andersson, 2000). Deneyler sonrasında oksasiline direnç kazanmış olduğu düşünülen koloniler, disk difüzyon yöntemi kullanılarak oksasilin ve siprofloksasin direnci kontrol edilmiştir. Ayrıca *mec* direnç geninin aktarılıp aktarılmadığının tespiti için 2 Rt kolonisine GeneXpert MRSA/SA PZR yöntemi TM uygulanmıştır.

CI= (antibiyotik dirençli bakteri/antibiyotik duyarlı bakteri)(t1) / (antibiyotik dirençli bakteri/antibiyotik duyarlı bakteri) t0.



Şekil 3.1. Replika Plate yöntemi kullanılarak antibiyotik direnci kazanmış duyarlı bakterilerin seçimi (İnt. Kyn.8). CIP: Siprofloksasin

3.2.6 Verilerin İstatiksel Değerlendirilmesi

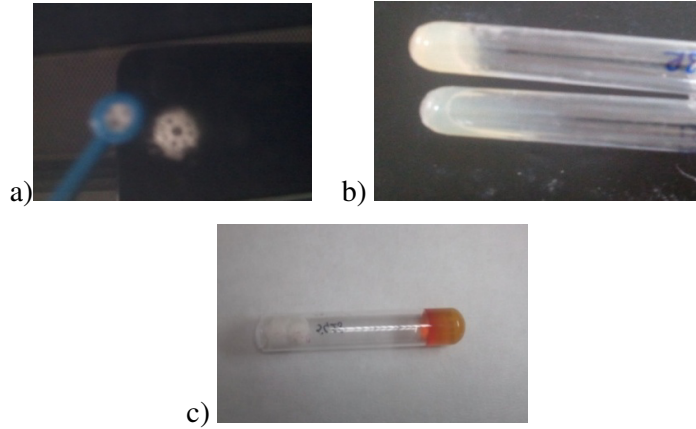
Parametrik testlerden iki örneklem t testi ve gruplar arasındaki farklılıkları ve benzerlikleri tespit etmek amacıyla Tukey_{HSD} varyans analizi kullanılmıştır (P=0,5). Gruplar arasındaki ilişkilendirme lineer regresyon kullanılarak analiz edilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmamızda, Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına Ocak 2012-Mayıs 2013 tarihleri arasında gelen çeşitli klinik örneklerden 424 Stafilokok suşu izole edilmiştir. Bunların 364'ü *S. aureus* olarak tanımlanmıştır. Tanımlanan izolatların metisiline olan duyarlılıkları hem geleneksel hem de moleküler yöntemlerle saptanmıştır. İdentifikasyonu yapılan MRSA (3R, 36R) ve MSSA (27S) izolatlarının gelişim oranları belirlenerek uyum güçleri hesaplanmış ve de 3R izolatından 27S izolatına *mec* gen aktarımının gerçekleşip gerçekleşmediği araştırılmıştır.

4.1. İzole Edilen *S. aureus* suşlarının Klinik Örneklerle Göre Dağılımı

Geleneksel yöntemlerle [Gram boyama, katalaz, koagülaz ve mannitol fermantasyon testi (Resim 4.1)] *S. aureus* olduğu saptanan 364 izolatın 158'i kandan (%43,40), 116'sı yaradan (%31,86), 34'ü endotrakeal aspirat ucundan (%9,34), 24'ü idrardan (%6,59), 8'i balgamdan (%2,19), 4'ü burundan (%1,09), 4'ü bronş lavajından (%1,09), 8'i beyin omurilik sıvısından (%2,19) ve 8 tanesi de diğer örneklerden (%2,19) elde edilmiştir (Tablo 4.1).



a) katalaz testi, b) koagülaz testi c) mannitol testi

Resim 4.1. Klinik örnekler izolatlarının geleneksel yöntemlerle identifikasyonu.

Tablo 4.1. İzole edilen *S. aureus* suşlarının klinik örneklerle göre dağılımı

| Örnekler | Sayı (%) |
|--------------|-------------|
| Kan | 158 (43,40) |
| Yara | 116 (31,86) |
| ETT | 34 (9,34) |
| İdrar | 24 (6,59) |
| Balgam | 8 (2,19) |
| Burun | 4 (1,09) |
| Bronş Lavajı | 4 (1,09) |
| BOS | 8 (2,19) |
| Diğer | 8 (2,19) |
| n | 364 |

ETT: Endotrakeal aspirat ucu, BOS: Beyin Omurilik Sıvısı, n: toplam

424 sayıda Sıtafilokok izolatının 364'ü geleneksel yöntemlerle *S. aureus* olarak tanımlanmıştır. Tablo 4.1'de görüldüğü gibi 364 *S. aureus* izolatının %43,40'ı kan örneklerinden ve %31,86'sı yaradan izole edilmiştir.

4.2. *S. aureus* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıkları

S. aureus suşlarının örneklerle göre disk difüzyon yöntemi ile çoğul antibiyotik duyarlılıklarının araştırma sonuçları Tablo 4.2'de verilmiştir. 364 *S. aureus* izolatının 207'sinin (%56,9) penisiline dirençli iken, 192 (%52,7) tanesinin de ampisilin sulfaktama dirençli olduğu belirlenmiştir. Bronş lavajı izolatlarında antibiyotik direnci gözlenmemiştir.

Tablo 4.2. *S. aureus* suşlarının disk difüzyon yöntemi ile çoğul antibiyotik duyarlılık sonuçları.

| Antibiyotik | P | | | FEP | | | SXT | | | SAM | | | CRO | | | VA | | | TEC | | | LZD | | |
|-------------|-----|---|---|-----|---|----|-----|---|----|-----|---|----|-----|---|----|----|---|-----|-----|---|-----|-----|---|-----|
| | R | I | S | R | I | S | R | I | S | R | I | S | R | I | S | R | I | S | R | I | S | R | I | S |
| Kan | 106 | 2 | 4 | 84 | - | 28 | 96 | 1 | 5 | 99 | 1 | 11 | 89 | 3 | 10 | - | - | 112 | - | - | 112 | - | - | 112 |
| Yara | 43 | - | 1 | 38 | 1 | 5 | 24 | - | 2 | 41 | 1 | 2 | 39 | 1 | 4 | - | - | 44 | - | - | 44 | - | - | 43 |
| T. A | 28 | - | - | 23 | | 5 | 25 | - | 3 | 26 | - | 2 | 26 | - | 2 | - | - | 27 | - | - | 28 | - | - | 28 |
| İdrar | 11 | - | - | 10 | - | 1 | 10 | 1 | - | 9 | - | 2 | 9 | - | 2 | - | - | 10 | - | - | 11 | - | - | 11 |
| Balgam | 4 | 1 | - | 5 | - | - | 4 | - | 1 | 3 | 1 | 1 | 3 | 1 | - | - | - | 4 | - | - | 4 | - | - | 4 |
| Burun | 3 | - | - | 2 | 1 | - | 3 | - | - | 3 | - | - | 2 | 1 | - | - | - | 3 | - | - | 3 | - | - | 3 |
| Bronş | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Lavajı | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| BOS | 5 | - | 1 | 5 | 1 | - | 6 | - | - | 4 | - | 2 | 3 | 1 | 1 | - | - | 5 | - | - | 5 | - | - | 5 |
| Diğer | 7 | - | - | 5 | - | 2 | 5 | 1 | 1 | 7 | - | - | 6 | - | 1 | - | - | 7 | - | - | 8 | - | - | 7 |
| n | 207 | 3 | 6 | 172 | 3 | 41 | 173 | 3 | 12 | 192 | 3 | 20 | 178 | 7 | 20 | - | - | 114 | - | - | 215 | - | - | 214 |

P:Penisilin, FEP:Sefepim, SXT:Trimetoprim-Sulfametoksazol, SAM:Ampisilin-Sulbaktam, CRO:Seftriakson, VA:Vankomisin, TEC:Teikoplanin, LZD:Linezolid

4.3. Geleneksel Yöntemlerle *S. aureus* Suşlarının Metisilin Direncinin Değerlendirilmesi

S. aureus olarak tanımlanan izolatların metisiline olan duyarlılıklarını belirlemek amacıyla geleneksel yöntemlerden oksasilin disk difüzyon, Sefoksitin disk difüzyon, CHROMagar-MRSA ve makrobroth dilüsyon testleri uygulanmıştır.

4.3.1. *S. aureus* İzolatlarının Oksasiline ve Sefoksitine Olan Duyarlılıklarının Disk Difüzyon Yöntemi ile Belirlenmesi

Metisilin'in ısıya oldukça duyarlı bir antibiyotik olması test sonuçlarının yanlış değerlendirilmesine neden olabilmektedir. Bu nedenle metisilin direncinin doğru olarak belirlenmesi için aynı amacı karşılayan ve daha stabil bir antibiyotik olan oksasilin kullanılmaktadır. Uygun laboratuvar koşullarında test edildiğinde *S. aureus* suşlarında oksasilin direnci bu izolatın MRSA olduğunu gösterir.

Oksasilin ve sefoksitin disk difüzyon testleri eş zamanlı olarak çalışılmıştır (Resim 4.2). *S. aureus* izolatlarının oksasilin disk difüzyon yöntemine göre duyarlılıkları Tablo 4.3'de gösterilmiştir.



Resim 4.2. Oksasiline dirençli 3R ve duyarlı 27S *S. aureus* izolatlarının plak üzerindeki görünümü

Tablo 4.3. *S. aureus* suşlarının oksasiline olan duyarlılıkları.

| Örnekler(İzolot sayısı) | Oksasiline Dirençli SA(%) | Oksasiline Duyarlı SA(%) |
|-------------------------|---------------------------|--------------------------|
| Kan (n=158) | 112 (70,88) | 46 (29,11) |
| Yara (n=116) | 44 (37,93) | 72 (62,06) |
| ETT (n=34) | 28 (82,35) | 6 (17,64) |
| İdrar (n=24) | 11 (45,80) | 13 (54,16) |
| Diğer (n=32) | 21 (65,62) | 11 (34,37) |
| Toplam (n=364) | 216 | 148 |

ETT: Endo trakeal aspirat ucu, BOS:Beyin omurilik sıvısı, SA: *S. aureus*

364 izolatın *S. aureus* izolatının 216'sı (%59,34) oksasiline dirençli bulunmuştur. 148 İzolatların (%40,65) ise oksasiline duyarlı olduğu saptanmıştır (Tablo 4.3). Endo trakeal aspirat ucu örneklerinin %82,35'i, kan örneklerinin %70,88'i oksasiline direnç göstermiştir. Bunu %62,06 ile yara ve %54,16 ile idrar örneklerine ait olan izolatlar takip etmiştir.

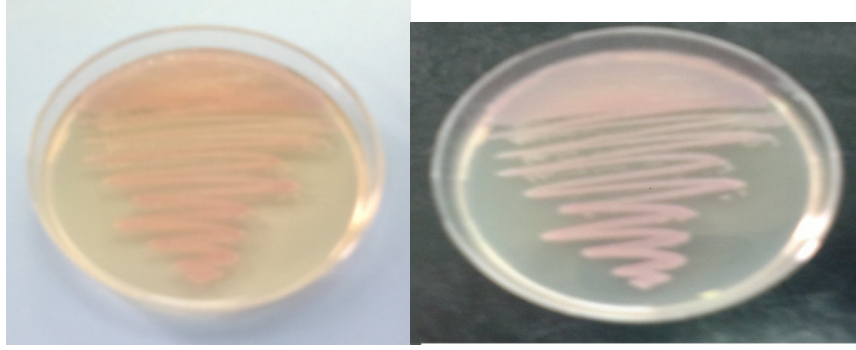
Tablo 4.4. *S. aureus* suşlarının sefoksitine olan duyarlılıklarının örneklere göre dağılımı

| Örnekler(n=İzolot sayısı) | Sefoksitine Dirençli(%) | Sefoksitine Duyarlı(%) |
|---------------------------|-------------------------|------------------------|
| Kan(n=158) | 72 (45,56) | 86 (54,43) |
| Yara(n=116) | 41 (35,34) | 75 (64,65) |
| ETT(n=34) | 16 (47,06) | 18 (52,94) |
| İdrar(n=24) | 12 (50,00) | 12 (50,00) |
| Diğer(n=32) | 13 (40,62) | 19 (59,37) |
| Toplam(n=364) | 154 | 210 |

364 *S. aureus* izolatında 154 izolatın sefoksitine direnç oranı (%42,30) olarak belirlenmiştir. Yaradan izole edilen örneklerin %64,65'i sefoksitine duyarlı olarak bulunmuştur. Sefoksitine karşı direnç gösterenlerin arasında en fazla oranda (%50,00) idrar örneklerine ait olan izolatları, ETT (%47,06) takip etmiştir (Tablo 4.4). Oksasilin ve sefoksitin disk difüzyon yöntemi ile dirençli her iki antibiyotiktede dirençli olduğu belirlenen 73 MRSA izolatın, seçici ve ayırt edici besiyeri olan CHROMagar'a ekimleri yapılmıştır.

