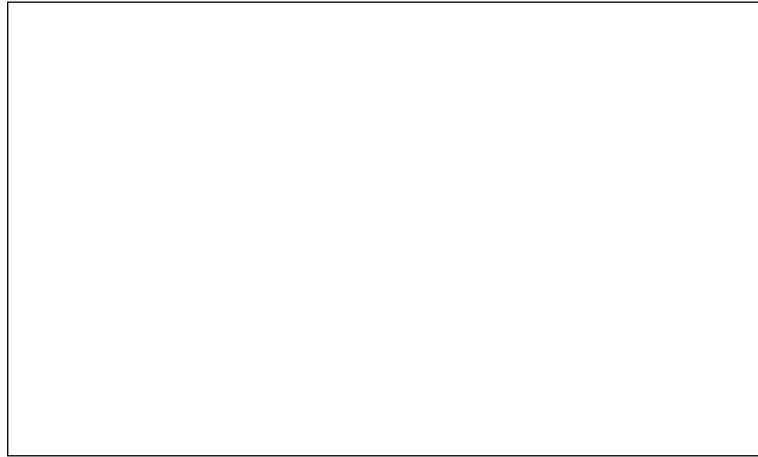




# SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



VANKOMİSİN, METİSİLİN DUYARLI TEİKOPLANİN DİRENÇLİ  
BAKTERİLERİN DİRENÇ PATERNLERİNİN BELİRLENMESİ

Nalin GÜMUŞÇÜ  
1168208104

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN  
Doç.Dr. Dumrul GÜLEN  
Tez No: 10251990

2019- TEKİRDAĞ

T.C

TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**VANKOMİSİN, METİSİLİN DUYARLI  
TEİKOPLANİN DİRENÇLİ BAKTERİLERİN  
DİRENÇ PATERNLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Nalin GÜMÜŞÇÜ  
1168208104**

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. Dumrul GÜLEN**

**Tez No: 10251990**

**2019-TEKİRDAĞ**

**KABUL ve ONAY**

Namık Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

çerçevesinde Doç.Dr. Dumrul GÜLEN danışmanlığında yürütülmüş bu çalışma,  
aşağıdaki jüri tarafından

Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi

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

**Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Nalin GÜMÜŞÇÜ'nün "VANKOMİSİN, METİSİLİN DUYARLI TEİKOPLANİN DİRENÇLİ BAKTERİLERİN DİRENÇ PATERNLERİNİN BELİRLENMESİ" başlıklı tezi..... günü saat .....’da Namık Kemal Üniversitesi Lisansüstü Eğitim- Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.**

.....  
Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Tez çalışma konusunun belirlenmesine katkı sağlayan danışman hocam Doç. Dr. Dumrul GÜLEN'e teşekkürlerimi bildiririm

Çalışmalarımın tüm aşamalarında, bütün desteğini cömertçe sunan Dr. Öğretim Üyesi Berna ERDAL hocama sonsuz teşekkürlerimi bildiririm.

Çalışmanın yazımı aşamasında ve literatür temininde katkılarını eksik etmeyen Dr. Öğretim Üyesi Gözde ÖZTAN hocama teşekkürlerimi sunarım.

Destek, ilgi ve yardımları için sevgili yüksek lisans arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim hayatım boyunca ne şartlarda olursa olsun bana hep ilerisini gösteren, bugüne gelmem için hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan tüm olumsuzlukları beraber aştığımız sevgili aileme minnettarlığımı bildiririm.

## ÖZET

**GÜMÜŞCÜ N, Vankomisin, Metisilin Duyarlı Teikoplanin Dirençli Bakterilerin Direnç Paternlerinin Belirlenmesi, Namık Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Tekirdağ, 2019.**

İnsanlarda mikrobiyota elemanları olan Stafilokoklar toplum ve hastane kaynaklı infeksiyonların en önemli etkenlerindedir. Metisilin dirençli Stafilokok suşlarında glikopeptid antibiyotikler kullanılır. Metisilin direncinin belirlenmesinde otomatize sistemlerin kullanımının artmasıyla düşük ve yanlış MIK sonuçlarında bile glikopeptid antibiyotiklerin kullanımını arttırmıştır. Bu sonuç vakalarda glikopeptid direncinin gelişmesini hızlandırmıştır. Artan direnç infeksiyonların tedavisinde zorluklara neden olmuş bu da vakalarda genetik temelin araştırılmasıyla farklı tedavi yöntemlerinin bulunmasının amaçlanmasına yönlendirmiştir. Çalışmamızda laboratuvar örneklerinden izole edilen *Staphylococcus* suşları incelenmiştir. 30 suşun 3'ü *S. aureus*, 27'si KNS olarak tespit edilmiştir. Bu suşlar Kirby Bauer disk difüzyon yöntemi ile metisilin, fusidik asit, penisilin, tetrasiklin, trimetoprim-sülfametoksazole, siprofloksasine, klindamisin, eritromisin ve gentamisine direnç olanları belirlenmiştir. Vankomisin ve teikoplanin mikrodilüsyon yöntemi ile duyarlılık durumları belirlenmiştir. Çıkan sonuçlarda teikoplanin dirençli olan suşlara PCR yöntemi ile *tcaRAB* gen bölgesindeki mutasyonların varlığı araştırılmıştır.

PCR ile mutasyon varlığı analiz edilen 15 stafilokok suşunun, 10 tanesi metisilin dirençli, vankomisin duyarlı ve teikoplanin dirençli, 5 tanesi metisilin, vankomisin duyarlı teikoplanin dirençli olarak tespit edilmişti. PCR sonuçlarına göre, teikoplanin dirençli 15 suşa gen bölgeleri amplifiye olmuştur.

Sonuçta hastane enfeksiyonlarının etkin tedavisi ve mutasyonlarla oluşan direncin minimuma indirilmesinde teikoplanin dirençlinin genetik temelinin araştırılması alınacak önlemlerin belirlenmesi için önem arz etmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Stafilokok, Metisilin, Vankomisin, Teikoplanin, MIK, PCR

## ABSTRACT

**GÜMÜŞÇÜ N, Determination of Resistance Patterns of Vancomycin, Methicillin-Sensitive Teicoplanin Resistant Bacteria, Namık Kemal University Institute of Health Sciences, Department of Medical Microbiology Master Thesis, Tekirdağ, Turkey.** Staphylococci with microbiota elements in humans are the most important factors of community and hospital central infections. Glycopeptide antibiotics are used in methicillin-resistant Staphylococci strains. Increased use of automated systems to detect methicillin resistance increased the use of glycopeptide antibiotics even in low and false MIK results. This result accelerated the development of glycopeptide resistance in cases. Increased resistance caused difficulties in the treatment of infections, which led to the investigation of the genetic basis in order to find different treatment methods. In this study, Staphylococcus strains isolated from laboratory samples were examined. Vitek 2 automated system and conventional methods, 3 of 30 strains were identified as S.aureus, 27 was identified as KNS. These strains were found to be resistant to methicillin, fusidic acid, penicillin, tetracycline, trimethoprim-sulfamethoxazole, ciprofloxacin, clindamycin, erythromycin and gentamicin by Kirby Bauer disc diffusion method. Sensitivity conditions were determined by vancomycin and teicoplanin microdilution method. In the results, the presence of mutations in the tcaRAB gene region were investigated by PCR method in strains resistant to teicoplanin.

The presence of mutations by PCR was determined as 15 resistant staphylococci strains, 10 of them were methicillin resistant, vancomycin sensitive and teicoplanin resistant, 5 of them were methicillin, vancomycin susceptible teicoplanin resistant. According to PCR results, gene region in 15 strains resistant to teicoplanin were amplified.

In conclusion, the effective treatment of hospital infections and the genetic basis of teicoplanin resistance in minimizing the resistance generated by mutations are important for determining the measures to be taken.

**Key words:** Staphylococcus, Methicillin, Vancomycin, Teicoplanin, MIK, PCR

**İÇİNDEKİLER**

TEŞEKKÜR	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Stafilokoklar	3
2.1.1. Tarihçe ve Sınıflama	3
2.1.2. Morfolojik ve Kimyasal Özellikleri	5
2.2. Üreme ve Kültür Özellikleri	5
2.3. Biyokimyasal Özellikleri	6
2.4. Genom Yapısı	6
2.5. Virulans ve Patojeniteleri	6
2.5.1. Kapsül	6
2.6. Hücre Duvarı	7
2.6.1. Peptidoglikan Tabaka	7
2.6.2. Teikoik Asit	8
2.6.3. Yüzey Proteinleri	8
2.7. Toksinler	9
2.7.1. Sitolitik Toksinler	9
2.7.2. Enterotoksin	10
2.7.3. Eksfoliyatin (Eksfoliyatif toksin)	10
2.8. Enzimler	11
2.8.1. Koagülaz	11
2.8.2. Lipaz	11
2.8.3. Katalaz	11
2.8.4. Hiyalüronidaz	12
2.8.5. Stafilokinaz (Fibrinolizin)	12



2.8.6. Spesifik fosfolipaz C – Fosfatidilinozitol	12
2.8.7. Deoksiribonükleaz	12
2.8.8. Penisilinaz (Beta-laktamaz)	12
2.8.9. Slime Faktör	12
2.9. Epidemiyoloji	13
2.10. Stafilokokların Neden Olduğu İnfeksiyonlar	13
2.10.1. <i>S. aureus</i> İnfeksiyonları	13
2.11. İnvazyon Yolu ile Oluşan İnfeksiyonlar	14
2.11.1. Deri İnfeksiyonları	14
2.11.2. Bakteriyemi ve Endokardit	16
2.11.3. Pnömoni ve Ampiyem	16
2.11.4. Kemik / Eklem İnfeksiyonları	17
2.11.5. Menenjit ve Beyin Absesi	17
2.11.6. Üriner Sistem İnfeksiyonları	18
2.12. Toksinlerle Oluşan İnfeksiyonlar	18
2.12.1. Haşlanmış Deri Sendromu	18
2.12.2. Toksik Şok Sendromu (TSS)	18
2.12.3. Stafilokokal Besin Zehirlenmesi	19
2.13. Koagülaz Negatif Stafilokok (KNS) İnfeksiyonları	19
2.13.1. İntravenöz Kateter İnfeksiyonları ve Nozokomiyal Bakteriyemi	19
2.13.2. Doğal ve Prostetik Kapak Endokarditi	20
2.13.3. Serebrospinal Sıvı Şantı İnfeksiyonları	20
2.13.4. Peritoneal Diyaliz Kateteri İlişkili Peritonit	21
2.13.5. İdrar Yolu İnfeksiyonları	21
2.13.6. Osteomyelit ve Protez Eklem İnfeksiyonu	22
2.14. Stafilokoklar'da Metisilin Direnci	22
2.15. Vankomisin	23
2.16. Teikoplanin	24
3. YÖNTEM ve GEREÇLER	27
3.1. Çalışmada Kullanılan Bakteriler	27
3.2. İzolasyonda Kullanılan Besiyerleri	27
3.2.1. Kanlı Besiyeri	27
3.2.2. Mueller-Hinton Agar	27

3.3. Stafilokokların Tanımlanması	27
3.3.1. Vitek 2 Otomatize Sistem	28
3.4. Antibiyogram Testi (Kirby Bauer disk difüzyon yöntemi)	28
3.5. Mikrodilüsyon Yöntemi	29
3.6. DNA İzolasyonu	30
3.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	31
4.BULGULAR	33
5. TARTIŞMA	40
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	47
7. KAYNAKLAR	48

## SİMGELER ve KISALTMALAR

<b>°C</b>	Santigrat Derece
<b>µg</b>	Mikrogram
<b>µl</b>	Mikrolitre
<b>µm</b>	Mikrometre
<b>µM</b>	Mikromolar
<b>BORSA</b>	Borderline resistant <i>S. aureus</i>
<b>bp</b>	Baz çifti
<b>BT</b>	Bilgisayarlı tomografi
<b>cAMP</b>	Siklik adenozin monofosfat
<b>C+G</b>	Sitozin ve Guanin toplamı
<b>CLSI</b>	Clinical and Laboratory Standards Institute
<b>cm</b>	Santimetre
<b>dk</b>	Dakika
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik Asit
<b>DD</b>	Disk difüzyon yöntemi
<b>EUCAST</b>	European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing
<b>FOX</b>	Sefoksitin
<b>GP</b>	Gram pozitif identifikasyon kartı
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Hidrojen peroksit
<b>IgA<sub>2</sub></b>	İmmunoglobulin A <sub>2</sub>
<b>IgG<sub>3</sub></b>	İmmunoglobulin G <sub>3</sub>
<b>IgG</b>	İmmunoglobulin G
<b>IgM</b>	İmmunoglobulin M
<b>IL-1</b>	İnterlökin-1
<b>IL-2</b>	İnterlökin-2