4.3.2. MRSA İzolatlarının CHROMagar Testi ile Değerlendirilmesi

Oksasilin ve sefoksitin disk difüzyon yöntemi ile 73 MRSA izolatının 50'sinin CHROMagar üzerinde eflatun renkli koloniler oluşturduğu saptanmıştır (Resim 4.3).



Resim 4.3. 3R ile 36R MRSA izolatlarının CHROMagar görüntüsü.

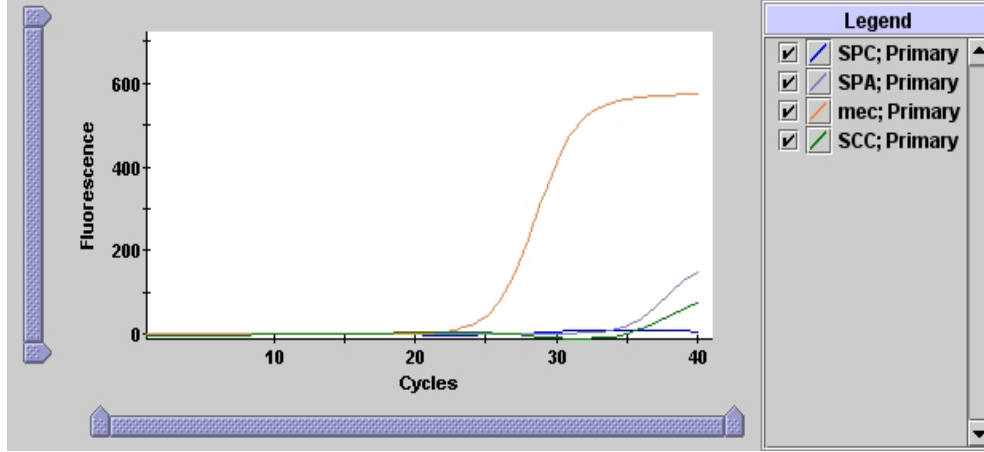
4.3.3. Oksasilin ve Siprofloksasin Minimum İnhibisyon Konsantrasyonlarının Değerlendirilmesi

Disk difüzyon yöntemi ve CHROMagar testi ile MRSA olarak tanımlanmış izolatların (50) oksasilin MİK değerleri; 27 izolatın 8 µg/ml, 21 kadarı 32µg/ml, 3R (endo trakeal aspirat ucu örneğinden izole edilmiştir) ile 36R (kan kültüründen izole edilmiştir) izolatlarının oksasiline direncinin yüksek düzeyde olduğu (64µg/ml) saptanmıştır. Oksasiline ve siprofloksasin dirençli 3R izolatı, oksasiline dirençli, siprofloksasin karşı duyarlı 36R izolatı, hem oksasiline hemde siprofloksasin karşı duyarlı bulunan 27S MSSA izolatı bundan sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir.

4.4. Stafilokok protein A (*spa*), SCC, *mecA* genlerinin qualitative rt-PZR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

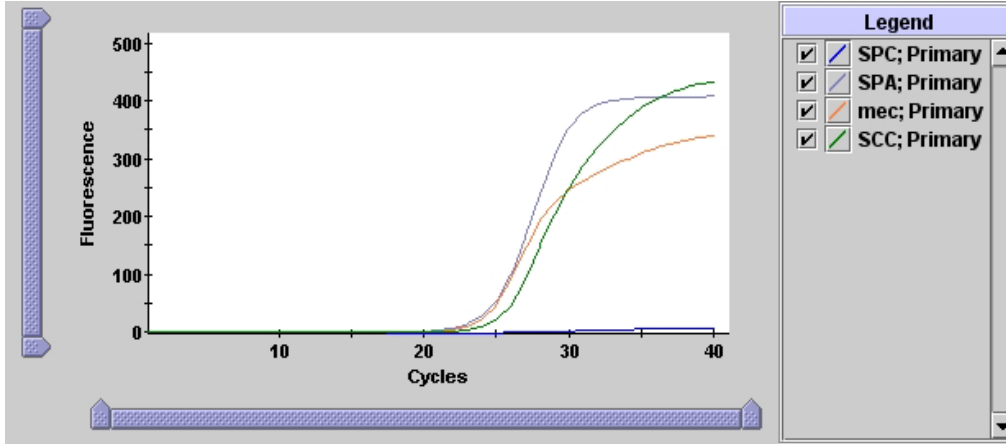
Geleneksel yöntemler ve CHROMagar testi ile MRSA olarak tespit edilen 50 izolat ve MSSA olarak saptanan 27S izolatında qualitative rt-PZR ile analiz edilmiştir. MRSA olarak tespit edilen 50 izolatın 47'sinde *spa*, SCC, *mecA* genlerinin varlığı qualitative real-time PZR ile tespit edilmiştir (Grafik 4.1). 27S izolatı ise MSSA olarak

tanımlanmıştır. Grafik 4.2 ve 4.3’de yüksek oksasilin direnci gösteren (64µg/ml) 3Rve 36R’nin *spa*, *SCC*, *mecA* genlerinin varlığı verilmiştir.

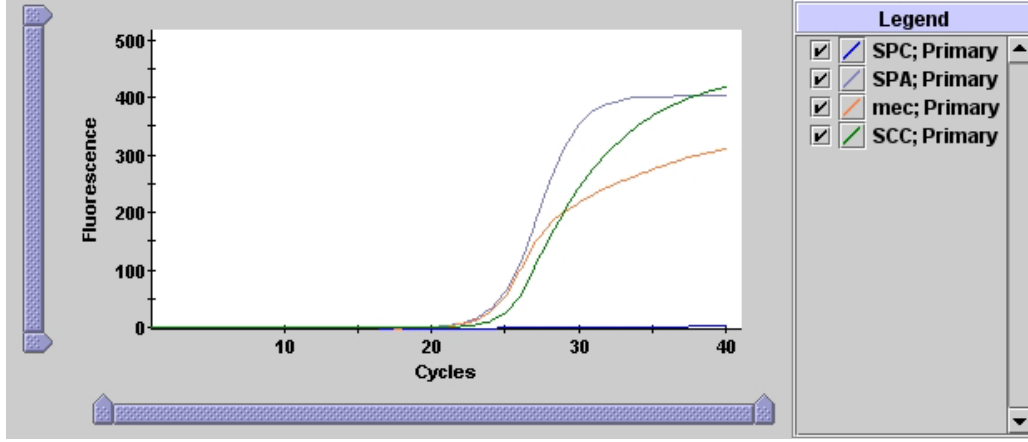


SPC: Örnek program kontrolü, SPA: Stafilokok protein A, *mec*: metisilin direnç geni, SCC: Stafilokok kaset kromozom

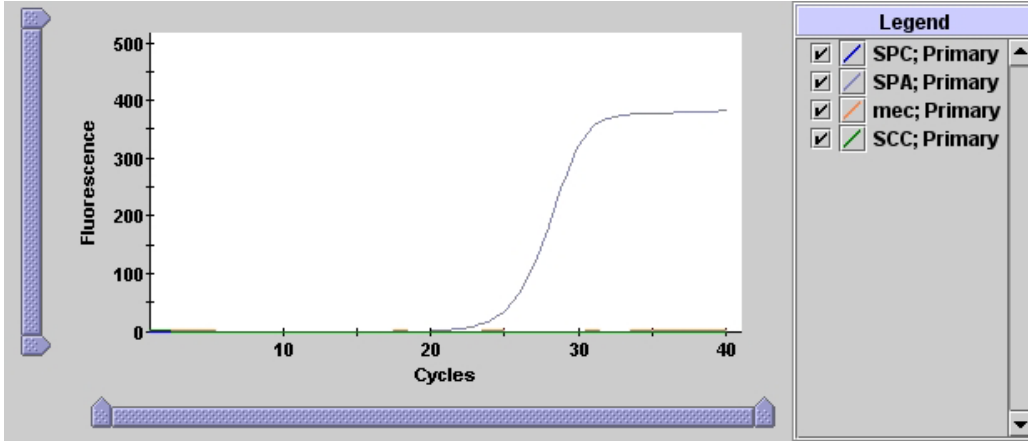
Grafik 4.1. 4R izolatının Qualitative real-time PZR ile *spa*, *SCC*, *mecA* genlerinin varlığının grafiksel olarak gösterimi.



Grafik 4.2. 3R suşunun qualitative real-time PZR *spa*, *SCC*, *mecA* genlerinin varlığının grafiksel olarak gösterimi.



Grafik 4.3. 36R suşunun qualitative real-time PZR ile *spa*, SCC, *mecA* genlerinin varlığının grafiksel olarak gösterimi.



Grafik 4.4. 27S suşunun qualitative real-time PZR ile *spa* varlığının grafiksel olarak gösterimi.

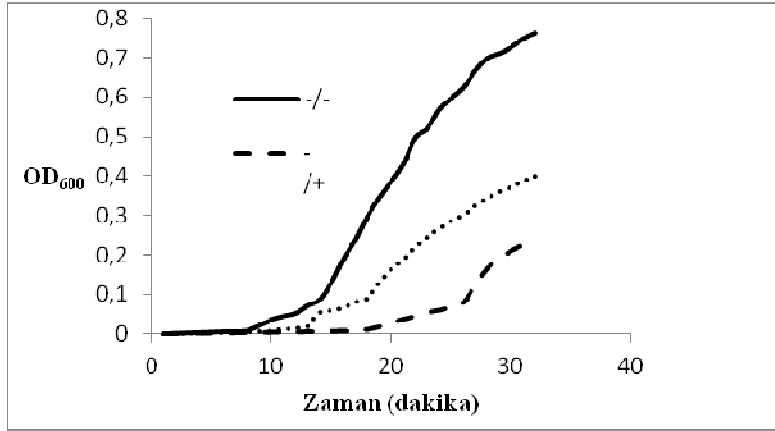
3R ile 36R izolatlarında Stafilokok protein A geninin varlığı bu izolatların *S. aureus* olduğunu moleküler olarak göstermiştir. SCC varlığı ise 3R ile 36R izolatlarının stafilokokal kaset kromozomunu taşıdığını, *mec* geninin varlığı ise izolatların metisiline direnç geni taşıdığını göstermiştir.

Geleneksel yöntemlerle ve disk difüzyon tekniği ile MSSA olduğu saptanan 27S izolatında Qualitative real-time PZR tekniği ile *spa* geni saptanmasına rağmen SCC, *mecA* genlerinin olmadığı tespit edilmiştir (Grafik 4.4). MSSA izolatının metisilin direnç geni taşımadığı saptanmıştır.

4.5. Uyum Gücü DeneYlerinin Değerlendirilmesi

4.5.1. MRSA Suşlarının Gelişim Oranlarının (Kinetiğinin) Değerlendirilmesi

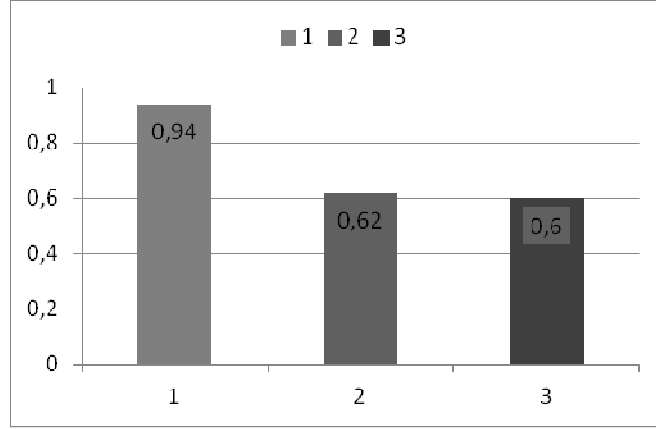
Geleneksel yöntemlere ek olarak moleküler olarak da identifikasyonu yapılan 2 MRSA izolatın (3R ve 36R) gelişim oranları microplate'da 600 nm'de spektrofotometre kullanılarak absorbans değerleri belirlenmiştir (Grafik 4.5).



Grafik 4.5. 3R izolatına ait gelişim kinetiklerinin karşılaştırılması.

3R'nin oksasilin içermeyen BHI'da (-/-),ön gelişiminde oksasilinsiz ve oksasilin MİK değerinin (16µg/ml) 1/50 oranında dilüsyonu ile hazırlanmış ön kültüründeki gelişimini gösteren eğri (-/+), öngelişimi oksasilinli besiyerinde ve altkültüründe de oksasilin MİK değerinin (64µg/ml) 1/50 oranında dilüsyonu ile hazırlanmış altkültüründeki gelişimini gösteren eğri.

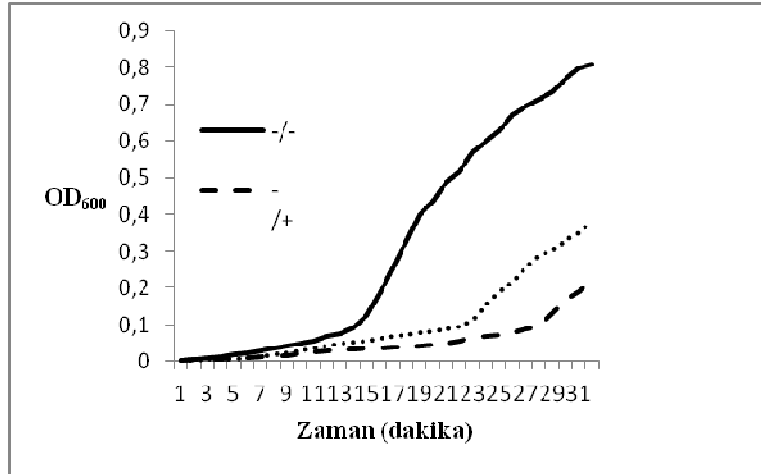
3R izolatına ait gelişim kinetiklerinin karşılaştırılması Grafik 4.5'de verilmiştir. 3R'nin oksasilin içermeyen BHI'da (-/-), ön gelişiminde oksasilinsiz ve oksasilin MİK değerinin (16µg/ml) 1/50 oranında dilüsyonu ile hazırlanmış ön kültüründeki gelişimini gösteren eğri (-/+), öngelişimi oksasilinli besiyerinde ve altkültüründe de oksasilin MİK değerinin (64µg/ml) 1/50 oranında dilüsyonu ile hazırlanmış altkültüründeki gelişimini gösteren eğri (+/+) değerlerine göre en iyi gelişimin -/- ortamında olduğu, bunu +/+’nın takip ederken, -/+ ortamında en düşük gelişim eğrisi olduğu saptanmıştır.



Grafik 4.6. 3R izolatının 27S izolatına göre relative gelişim oranları.

1) 0,94 -/- antibiyotik olmayan besiyerindeki oran; 2) 0,60 +/- öngelişimi ve önkültürdeki 1/50 oranında hazırlanan besiyerindeki oran; 3) 0,62 +/- sadece MİK değerinin 1/50 oranında hazırlanan besiyerindeki oranı göstermektedir.

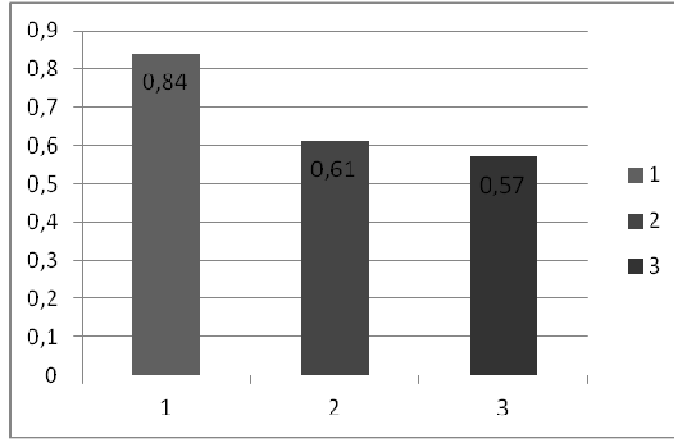
En yüksek düzeydeki relative gelişim oranı 0,94 ile -/- ortamında gözlenmiştir. (±/+) deneylerde relative gelişim oranları birbirine benzer olarak (0,62 ve 0,63) bulunmuştur. İkinci kültür ortamına oksasilinin eklenmesi relative gelişim oranını yaklaşık olarak %35 inhibe ettiği saptanmıştır (Grafik 4.6) .



Grafik 4.7. 36R izolatına ait gelişim kinetiklerinin karşılaştırılması.

36R'nin oksasilin içermeyen BHI'da (-/-), ön gelişiminde oksasilinsiz ve oksasilinin MİK değerinin (16µg/ml) 1/50 oranında dilüsyonu ile hazırlanmış ikinci kültüründeki gelişimini gösteren eğri (-/+), öngelişimi oksasilinli besiyerinde ve kültüründe de oksasilinin MİK değerinin (16µg/ml) 1/50 oranında dilüsyonu ile hazırlanmış altkültüründeki gelişimini gösteren eğri.

36R izolatına ait gelişim kinetiklerinin karşılaştırılması Grafik 4.7’de verilmiştir. 36R izolatı 3R izolatının gelişim eğrisine benzer olarak oksasilin içermeyen BHI’da (-/-), ön gelişiminde oksasilinsiz ve oksasilin MİK değerinin 1/50 oranında dilüsyonu ile hazırlanmış ikinci kültüründeki gelişimi diğer gelişim eğrilerine göre daha iyi olduğu gözlenmiştir.



Grafik 4.8. 36R izolatının 27S izolatına göre relative gelişim oranları.

1)0,94 -/- antibiyotik olmayan besiyerindeki oran; 2)0,71 -/+ sadece Mik değerinin 1/50 oranında hazırlanan besiyerindeki oran; 3) 0,69 +/- öngelişimi ve önkültürdeki 1/50 oranında hazırlanan besiyerindeki oranı göstermektedir.

36R izolatının 27S izolatına göre relative gelişim oranları grafik 4.8’de verilmiştir. En yüksek düzeydeki relative gelişim oranı 0,84 ile -/- ortamında gözlenmiştir (Grafik 4.8). Oksasilinli ve oksasilinsiz ön gelişim ve oksasilinli ikinci kültür kullanılarak yapılan deneylerde relative gelişim oranları birbirine benzer olarak (0,61 ve 0,57) bulunmuştur. İkinci kültür ortamına oksasilinin eklenmesi, oksasilinsiz kültür ortamına oranla relative gelişim oranını yaklaşık olarak %30 inhibe ettiği saptanmıştır (Grafik 4.8).

Tablo 4.5. *S. aureus* izolatlarının MİK değerleri ile ortalama relative gelişim oranlarının karşılaştırılması

| <i>S. aureus</i> izolatları | Oksasilin MİK değerleri (µg/ml) | Ortalama Gelişim Oran ± Standart Sapma | | |
|-----------------------------|---------------------------------|--|---------------|---------------|
| | | -/- | -/+ | +/+ |
| 27S | | 0.0229±0,0029 | - | - |
| 3R | 64 | 0.0215±0,0035 | 0.0143±0,0028 | 0.0137±0,0021 |
| 36R | 64 | 0.0192±0,0016 | 0.0139±0,0019 | 0.0130±0,0024 |

Bakteriyel fitness altkültürlerin eksponensiyel fazında bakteriyel populasyonun gelişme oranlarına bakılarak ölçülerek değerlendirilmesi yapılmıştır. Oksasilin yokluğunda 3R'nin gelişim oranı 0,0215, 36R'nin ise 0,0192 olduğu belirlenmiştir.

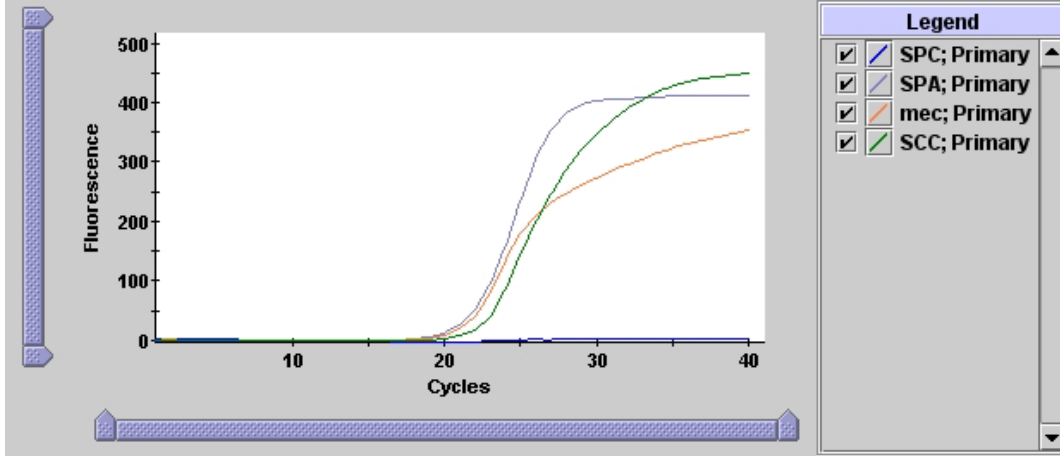
Ön gelişimin oksasilinsiz ikinci kültürü oksasilinli ortamında yapıldığı gelişim oranı deneylerinde konjugant izolatların gelişimi 3R' de 0,0143 iken, 36R'de 0,0139 olarak bulunmuştur.

Gerek öngelişiminde gerekse ikinci kültüründe oksasilin bulunan ortamdaki gelişim oranları ise 3R de ve 36R de sırasıyla 0,0137, 0,0130 olarak bulunmuştur.

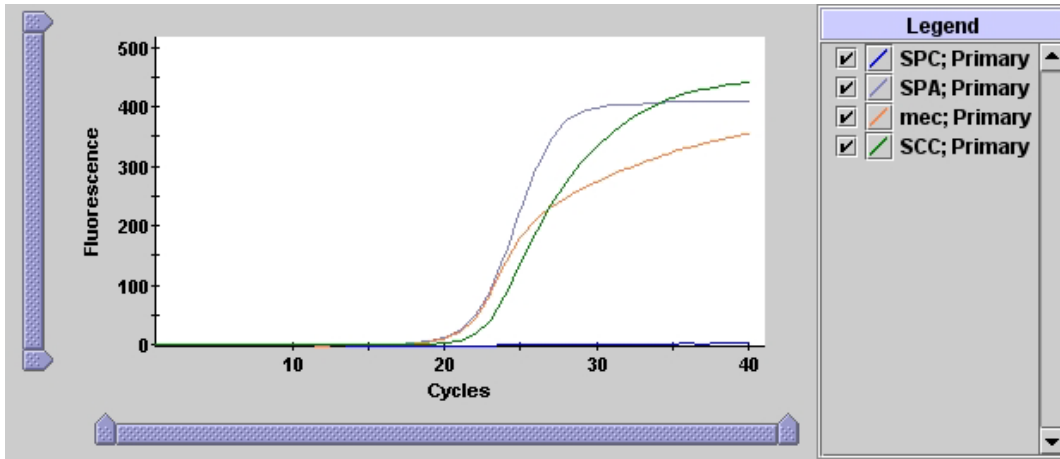
4.5.2. MRSA ve MSSA'ların Gelişime Bağlı Rekabet Deneylerinin Değerlendirilmesi

Fitness deneyinde, metisiline dirençli ve metisiline duyarlı olan *S. aureus* suşları arasında rekabete bağlı olan deneylerde 1:1, 1:100 ve 100:1 oranlarında kültürler hazırlanarak ve replika plate yöntemi ile tespit edilmiştir.

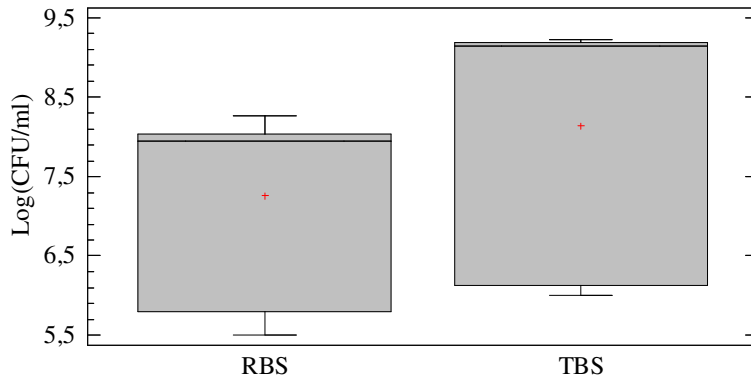
Gelişime bağlı rekabet deneylerinde replika plate yöntemi ile belirlenen CIP'e duyarlı OX'e dirençli suşlar transforme suşlar (Rt) olarak değerlendirilmiştir. Rt'lere (3R ile 27S izolatları arasında) gen aktarımının (*mec* geni) gerçekleştiği qualitative rt-PZR ile gösterilmiştir (Grafik 4.9-10).