<b>KNS</b>	Koagülaz Negatif Stafilokok
<b>KAMHB</b>	Katyon ayarı yapılmış Mueller-Hinton Broth
<b>Kbp</b>	Kilobaz çifti
<b>kDa</b>	Kilo dalton
<b>KDİ</b>	Kateter ilişkili infeksiyonları
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Magnezyum klorür
<b>MHB</b>	Mueller-Hinton Broth
<b>MIK</b>	Minimal İnhibitör Konsantrasyon
<b>ml</b>	Mililitre
<b>mm</b>	Milimetre
<b>MODSA</b>	Modified resistant <i>S. aureus</i>
<b>MRG</b>	Manyetik rezonans görüntüleme
<b>MRSA</b>	Metisilin Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>MSSA</b>	Metisilin Duyarlı <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>MSKNS</b>	Metisilin Duyarlı Koagülaz Negatif <i>Stafilokok</i>
<b>Mu3/ hVISA</b>	Vankomisine orta derecede duyarlı suş heterojen VISA
<b>Mu50</b>	Vankomisine duyarlılığı azalmış suş
<b>NAG</b>	N-asetil glukozamin
<b>NAMA</b>	N-asetil muramik asit
<b>nm</b>	Nanometre
<b>PBP</b>	Penisilin bağlayan proteinler
<b>PCR</b>	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>SCCmec</b>	Stafilokokal kaset kromozomu
<b>SMD</b>	Sıvı mikrodilüsyon yöntemi
<b>SSSS</b>	<i>Stafilokokal</i> Haşlanmış Deri Sendromu
<b>STSS</b>	<i>Stafilokoksik</i> Toksik Şok Sendromu
<b>TSS</b>	Toksik Şok Sendromu
<b>TSST-1</b>	Toksik Şok Sendromu Toksini-1
<b>VISA</b>	Vankomisine duyarlı olan <i>Stafilokoklar</i>

<b>VRE</b>	Vankomisine dirençli enterokok
<b>VRSA</b>	Vankomisine dirençli <i>S. aureus</i>

## ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Teikoplanin'in Açık Formülü .....	25
Şekil 4.1. Teikoplanin dirençli bulunan <i>Staphylococcus</i> sp. DNA izolasyonu sonrası agarose jel elektroforez görüntüsü .....	37
Şekil 4.2. <i>tcaR</i> gen bölgesi .....	38
Şekil 4.3. <i>tcaA</i> gen bölgesi .....	38

**TABLolar**

Tablo 2.1. Tanımlanmış stafilokok tür ve alt türleri	4
Tablo 2.2' de Teikoplanin bileşenlerinin moleköl ağırlıkları ve kapalı formülleri	25
Tablo 3.1. Antibiyotikler ve zon çapı sınır değerleri	29
Tablo 3.2 Vankomisin ve Teikoplanin'in, <i>S. aureus</i> ve KNS'ler için EUCAST tarafından belirlenmiş MIK sınır değerleri	30
Tablo 3.3. Moleküler biyolojik çalışmada kullanılmak üzere tasarlanan primerler	31
Tablo 4.1. Stafilokok suşlarının çeşitli antibiyotiklere duyarlılık sonuçları	34
Tablo 4.2. Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MIK) değerleri	35
Tablo 4.3. Teikoplanin Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MIK) değerleri	35
Tablo 4.4. 15 suşun PCR sırasına göre metisilin durumu	36

## 1. GİRİŞ

*Micrococcaceae* ailesinin üyesi olan stafilokokların 60'ın üzerinde türü tanımlanmış olup fakültatif anaerop koklardır. Kanlı agarda S tipi koloni oluşturan bu bakteriler Gram pozitif kok morfolojisine sahiptirler ve mikroskopta boyalı preparatlarda üzüm salkımı şeklinde görülürler. İnsanda saptanmış 35 türü vardır. Doğada yaygın bir şekilde bulunurlar. İnsan derisinin mikrobiyota elemanlarıdır ve buradan dışarıya açılan vücut boşluklarından mukozalara yerleşirler. İnsanların en çok burun boşluğu ve deri lezyonlarında üreyebilirler. Besin zehirlenmesi, yara infeksiyonu ve deri bütünlüğünün bozulmasıyla yumuşak doku infeksiyonları sebep olurlar (Peacock 2006).

Stafilokoklarda etken olarak en çok rastlanan tür koagülaz pozitif olan *S. aureus*'tur. Kan kültürlerinden sıklıkla Koagülaz Negatif Stafilokok (KNS) olan *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* ve *S. saprophyticus* izole edilir. Hastane ve toplum kaynaklı toksik şok sendromu, bakteriyemi, pnömoni, endokardit ve osteomyelit gibi mortalitesi ve morbiditesi yüksek ciddi infeksiyonlara sebep olurlar (Lowy 1998).

İlk antibiyotiğin keşfinden sonra mikroorganizmalarda direnç mekanizmaları geliştirmektedir. Penisilinin keşfinden sonra 1940'ta seri üretimine başlanmış ve bu durum stafilokokal infeksiyonların tedavisi için önemli bir aşama olmuştur. Fakat penisilinin yaygın bir şekilde kullanılması penisilini parçalayan suşların ortaya çıkmasına da zemin hazırlamıştır. Kirby tarafından 1944 yılında ilk kez penisilinaz üretimi gerçekleştiren stafilokok suşları bildirilmiştir. İlerleyen yıllarda stafilokoklarda penisilin direncinde önemli artışlar olmuştur. 1950'li yıllara gelindiğinde penisiline ek olarak o dönemde kullanımda olan streptomisin, eritromisin ve tetrasikline de direnç gelişmiştir. 1960 yılında metisilinin kullanıma girmesiyle stafilokok infeksiyonlarının tedavisinde önemli bir aşama olmuş fakat kısa bir süre içinde 1961'de Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) tanımlanmaya başlanmıştır. 1970'li yıllara gelindiğinde ise metisilin direnci gelişen stafilokoklarda çoklu antibiyotik direnci ortaya çıkmıştır (Şardan 2002). Metisiline dirençli stafilokok infeksiyonlarının artması hastanelerde klinik ve epidemiyolojik problemlere neden olmuş, bu infeksiyonların tedavisinde beta-laktam antibiyotiklerin kullanılamaması önemli tedavi sorunlarına sebep olmuş ve yeni



antibiyotiklere gereksinimi arttırmıştır (Çavuşoğlu ve diğ. 1999).

Beta laktam direnci ve özellikle metisiline direnç gösteren stafilokok infeksiyonlarında glikopeptid antibiyotikler tercih edilmektedir. Glikopeptid grubu antibiyotik olan vankomisin ve teikoplanin hücre duvar sentezini inhibe ederek etki gösterirler. Stafilokok infeksiyonlarında bu antibiyotiklerin kullanılmasının artmasıyla vankomisin ve teikoplanin direnci çeşitli ülkelerde bildirilmeye başlanmıştır. Bu suşların saptanmasından sonra duyarlılık azalmasına neden olan aktarılabılır direnç genlerinin kaynağı ve türü araştırılmaya başlanmıştır. Metisiline duyarlı stafilokokların dirençli olarak saptanması gereksiz yere glikopeptid antibiyotiklerin kullanılmasına neden olmaktadır. Benzer şekilde metisiline dirençli stafilokokların yanlış bir şekilde duyarlı olarak tanımlanması tedavide başarısızlıklarına yol açmaktadır. Glikopeptidlere dirençli stafilokok suşlarının ortaya çıkması bu konunun önemini arttırmaktadır (Sievert ve diğ. 2002). Teikoplanin ve vankomisine eşzamanlı olarak dirençli suşların bildirilmesine rağmen, bu türdeki diğer koagülaz negatif stafilokokların herhangi birinde glikopeptid direncinin genetik temeli büyük oranda bilinmemektedir (Kim ve diğ. 2012).

Yakın zaman da Bakthavatchalam ve ark. bir vakadan izole ettikleri metisilin, vankomisin duyarlı teikoplanin dirençli *Staphylococcus haemolyticus* suşunun gen dizilimini yaparak tcaRAB operonunda mutasyonlar bildirmişlerdir (Bakthavatchalam ve diğ. 2017).

Çalışmamızda Namık Kemal Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarında çeşitli örneklerden izole edilen *S. aureus* ve KNS suşlarında glikopeptid direncinin moleküler temelini araştırabilmek adına tcaRAB operonunda mutasyonlara özgü primerler tasarlanarak bu mutasyonların stafilokok suşlarındaki varlığını gösterebilmek amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Stafilocoklar

#### 2.1.1. Tarihçe ve Sınıflama

Robert Koch 1878'de ilk kez ışık mikroskopunda stafilocokları tanımlamıştır. Pasteur 1880'de sıvı besiyerinde stafilocokları üretmiştir. Stafilocokların ilk isimlendirmesini 1881 de İskoçyalı cerrah Alexander Ogston yapmıştır. Kobaylar ve fareler için stafilocokların patojenitesini gösterirken bu bakterilerin üreme esnasında üzüm salkımı şeklinde düzensiz yapılar oluşturmasından dolayı *Staphyle*: üzüm salkımı ismini vermiştir. İlk kez 1884'de Rosenbach insandan stafilocokları izole etmiştir. *S. albus* bakteri grubunun birden çok alt türünün olduğu ve *S. epidermidis* dışındaki farklı KNS türleri de 1970'ten itibaren tanımlanmaya başlanmıştır (Bannerman ve diğ. 2003).

1986'da Bergey'in yaptığı bakteriyoloji sınıflamasına göre *Micrococcaceae* ailesinde *Planococcus* ve *Stomatococcus* ile beraber olan *Micrococcus* ve *Staphylococcus* türleri Gram pozitif ve katalaz pozitifdir (Alen ve diğ. 2006). Ayrıca DNA-rRNA hibridizasyonu, DNA dizi analizi, 16S rRNA'nın oligonükleotid karşılaştırmalı kataloglaması *Micrococcus* ve *Staphylococcus* türleri benzerlik göstermektedir. Stafilocok türlerinin nispeten *Gemella*, *Bacillus*, *Listeria*, *Planococcus* ve *Brochothrix* ile benzerlik gösterdiği bulunmuştur. Bu türler bir süre Stafilocoklarla beraber *Streptococcus-Bacillus-Lactobacillus* kümesinin *Bacillaceae* ailesindeki türler ile sınıflandırılmıştır. Yapılan çalışmalarda, mikrocokların oksidaz + (pozitif) olduğunu, C+G oranının (%73-63 mol) yüksek miktarda olduğunu, in-vitro koşullarda Stafilocokların aksine basitrasine (0.04 µg/ml) duyarlı iken, lizostafine (200 µg/ml) ve furazolidon (100 µg/ml) dirençli olduklarını göstermiştir (Peacock ve diğ. 2005). *S. aureus*, Stafilocoklar içerisinde en patojen türdür ve infeksiyonlarda ilk sırada görülür. Stafilocok türleri, *S. aureus* hariç KNS'lar olarak adlandırılır (Alen ve diğ. 2006). Deri mikrobiyota üyesi olan *S. epidermidis* KNS'ler içerisinde en sık izole edilen türdür. Bugüne kadar stafilocok cinsinden 35 tür tanımlanmıştır ve 17 tanesi klinik örneklerden elde edilmiştir (Tablo 2.1.) (Alen ve diğ. 2006).