Grafik 4.9. 1/1 oranından elde edilen Rt' nin *mec* geninin geçişini göstermektedir.

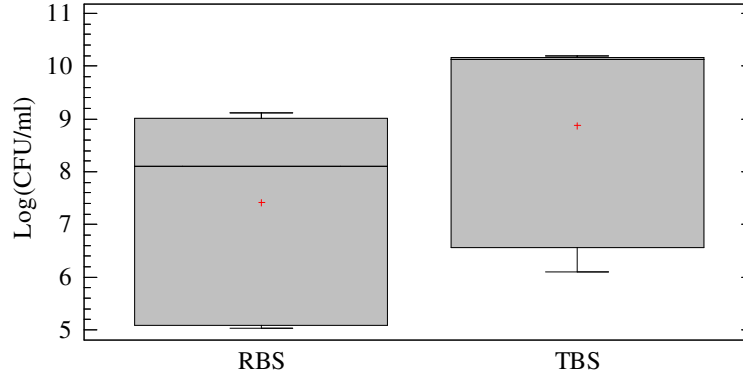


Grafik 4.10. 100/1 oranından elde edilen Rt' nin *mec* geninin geçişini göstermektedir



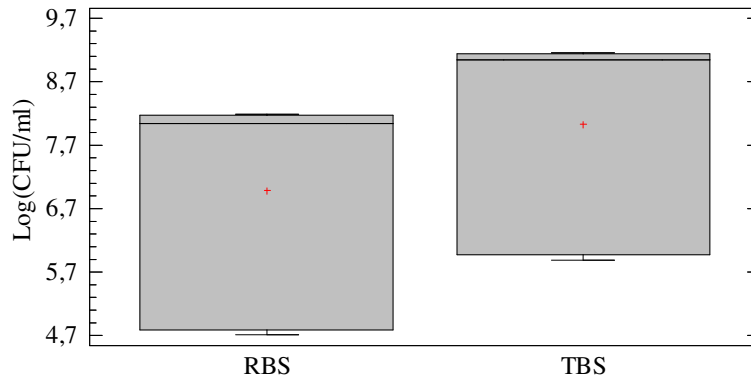
Şekil 4.1. 1/1 oranında 27S ile 3R suşlarının karışık kültürlerinde dirençli bakteri sayısı ile toplam bakteri sayısının oranı

1/1 oranında 27S ile 3R suşlarının karışık kültürlerinde dirençli bakteri sayısı ile toplam bakteri sayısı arasında t testi analizleri sonucuna göre %95 güvenirlilikte bir fark bulunmamıştır ($t = -1,35108$, $P\text{-value} = 0,195467$) (Şekil4.1). Dirençli bakteri (RBS) sayısındaki standart sapma 1,2, total bakteri sayısındaki (TBS) standart sapma 1,55 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.2. 1/100 oranında 3R ile 27S suşlarının karışık kültürlerinde dirençli bakteri sayısı ile toplam bakteri sayısının oranı.

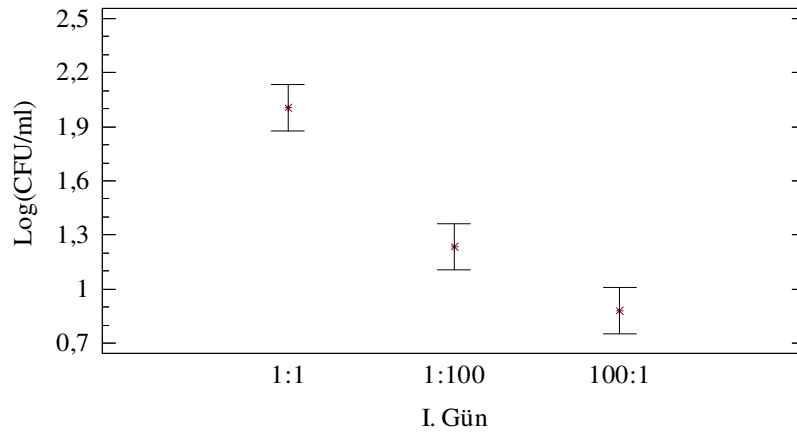
1/100 oranında 3R ile 27S suşlarının karışık kültürlerinde dirençli bakteri sayısı ile toplam bakteri sayısı arasında t testi analizleri sonucuna göre %95 güvenirlilikte bir fark bulunmamıştır ($t = -1,66119$ $P\text{-value} = 0,11614$) (Şekil 4.2). RBS'nin standart sapması yaklaşık olarak 1.83 olarak belirlenirken, TBS' nin ise standart sapma değeri 1.89 olarak saptanmıştır.



Şekil 4.3. 100/1 oranında 3R ile 27S suşlarının karışık kültürlerinde dirençli bakteri sayısı ile toplam bakteri sayısının oranı.

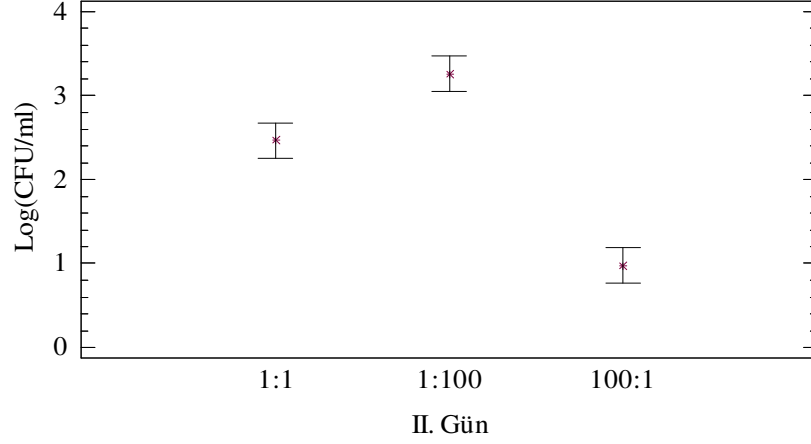
100/1 oranında 27S ile 3R suşlarının karışık kültürlerinde dirençli bakteri sayısı ile toplam bakteri sayısı arasında t testi analizleri sonucuna göre %95 güvenirlilikte bir fark bulunmamıştır ($t = -1,36367$, $P\text{-value} = 0,191551$) (Şekil 4.3). RBS standart sapma 1.67, TBS deki standart sapma 1.58 olarak belirlenmiştir.

3 ayrı karışık kültürde transforme (duyarlı formdan dirençli forma dönüşen) (Rt) olan bakteri sayımı karşılaştırılması I. Gün, II. Gün ve III. Günde ayrı ayrı Tukey_{HSD} testi ile değerlendirilmiştir. İlk gün için yapılan analiz sonucunda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu saptanmıştır ($Df: 2$, $F: 60,90$, $P: 0,0001$) (Şekil 4.4).



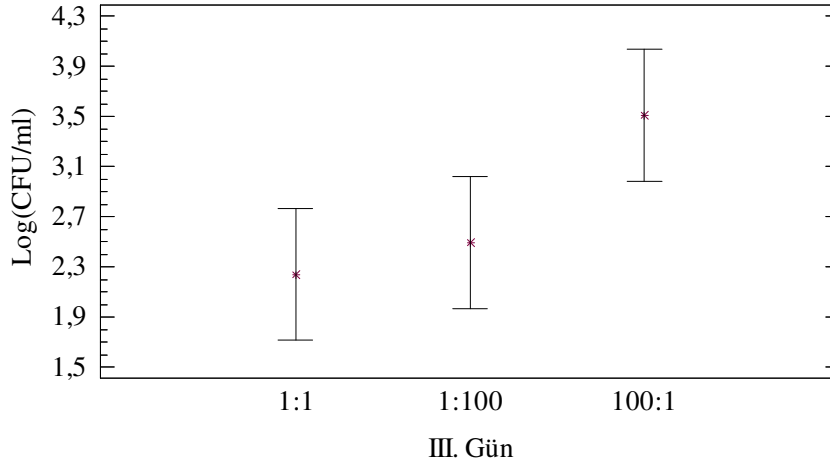
Şekil 4.4. I. Gün bakteri karışık kültürlerdeki Rt dönüşüm sayısı.

İkinci gün için yapılan analiz sonucunda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu saptanmıştır ($Df:2$, $F:90.56$, $P: 0,0000$) (Şekil 4.5).



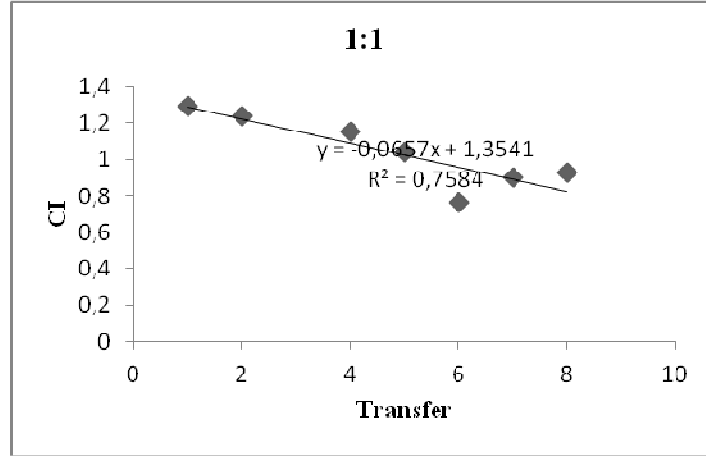
Şekil 4.5. II. Gün bakteri karışık kültürlerdeki Rt dönüşüm sayısı.

Üçüncü gün için yapılan analiz sonucunda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu saptanmıştır (Df:2, F:4,86, P:0,0557) (Şekil 4.6).

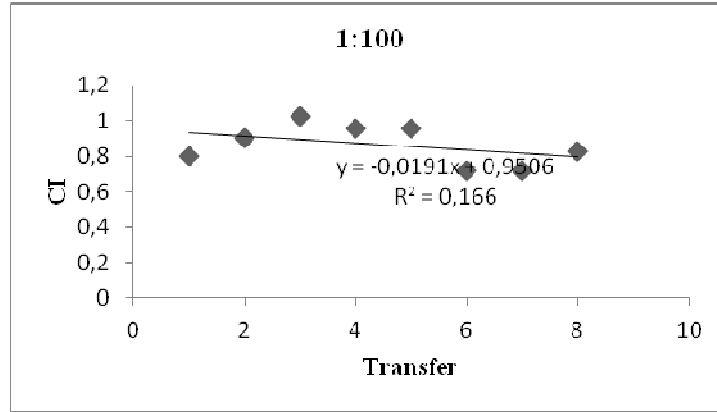


Şekil 4.6. III. Gün bakteri karışık kültürlerdeki Rt dönüşüm sayısı.

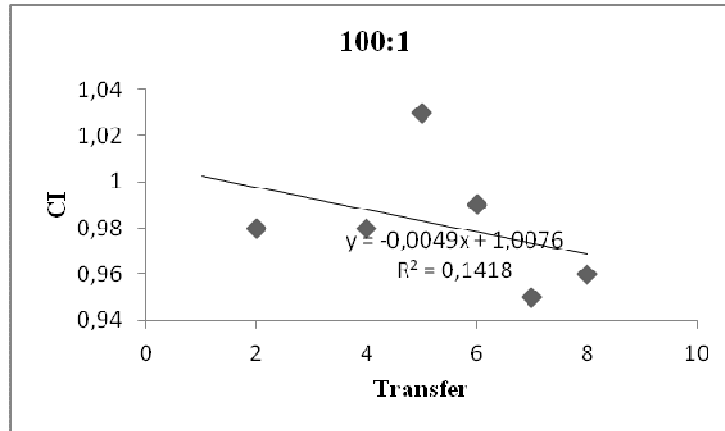
3 farklı karışık kültürde de dirençli bakterilerin üremesi [Log (cfu/ml)] duyarlı bakterilere göre daha fazla olmuştur. Üreme eğrilerinden elde edilen rekabet indeksi (CI) Grafik 4.11-12-13' de verilmiştir. 1/1 oranındaki karışık kültürde $R^2=0,7584$, 1/100 oranındaki karışık kültürde $R^2=0,166$ ve 100/1 oranında hazırlanan karışık kültürde $R^2=0,1418$ olarak bulunmuştur.