**Tablo 2.1. Tanımlanmış stafilokok tür ve alt türleri**

Tür	Alt tür	Referans
<i>S.arlettae</i> <sup>‡</sup>		Schleifer et al. 1984
<i>S.aureus</i>	<i>anaerobius</i>	De la Fuente et al. 1985
<i>S.aureus</i> *	<i>aureus</i>	Rosenbach 1884
<i>S.auricularis</i> *		Kloos and Schleifer 1983
<i>S.capitis</i> *	<i>capitis</i>	Kloos and Schleifer 1975
<i>S.capitis</i> *	<i>ureolyticus</i>	Bannerman and Kloos 1991
<i>S.caprae</i> <sup>*</sup>		Devriese et al. 1983
<i>S.carnosus</i> <sup>‡</sup>	<i>carnosus</i>	Schleifer and Fischer 1982
<i>S.carnosus</i> <sup>‡</sup>	<i>utilis</i>	Probst et al. 1998
<i>S.chromogenes</i> <sup>§</sup>		(Devriese et al. 1978), Hajek et al. 1986
<i>S.cohnii</i> *	<i>cohnii</i>	Schleifer and Kloos 1975
<i>S.cohnii</i> *	<i>urealyticum</i>	Kloos and Wolfshohl 1991
<i>S.condimenti</i>		Probst et al. 1998
<i>S.delphini</i> <sup>§</sup>		Varaldo et al. 1988
<i>S.epidermidis</i> *		Winslow and Winslow 1908; Evans 1916
<i>S.equorum</i> <sup>§</sup>	<i>equorum</i>	Schleifer et al. 1984
<i>S.equorum</i> <sup>§</sup>	<i>linens</i>	Place et al. 2003
<i>S.felis</i> <sup>§</sup>		Igimi et al. 1989
<i>S.fleurettii</i>		Vernozy-Rozand et al. 2000
<i>S.gallinarum</i> <sup>§</sup>		Devriese et al. 1978
<i>S.haemolyticus</i> *		Schleifer and Kloos 1975
<i>S.hominis</i> *	<i>hominis</i>	Kloos and Schleifer 1975
<i>S.hominis</i> *	<i>novobiosepticus</i>	Kloos et al. 1998
<i>S.hyicus</i> <sup>§</sup>		(Sompolinski 1953), Devriese et al. 1978
<i>S.hyicus</i>	<i>chromogenes</i>	Devriese et al. 1978
<i>S.intermedius</i>		Hajek 1976
<i>S.kloosii</i> <sup>‡</sup>		Schleifer et al. 1984
<i>S.lentus</i> <sup>§</sup>		Kloos et al. 1976, Schleifer et al. 1983
<i>S.lugdunensis</i> *		Freny et al. 1988
<i>S.lutrae</i>		Foster et al. 1997
<i>S.muscae</i> <sup>§</sup>		Hajek et al. 1992
<i>S.pasteuri</i> *		Chesneau et al. 1993
<i>S.piscifermentans</i> <sup>§</sup>		Tanasupawat et al. 1992
<i>S.saccharolyticus</i> *		Kilpper-Balz and Schleifer 1981
<i>S.saprophyticus</i>	<i>bovis</i>	Hajek et al. 1996
<i>S.saprophyticus</i> *	<i>saprophyticus</i>	Shaw et al. 1951
<i>S.schleiferi</i> *	<i>coagulans</i>	Igimi et al. 1990
<i>S.schleiferi</i>	<i>schleiferi</i>	Freny et al. 1988
<i>S.sciuri</i>	<i>carnaticus</i>	Kloos et al. 1997
<i>S.sciuri</i> <sup>§</sup>	<i>lentus</i>	Kloos et al. 1976
<i>S.sciuri</i> <sup>§</sup>	<i>rodentium</i>	Kloos et al. 1997
<i>S.sciuri</i> <sup>§</sup>	<i>sciuri</i>	Kloos et al. 1976
<i>S.simulans</i> *		Kloos and Schleifer 1975
<i>S.succinus</i>	<i>casei</i>	Place et al. 2003
<i>S.succinus</i>	<i>succinus</i>	Lambert et al. 1998
<i>S.vitulinus</i> <sup>§</sup>		Webster et al. 1994
<i>S.warneri</i> *		Kloos and Schleifer 1975
<i>S.xylosum</i> *		Schleifer and Kloos 1975

\* İnsanlarda ve insan dışı primatlarda bulunanlar

‡ Diğer hayvanlarda bulunanlar

§ Daha çok doğa ve toprakta bulunanlar

Alexander Fleming'in 1928'de penisilini bulması ve 1940'da Florey ve Chain tarafından penisilin üretiminin başarılması ile stafilokok infeksiyonlarının tedavisinde önemli bir aşama kaydedilmiştir. Penisilinaz üretimi ilk olarak 1940'da Abraham Chain tarafından *Escherchia coli*'de bildirilmiştir. *S. aureus* suşlarında ise penisilin direncini 1944'de Kirby tanımlamıştır (Shopsin ve Kreiswirth 2001).

### 2.1.2. Morfolojik ve Kimyasal Özellikleri

#### Görünüm ve Boyanma

Stafilokoklar; yuvarlak, 0.5-1.5 µm çapında, gram pozitif, sporsuz ve hareketsiz mikroorganizmalardır. Zorunlu anaerop, *S. aureus subsp. anaerobius* ve *S. saccharolyticus* dışında fakültatif anaerop olup genellikle aerop ürerler. Çoğunlukla oksidaz negatif (*S. lentus*, *S. vitulinus* ve *S. sciuri* hariç), katalaz pozitif (*S. aureus subsp. anaerobius* ve *S. saccharolyticus* hariç) kapsülsüz mikroorganizmalardır. Mikroskopta üzüm salkımı (düzensiz kümeler) görünümü oluştururlar. Bazen üçlü-dörtlü kısa zincir benzeri görünümüleriyle Stafilokoklar, katalaz testinin pozitif olmasıyla Streptokoklardan ayrılır (Alen ve diğ. 2006).

### 2.2. Üreme ve Kültür Özellikleri

Nutrient agar, triptik soy agar, kanlı agar veya beyin kalp infüzyon agar gibi besiyerlerinden izole edilen Stafilokok türlerinin birçoğu 18-24 saat içinde 30-37°C'de 1-3 mm çapında koloni oluştururlar (Peacock ve diğ. 2005).

*S. aureus* kolonileri 37°C de 18-24 saatte portakal rengi, krem rengi veya sarı, hafif kabarık, yuvarlak, S tipi koloni oluştururlar ve çoğunluğu kanlı agarda beta hemoliz yaparlar. Bazı kapsül oluşturan suşları ıslak ve parlak görümlü koloni oluşturabilirler. *S. aureus*'un kanlı besiyerinde, pigmentsiz, hemoliz yapmayan ve küçük koloniler şeklinde çoğalan daha küçük koloni varyantları saptanmıştır (Moreillon ve diğ. 2005).

KNS kolonileri ise S tipi, hafif konveks kabarık, parlak ve sıklıkla pigmentsizdir. Güçlü slime tabakası oluşturan bazı türleri mukoid koloni morfolojisi gösterir. *S.*

*epidermidis* ve *S. hominis* kolonileri genellikle *S. haemolyticus* kolonilerinden küçüktür. *S. saprophyticus* ve *S. epidermidis* suşlarının bazılarında kanlı agarda beta hemoliz gözlenebilir. (Alen ve diğ. 2006).

### 2.3. Biyokimyasal Özellikleri

*S. aureus*, *S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. schleiferi subsp.*, *S. lugdunensis*, *S. lutrae* ve *S. delphini* suşları koagülaz pozitifdir. Stafilokoklar glukozu fermantatif şekilde parçalara ayırır ve son ürün olarak laktik asit oluştururlar. Ayrıca sükroz, trehaloz, maltoz ve laktozu da fermente ederler. Mannitolu yalnızca *S. aureus* fermente eder (Moreillon ve diğ. 2005).

Stafilokoklar, %7.5-10 NaCl içeren besiyerlerinde üreyebilirler. Suşlar pH 7-7.5 arasında ve 30-37°C optimal sıcaklıkta ürerler. Basitrasin ve lizozime karşı dirençli, lizostafine ve furazolidona duyarlıdırlar. Nitratı nitrite indirgerler. *S. aureus* kuruluğa ve ısıya direnç gösterir. Antiseptiklere ve dezenfektanlara karşı duyarlıdırlar (Bannerman ve diğ. 2003).

### 2.4. Genom Yapısı

Genomu transpozonlardan, profajlar ve plazmidler ile yaklaşık 2000-3000 kbp uzunluğunda bir kromozomdan oluşur. DNA'larında C+G (Sitozin ve Guanin) içeriği %30-39 mol'dür (Peacock ve diğ. 2005). *S. aureus* genomu C+G oranı yaklaşık %32 mol, tek bir kromozomdan oluşur ve 2800 kbp (kilo baz çifti) uzunluğunda, 2500 yakın geni kodladığı düşünülür. *S. epidermidis*'in ise çeşitli sayıdaki plazmidlerden ve 2500 kbp uzunluğundaki bir kromozom oluşur. Bu türler 2400-2500 kodlanmış sekans ve %32'lik C+G içeriğine sahiptirler (Baba ve diğ. 2002).

### 2.5. Virulans ve Patojeniteleri

#### 2.5.1. Kapsül

*S. aureus*'un mukoid suşlarında polisakkarid bir mikrokapsül vardır. Bu türler intravenöz kateterlerde, infekte kalp pillerinde ve periton kateterlerde elektron mikroskop incelemelerle gösterilmiştir. Ekzopolisakkarit konak hücrelerine özellikle de kateterler gibi yabancı cisimlere adherensini kolaylaştırır ve bakteriyi fagositozdan

korur. Stafilokoklarda 11 mikrokapsüler polisakkarit serotipi adlandırılmıştır.

*S. aureus* türlerinin %70-80'inde tip 8 ve tip 5 kapsül serotipleri bulunur (Moreillon ve diğ. 2005). Toksik şok sendromu toksini üreten türlerin çoğu tip 8 ve penisiline dirençli *S. aureus* suşlarının büyük çoğunluğu tip 5 kapsül içerir (Alen ve diğ. 2006).

## 2.6. Hücre Duvarı

### 2.6.1. Peptidoglikan Tabaka

Hücre duvarının esas yapısı karmaşık bir makromoleküldür ve hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakterilerde bulunur. Stafilokoklarda hücre duvarının kuru ağırlığının %50-60'ını peptidoglikan tabaka oluşturur. Peptidoglikan tabaka bakteri hücrelerinde bulunur, fakat insan hücrelerinde bulunmaz buda antibakteriyel ilaçlar için iyi bir hedef oluşturur. Peptidoglikan tabaka üç bölümden oluşmaktadır. İlk bölüm  $\beta$ -1,4 glikozid bağları ile bağlanan N-asetil glukozamin (NAG) ve N-asetil muramik asit (NAMA) alt gruplarından oluşan disakkarit yapısıdır. İkinci bölüm N-asetil muramik asite bağlı L ve D aminoasitlerinden oluşmuş pentapeptid zincirdir. NAMA de bağlanan pentapeptid yapı sırasıyla; L-alanin, D-glutamik asit, L-lizin, D-alanin, D-alanin şeklindedir. Üçüncü bölümde ise NAMA'ye bağlı pentapeptid yan zincirleri, pentaglisin köprüleri ve bir zincirde D-alanin ile diğer zincirdeki L-lizin arasında olacak şekilde birbirlerine çapraz bağlanır.

Hücre duvarının sağlamlılığını çapraz bağlar sağlar ve bu bağların yapısı suşlar arasında farklıdır. *S. aureus*'un lizozim enzimine karşı dirençli oluşu çapraz bağlantı oranının yüksek olmasından kaynaklanır.

Transglikozilaz, transpeptidaz ve pentapeptid köprüler oluşturup peptidoglikan yapının retiküler yapı kazanmasını, disakkarid pentapeptidlerin birbiri ile bağlanmalarını ve D-karboksipeptidaz pentapeptid yapı içindeki son D-alaninin zincirden ayrılmasına neden olur. Beta-laktam antibiyotikleri, spesifik olarak karboksipeptidaz, peptidoglikan sentezini ve en önemlisi transpeptidazları inhibe ederek durdururlar. Bu enzimler penisilin bağlayan proteinler (PBP) olarak adlandırılır. Beta-laktam antibiyotiklerin bu

enzimlere bağlanmasıyla inhibisyon gelişir. *S. aureus*'ta dört tane PBP (PBP1, PBP2, PBP3, PBP4) vardır.