Grafik 4.11. 1/1 oranında karışık kültürdeki rekabet indeksi (CI)



Grafik 4.12. 1/100 oranında karışık kültürdeki rekabet indeksi (CI)



Grafik 4.13. 100/1 oranında karışık kültürdeki rekabet indeksi (CI)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmamızda, AKÜ Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji laboratuvarına gelen çeşitli klinik örneklerden izole edilen 364 *S. aureus* suşu çalışmaya alınmıştır. İzolatların 158'i kandan (%43,40), 116'sı yaradan (%31,86), 34'ü endo trakeal aspirat ucundan (%9,34), 24 idrardan (%6,59), 8 balgamdan (%2,19), 4 burundan (%1,09), 4 bronş lavajından (%1,09), 8 beyin omurilik sıvısından (%2,19) ve 8'i de diğer örneklerden (%2,19) elde edilmiştir (Tablo 4.1).

Sultan vd. (2008) yapmış olduğu çalışmada çeşitli servislerden gönderilen hasta örneklerinden 66 MRSA suşu izole etmişlerdir. İncelenen MRSA'ların %28,7'si yara, %19,6'sı kan, %18,1'i bronkoalveoler lavaj, %9'u balgam, %6'sı pü, %3'ü trakeal aspirat, %3'ü eklem sıvısı, %3'ü doku biyopsisi, %3'ü burun kültürü, %1,5'i periton sıvısı, %1,5'i plevra sıvısı, %1,5'i beyin-omurilik sıvısı, %1,5'i kateter kültürlerinden izole edilmiştir. Özel (2011) yapmış olduğu çalışmada, MRSA olarak tiplendirilen 30 suşun 15'inin yara yerinde, 5'inin solunum yolu örneklerinden (bronkoalveolar lavaj (BAL)), 4'ünü idrardan, 3'ünü abse materyalinden, 3'ünü kan kültürü örneklerinden izole etmiştir. Namıduru ve Karaoğlan (2003), MRSA'nın en sık izole edildiği klinik materyallerin yara ve trakeal aspirat olduğunu saptamışlardır. Kapuagası vd. (1997) ise MRSA suşlarını %70 oranında yara ve kateter örneklerinden izole etmişlerdir. Gülbüken vd. (2013), 67 MRSA izolatının %31,3'ü kan, %20,9'u yara, %13,5'i trakeal aspirat, %13,5'i idrar ve %20,8'i de diğer çeşitli klinik örneklerden izole etmişler. Bu çalışmada MRSA olarak tanımlanan izolatların %31,3'ü kan, %20,9'u yara, %13,5'i trakeal aspirat, %13,5'i idrar ve %20,8'i de diğer klinik örneklerinden izole edilmiştir. Bu sonuçlar Gülbüken vd. (2013) yapmış olduğu çalışma ile benzerlik göstermektedir.

Stafilokokların metisiline direncini saptamak için, oksasilin disk difüzyon, mikrodilüsyon, sefoksitin disk difüzyon, PZR teknikleri kullanılmaktadır (Velasco *et al.* 2005). 2008 CLSI sefoksitin disk difüzyon, sefoksitin mikrodilüsyon ve oksasilin agar tarama testini MRSA tarama testi olarak önermektedir (CLSI Pennsylvania 2008).

MRSA oranları 2008 EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System)

verilerine göre Avrupa'da ülkeden ülkeye farklılık göstermektedir. Bazı ülkelerde özellikle Kuzey Avrupa ülkelerinde MRSA prevalansı % 1'in altındadır. Bu oran Güney Avrupa ülkelerinde ve Amerika Birleşik Devletleri'nde % 5-40, Japonya'da % 60'lara çıkmıştır (Sancak 2007, Sipahi *et al.* 2007). Türkiye'de \geq % 25 direnç olduğu hatta bazen bu oranın % 50 civarında olduğu bildirilmektedir. Vural vd. (2011) yapmış oldukları çalışmada 117 *S. aureus* suşundan 53'ünü (% 45) MRSA, 64'ünü (% 55) MSSA olarak belirlemişlerdir (Vural *et al.* 2011). 2004 yılında İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde yapılan bir çalışmada 144 *S. aureus* suşunun 59'unda (%41) metisilin direnci tespit edilmiştir (Arıdoğan *et al.* 2004). Arabacı ve Oldacay (2008) yaptıkları çalışmada bu oranı %42 olarak bildirmişlerdir.

Çalışmamızda Stafilokok izolatlarının %85.85 geleneksel yöntemlerle *S. aureus* olarak tanımlanmıştır (Tablo 4.1). Oksasilin disk difüzyon yöntemine göre 364 *S. aureus* izolatının 216'sı (%59.34) oksasiline dirençli bulunmuştur. Sefoksitine duyarlılık deney sonuçlarına bakıldığında ise 154 (%42.30) izolatın sefoksitine dirençli olduğu saptanmıştır (Tablo 4.2). Oksasilin disk difüzyon yönteminin birçok heterojen suşda %61-%96.4 arasında duyarlılık gösterdiğini belirten çalışmalar vardır (Swenson *et al.*, 2001). Bazı çalışmalarda ise oksasilin disk difüzyonu ile ilgili çok iyi duyarlılık sonuçları bildirilmiştir (Swenson *et al.* 2001, Kohner *et al.* 1999). Disk difüzyon yönteminde görülen diğer bir problem, özgüllüğünün duyarlılığından daha yüksek oluşudur (%89-100). Bir başka deyişle, yanlış pozitif sonuç olasılığı, yanlış negatif sonuç olasılığından daha yüksektir. Sefoksitin ve oksasilin metisilin direncini saptamadaki performanslarının karşılaştırıldığı birçok çalışmada sefoksitin ve oksasilin duyarlılıkları ve özgüllükleri (% 90-100) birbirine yakın ve sefoksitin özellikle heterojen dirençli suşların saptanmasında *mecA* için daha iyi ve hızlı bir indükleyici olduğu düşünülmekte ve metisilin direncini belirlemede oksasiline alternatif olarak kullanılabilceği bildirilmektedir (Özel *et al.* 2011, Özen *et al.* 2013).

Yapılmış olan bu çalışmada, endo trakeal aspirat ucu örneklerinin %82,35'i, burun sürüntü ile BOS örneklerinin %75,00'i, kan örneklerinin %70,88'i oksasiline direnç göstermiş iken tüm bronş lavajı örneklerine ait olan izolatlar oksasiline karşı duyarlı olarak bulunmuştur. Sefoksitine karşı direnç gösterenlerin arasında en fazla oranda

(%50,00) idrar örneklerine ait olan izolatları %47,06 ile trakeal aspirat ve %45,56 ile kan örneği izolatların olduğu saptanmıştır (Tablo 4.3,4).

Metisilin direncinin saptanmasında kullanılmak üzere çeşitli ticari kromojenik besiyerleride geliştirilmiştir. Yapılan çalışmalarda bu besiyerlerinin diğer besiyerlerine göre etken patojenleri daha kısa sürede saptama ve karışık kültürlerden ayırmada daha etkili olduğu görülmüştür (Özen *et al.* 2013).

Bu nedenle çalışmamızda oksasilin ve sefoksitin disk difüzyon yöntemi ile her iki antibiyotiğe de dirençli olduğu belirlenen 73 MRSA izolatın (%20,32), seçici ve ayırt edici besiyeri olan CHROMagar'a ekimleri yapılmıştır ve 50'sinin (%68,5) eflatun renkli koloniler oluşturduğu saptanmıştır (Resim 4,3). CHROMagar besiyerinin duyarlılık ve özgüllüğü %82,9-87,7 oranları arasında saptanmıştır (Paule *et al.* 2009, García-Álvarez *et al.* 2011) Uzamış inkübasyon süresi, seçici agarlarda yanlış pozitif sonuçlara neden olmaktadır. Çeşitli kromojenik besiyerlerinin değerlendirildiği bir çalışmada, CHROMagar MRSA besiyerinin 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinde MRSA izolatlarını belirleme duyarlılıkları sırasıyla %59 ve %99,3, özgüllükleri %72 ve %92.1 olarak saptanmıştır (Perry *et al.* 2004). Bunun yanı sıra Cesur ve arkadaşları (2010) CHROMagar MRSA besiyeri için duyarlılık, özgüllük, PPD (pozitif prediktif değer) ve NPD (negative prediktif değer) değerlerini 48 saat sonunda sırasıyla %95.5, %37.6, %35.7 ve %96.1 olarak belirlemişlerdir. Van Hal vd. (2007)'nin sürüntü örneklerinden MRSA saptanmasında moleküler yöntemler ve seçici agarları karşılaştırdıkları çalışmalarında, CHROMagar MRSA besiyerinin duyarlılık, özgüllük, PPD ve NPD değerleri sırasıyla 24. saatte %63, %99, %98, %81; 48. saatte %71, %67, %56 ve %79 olarak bulunmuştur. Diederer *et al.* (2005) CHROMagar MRSA besiyerinin duyarlılığını %95.4, özgüllüğünü %100 olarak bildirirken; Malhotra-Kumar vd. (2010) bu besiyerinin duyarlılık, özgüllük, PPD ve NPD değerlerini sırasıyla %81.9, %99.1, %83 ve %93 olarak saptamışlardır.

Yapılan çalışmada oksasilin, sefoksitin disk difüzyon yöntemi ve CHROMagar testi ile MRSA olarak tanımlanmış 50 izolata oksasilin MİK değerlerine bakıldığında 27 izolatın 8 µg/ml, 21 tanesi 32µg/ml, 3R ile 36R izolatlarının oksasiline direncinin

yüksek düzeyde olduğu (64µg/ml) belirlenmiştir. Oksasiline ve siprofloksasin dirençli 3R izolatı, oksasiline dirençli, siprofloksasin karşı duyarlı 36R izolatı, hem oksasiline hemde siprofloksasin karşı duyarlı bulunan 27S MSSA izolatı bundan sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir.

Stafilokoklarda metisilin direnci kromozomal *mecA* geni tarafından kodlanmaktadır. Sadece metisiline dirençli izolatlarda bu gen bulunmaktadır (Boyce 1989, Chambers 1997). Antibiyotiklere direnç, plazmidler, transpozonlar ve integronlar aracılığıyla konak hücre bölünmesi sırasında vertikal olarak geçtiği gibi, karışık bakteriyel populasyonlardaki aynı veya farklı tür ve soylardaki patojen veya apatojen bakteriler arasında transdüksiyon, konjugasyon veya transformasyon aracılığı ile horizontal olarak da geçebilmektedir (Büyükkaya 2012). *mecA* genide dirençli suşlardan duyarlı suşlara aktarılabilir. Metisilin direncini saptamada PZR ile *mecA* geni varlığını belirleme referans yöntem olarak Kabul edilmektedir.

Bu çalışmada geleneksel yöntemler ve CHROMagar testi ile MRSA olarak tespit edilen 50 izolat ve MSSA olarak belirlenen 27S izolatında qualitative rt-PZR ile analiz edilmiştir. MRSA olarak tespit edilen 50 izolatın 47'sinde *spa*, *SCC*, *mecA* genlerinin varlığı qualitative rt-PZR ile tespit edilmiştir (Grafik 4.1). Geleneksel yöntemlerle ve disk difüzyon tekniği ile MSSA olduğu saptanan 27S izolatında qualitative rt-PZR tekniği ile *spa* geni saptanmasına rağmen *SCC*, *mecA* genlerinin olmadığı tespit edilmiştir (Grafik 4.4). MSSA izolatının metisilin direnç geni taşımadığı saptanmıştır.

GeneXpert rt-PZR (Cepheid)'in metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*'larda SCCmec kaset geninin belirlemede en hızlı ve güvenilir sonuç veren PZR metodu olduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Wolk *et al.* 2009, Rossney *et al.* 2008). Rossney *et al.* (2008) nasal örnekleri ile yaptıkları çalışmada GeneXpert rt-PZR'in duyarlılığı ve özgüllüğünü sırasıyla 95%, 98% olarak bulmuşlardır. Daha önce kullanılan *mec*, *nuc* ve *fem* genlerinin amplifikasyonuna dayanan yöntemlere göre bu teknik karışık kültürlerde de kullanılabilir. Bu şekilde MRKNS (metisilin dirençli koagülaz negatif Stafilokok), MSSA ve MRSA ayırımı, örnek hazırlaması da dâhil olmak üzere 75 dakikalık kısa bir sürede yapabilmektedir.