Peptidoglikan tabakası stafilokoklarda; komplemanın aktivasyonuna, trombosit agregasyonuna ve makrofajlardan sitokin salınımını uyarmasına neden olur. Dahası monositlerden interlökin-1 (IL-1) salınımını uyarak polimorfonükleer lökositlerin infeksiyon bölgesine göç ederek apse oluşmasına sebep olur. Gözyaşı, ter ve lökositlerde bulunan muramidaz (lizozim) enziminin hedefi diğer Gram pozitif bakterilerin ve stafilokokların peptidoglikan tabakasının  $\beta$ -1,4 bağlarıdır. Stafilokoklardaki pentaglisin köprülerinin lizostafin enzimine karşı duyarlılığı vardır (Ünal ve diğ. 2004).

### 2.6.2. Teikoik Asit

Fosfodiester bağlarıyla bağlanarak uzun zincirler oluşturan, suda eriyebilen şeker-alkol-fosfat polimerlerine teikoik asit denir. Peptidoglikan tabakadaki N-asetil muramik asit molekülüne fosfodiester bağlarıyla kovalent bir şekilde bağlanmıştır. Hücre duvarının kuru ağırlığının %30-50'sini oluşturur. Kalınlığı 10-12 nm arasında olduğu bilinir. Gliserol teikoik asit ve ribitol teikoik asit olarak iki tiptir.

Teikoik asit, *S. epidermidis*'de gliserol fosfat yapısında iken; *S. aureus*'da özgün ribitol (5-karbon monosakkarid) fosfat polimeri yapısındadır. Bu yapı yalnızca Gram pozitif bakterilerin hücre duvarında bulunur. Teikoik asit hücre yüzeyine negatif yük verir. Çeşitli otolitik enzimlerin aktivasyonunda, metal iyonlarının ve katyonların lokalizasyonunda rol oynar. Teikoik asitler stafilokokların türe özgü antijenleridir. Fibronektin, sialoprotein, fibrinojen, elastin, laminin, kollojen, trombospondin ve vitronektin (mukozalarda bulunan özgül reseptörleri) ile birleşerek stafilokokların konağa adherensini sağlar (Moreillon ve diğ. 2005).

### 2.6.3. Yüzey Proteinleri

Stafilokokların hücre duvarı yerleşimleri ve kimyasal yapıları birbirine benzeyen yüzey proteinleri elastin, fibronektin bağlayan proteinler, kollajen, kümeleşme faktörü (clumping faktör) ve Protein A'dır. Bunlar stafilokokların konak dokularına yerleşmesini sağlayan önemli proteinlerdir. Bu grubun prototipi, 1940'da Wervey

tarafından tanımlanan 42 kilodalton ağırlığıyla protein A dır. Büyük bir bölümü peptidoglikan yapıya kovalan bağlanıp, bir bölümü ise hücre dışına salınmaktadır. Önemli özelliği bazı immunoglobulin M (IgM)'lerin, immunoglobulin G3 (IgG3) dışındaki tüm immunoglobulin G (IgG) ve immunoglobulin A<sub>2</sub> (IgA<sub>2</sub>)'lerin Fc reseptörleri ile birleşebilmesidir. Bu yüzden protein A'nın antifagositer ve antikomplemanter etkisi vardır (Moreillon ve diğ. 2005).

## 2.7. Toksinler

### 2.7.1. Sitolitik Toksinler

Stafilokoklarda, en iyi bilinen, konak hücre fonksiyonunu ve morfolojisini etkileyen ekstrasellüler toksinler lökositinler ve hemolizindir. Bu ekstrasellüler toksinler stafilokokların çok fazla inflamatuvar yanıt olan bölgelerde bile üremelerini sağlar (Moreillon ve diğ. 2005).

#### Hemolizindir

Hemolizindir dört tipe ayrılır. Alfa hemolizindir, *S. aureus* suşlarının öncül hemolizindir ve 33 kDa (kilo dalton) ağırlığındadır. Sitolitik, hemolitik ve dermonekrotik etkileri vardır. İnsanların trombosit ve makrofaj hücre membranları üstünde litik etkiye sahiptir, ancak monositlere etkili değildir. Plazmidlerde ve bakteriyel kromozomlarda kodlanır. Formol ile toksoid haline getirilebilir.

Beta hemolizindir en iyi koyun eritrositlerinde, daha sonra tavşan ve insan eritrositlerinde litik etki gösterir ve 35 kDa ağırlığındadır. Bu toksinin bir diğer özelliği soğuk-sıcak lizis yapabilmesidir. Lökosit ve Fibroblast hücrelerine toksik etki yapar. Antijeniktir, formolle toksoid haline getirilebilir ve antitoksinle nötralize olur (Peacock ve diğ. 2005).

Gama hemolizindir koyun ve tavşan eritrositleri duyarlı, insan eritrositlerine orta derecede etkilidir. Özellikle stafilokoklara bağlı kemik hastalıklarında kanda bu toksine etkili antikor düzeyinin yüksek bulunması, toksinin bu hastalıklarda etkili olduğu varsayılır.

Delta Hemolizindir, hücre membranının bütünlüğünü ortadan kaldırır. Adenilat



siklazı aktive eder ve cAMP salınımını sağlar. Bu enzimatik aktivite, Stafilokokal besin zehirlenmesinde ve Stafilokoksik Toksik Şok Sendromunda (STSS) rol oynar. Maymun, insan ve tavşan eritrositlerine etkilidir. Ayrıca trombosit, lökosit, lenfosit ve makrofajları hasara uğrattır. Delta ve Alfa hemoliz insanda hastalık yapan stafilokok türlerinde en çok bulunanlardır. *S. aureus* türlerinin %82'inde her ikisi de birlikte bulunurken, %95'inde bunlardan biri veya diğeri bulunabilmektedir (Alen ve diğ. 2006).

### **Lökosidin (Panton-Valentine Toksin)**

Ekzotoksin olan lökosidin S (slow) ve F (fast) adında birbirini sinerjik şekilde etkileyen iki protein komponentinden oluşur. Bu proteinlerin moleküler ağırlıkları 35 ve 32 kDa'dur. Toksoid oluştururlar ve iyi birer antijen yapıdadırlar. Toksin aktivite gösterebilmeleri için 2 alt biriminde olması gerekir. Hücre zarının katyonlara ve potasyuma karşı geçirgenliği artırıcı gözeneklerin açılmasında toksin etkilidir. Makrofajlar ve lökositler üzerinde litik etkisi bulunur. Lökositler ile fagosite olurlar fakat lökosit ürettiği bilinen stafilokoklar hücrede üremeye devam ederler. Bu toksini olan stafilokok infeksiyonlarında kanama, nekrotizan pnömoni ve hızlı ilerleme tablosu görülmektedir (Peacock ve diğ. 2005).

### **2.7.2. Enterotoksin**

Enterotoksin, 100°C'ye 30 dakika (dk) kadar dayanabilen, ısıya dirençli, polipeptid yapılı maddelerdir. A, B, C1, C2, C3, D, E ve F olmak kaydıyla enterotoksinin 8 immünolojik tipi vardır, ayrıca yardımcı T hücreleri ve makrofajlardan, sıra ile interlökin-2 (IL-2) ve interlökin-1 (IL-1) salınımını uyarılıp sindirim kanalında bir süper antijen gibi davranırlar. D ve A besin zehirlenmelerinde sıklıkla karşılaşılan toksinlerdir ve *S. aureus*'ların %35- 50'sinin bu toksinleri oluşturabildiği bilinmektedir (Alen ve diğ. 2006).

### **2.7.3. Eksfoliyatin (Eksfoliyatif toksin)**

Stafilokok infeksiyonların eksfoliyatif ve veziküler deri lezyonlarından sorumlu epidermolitik toksindir. Biyokimyasal ve antijenik özellik olarak iki gruba ayrılır. Eksfoliyatif toksin A ısıya dirençli değildir ve plazmid orjinlidir, eksfoliyatif toksin B

ise kromozomaldır ve ısıya dirençlidir. Bu proteinler yapısal olarak aynı olmamalarına karşın benzer biyolojik aktivitelidirler. Stafilocokal Haşlanmış Deri Sendromu (SSSS)'ndan sorumludurlar (Alden ve diğ. 2006).

### **Toksik Şok Sendromu Toksini-1 (TSST-1)**

Bu toksin STSS sendromundan sorumludur. Süperantijen mekanizması ile sitokin salınımını uyarır. Ayrıca endotel hücrelerine direkt toksik etki de gösterebilir. Bu süperantijenler, konvansiyonel antijenlerden farklı birçok T hücre alt gruplarını uyararak, çok fazla miktarda sitokin salınımına, hastalarda şoklara ve ölümlere yol açabilirler (Himaratsu ve diğ. 1997).

## **2.8. Enzimler**

### **2.8.1. Koagülaz**

Plazma pıhtılaşma proteinidir ve stafilocoklar tarafından üretilir. İki çeşit koagülaz vardır. Bunlar bağlı clumping factorler, serbest koagülazdır ve farklı mekanizmalarla plazmada pıhtılaşmalara neden olurlar. Koagülaz enzimi pozitif olan stafilocokların üzerinde kalın fibrin tabakası oluşur. Bu özellik sayesinde stafilocoklar fagositoza karşı korunmuş olur, bunun da patojeniteye katkı sağladığı düşünülür (Alden ve diğ. 2006).

### **2.8.2. Lipaz**

KNS'ların yaklaşık %30'u ve *S. aureus* suşlarının tümünde üretilir. Lipaz enzimi, yağları hidrolize edilmesini vücutta lipid içeren bölgelerde stafilocok suşların yaşamını sürdürmesini sağlar. Ayrıca yüzeyel dokuları invaze ederek karbonkül ve fronkül gibi infeksiyonlarının gelişimine sebep olurlar (Alden ve diğ. 2006).

### **2.8.3. Katalaz**

Stafilocokların (*S. saccharolyticus* ve *S. aureus subsp. anaerobius* hariç) toksik enzimi, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'i (hidrojen peroksit) moleküllerine ayıştırarak su ve toksik olmayan oksijen açığa çıkarır. Bu enzim ile bakteriler fagositlere karşı direnç kazanırlar (Alden ve

diğ. 2006).

#### **2.8.4. Hiyalüronidaz**

Asit mukopolisakkaritidir. Konağın bağ doku matriksinde bulunur. Hiyalüronik asidi parçalar ve mikroorganizmanın hızlıca yayılmasını sağlar. Bu enzimin antijenik özelliği vardır. *S. aureus* suşlarının çoğu (%90'dan fazlası) hiyalüronidaz oluşturur (Alen ve diğ. 2006).

#### **2.8.5. Stafilokinaz (Fibrinolizin)**

Stafilokokların ortama saldığı kinazlar, plazmada var olan plazminojeni aktif hale getirerek plazmin oluşturur. Fibrini parçalayan fibrinolitik etki ile organizmanın yayılmasını sağlar (Alen ve diğ. 2006).

#### **2.8.6. Spesifik fosfolipaz C – Fosfatidilinozitol**

Dissemine intravasküler koagülasyon ve erişkin tip solunum zorluğu sendromu olan hastalardan alınan suşlarda gözlemlenen bir enzimdir. Bu suşlar penisiline ve antimikrobiyal ajanlara dirençlidir (Alen ve diğ. 2006).

#### **2.8.7. Deoksiribonükleaz**

*S. aureus* türünün %90'dan fazlasında vardır. DNAaz enzimleri ekzonükleaz ve endonükleaz aktivitesine sahiptir. Nükleik asitleri 3'-fosfomononükleotidlere kadar parçalayan fosfodiesterazlardır. Bu enzim ısıya dirençlidir (Alen ve diğ. 2006).

#### **2.8.8. Penisilinaz (Beta-laktamaz)**

Stafilokoklar tarafından salgılanan penisilinaz enzimi, penisilin grubu antibiyotiklerdeki beta-laktam halkasının hidroksil grubunu parçalayarak etkisiz hale getirir. Genetik taşınma transpozonlar ve plazmidler ile sağlanır (Bannerman ve diğ. 2003).