Çalışmamızda 3R'nin en iyi gelişiminin -/- ortamında olduğu, bunu +/-'nin takip ettiği, -/+ ortamında ise en düşük gelişim eğrisi olduğu saptanmıştır (Grafik 4.5). 36R izolatu 3R izolatının gelişim eğrisine benzer olarak oksasilin içermeyen BHI'da (-/-), ön gelişiminde oksasilinsiz ve oksasilin MİK değerinin 1/50 oranında dilüsyonu ile hazırlanmış ikinci kültüründeki gelişimi, diğer gelişim eğrilerine göre daha iyi olduğu gözlenmiştir. 3R izolatında en yüksek relative gelişim oranı 0,94 ile -/- ortamında gözlenmiştir. (\pm /+) deneylerde relative gelişim oranları birbirine benzer olarak (0,62 ve 0,63) bulunmuştur. İkinci kültür ortamına oksasilinin eklenmesi relative gelişim oranını yaklaşık olarak %35 inhibe ettiği saptanmıştır (Grafik 4.6). 36R izolatının 27S izolatına göre relative gelişim oranları grafik 4.8' de verilmiştir. En yüksek düzeydeki relative gelişim oranı 0,84 ile -/- ortamında gözlenmiştir. Oksasilinli ve oksasilinsiz ön gelişim ve oksasilinli ikinci kültür kullanılarak yapılan deneylerde relative gelişim oranları birbirine benzer bulunmuştur. İkinci kültür ortamına oksasilinin eklenmesi, oksasilinsiz kültür ortamına oranla relative gelişim oranını yaklaşık olarak %30 inhibe etmiştir (Grafik 4.8).

Bu sonuçlara göre ön kültüründe antibiyotik bulunan ortamda geliştirilen izolatlar, antibiyotikli ikinci kültürde, ön kültüründe antibiyotik bulunmayanlara göre daha iyi geliştikleri saptanmıştır. Çalışmamıza benzer olarak Foucault vd. (2009) yaptıkları çalışmada ön kültürde antibiyotik bulunmasının ikinci kültürde gelişimi olumlu yönde etkilediğini saptamışlardır. İndüklenen koşullarda %20 ile %33 oranında fitness'ın (relative gelişim oranı) azaldığını göstermişlerdir.

Bakteriyel fitness, altkültürlerin ekspanensiyel fazında bakteriyel populasyonun gelişme oranlarına bakılarak ölçülmüş ve değerlendirilmesi yapılmıştır. Oksasilin yokluğunda 3R'nin gelişim oranı 0,0215, 36R'nin ise 0,0192 olduğu belirlenmiştir. Ön gelişimin oksasilinsiz, ikinci kültürü oksasilinli ortamda yapıldığı gelişim oranı deneylerinde konjugant izolatların gelişimi 3R'de 0,0143 iken, 36R'de 0,0139 olarak bulunmuştur. Gerek öngelişiminde gerekse ikinci kültüründe oksasilin bulunan ortamda ki gelişim oranları ise 3R de ve 36R de sırasıyla 0,0137, 0,0130 olarak saptanmıştır.

Foucault vd (2009) VanA-tip vankomisin dirençli MRSA'lar ile yaptıkları uyum gücü

çalışmalarında alıcı suşun ortalama gelişme oranlarını 0,0162, üç transkonjugant izolatların ise ortalama gelişme oranlarını -/- ortamda 0,0157, 0,0160, 0,0156; +/- ortamda 0,0101, 0,0130, 0,0106; ++ ortamında 0,0098, 0,0127, 0,0104 olarak bulmuşlardır.

Ender vd. (2004) SCCmec 'un *Staphylococcus aureus*'a transformasyonu üzerine yaptıkları çalışmada oksasilin direnci ile gelişme oranı arasında bir korelasyon olduğunu belirlemişlerdir. Dirençli suşların, duyarlı suşlara oranla gelişme oranlarının azaldığını saptamışlardır. Antibiyotiklere direnç sıklıkla antibiyotik yokluğunda bakterinin ortama uyumunu azaltır; buda direncin bedeli olarak ifade edilir (Spratt 1996). Bir başka deyişle antibiyotik direnç genleri taşıyan organizmalar optimum koşulların bulunduğu ortamlarda direnç genleri taşımayan türlerine oranla daha az gelişim gösterirler. Bunun nedeni ekstra taşıdıkları direnç genlerinin replikasyonu için fazladan ATP'ye ihtiyaç duymalarıdır. Ancak direnç gelişiminden sonra direnç kaybı olmaksızın telafi edici mutasyonlar ile ortama adaptasyon sağlanabilir. Son çalışmalar adaptasyonun farklı genlerde ya da etkilenen hedef geninin gen amplifikasyonu ile oluşabileceğini göstermiştir (Sandegren and Anderson 2009).

Bu çalışmamızda 3R izolatı 27S izolatına oranla gelişim oranları deneylerinde daha iyi gelişim göstermiştir. Bunun nedeni dirençli izolatımızın sekonder mutasyonlar ile ortam adaptasyonunu sağlamış olmasından kaynaklanabilir (Wiesch et al, 2010). Horvath vd. (2012) MRSA izolatlarının rekabet oranlarının izolata göre değiştiğini, hastanelerde hem Japonya hem de Meksika hastane kaynaklı MRSA izolatlarının metisilin dirençli ST30 izolatının yerini aldığını bildirmişlerdir.

Dirençli bakteriler sıklıkla antibiyotik yokluğunda duyarlılarla rekabet halindedir. Başka bir ifadeyle, antibiyotik direncinin costu gelişebilir ve doğal seleksiyonla zaman içerisinde azalma eğilimi gösterir. Ne yazık ki, bu eğilim dirençli suşların yayılımının zamanla kontrolünün daha da zorlaşacağı anlamına gelmektedir (Lenski 1998).

Çalışmamızda üç farklı karışık kültürde de (1:1, 1:100, 100:1) dirençli bakteri sayısı ile toplam bakteri sayısı arasında, t testi analizleri sonucuna göre %95 güvenirlilikte bir

fark bulunmamıştır. Transkonjugant ve alıcı suşun farklı oranlarda bulunduğu bu karışık kültürlerde (1:100, 100:1) toplam bakteri sayısı ile dirençli bakteri sayısı arasında istatistiksel olarak fark görülmemiş olması ortama konulan dirençli ve duyarlı bakterilerde transforme olabildiklerini ($R \rightarrow S/S \rightarrow R$) göstermektedir. Rekabet deneylerinde üç olasılık dikkati çeker i) duyarlı bakteri, dirençli bakteriye oranla daha iyi gelişebilir ii) dirençli bakteri antibiyotik direncini korur ya da plazmit eliminasyonu (Cutting) gerçekleşebilir iii) dirençli bakteri uyum nedeni ile uğradığı zararı ilave mutasyonlarla en aza indirebilir.

Üç ayrı karışık kültürde transforme (duyarlı formdan dirençli forma dönüşen) (R_t) olan bakteri sayımı karşılaştırılması I. Gün, II. Gün ve III. Günde ayrı ayrı varyans analiz testi ile değerlendirilmiştir. İlk ve ikinci günler için yapılan analiz sonucunda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu saptanmıştır. Bu bulgular ortamda alıcı bakteri sayısının fazla olmasından dolayı gen aktarımının birinci ve ikinci gün, üçüncü güne oranla daha fazla gerçekleştiğini göstermektedir. Üreme eğrilerinden elde edilen rekabet indeksi (CI), bu verileri doğrulamaktadır. CI değerlerine göre başlangıçtaki 3R'nin tüm deneylerde 27S' e göre rekabet avantajına sahip olduğu görülmüştür. Aynı koşullarda antibiyotik yokluğunda karışık kültürlerde transkonjugantın alıcıya göre daha uyumlu olduğu belirlenmiştir.

Çalışmada antibiyotikli ortamda gelişen MRSA izolatlarının tekrar aynı antibiyotikle karşılaştıklarında, daha önce antibiyotikli ortamda gelişmeyen MRSA'lara göre gelişim kinetiklerinin daha iyi olduğu görülmüştür. Bu durum bilinçsiz antibiyotik kullanımının dirençli izolatların gelişimini arttırdığını desteklemektedir. Ortama belirli miktarda koyulan antibiyotiğin varolan direnç plazmidlerinin sayısını artıracığından, dirençli bakterinin gelişimini de artış görülebilir (Weigel *et al.* 2003).

Birçok çalışmada, antibiyotiksiz ortamda duyarlı izolatların rekabet deneylerinde dirençli olanlara göre daha avantajlı olduğu görülmüştür (Ender 2004, Foucault *et al.* 2009). Ancak bu çalışmada dirençli suş 3R'nin, duyarlı suş 27S'e göre rekabet deneylerinde antibiyotiksiz ortamda daha iyi üreme gösterdiği saptanmıştır. Bu durum da antibiyotiksiz ortamda MSSA'lara oranla daha iyi gelişime uyum göstermiş

antibiyotiğe dirençli ve uyumu sağlayan mutasyonlara sahip izolatların ortaya çıkmasının, MRSA'ların yayılımında önemli olduğunu düşündürmektedir. Özellikle hastane kökenli dirençli izolatların duyarlı izolatları etkileyerek ortamdaki direnç gelişimini tetikleyebileceği kanısına varılabilir. Bu nedenle her bir hastane ortamından izole edilen dirençli, duyarlı izolatların tespiti ve rekabet deneylerinin yapılarak uyum gücünün belirlenmesi, dirençli organizmaların yayılımını engellemekte önem taşır.

Sonuç olarak son yıllarda tüm dünyada MRSA enfeksiyonlarında ciddi bir artış görülmektedir (Klein 2007). Bu güne kadar yapılan çalışmalar genellikle durum tespiti ve hızlı tanı üzerine olmuştur. MRSA'ların direnç gelişimi ile ilgili ülkemizde hiç bir çalışma bulunmamakla birlikte, literatür araştırmalarımıza göre fitness deneylerinde verici olarak kullanılan suşlar standart mutant suşlar olup hastane izolatlarının kullanıldığı başka bir çalışma yoktur. Dolayısıyla direnç mekanizmasının anlaşılmasının yanı sıra hastane izolatlarının adaptasyonunun belirlenmesi ve bu izolatlar arasında gen aktarım oranlarının saptanması, dirençli izolatların yayılmasını önlemek için yeni stratejilerin geliştirilmesine büyük katkı sağlayacaktır.

6. KAYNAKLAR

- Alen, S., Koneman, E., Janda, W., Schreckenberger, P., Winn, W., Woods, G., Procop, G. (2006). The gram-positive cocci: Part 1: Staphylococci and related organism. Eds. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 5th Ed, Philadelphia: Lippincott Williams &Wilkins. 539-576.
- Appelbaum, P., C. (2007). Microbiology of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis, 45 Suppl 3. S165-70.
- Arabacı, F., E., Oldacay, M. (2008). Sağlık Çalışanlarının Burun Kültürlerinden İzole Edilen Stafilokoklarda Metisilin Direnci Ve Slime Yapımı Pozitifliği, İnfeksiyon Dergisi sayı:22, p:165-168.
- Arıdoğan, A., Atasever, L., Bal, Ç. (2004). Klinik Örneklerden İzole Edilen *S. aureus* Suşlarının Antibiyotiklere Dirençleri, Türk Mikrobiyal Cem Dergisi sayı:34,p:20-23.
- Atay, T., Gülay Z., Kocagöz, S., Yulug, N. (2002). *Staphylococcus aureus* izolatlarının metisili direncinin saptanmasında rutin duyarlılık testleri ve mecA gen analizi sonuçlarının karşılaştırılması. Mikrobiyol Bülteni 36:133-140.
- Baird, D., Collee, (1996). Staphylococcus: cluster-forming Gram-positive cocci, Practical Medical Microbiology. 245-262.
- Bannerman, T., L., (2003., Staphylococcus, Micrococcus and other catalase-positive cocci that grow aerobically, Manual of Clinical Microbiology. 8th Ed. Washington: DC. 384-404.
- Berger-Bächi, B., Rohrer, S., (2002). Factors influencing met hicillin resistance in staphylococci, Arch Microbiol. 178(3):165-71.

- Bilgehan, H. (2000). Staphylococcus. Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. İzmir: Barış yayınları: 240-266.
- Bilgehan, H. (2004). Klinik Mikrobiyolojik Tanı, 4. Baskı, İzmir: Barış Yayınları; 495–96.
- Bilgehan, H. (1995). Klinik Mikrobiyolojik Tanı, Gram Olumlu Koklar. syf. 498. 2.baskı Barış Yayınları, İzmir.
- Bilgehan, H, (1994). Klinik mikrobiyoloji özel bakteriyoloji ve bakteri enfeksiyonları, Barış Yayınları, Bornova. 188-21.
- Boubaker, B., I., Abbe,s R.B., Abdallah, H.B. et al, (2004). Evaluation of a cefoxitin disk diffusion test for the routine detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Clin. Microbiol. Infect. **10**: 762–765, 2004.
- Björkman, J., Andersson, D., I (2000).The cost of antibiotic resistance from a bacterial perspective. Drug Resistance Updates. **3**, 237–245.
- Boyce M., J: (1989). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* detection, epidemiology and control measures. Infectios Diseases Clinics of North America; **3**: 901-913.
- Campanile F., Bongiorno, D., Borbone, S., Stefani, S. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* evolution – The multiple facets of an old pathogen, Eur Infect Dis. **4(1)**:70-6.
- Cengiz A., T., Ustaçelebi Ş., (2003). Stafilokoklar, Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Güneş Kitabevi, Ankara. 339-48.
- Cesur, S., Yıldız, E., Irmak, H., et al. (2003). Evaluation of oxacillin resistance screening agar and chromogenic MRSA agar media for the detection of

- methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Mikrobiyol Bül.* **44(2)**: 279-284, 2010.
- Chambers, H., F. (1997). Methicillin resistance in Staphylococci: Molecular and biochemical basis and clinical implications, *Clin Microbiol Rev.* **10(4)**:781-91.
- Cheung, A. L., Nishina, K. A., Trotonda, M. P. & Tamber, S. (2008). The SarA protein family of *Staphylococcus aureus*. *Int J Biochem Cell Biol.* **40**, 355–361.
- Chongtrakool, P., Ito, T., Ma, X.X., Kondo, Y., Trakulsomboon, S., Tiensasitorn, C., Jamklang, M., Chavalit, T., Song, J.H., Hiramatsu, K. (2006). Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec) Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains Isolated in 11 Asian Countries: a Proposal for a New Nomenclature for SCCmec Elements. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **50**: 1001-1012.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. (2006). Sixteenth Informational Supplement. CLSI document M100-S16., 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania, 19087-1898 USA,.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2008). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 18th Informational Supplement (M100-S18), CLSI, Pennsylvania, PA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. (2009). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing-Nineteenth Informational Supplement. CLSI/NCCLS Document M100-S19. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania.
- Clinical and Laboratory Standarts Institute. (2012). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for that grow aerobically approved Standarts M02-A11 and

M07-A9.

Cookson, B. (1995). “Aspects of epidemiology of MRSA in Europe”, *J.Chemoteraphy*, (Suppl 3), 93-8.

Corrigana, D., K., Schulzea, H., Henihana, G., Cianic, I., Giraudb, G., Terryd, J., G., Waltond, A., J., Pethigd, R., Ghazala, P., Crainb, J., Campbella, C., J., Mountc, A., R., Bachmanna, T., T. (2012). Impedimetric detection of single-stranded PCR products derived from methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates, *Biosensors and Bioelectronics* **34**, 178– 184.

Cowan, M., M. (1999). *Clin. Microbiol. Rev.*12, 564-582, 1999.

Çatar, K., F. (2008). *Staphylococcus aureus* Suşlarında Metisilin Direnci Tanısında Kullanılan Bazı Fenotipik Yöntemlerin Karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Ankara,

Çetin, E., T. (1993). “Hastane enfeksiyonlarının önemi”, *Klimik Dergisi*. **3(6)**, 99.

Daum, R., S., Ito, T. (2002). Hiramatsu K, Hussain F, Mongkolrattanothai K, Jamklang M, Boyle-Vavra S. A novel methicillin-resistance cassette in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates of diverse genetic backgrounds. *J Infect Dis.***186(9)**:1344-7.

David, M., Z., Daum, R., S. (2010). Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Epidemiology and Clinical Consequences of an Emerging Epidemic. **23**:616-687.

De Lencastre, H., Oliveria, D., Tomasz, A. (2007) Antibiotic Resistant *Staphylococcus aureus*: A Paradigm of Adaptive Power. *Current Opinion in Microbiology*, **10**: 428-35.

- Deurenberg, R., H., Stobberingh, EE. (2008) The evolution of *Staphylococcus aureus*, Infect Genet Evol, **8(6)**:747-63.
- Deurenberg, R., H., Vink, C., Kalenic, S., Friedrich A., W. Bruggeman, C., A., Stobberingh, EE.. (2007) The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Clin Microbiol Infect. **13(3)**:222-35.
- Diederens, B., Van Duijn, I., Van Belkum, A., Willemsse, P., Van Keulen, P., Kluytmans, J. (2005). Performance of chromagar MRSA medium for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. **43(4)**: 1925-7.
- Dündar, V. (2000). Metisiline dirençli stafilokok infeksiyonları. Klimik Dergisi, Özel Sayı, **13**: 26-27.
- Eady, E., A., Cove J., H. (2003). Staphylococcal resistance revisited: community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* an emerging problem for the management of skin and soft tissue infections, Curr Opin Infect Dis. **16(2)**:103-24.
- Ender, M., McCallum, N., Adhikari, R., Berger-Bachi, B. (2004). Fitness cost of SCCmec and methicillin resistance levels in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. **48**:2295–2297.
- Felten, A., Grandy, B., Lagrange, P.H., Casin, I. (2002). Evaluation of three techniques for detection of low level methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test. J Clin Microbiol, **40**: 2766–2771.
- Forbes, B.A., Sahm, D.F., Weissfeld, A.S. (2007). Laboratory Methods and Strategies For Antimicrobial Susceptibility Testing: Bailey and Scotts Diagnostic Microbiology. 12th Ed. USA: Mosby, p.187-214

- Foucault, M., Courvalin, P., Courvalin, C. (2009). Fitness Cost of VanA-Type Vancomycin Resistance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. **53**, No. 6, p. 2354–2359.
- Frost, L., S., Leplae, R., Summers, A. O., Toussaint, A. (2005). Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 722–732.
- García-Álvarez, L, Holden, MT, Lindsay, H, et al. (2011). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel mecA homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infect Dis.* **11(8)**: 595-603.
- Ghuysen, J., M. (1994). Molecular structures of penicillin-binding proteins and betalactamases. *Trends Microbiol.* **2(10)**:372-80.
- Guignard, B, Entenza, J., M., Moreillon, P. (2005). Beta-lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Curr Opin Pharmacol.* **5(5)**:479-89, 2005.
- Gülây, Z. (2009). Çoklu Dirençli Hastane İnfeksiyonu Etkenlerinin Kontrolünde Hızlı Tanı Testleri. *Ankem Dergisi*, **23(Ek 2)**: 193-200.
- Gülbüken, İ. (2013). Hastane Enfeksiyonu Etkeni Olarak Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* Epidemiyolojisinin Rep-PZR İle Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mersin.
- Hiramatsu, K., Cui, L., Kuroda, M., Ito, T. (2001). The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *TRENDS in Microbiology.* **9**:486-93.
- Hiramatsu, K., Ito, T., Tsubakishita, S., Sasaki, T., et al. (2013). Genomic Basis for Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*, *Infection & Chemotherapy*, **45(2)**:117-136.

- Hiramatsu, .K, Katayama, Y., Yuzawa, H., Ito, T. (2002). Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Int J Med Microbiol. **292**:67-74.
- Hiramatsu, K. (2002). Novel type of staphylococcal cassette chromosome mec identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. Antimicrob Agents Chemother. **46(4)**:1147-52.
- Horváth & O. Dobay & S. Kardos & Á. Ghidán &Á. Tóth & J. Pászti & E. Ungvári & P. Horváth & K. Nagy & S. Zissman & M. Füzi. (2012). Varying fitness cost associated with resistance to fluoroquinolones governs clonal dynamic of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. **31**:2029–2036.
- Howard, B., J., Kloos, W., E. (1987). Staphylococci, Howard, B. (Ed.): Clinical and Pathogenic Microbiology. s 231.
- International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements, (IWG-SCC). (2009). Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements, Antimicrob Agents Chemother. **53(12)**:4961-7.
- Ito, T., Okuma, K., Ma, X., X., Yuzawa, H., Hiramatsu, K. (2003). Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. Drug Resistance Updates. **6**:41-52.
- Ito, T., Ma, X. X., Takeuchi, F., Okuma, K., Yuzawa, H. & Hiramatsu. (2004). Novel type V staphylococcal cassette chromosome mec driven by a novel cassette chromosome recombinase, ccrC. Antimicrob Agents Chemother **48**, 2637–2651.
- Kapuağası, A., Ağalar C., Diri, C., Apaydın, N., Türkyılmaz, R. (1997). Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen Stafilokok Suşlarının Antibiyotik Direnç Oranlarının Değerlendirilmesi. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası. **50(2)**:105-112,.

- Katayama, Y., Ito, T., Hiramatsu, K. (2000). A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* **44(6)**:1549-55.
- Katayama, Y., Ito, T., Hiramatsu, K. (2001). Genetic organization of the chromosome region surrounding mecA in clinical staphylococcal strains: role of IS431-mediated mecI deletion in expression of resistance in mecA-carrying, low-level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrob Agents Chemother.* **45(7)**:1955-63.
- Kılıç, A. (2008). Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus*'un Moleküler Epidemiyolojisi. 5. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi. 24-28 Haziran 2008, Ankara. Kongre Kita. PNL6, 85-90, 2008.
- Klein, E., Smith, D., L., Laxminarayan, R. (2007). Hospitalizations and deaths caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, United States, 1999-2005. *Emerg Infect Dis. Dec.* **13(12)**:1840-6.
- Kloos, W., E., Bannerman, T., L. (1995). *Staphylococcus and Micrococcus*. *Manuel of Clinical Microbiology*, 6th Ed.; Murray, P. R.; Baron, E. J.; Tenover, F. C.; Tenover, F. C.; Tenover, R. H. Eds.; ASM Press, Washington, USA, 282-298.
- Kohner, P., Uhl J., Kolbert, C. et al. (1999). Comparison of susceptibility testing methods with mecA gene analysis for determining oxacillin (methicillin) resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococcus spp. *J Clin Microbiol.* **37**: 2952-62.
- Kolbert, C., P., Arruda, J., Varga-Delmore, P., Zheng, X., Lewis, M., Kolberg, J. & Persing, D., H. (1998). Branched-DNA assay for detection of the mecA gene in oxacillin-resistant and oxacillin-sensitive staphylococci, *Journal of Clinical Microbiology*. Vol.**36**, pp.2640–2644.

- Koneman, E., W., Winn, W., C., Allen, S., D., Janda, W., M., Procop, G., W., Schreckenberger, P., C., Woods, G., L. (2006). Staphylococci and Related Gram-Positive Cocci. In: Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th Ed. USA: Lippincott Williams and Wilkins. p.: 624-662, 2006.
- Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I. (2001). Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. The Lancet. **357**:1225- 40.
- Kuyucu, N. (2007). Antibiyotik Direnci, Çocuk Enf Derg. 1: Özel Sayı **1**; 33-8.
- Lencastre, H., de Jonge, B., L, Matthews, P., R., Tomasz, A. (1994). Molecular aspects of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*, J Antimicrob Chemother. **33(1)**:7-24.
- Lenski, E., R. (1998). Bacterial evolution and the cost of antibiotic resistance. Internatl Microbiol. **1**:265-270.
- Li, M., Du, X., Villaruz, A., E., Diep, B., A., Wang, D et al. (2012). MRSA epidemic linked to a quickly spreading colonization and virulence determinant. Nat Med **18**: 816-819.
- Li, X., Xiong, Y., Fan, X., Feng, P., Tang, H., Zhou, T. (2012). The role of femA regulating gene on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates, Elsevier Masson SAS. **42**, 218–225.
- Lowy, F.D. (2003). Antimicrobial Resistance: The Example of *Staphylococcus aureus*. The Journal of Clinical Investigation. **111**: 1265-1273.
- Ma, X., X., Ito, T., Tiensasitorn, C., Jamklang, M., Chongtrakool, P., Boyle-Vavra, S., Daum, R., S., Hiramatsu, K. (2002). Novel Type of Staphylococcal Cassette Chromosome mec Identified in Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. **46**, 4, 1147-1152.

- Mackenzie, A., M., Richardson, R., H., Lannigan, R., Wood D. (1995). Evidence that the National Committee for Clinical Laboratory Standards disk test is less sensitive than the screen plate for detection of low-expression- class methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* **33**:190-211.
- Mahon, C., R. (2007). Textbook of Diagnostic Microbiology, 3 th ed. Chapter 13: Antimicrobial Susceptibility Testing. 319-362,
- Malhotra-Kumar, S., Abrahantes, J., C., Sabiiti, W., et al. (2010). Evaluation of chromogenic media for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* **48(4)**:1040-6.
- Millar, B., C., Loughrey, A., Elborn, J., S. & Moore, J., E. (2007). Proposed definitions of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *J Hosp Infect.* **67**, 109–113.
- Moreillon, P., Que, Y., Glauser, M., P. (2005). *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock), Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th Ed. Philadelphia: Churchill Livingstone. 2321-2351.
- Namıduru, M., Karaoğlan, İ. (2003). Cerrahi Yogun Bakım Ünitelerinde Hastane İnfeksiyonu Etkeni Olan *Staphylococcus aureus* Suşlarının Antibiyotik Dirençleri. *Van Tıp Dergisi.* **10(3)**:72-75.
- Navarro, M.B., Huttner, B., Harbarth, S. (2008). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* control in the 21st century: beyond the acute care hospital. *Current Opinion in Infectious Diseases.* **21**, 372-379.
- Nolte, F., S., Caliendo, A., M. (2003). Molecular detection and identification of microorganisms. In: Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Pfaller, M.A., Tenover, R.H. (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press, Washington, DC, pp.234–256.