#### **2.8.9. Slime Faktör**

Glikokaliks materyali ve amorf kapsül yapısında olup %27 protein, %40

karbonhidrat içerir. Yüksek derecede antijenik yapıda olduğundan tavşanlarda çok yüksek titrede antikor cevabı oluşturur. Slime faktörü pozitif olan stafilokoklar daha virülandırlar ve antibiyotiklere daha çok direnç gösterdikleri bildirilmiştir. Slime faktör hücrel bağışıklık cevabı baskılar, nötrofil fagositozunu, nötrofil kemotaksisini ve opsonizasyonu inhibe eder (Alen ve diğ. 2006).

## 2.9. Epidemiyoloji

Stafilokok suşları çok yaygın şekilde görülür. KNS'ler insan derisi üzerinde mikroflora üyesi olarak görülürken *S. aureus* deri üzerindeki nemli bölgelerde geçici kolonizasyonlar yapar. Yeni doğmuş bebeklerin deri, perianal bölgelerinde ve göbek kordunu kalıntılarında *S. aureus* kolonizasyonuna sık rastlanır. Dahası KNS ve *S. aureus* genital sistemde, orofarinkste ve gastrointestinal sistemde bulunurlar. Sağlık personellerinde ve hastanede yatan hastalarda uzun süreli nazofarinks *S. aureus* taşıyıcılığı yüksek oranlarda görülür. Bu oran sağlıklı yetişkinler için %30'dur. Stafilokoklar hücre yüzey adezinleri sayesinde mukozal yüzeylere aderensi sağlar. Stafilokoklar kuru yüzeylerde çok uzun süre canlılığını koruyabilmelerine rağmen antiseptik solüsyonlara, dezenfektanlara ve yüksek sıcaklığa duyarlıdırlar (Vural ve diğ. 2011).

Sağlık çalışanları stafilokokları diğer insanlara bulaştırmamak için bireylere doğrudan temastan kaçınmalı, el hijyenine ve kullandığı aletlerin hijyenine dikkat etmelidir. Çünkü bakteriler duyarlı bireylerde kontaminasyon ile bulaşır (Fıskırma ve diğ. 2011).

## 2.10. Stafilokokların Neden Olduğu İnfeksiyonlar

### 2.10.1. *S. aureus* İnfeksiyonları

Stafilokoklar basit zührevi ve yumuşak doku infeksiyonlarından, sepsis gibi hayati tehlikesi olan hastalık yapabilecek kadar geniş bir spektrumu bulunur (Usluer 2004).

Stafilokok infeksiyonları vakaların farklılığına göre, invazyon yoluyla gelişen ve toksine bağlı ortaya çıkan infeksiyonlar olarak iki şekilde incelenir. Stafilokokal

infeksiyonların oluşması hem bakterideki virülans faktörlerine hem de konağın faktörlerine bağlıdır.

*S. aureus* infeksiyonlarının oluşumuna zemin hazırlayan faktörlerin başında fagositer sisteme ait kantitatif ve kalitatif yetersizlikler gelmektedir. İnfluenza gibi viral infeksiyonlar, hospitalizasyon, tanı ve tedavi için kullanılan yabancı cisimler, *S. aureus* infeksiyonların sıklığını arttırmırlar. Diyabetik hastalar, *S. aureus* infeksiyonları için risk grubundadır (Usluer 2004).

## 2.11. İnvazyon Yolu ile Oluşan İnfeksiyonlar

### 2.11.1. Deri İnfeksiyonları

Stafilokoklar; impetigo, fronkül, karbonkül, mastit gibi farklı deri infeksiyonuna yol açar. Derinin bütünlüğünü bozan ekzema ve travma gibi cilt hastalıkları stafilokok infeksiyonlarının altta yatan nedenleri arasındadır (Ünal ve Akhan 1996).

Folikülit (Kıl kökü iltihabı): Kıl foliküllerinde görülen yüzeysel infeksiyonlardır. Lezyonlar püstül veya papül şeklinde görülür. Etken sıklıkla *S. aureus*'tur (Kılıç ve diğ. 2011). Sistemik semptom görülmez. Lokal antiseptikler tedavi için kullanılır (Usluer 2004).

Fronkül ve karbonkül: Fronkül genellikle *S. aureus*'a bağlı olarak gelişen folikülitin derin inflamatuvar bir nodüle dönüşmesidir (Kılıç ve diğ. 2011). Vücudun boyun, yüz, koltuk altı gibi kıl dokusu açısından zengin olan bölgelerinde meydana gelir. Fronkül ağrılı bir şekilde kırmızı nodülle başlar ve ödem gelişir. Ödemli nodülün derisi ince ve parlaktır (Kutlu 2006). Semptomları genellikle sistemik değildir. Hastalarda halsizlik ve ateş olabilir. Sıklıkla otoinokülasyona bağlı krem, sarı renkli pürülan akıntı ile nekrotik materyalli satelit lezyon oluşur. Tedavi özgül değildir. Cerrahi eksizyon ya da spontan apse drenajı ile iyileşme görülür.

Kıl foliküllerinden köken alan karbonkül daha derin yerleşimlidir. Ağrılı geniş bir apse olan karbonkülün lezyonu üzerinde birden fazla sinüs ağzı bulunur ve boyun bölgesinde yerleşim gösterir. İyileşme sonucunda hipertrofik skar dokusu bırakır. Çoğu kez bakteriyemi ve sistemik semptomlar ile birlikte görülür. Hastaların ailelerinde ve

kendilerinde Stafilokokal taşıyıcılığı araştırılmalıdır. Tedavide genellikle oral antibiyotikler kullanılır.

İmpetigo: Genellikle yaz aylarında çocuklarda görülen yüzeysel deri enfeksiyonudur. En sık etken Stafilokoklardır fakat %10 oranında *S. pyogenes* (*Streptococcus pyogenes*) de etken olur. Kırmızı renkli makülle başlayıp, eritemli bir veziküle dönüşür. Vezikül zamanla yırtılarak, eritemli deri yüzeyinden 1 cm kabarık, sarı renkli, ıslak kurut ortaya çıkar. Sistemik semptom görülmez. Tedavi olmadan, yara izi bırakmadan iyileşebilir (Usluer 2004).

Süperatif hidradenit: Perineal, Genital ve aksiller bölgelerde oluşan fronküllerdir. Ter bezlerinde tekrarlayan piyojenik enfeksiyondur. Etkeni genellikle *S. aureus*'tur. (Kutlu 2006). Birden fazla sinüs başı vardır, kendiliğinden drene olur ve hipertrofik skar bırakır.

Mastit: *S. aureus*'un neden olduğu mastitler doğum sonrası 2 ile 3. haftalarda kadınların %1-3'ünde görülür (Kutlu 2006). Eritemli, kanaliküler ve ağrılı apseidir. İlk evresinde sistemik semptomları yoktur, daha sonraki evrelerinde görülür. Yaygın olarak  $\beta$ -laktamazlara dirençli penisilin tedavisi verilmelidir. Apseye cerrahi drenaj gerekir.

Yara enfeksiyonları: *S. aureus* %15-20 oranlarda temiz cerrahi girişim sonrasında enfeksiyon yapabilir. Bu yüzden temiz cerrahi girişimlerinde yara enfeksiyonu oluşumunu engellemek için profilaktik olarak insizyon ve birinci veya ikinci kuşak sefalosorinlere birlikte başlanmalıdır ve bunların kullanımı 24 saati geçmemelidir. Bu enfeksiyonlar ağrı, ödem ve eritemle ortaya çıkar. Sıklıkla ateş görülür. Hafif sistemik semptomlardır (Usluer 2004).

Yaygın piyodermi: *S. aureus* kolonizasyonu ile cilt enfeksiyonları dokulara hızlı bir şekilde yayılır ve lenfadenit, nekrotizan fasiit veya selülit meydana getirebilir (Kutlu 2006). Doğru antibiyotik tedavisine başlayabilmek için bu tip enfeksiyonlarda etkenin A grubu Streptokoklar mı yoksa Stafilokoklar mı olduğunu ayırt edebilmek gerekir (Usluer 2004).

### 2.11.2. Bakteriyemi ve Endokardit

Stafilokok kaynaklı bakteriyemiler hem hastane kökenli hem de toplum kökenli olabilirler. Bu durumlarda mortalite oranı oldukça yüksek olup hastane kökenli enfeksiyonlarda %80'lere kadar çıkabilmektedir (Usluer 2004).

*S. aureus* bakteriyemileri sıklıkla lokal bir enfeksiyon odağından sekonder olarak gelişmektedir. Bu odaklar; intravasküler (intravenöz ilaç kullananlar, intravenöz kataterler) ve ekstravasküler (pnömoni, selülit, osteomyelit, vs.) olarak sınıflandırılabilirler.

Septisemili vakaların 1/3'ünde ise odak bulunamaz. Hastalarda eklem ağrıları, yüksek ateş ile şiddetli titreme, plöritik göğüs ağrısı ve nadiren obtundasyona varan bilinç durumu değişiklikleri saptanabilir.

*S. aureus* kaynaklı enfektif endokarditler akut klinik bir tablo şeklinde görülür. Klinik belirtileri titremeler, yaygın kas ve eklem ağrıları ve yüksek ateş vardır (Ünal ve Akhan 1996).

### 2.11.3. Pnömoni ve Ampiyem

*S. aureus* pnömonisi sık olarak viral alt solunum yolları enfeksiyonlarından daha sonra görülür. Nozokomiyal *S. aureus* pnömonisi aspirasyon veya entübasyon ilişkilidir ve %10'unda ampiyem gelişir (Ünal ve Akhan 1996).

Pnömoninin klinik bulgularına ek olarak taşikardi, göğüs ağrısı, plevral efüzyon, ateş ve nefes almada zorluk görülür. Tanısı; ultrasonografi, akciğer grafisi ve bilgisayarlı tomografi (BT) ile konulur. *S. aureus* kaynaklı ampiyemler koyu pürülan, sıvı bulanık ve kokusuzdur.

Mikroskopik incelemede koklar ve çok fazla polimorfo nükleer lökositler görülür. Tedavi ampiyem sıvısının drenajı, antibiyotiklerin kullanımı ve eğer varsa bronkoplevral fistülün cerrahi girişimiyle yapılır (Usluer 2004).

#### 2.11.4. Kemik / Eklem İnfeksiyonları

Osteomyelit: Akut osteomyelitlerde *S. aureus* en sık görülen etkindir (Usluer 2004). Stafilokoklar direkt inokülasyonla eklem ve kemik dokusuna ulaşırlar. Osteomyelitler penetran yaralanmalar ya da cerrahi komplikasyonlar sonucu görülür. Akıntılı sinüs ağızları operasyon bölgesinde oluşabilir (Ünal ve Akhan 1996). Daha sık olarak çocuklarda hematogen yayılım osteomyelit oluşumunu tetikler. Çoğunlukla bebeklerde ve çocuklarda görülen osteomyelitte uzun kemiklerin metafizleri tutar ve bakteriyemiye yol açar.

*S. aureus* bakteriyemisi yetişkinlerde vertebra osteomyelitine neden olsa bile daha az uzun kemiklerde görülür ve çocukların tersine subakut seyreder (Usluer 2004). Tanı için MRG (manyetik rezonans görüntüleme) ve kemik sintigrafisi yaptırılabilir. Direkt kemik aspirasyonu mikrobiyolojik tanısı için yapılır. Kemik biyopsisi ve Sintigrafi ile tanı konulur.

Septik artrit: *S. aureus* her yaş grubunda septik artritlerin en çok rastlanan etkenidir (Tünger 2004). Çoğunlukla kalça, omuz, diz, dirsek ve interfalanjial eklemlerde görülür. Kronik görülen eklem hastalığı risk faktörü oluşturur (Ünal ve Akhan 1996). Artritli hastada şiddetli ağrı ve ateş olduğunda, acilen aspire edilen eklem sıvısı incelenmelidir. Tutulan eklem ağrılı, şiş ve sıcaktır. Eklem sıvısı berrak olmaz, bol sayıda ekstraselüler gram pozitif kok ve  $>50000$  lökosit/ $m^3$  içerir.

Septik bursit: Etken %90 oranında *S. aureus*'tur. Çoğunlukla dirsek ve diz eklemleri etkilenir. Eklem hareketinde zorlama olmaz. Etkilenen eklem üzerindeki deri parlak, ödemli ve sıcaktır. Bursa sıvısının içerisinde 1000'den fazla granülosit bulunur. Tedavi antistafilokokal antibiyotikler ile yapılır. Tekrar eden vakalarda antibiyotik tedavisinden sonra cerrahi yöntemlerle bursa sıvısı alınır (Usluer 2004).

#### 2.11.5. Menenjit ve Beyin Absesi

Menenjitin etkeni *S. aureus* olduğunda, çoğunlukla sıklıkla santral sinir sistemine tanı amacıyla yapılan cerrahi işlem veya girişim komplikasyonu şeklinde ortaya çıkar. İntravenöz ilaç alışkanlığı, kronik böbrek yetmezliği, diabetes mellitus, malign



hastalıklar ve alkolizm menenjitte yatkınlık yaratabilir. Nadiren de olsa osteomyelit sırasında oluşan bakteriyemiler, pnömoni ve infektif endokardit menenjitte sonuçlanabilir. Tedavide predispozan hastalığın tedavisi önemlidir ve bununla beraber 4 hafta olarak parenteral antistafilokokal antibiyotikler önerilir (Ünal ve Akhan 1996).

### **2.11.6. Üriner Sistem İnfeksiyonları**

*S. aureus* iki şekilde üriner sistem infeksiyonuna sebep olabilir. Bakteriyemi oluşurken renal kortekse yerleşimi karbonküle veya apseye, sürekli üriner katateri olanlarda asendan yolla infeksiyona sebep olabilir (Kutlu 2006).

## **2.12. Toksinlerle Oluşan İnfeksiyonlar**

### **2.12.1. Haşlanmış Deri Sendromu**

Eksfoliyatif toksini olan *S. aureus*'lar haşlanmış deri sendromuna sebep olur (Tünger 2004). Plazmidde veya kromozomlarda bulunan genler ile kodlanabilen iki çeşit eksfoliyatif toksin vardır. Toksikjenik suşlar bunların ikisini veya birini salgılar (Ünal ve Akhan 1996). Bunlar epidermiste geniş katlar ve büyük büller şeklinde ayrılmayla karakterizedir. Nadiren yetişkinlerde de bildirilmiş olup sıklıkla 5 yaşından küçük çocuklarda rastlanır. Çoğunlukla asemptomatik veya çok hafif seyreden omfalitle birlikte yenidoğanlarda, hastane salgını şeklinde görülür. Bu yaş grubundaki adı Ritter hastalığıdır.

Enfekte lokal bölgeden salgılanmaya başlayan toksin, sistemik bir şekilde yayılır. 24-48 saatte tüm vücutta büller, blisterler ve yaygın eritem ortaya çıkar. Ciltde sağlamış gibi görünen deri hafif bir sürtünmeyle soyulur. Bu bulguya Nikolsky bulgusu denir ve tanı için önemlidir. Tedavi olarak  $\beta$ -laktamazlara dayanıklı  $\beta$ -laktam antibiyotikler kullanılır. Tamamlayıcı tedaviler olarak sıvı-elektrolit kaybının yerine konması ve deri bakımı sayılabilir. Yara izi bırakmadan iyileşir (Usluer 2004).

### **2.12.2. Toksik Şok Sendromu (TSS)**

Bu sendrom *S. aureus*'un toksin salgılayan suşlarının enfeksiyonu veya kolonizasyonu sırasında ortaya çıkar (Ünal ve Akhan 1996). 1980'lerde TSS yüksek

absorban tamponları ile ilişkili olduğu bulunmuş, fakat günümüzde postoperatif yaraların bulunduğu bölgelerde ve invaziv hastalık görülen nonmenstrüel durumlarda *S. aureus* kolonizasyonu ile oluştuğu tanımlanmıştır (Bannerman ve Peacock 2009). Menstrual TSS vakalarının %98'inde vajinal kültürlerinde *S. aureus* saptanmaktadır.

TSS vakalarının %25'inde enterotoksin-C veya enterotoksin-B salgılandığı, %75'inde *S. aureus*'un TSST-1 salgılandığı gösterilmiştir.

### **2.12.3. Stafilokokal Besin Zehirlenmesi**

*S. aureus*'un enterotoksin salgılaması sonucu meydana gelir. Sıklıkla salgınlar halinde görülür. Klinik tabloya enterotoksin D ve enterotoksin A sebep olur (Ünal ve Akhan 1996). Enfeksiyon değil ve entoksikasyondur. Karbonhidrat miktarı fazla besin maddelerinde *S. aureus* kontaminasyonu, uygun ısı ve koşulda toksin oluşur (Tünger 2004). Pişirmek ya da kaynatmakla inaktive olmaz, ısıya dirençlidir. Gıda zehirlenmesinin en çok rastlanan nedenleri arasında %30 civarındadır. Sıklıkla konserveler, patates salataları, sütlü tatlılar, dondurmalar ve etli yiyeceklerdir (Usluer 2004). 2-6 saatlik inkübasyon süresi sonunda kusma ve bulantı görülür. Diyare ile görülen abdominal ağrı semptomları arasındadır (Bannerman ve Peacock 2009). Bazı vakalarda ateş görülse de 12-24 saat içerisinde kendiliğinden düzelir. Bu vakalarda elektrolit ve sıvı kaybını giderecek destekleyici tedavi uygulanır, ayrıca antimikrobiyal tedaviye ihtiyaç olmaz (Ünal ve Akhan 1996).

## **2.13. Koagülaz Negatif Stafilokok (KNS) İnfeksiyonları**

### **2.13.1. İntravenöz Kateter İnfeksiyonları ve Nozokomiyal Bakteriyemi**

KNS, hastanelerde damar içinde kullanılan kateterlerin sık kullanıldığı birimlerde en sık nozokomiyal bakteriyemiye yol açan bakterilerdir (Marshall ve diğ. 1998). Kan kültürlerinin kontaminasyon oranı %1-3 olduğu biliniyor fakat yapılan araştırmalar KNS'lerin neden olduğu bakteriyemiler %74-25 oranlarında kontaminasyona bağlı bulunmuştur (Souvenir ve diğ. 1998). Tek pozitif çıkan kan kültürleri genellikle kontaminasyonu düşündürmektedir. Gerçek bakteriyemi bulmak için tanımında da belirtildiği gibi birden fazla damardan birden fazla kan kültürü alınmalıdır (Garner ve

diğ. 1988).

*S. epidermidis*, intravenöz kateter infeksiyonların da önemli bir etkidir. *S. epidermidis*'e bağlı kateter nedenli infeksiyonların artması *S. epidermidis*'e bağlı nozokomiyal kateter ilişkili infeksiyonların (KDİ) insidansını da yükseltmektedir (Mermel ve diğ. 2001).

KDİ'den korunmak için; kateter takılırken gerekli antiseptik yöntem, hastaya cilt temasının öncesinde ve sonrasında el dezenfektanı kullanımı, ayrıca kateter takıldıktan sonra bakımının düzenli bir şekilde yapılması gereklidir. Tedavi antibiyogram sonucuna göre yapılmalıdır. Kateter ilişkili bakteri suşlarında metisilin direnci yaygınlığı olduğu bilinen merkezlerde tedavi için glikopeptid antibiyotikler önerilmektedir (O'Grady ve diğ. 2002).

### **2.13.2. Doğal ve Prostetik Kapak Endokarditi**

Nadir görülen KNS'ler ile oluşan doğal kapak endokarditi tüm endokardit vakalarının %5-8'ini oluşturur (Archer ve diğ. 2005). Ayrıca KNS'ler prostetik kapak endokarditlerinde de sıklıkla saptanır. Prostetik kapak endokarditlerinin etkeni %40 oranında *S. epidermidis*'tir (Wolff ve diğ. 1995).

Endokardit oluşumu, KNS'lerin hasarlı kalp kapaklarına ve endokarda tutunmalarıyla görülür. *S. epidermidis*'in neden olduğu infeksiyonlarda komplikasyonlar gözlenir. Bu vakalardan izole edilen KNS suşlarının metisilin direncinin arttığı gözlenmektedir (%87). Bu suşlar çoklu ilaç direnci de gösterirler ve bu veriler suşların hastane kaynaklı olduğunu düşündürür. *S. epidermidis*'e bağlı prostetik kapak endokardit tedavisinde çoğunlukla medikal ve cerrahi yöntemler kullanılır. Metisilin dirençli stafilokok infeksiyonlarının tedavisinde genellikle vankomisin kullanılır. Buna ek olarak rifampisin, gentamisin veya ikisinin beraber kullanımı tedavinin başarısını artırır (McGirt ve diğ. 2003).

### **2.13.3. Serebrospinal Sıvı Şanti İnfeksiyonları**

Bu enfeksiyonunun en sık nedeni *S. epidermidis*'tir. Bazı vakalarda *S. aureus* da etken olabilir. Enfeksiyonlar genellikle implantasyonun ilk iki haftasında oluşur.

İntraoperatif nöroendoskop kullanılması enfeksiyon riskinin arttığını bildirilmiştir (McGirt ve diğ. 2003).

Ventriküler serebrospinal sıvı, Lumbal serebrospinal sıvıdan daha az normal görünebilir ayrıca kültür de negatif olabilir. Bu yüzden optimal tanısı için iki serebrospinal sıvının da kültürü yapılmalıdır.

İnfeksiyonlar çoğunlukla hastane kaynaklıdır, bu nedenle hastalardan izole edilen *S. epidermidis*'in metisiline dirençli olabileceği düşünülmelidir. Tedavisinde rifampisin, vankomisin ve gentamisin gibi antibiyotikler seçilebilir.

#### **2.13.4. Peritoneal Diyaliz Kateteri İlişkili Peritonit**

Tanıyı destekleyen bulgular arasında; karın ağrısı, bulanık diyalizat sıvısı ve bu sıvıda milimetreküpde 100 lökosit ve fazlasının bulunması yer alır. Gram boyama ile sıvı içinde mikroorganizma görülmez. Hastaların %17-50'sinde izole edilen bakteri türü *S. epidermidis*'dir (Kim ve diğ. 2004).

#### **2.13.5. İdrar Yolu İnfeksiyonları**

Nadiren izole edilen *S. saprophyticus* ve *S. epidermidis* genç kadınlardaki idrar yolu infeksiyonuna sebep olan KNS'lerdir (Archer ve diğ. 2005). Bu bakteriler antibiyogramda 5 µg'lık novobiyosin diski ile ayrılır. *S. epidermidis* novobiyosine duyarlı, *S. saprophyticus* ise dirençlidir. KNS türlerinden çoklu antibiyotik direnci olan bakterilerde bile novobiyosine duyarlıdır. Bu yüzden idrar numunelerinden izole edilen ve novobiyosine direnç gösteren KNS türleri başka bir ayırma gerek duyulmadan *S. saprophyticus* olduğu yönünde rapor edilir (Alden ve diğ. 2006). *S. saprophyticus* üst üriner sistem infeksiyonuna da sebep olabilir. *S. saprophyticus* genellikle cinsel olarak aktif genç kadınların idrar yollarında saptanır. *S. saprophyticus*'un sebep olduğu idrar yolu infeksiyonu enterik bakterilerin aksine mevsimsel olarak görülür. Sonbahar başında ve yaz sonlarında sıklığı artar. Kültür ortamında koloni sayıları azdır. Bu sebeple üretilemediklerinden abakteriyel pyüri ve disüri-piyuri sendromlarının (akut üretral sendrom) etkeni olduğu söylenir. *S. saprophyticus* dışında KNS'lerin idrar yolu infeksiyonundan izole edilmesi daha nadir görülür. *S. saprophyticus* dışında KNS'lerin

oluşturduğu idrar yolu infeksiyonlarında %80 – 90 oranlarında *S. epidermidis* izole edilir ve daha çok idrar kateteri bulunan hastanede yatan hastalarda etkindir. Hastaların birçoğu nörolojik mesanesi olan, yeni üriner sistem operasyonu olan, renal transplantasyon sonrası, obstrüktif üropatisi veya nefrolitiazisi bulunan komplike hastalardır (Archer ve diğ. 2005).