- Onorato, M., Boricki, M.J., Baillargeon, G., et al. (1996). Risk factors for colonization or infection due to Meticillin resistant *Staphylococcus aureus* in HIV positive patients: A retrospective case control study. *Infect Control Hosp. Epidemiol.* **17**:775-779.
- Öner, M. (1996). Genel Mikrobiyoloji. 3. Baskı, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, Türkiye, 208-213.
- Özel, E. (2001). Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) Suşlarında mecA Geninin Tespitinde Evigene Testi, Latex Aglütinasyon Testi ve PZR Yönteminin Karşılaştırılması, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Isparta.
- Öztürk, R. (2002). Antimikrobik ilaçlara karşı direnç gelişme mekanizmaları ve günümüzde direnç durumu. İstanbul: İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi sempozyum dizisi No:**31**; 83–100.
- Paule, S, M, Mehta, M, Hacek, D, M, et al. (2009). Chromogenic media vs real-time PCR for nasal surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* impact on detection of MRSA-positive persons. *Am J Clin Pathol.* **131(4)**: 532-9.
- Peacock, S., J. (2005). *Staphylococcus*, Microbiology and Microbial Infections, 10th Ed. Hodder Arnold, London, United Kingdom. 771-832.
- Perry, J., D, Davies, A., Butterworth, L., A., Hopley, A., L., Nicholson, A., Gould F., K. (2004). Development and evaluation of a chromogenic agar medium for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* **42(10)**: 4519-23.
- Podzorski, R., P., Persing, D., H. (1995). Molecular detection and identification of microorganisms. in *Manual of clinical microbiology*, (ASM Press, Washington, D.C), pp 130–157.

- Poulsen, M., O., Jacobsen, K., Thorsing, M., Kristensen, N., R., Clasen, J. (2012). Thioridazine potentiates the effect of a beta-lactam antibiotic against *Staphylococcus aureus* independently of *mecA* expression. *Res Microbiol.* **12**, S0923–2508.
- Qoronfleh, M., W., Wilkinson, B., J. (1986). Effects of growth of methicillin resistant and susceptible *Staphylococcus aureus* in the presence of beta lactams on peptidoglycan structure and susceptibility to lytic enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **29**: 250-257.
- Rehm, S., J., Tice, A. (2010). *Staphylococcus aureus*:Methicillin-Susceptible *S. aureus* to Methicillin-Resistant *S. aureus* and Vancomycin-Resistant *S. aureus*, *Clinical Infectious Diseases* **1(S2)**:S176–S182.
- Rossney, A., S., Herra, C., H., Brennan, G., I., Morgan, P., M., O’Connell, B. (2008). Evaluation of the Xpert Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Assay Using the GeneXpert Real-Time PCR Platform for Rapid Detection of MRSA from Screening Specimens. *Journal of Clinical Microbiology.* **46(10)**: 3285-3290.
- Sakoulas, G., Gold, H., S., Venkataraman, L., Degirolami, P., C., Eliopoulos, G. (2001). Methicillin- resistant *Staphylococcus aureus*, Comparison of susceptibility testing methods and analysis of *mecA*-positive susceptible strains. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 3946-5, 2001.
- Salgado, C. D. Farr, B. M. Calfee, D. P. (2003). Community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: a meta-analysis of prevalence and risk factors. *Clin. Infect. Dis.* **36**.131-139.
- Salmenlinna, S. (2002). Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Finland. Academic dissertation. Faculty of Medicine, University of Helsinki, Haartman Institute. Helsinki. 14-44.

- Sancak, B. (2000). *Staphylococcus aureus*'da metisilin direnç mekanizmaları, Mikrobiyol Bül. **34(3-4)**:381-9.
- Sancak, B. (2007). *Staphylococcus aureus*'ta metisilin ve vankomisin direnci, Hacettepe Tıp Dergisi. **38**:127-134.
- Sancak, B. (2011). *Staphylococcus aureus* ve antibiyotik direnci, Mikrobiyoloji Bül. **45(3)**:565-76, PMid:21935792.
- Sancak, B. (2012). MRSA Direnç Mekanizmaları: Dünyada ve Türkiye'de Epidemiyolojisi, Ankem Dergisi. **26(Ek 2)**:38-47, 2012.
- Sandegren, L., Andersson, D., I. (2009). Bacterial gene amplification: implications for the evolution of antibiotic resistance. Nat Rev Microbiol. **7**: 578–588.
- Shopsin, B., Kreiswirth, B., N. (2001). Molecular epidemiology of methicillin resistant *Staphylococcus Aureus*, Emerg Infect Dis. **7**:323-326.
- Shorr, A., F. (2007). Epidemiology and economic impact of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: review and analysis of the literature. Pharmacoeconomics. **25**, 751-768.
- Sipahi, O., R., Pullukçu, H., Aydemir, Ş., Taşbakan, M., Tunger, A. (2007). Mikrobiyolojik kanıtlı hastane kökenli *Staphylococcus aureus* bakteremilerinde direnç paternleri: 2001-2005 yıllarının değerlendirilmesi, Ankem Derg. **21(1)**:1-4.
- Sobayo, E., I. (1991). Nursing aspect of infection control in developing countries", J. of Hospital Infection. **18(A)**, 388-391.
- Spratt, B., G. (1996). Antibiotic resistance: counting the cost. Curr Biol. **6**, 1219–1221.
- Sridhar, Rao, P., N. (2009). Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA),

JJMMC, Davangere.

Stapleton, P., D., Taylor, P., W. (2002). Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation, *Sci Prog*;85(Pt 1):57-72.

Stefani, A., Pierantozzi, M., Koch, G., et al. (2010). Therapy for dyskinesias in Parkinson's disease patients. *Future Neurology*. **5**:277–299.

Stefani, S., Goglio, A. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: related infections and antibiotic resistance. *International Journal of Infectious Diseases*. **14(4)**:19–22.

Swenson, J., M., Williams, P., P., Killgore, G., O'hara, C., M., Tenover, F., C. (2001). Performance of eight methods, including two new rapid methods, for detection of oxacillin resistance in a challenge set of *Staphylococcus aureus* organisms. *J. Clin. Microbiol.* **39**:3785-3788.

Swenson, J., M., Tenover, F., C. (2005). Results of Disk Diffusion Testing with Cefoxitin Correlate with Presence of *mecA* in *Staphylococcus* spp. *J Clin Microbiol.* **43**:3818-23.

Swenson, J., M., Williams, P., P., Killgore, G., O'hara, C., M., Tenover, F., C. (2001). Performance of eight methods, including two new rapid methods, for detection of oxacillin resistance in a challenge set of *Staphylococcus aureus* organisms. *J Clin Microbiol.* **39**: 3785-8.

Thong, K., L., Lai, M., Y., Teh, C., S., J., and Chua, K., H. (2011). Simultaneous detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* by multiplex PCR. **28(1)**:21–31.

Tsiodras, S., Gold, H., S., Sakoulas, G. (2001). Linezolid resistance in a clinical isolate

of *Staphylococcus aureus*. Lancet. **358**:207-8.

Tsubakishita, S., Kuwahara-Arai, K., Sasaki, T., Hiramatsu, K. (2010). Origin and molecular evolution of the determinant of methicillin resistance in staphylococci, Antimicrob Agents Chemother. **54(10)**:4352-9.

Turlej, A., Hryniewicz, W., Empel, J. (2011). Staphylococcal cassette chromosome mec (Scmec) classification and typing methods: an overview, Pol J Microbiol, **60(2)**:95-103.

Tünger, A. (2004). Staphylococcus aureus: Mikrobiyoloji, Patogenez ve Epidemiyoloji, Ulusoy S, Usluer, G, Ünal S, Gram-Pozitif Bakteri İnfeksiyonları, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara; 9-68.

Ünal S. (2004) Staphylococcus aureus: direnç mekanizmaları. Önemli ve Sorunlu Gram Pozitif Bakteri Enfeksiyonları, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara. 23-38.

Ünal, S., Hoskins, J., Flokowitsch, J., E., Ernie Wu, C., Y., Preston, D., A., Skatrud, P., L. (1992). Detection of methicillin resistant Staphylococci by using the polymerase chain reaction”, J. Clin. Microbiology. **30**, 1685-1691.

Van Hal, S., J., Stark, D., Lockwood, B., Marriott, D., Harkness. J. (2007). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) detection: comparison of two molecular methods (IDI-MRSA PCR assay and Genotype MRSA Direct PCR Assay) with three selective MRSA agars (MRSA ID, MRSASelect and CHROMagar MRSA) for use with infection- control swabs, J Clin Microbiol. **45(8)**:2486-90.

Velasco, D., del Mar Tomas, M., Cartelle, M. et al. (2005). Evaluation of different methods for detecting methicillin (oxacillin) resistance in *Staphylococcus aureus*, J Antimicrob Chemother. **55(3)**:379-82.

Vural, A., Afşar, İ., Kurultay, N., Demirci, M. (2011). *Staphylococcus Aureus*'da

Metisilin Direncinin Saptanmasında Disk Difüzyon, Oksasilin Agar Tarama, Mikrodilüsyon ve PBP2a Lateks Aglutinasyon Testlerinin Karşılaştırılması, *Ankem Derg.* **25(3)**:145-149.

Waldvogel, F., A. (2000). *Staphylococcus aureus* (including staphylococcal toxic shock). In: Mandel GL, Bennet JE, Dolin R (eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 5th. ed. New York: Churchill Livingstone. 2070–92.

Wenzel, R., P. et al. (1998). Methicillin-resistant *Staphylococcus* outbreak: A consensus panel's definition and management guidelines. *American Journal of Infection Control*. **26(2)**:102-110.

Wiesch, S., Z., Engelstädter, P., K., J., & S., Bonhoeffer. (2010). Compensation of fitness costs and reversibility of antibiotic resistance mutations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **54**: 2085-2095.

Weigel, L., M., Clewell, S., R., Gill, N., C., Clark, L., K., McDougal, S., E., Flannagan, J., F., Kolonay et al. (2003). Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science* **302**:1569–1571.

Wikler, M., A., Cockerill, F., R., Craig, W., A., Dudley, M., N. (2007). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility", *Clinical and Laboratory Standards Institute*. 17th Ed. Informational Supplement. **27**: 44-51.

Winn, W., C., Allen, S., D., Koneman, E., W., Procop, G., W., Janda, W., M., Schreckenberger, P., C., Woods, G., L. (2006). *Koneman's, Gram Positive Cocci*, (Ed) *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology* Lippincott William and Wilkins, Philadelphia, New York. 624-662.

Wong, H., Louie, L., Lo, R., Y., C., and Simor, A., E., (2010). Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolates with a Partial or Complete Absence of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements, *Journal of Clinical Microbiology*.

48(10):3525-3531.

Xiong, Y., Q., Hadya, W., A., Bayera, A., S., Chenc, L., Kreiswirthc, B., N., Yang, S. (2012). Telavancin in Therapy of Experimental Aortic Valve Endocarditis in Rabbits Due to Daptomycin-Nonsusceptible Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **56(11):5528-5533.**

Zhang, H., Z., Hackbarth, C., J., Chansky. K., M., Chambers, H., F. (2001). A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to beta-lactams in staphylococci, Science. **291(5510):1962-5.**

İNTERNET KAYNAKLARI

- 1) <http://www.gata.edu.tr/infkom/MRSA.pdf>
- 2) http://microgen.ouhsc.edu/s_aureus/s_aureus_home.htm
- 3) <http://itech.dickinson.edu/chemistry/?cat=65>
- 4) <http://livertox.nih.gov/Penicillins.htm>
- 5) <http://www2.uwrf.edu/caseit/mrsa.html>
- 6) <http://www.frizbiochem.de/en/molecular-cycle/ivd.-tests/mrsa-poc-ivd..html>
- 7) <http://academic.pgcc.edu/~kroberts/Lecture/Chapter%207/horizontal.html>
- 8) http://en.wikipedia.org/wiki/Replica_plating