### **2.13.6. Osteomyelit ve Protez Eklem İnfeksiyonu**

KNS'ler nadiren de olsa osteomyelit etkeni olabilir. KNS'lerde sternal osteomyelit (açık kalp cerrahisi olmuş hastalarda) ve protez infeksiyonu (eklem protezi takılmış hastalarda) şeklinde görülür. Genellikle infeksiyonlardan *S. epidermidis* izole edilir. Bu olgularda medikal tedavi zordur ve protezin çıkarılması ya da derin cerrahi debridman söz konusudur (Pavoni ve diğ. 2004). Kardiyotorasik cerrahi sonrasında gelişen sternal osteomyelit komplikasyonu vakaların %1–4,5'inde rastlanır. Bu vakaların %16–57'sinden *S. epidermidis* sorumludur. Göğüs kemiği bölgesinde deri altında yer alan dokuların inceliğinden dolayı küçük bir lezyon bile osteomyelit ve derin infeksiyon olma olasılığı yüksektir, bu sebeple dikkat edilmelidir. Vakalarda eritem, yara yeri akıntısı ve kostokondral eklem hassasiyeti infeksiyon bulgularıdır. Tanıya yardımcı olarak aksiyel tomografi istenebilir. Aspirasyon kültürü yapılması önerilmektedir. Direnç durumuna bakılması hastane kaynaklı patojenlerin ampirik tedavisi için önem arz eder (Archer ve diğ. 2005).

### **2.14. Stafilokoklar'da Metisilin Direnci**

1928'de Alexander Fleming'in penisilini bulması ilerleyen yıllarda Florey ve Chain'in penisilini klinik kullanıma alması, penisilinin üretiminin artmasına ve Stafilokok infeksiyonlarında mortalite ve morbiditeyi kısa süreli düşürmüştür. Fakat ilerleyen yıllarda penisiline dirençli stafilokok suşları ortaya çıkmıştır. 1944'de Kirby ilk kez penisilinaz üreten stafilokok suşunu bildirmiştir. Zamanla stafilokoklarda penisiline duyarlı olmayan suşlar giderek artmıştır. O dönemde kullanımı artan penisiline ek 1950'li yıllarda streptomisin, eritromisin ve tetrasikline de direnç gelişmiştir. 1960 yılında metisilin de kullanıma girmesiyle Stafilokok infeksiyonlarında

yeni bir dönem başlamış fakat kısa bir sürede 1961 de Barber tarafından stafilokoklarda metisilin direnci bildirilmiştir (Çiftçi ve Altındış 2009).

Metisilin direnci; Kromozomal (İntrinsik), Intermediate ve Sınırdaki (Borderline) metisilin direnci olarak üç mekanizma ile gerçekleşmektedir. Kromozomal (İntrinsik) metisilin direncinde *mecA* geni görev alır. *mecA* geni stafilokokal kaset kromozomu (Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*; *SCCmec*) üzerinde yer alır. *MecA* genindeki yapısal değişikliklerde direnç gelişir. 11 *SCCmec* tipi (Tip I-XI) tanımlanmış yapısal değişikliklerdir. Metisilin duyarlı tüm stafilokok suşlarında *mecA* geni yoktur fakat metisilin dirençli suşlarda *mecA* geni bulunur. Buda transdüksiyonla genetik bilginin dirençli suşlardan duyarlı suşlara aktarılabilirliğidir (Sancak 2011). Intermediate metisilin direnci; bu dirence sahip *S. aureus* suşlarına MODSA (modified resistant *S. aureus*) denilmektedir (Ünal ve Akhan 1996). Bu suşlar  $\beta$ -laktamaz negatiftir ve *mecA* geni taşımazlar. Bu türlerde yeni bir direnç geliştiği düşünülür. İncelemeler sonucunda bu bakterilerin PBP'lerden ziyade  $\beta$ -laktam antibiyotiklere bağlandıkları gösterilmiştir. Borderline metisilin direnci; bu dirence sahip *S. aureus* suşlarına BORSA (borderline resistant *S. aureus*) denilmektedir (Elçi 2005). Metisiline sınır değerinde direnç gösterirler. Borderline metisilin direncinde çok fazla miktarda  $\beta$ -laktamaz salgılanması olur. Oksasilin'in MİK değerinde 4-8  $\mu\text{g/ml}$  dir (Tünger 2004).

## 2.15. Vankomisin

Glikopeptit grubu antibiyotik olan vankomisin ilk olarak *Streptomyces orientalis*'in fermentasyonu sonucu izole edilmiştir. Vankomisin gram pozitif bakterilerde hücre duvarının yapısına katılan peptidlerin yan zincirlerinin ucundaki terminalin D-alanin-D-alanin dizisine yüksek afinite göstererek bağlanır. Peptidoglikan zincirin biyosentezini inhibe ederek bakteri hücre duvarı sentezi bozar (Sancak 2007).

1980'lerden sonra stafilokoklarda yükselen oranda metisilin direncinin görülmesiyle birlikte vankomisin stafilokok infeksiyonlarının tedavisinde daha çok kullanılır hale gelmiştir. Vankomisinin artan oranda kullanımı glikopeptid antibiyotiklere de direnç gelişebileceğini düşündürmüştü ve 1996'da 'vankomisine

duyarlılığı azalmış' suş Japonya'daki bilim insanları tarafından bildirilmiştir. Bu suş Mu50 olarak isimlendirilmiş ve vankomisin için minimum inhibisyon konsantrasyon (MIK) değeri 8 µg/ml olarak tanımlanmıştır. Vankomisine azalmış duyarlılığı olan stafilokoklar 'VISA' olarak adlandırılmıştır. Hiramatsu ve ark. 1997 yılında Mu3 adı verilen yeni bir direnç tipi bildirmişlerdir. Bu suşun vankomisine orta derecede duyarlı olduğu tespit edilmiştir ve h-VISA olarak tanımlanmıştır. Bu suşun MIK değerleri duyarlı sınırlar içinde yer aldığı ve topluluğun içindeki  $1/10^{5-6}$  bakterinin vankomisinin 4-9 µg/ml konsantrasyonlarında üreyebildiği bildirilmiştir (Hiramatsu 1997).

4 farklı fenotipte Vankomisin direnç gösterir.

**VanA tipi fenotip:** Vankomisine yüksek düzeyde direnç görülür. VanA gen grubu Tn1546 transpozonu üzerinde bulunur ve plazmid ile bakteriler arasında kolayca taşınır.

**VanB tipi fenotip:** Bu fenotipi taşıyan suşlar vankomisine duyarlıdır.

**VanC tipi fenotip:** Bu fenotipi taşıyan suşların MIK aralığı 4-32 µg/mL arasında değişir ve içsel bir vankomisin direnci gösterirler.

**VanD tipi fenotip:** Bu fenotipi taşıyan suşlar vankomisine dirençlidir. MIK değeri 64 µg/mL'dir (Öncül 2010).

## 2.16. Teikoplanin

Teikoplanin ilk kez 1970 yıllarında *Actinoplanes teichomyceticus*'tan fermantasyon yolu ile izole edilir. Antimikrobiyal aktivite ve yapı olarak vankomisine benzerlik gösterir. Hücre duvarının yapısında bulunan peptidoglikan tabakasının muramilpentapeptidin amino açil-D-alanil-D-alanin dizisine bağlanır. Hücre duvarı biyosentezinde peptidoglikan tabakasının polimerizasyonunu engelleyerek hücre duvarı oluşumunu engeller (Sancak 2011).

Teikoplanin'in molekül ağırlığı 1877 ile 1894 dalton arasında değişir. Biyolojik aktivitesi ve polaritesi birbirine benzeyen 5 bileşen ve daha polar hidroliz ürünü olan A<sub>3-1</sub> (1562 dalton molekül ağırlığı) olarak isimlendirilen bileşenlerin karışımı olan





sonucunda intraselüler fagositlere ve dokulara mükemmel penetre olur (Jawetz 1995).

Stafilokoklarda hücre duvarı kalınlığının artması teikoplanin direncine katkı sağlamaktadır ve hücre duvarı kalınlığı azaldığında direnç de azalmaktadır.

Teikoplanin direnç operonu *tcaRAB* (*tcaR-tcaA-tcaB*) glikopeptit duyarlılığın belirlenmesinde rol almaktadır.

**tcaR**, hücre duvarına sabitlenmiş proteinler için ilk bildirilen regülatör olan *icaADBC*, *spa*, *sasF* ve *sarS* transkripsiyonunu düzenler (Chang ve diğ. 2014).

**tcaA**, metal bağlama motifli, muhtemelen sensör-transdüserli bir varsayımsal transmembran proteini kodlar.

**tcaB**, bir bisiklomisın direnç proteini ile dizi homolojileri olan bir membrana bağlı protein kodlar (Brandenberger ve diğ. 2000). Bu operonun mutasyonu veya silinmesi teikoplanin direncini arttırdığı bildirilmiştir (Bakthavatchalam 2017).

### 3. YÖNTEM ve GEREÇLER

#### 3.1. Çalışmada Kullanılan Bakteriler

Namık Kemal Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına Ocak 2017 – Aralık 2017 tarihleri arasında laboratuvara gelen kan, yara, idrar, balgam örneklerinden izole edilen stafilokok suşları çalışmaya alınmıştır. İzole edilen suşlar kullanılıncaya kadar uygun koşullarda -20°C’de saklanmıştır.

#### 3.2. İzolasyonda Kullanılan Besiyerleri

##### 3.2.1. Kanlı Besiyeri

Çeşitli klinik ve polikliniklerden gelen örneklerin *Staphylococcus sp.* izolasyonu için kanlı agar besiyeri kullanılmıştır. Kanlı agar besiyeri hazırlanırken, distile su içerisine Blood-Agar Base (Biolife) 40 g/L olacak şekilde eritilerek pH 7,2’ye ayarlanmıştır. Otoklavda 121°C’de 15 dakika sterilize edilmiştir. Ardından, bu ortam, 50°C’ye kadar soğutularak defibrine koyun kanından 70 ml eklendikten sonra karıştırılıp plaklara dökülmüştür. Kanlı besiyerinde stafilokokların koloni morfolojileri, pigmentasyon ve hemoliz tipi özellikleri saptanmıştır.

##### 3.2.2. Mueller-Hinton Agar

Mueller-Hinton agar, bakterilerin antibiyotiklere dirençliliklerinin belirlenmesinde yapılan antibiyogram testi için kullanıldı. Mueller-Hinton Agar (Biolife) distile suda 36 g/L olacak şekilde eritilerek pH 7,4’e ayarlanmıştır. Otoklavda 121°C’de 15 dakika sterilize edilmiştir. Besiyerleri 9 cm çapındaki steril petrilere 4 mm derinlik olacak şekilde düzgün bir zeminde dökülmüştür. Etüvde bekletilerek kontaminasyon kontrolü yapılmıştır. Besiyerleri hazırlandıktan sonra en geç bir hafta içinde kullanılmak üzere buzdolabında muhafaza edilmiştir (Bauer ve diğ. 1974).

#### 3.3. Stafilokokların Tanımlanması

Stafilokoklar; Beta hemoliz, gram boyama, katalaz testi sonuçlarına göre tanımlamaları yapılmıştır.

### 3.3.1. Vitek 2 Otomatize Sistem

Beta hemoliz, gram boyama ve katalaz testlerinden sonra suşlar duyarlılık ve identifikasyon için rutin bir şekilde kullanılan Vitek 2 otomatize sisteme verilmiştir. Vitek 2 otomatize sistem Gram pozitif bakterilerin otomatize kalitatif veya kantitatif duyarlılık testi için kullanılır. Gram pozitif duyarlılık kartı AST-P536 (bioMerieux) ve Gram pozitif identifikasyon kartı (GP) (bioMerieux) kullanılmıştır. Steril tuzlu sudan (%0.45-0.50 NaCl, pH 4.5-7.0) deney tüpüne 3 ml konuldu. Deney tüpüne steril öze ile saf kolonilerden aktarılmıştır. McFarland 0.5 ile 0.6 arasında bir yoğunlukta homojen bir süspansiyon hazırlanmıştır. Referans suş olarak *S. aureus* ATCC 29213 kullanılmıştır. Süspansiyon tüpü, AST-P536 kartı ve GP kartı kasete yerleştirilmiştir. Kasetin cihaza yüklenmesi ve veri girişi Vitek 2 otomatize sistem kullanım talimatına uygun şekilde yapılmıştır.

Çalışmada incelenen suşlardan vankomisin duyarlı teikoplanin dirençli olduğu belirlenen 30 suş daha sonra tekrar kullanılmak üzere -20°C’de saklanmıştır.

### 3.4. Antibiyogram Testi (Kirby Bauer disk difüzyon yöntemi)

Vankomisin duyarlı, teikoplanin dirençli stafilocok suşlarının antibiyotiklere duyarlılıklarını belirlemek için disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Bunun için bir gece önceden kanlı besiyerine suşlar ekilmiştir. Daha sonra besiyerinden, bir öze yardımıyla stafilocok suşları tüp içindeki Mueller-Hinton Broth (MHB) besiyerine çekilmiştir. Sıvı besiyerinde bulanıklık McFarland 0.5 göre ayarlanmıştır. Bulanıklığı ayarlanan sıvı besiyerinden eküvyon çubuğu ile alınan örnek yayma ekim yöntemi ile Mueller-Hinton Agar’a ekildi ve kuruması beklenmiştir. Ardından, üzerine antibiyotik diskleri 2 cm ara ile yerleştirilmiştir. 37°C’de 18- 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Zon çapı sınır değerleri tablo 3.1’de gösterilmiştir.

**Tablo 3.1. Antibiyotikler ve zon çapı sınır değerleri**

Antibiyotik	Sembol	Grubu	Disk Konsantrasyonu (µg)	Zon Çapı Sınır Değeri (Mm)	
				S ≥	R <
Sefoksitin	<b>FOX</b>	Beta Laktam	30	22/25	22/25
Fusidik Asit	<b>FA</b>	Antistafilokokal	10	24	24
Penisilin	<b>P</b>	Beta Laktam	10	26	26
Tetrasiklin	<b>TE</b>	Tekrasiklin	30	22	19
Trimetoprim-Sülfametoksazol,	<b>SXT</b>	Sülfanamid	10	17	14
Siprofloksasin	<b>CIP</b>	Florokinolon	5	20	20
Klindamisin	<b>CC</b>	Linkozamid	2	22	19
Eritromisin	<b>E</b>	Makrolit	15	21	18
Gentamisin	<b>GM10</b>	Aminoglikozit	10	18/22	18

### 3.5. Mikrodilüsyon Yöntemi

Bir gece önceden kanlı besiyerinde ekim yapılan örneklerden birer koloni alınarak katyon ayarı yapılmış Mueller-Hinton Broth'da (KAMHB) McFarland 0.5 yoğunlukta bakteri solüsyonu hazırlanmıştır. Teikoplaninin ve vankomisin için 256 µg/ml'lik solüsyonlar KAMHB'ta hazırlanmıştır. 12 kuyucuklu U tabanlı mikroplağın her bir kuyucuğuna 100'er µl KAMHB eklenmiştir. Teikoplanin ve vankomisin için hazırlanmış çözeltiden ayrı ayrı 100 µl alınıp ilk kuyucuğa konular pipetaj yapılır tekrar 100 µl alınıp 2. kuyucuğa konular bu şekilde sırayla 11. kuyucuğa kadar dilüsyon yapılmıştır. 12. Kuyucuk antibiyotik koyulmamıştır ve pozitif kontrol olarak değerlendirilmiştir. Daha sonra önceden hazırlanmış  $10^7$  CFU/ml bakteri süspansiyonundan 100'er µl alınır 11. kuyucuğa koyulmadan tüm kuyucuklara ilave edilmiştir. 11. kuyucuk negatif kontrol olarak değerlendirilmiştir. Daha sonra mikroplak 35°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Tüm suşlara ait üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon MİK olarak sonuçlandırılmıştır. Çıkan tüm sonuçlar EUCAST tarafından

belirlenen direnç sınır değerlerine göre değerlendirilmiştir. (EUCAST 2018).

**Tablo 3.2 Vankomisin ve Teikoplanin'in, *S. aureus* ve KNS'ler için EUCAST tarafından belirlenmiş MIK sınır değerleri**

	MIK sınır değeri (mg/L)	
	S ≤	R >
Teikoplanin, <i>S. aureus</i>	2	2
Teikoplanin, Koagülaz negatif stafilocoklar	4	4
Vankomisin, <i>S. aureus</i>	2	2
Vankomisin, Koagülaz negatif stafilocoklar	4	4

### 3.6. DNA İzolasyonu

Bu çalışmada kullanılan stafilocok suşlarının bir gece önceden kanlı agarda taze pasajları yapılmıştır. Yapılan pasajlardan geliştirilen kültürler; PureLink® Genomic DNA Kit (İnvitrogen) kullanılarak, üretici firma önerileri doğrultusunda ekstraksiyona alınmıştır. Ekstraksiyon uygulamasından önce kitin önerisi doğrultusunda bazı çözeltiler hazırlanmıştır. 180 µl Lizozim Digestion Buffer (25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2.5 mM EDTA, 1% Triton X-100) bulunan temiz 1.5 ml' lik ependorfa bir miktar kültürlerden alınarak üzerlerine son konsantrasyon 20 mg/ml olacak şekilde lizozim eklenmiş ve vortekslenmiştir. Elde edilen karışım 37°C' de 30 dakika inkübe edildikten sonra üzerine 20 µl proteinaz K solüsyonu ilave edilip, yavaşça vortekslenmiştir. Örnekler 200 µl Genomic Lysis/Binding solüsyonu eklenip vortekslenip homojen solüsyon elde edilmiştir. Örnekler, 55°C'de su banyosunda 30 dakika inkübe edildikten sonra, üzerlerine 200 µl ethanol eklenip vortekslenmiştir. Örnekler 2 ml'lik toplama tüplerine yerleştirilmiş olan kit içerisinde bulunan kolonlara alınarak ve 10.000×g'de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Sıvının toplandığı toplama tüpleri atılıp ve kolonlar yeni toplama tüpleri içine yerleştirilmiştir. Kolonlara 500 µl wash buffer 1 konularak 10.000×g' de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Kolonların yıkanma işlemine 500 µl wash buffer 2 eklenerek santrifüjün maximum hızında 3 dakika santrifüjlenerek devam edilmiştir. Daha sonra

toplama tüpleri atılıp, kolonlar 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine yerleştirilmiştir. Kolon üzerine 75 µl eluasyon buffer konularak 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir ve maximum hızda 1 dakika santrifüj edilip DNA eldesi sağlanmıştır.

Elde edilen DNA örnekleri PCR ile amplifikasyon işleminde kalıp olarak kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

### 3.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

DNA izolasyonu yapılmış örneklerin, teikoplanin direnç geni olan tcaA ve tcaR gen bölgelerinde mutasyon olduğu düşünülen nükleotitlerden genBank'tan yararlanılarak primerler tasarlanmıştır (Bakthavatchalam 2017). Üretici firma tarafından bu primerlerin sentezi yapılmıştır.

**Tablo 3.3. Moleküler biyolojik çalışmada kullanılmak üzere tasarlanan primerler**

Oligo İsmi	Bulunduğu Gen Bölgesi	Oligonükleotid dizisi / 5' -3'
Primer 1	tcaR	5'- AAGATCAGCAAAGCAAGTATGGT -3'
Primer 2	tcaR	5'- CGTCGACTTACTGCTGCTTT -3'
Primer 3	tcaR	5'- ACCTTTTCCGTTAGAGCAACA -3'
Primer 4	tcaR	5'- TCGATAGTGGCTTCGTAGCAT -3'
Primer 5	tcaA	5'- TTCCTTGGGCTATCGTTGCG -3'
Primer 6	tcaA	5'- TCGCGCGCAAATTTCTTCAT -3'

Bu primerler kullanılarak amplifikasyon yapılmıştır. Bu amaçla, 25 µl hacimde 10x Taq Buffer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM deoksinükleotidtrifosfatlar (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 2.5 µM'lık Forward ve Reverse primerleri, 1 ünite Taq DNA polimeraz enzimi ve 0.5-2 µl template DNA olacak şekilde reaksiyonlar kurulmuştur.

tcaA bölgesinden tasarlanan primerlerin amplifikasyonları için reaksiyon şartları:

94 °C 2 dakika (başlangıç denatürasyonu)

94 °C 45 saniye }  
62 °C 45 saniye } 35 Döngü  
72 °C 90 saniye }

72 °C 10 dakika

4 °C sonsuz

tcaR bölgesinden tasarlanan primerlerin amplifikasyonları için reaksiyon şartları:

94 °C 2 dakika (başlangıç denatürasyonu)

94 °C 45 saniye }  
62 °C 45 saniye } 35 Döngü  
72 °C 90 saniye }

72 °C 10 dakika

4 °C sonsuz

Amplifikasyon işlemleri sonrasında oluşan ürünlerin varlığını gösterebilmek amacıyla ampikonlar agaroz jel içerisinde elektroforez ile görüntülenmiştir.

#### 4.BULGULAR

Çalışmamızda Ocak 2017 ve Aralık 2017 tarihleri arasında Namık Kemal Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen çeşitli örneklerden izole edilen stafilokok suşu incelenmiştir. İncelenen 30 suştan 3'ü *S. aureus*, 27'si KNS dir.

##### 4.1. Stafilokok suşlarında disk difüzyon yöntemi ile metisilin direnci ve bazı antibiyotiklere duyarlılıklarının belirlenmesi

Kirby Bauer disk difüzyon yönteminde metisilin direncini belirlemek için 30 µg sefoksitin (FOX) diski kullanılmıştır. Kontrol suş olarak *S. aureus* ATCC 29213 kullanılmıştır. EUCAST tarafından belirlenen direnç sınır değerlerine göre değerlendirme yapılmıştır. Buna göre 30 Stafilokok suşunun 12'si (%40) sefoksitin duyarlı olarak, 18'i (%60) sefoksitin dirençli olarak bulunmuştur. Sefoksitin duyarlı olarak bulunan suşlar metisilin duyarlı olarak yorumlanmıştır. Çalışmada kullanılan 30 Stafilokok suşunun metisiline direnç durumu, Vitek 2 otomatize sistem ile Kirby Bauer disk difüzyon yöntemi sonuçları birbiriyle uyumlu bulunmuştur.

Suşların %40 (12/30)'ı fusidik aside, %6,7(2/30)'si penisiline, %40 (12/30)'ı tetrasikline, %53,3 (16/30)'ü trimetoprim-sülfametoksazole, %40 (12/30)'ı siprofloksasine, %13,3 (4/30)'üs klindamisine, %30 (9/30)'ü eritromisine ve %36,7 (11/30)'si gentamisine duyarlı olarak bulunmuştur.

Bu suşların %60 (18/30)'ı fusidik aside, %93,3 (28/30)'ü penisiline, %36,7 (11/30)'si tetrasikline, %23,3 (7/30)'ü trimetoprim-sülfametoksazole, %60 (18/30)'ı siprofloksasine, %40 (12/30)'si klindamisine, %60 (18/30)'ı eritromisine ve %60 (18/30)'ı gentamisine dirençli olarak bulunmuştur.

Aynı suşların %23,3 (7/30)'ü tetrasikline, %23,3 (7/30)'ü trimetoprim-sülfametoksazole, %46,7 (14/30)'si klindamisine, %10 (3/30)'u eritromisine ve %3,3 (1/30)'ü gentamisine orta direnç geliştirmeye başlamıştır. Antibiyogram test sonuçları Tablo 4.1'de özetlenmiştir.



**Tablo 4.1. Stafilokok suşlarının çeşitli antibiyotiklere duyarlılık sonuçları**

<b>ANTİBİYOTİKLER</b>	<b>DUYARLI SAYISI (%)</b>	<b>ORTA DİRENÇ SAYISI (%)</b>	<b>DİRENÇLİ SAYISI (%)</b>
<b>FUSİDİK ASİT</b>	12/30 (40)	-	18/30 (60)
<b>PENİSİLİN</b>	2/30 (6,7)	-	28/30 (93,3)
<b>TETRASİKLİN</b>	12/30 (40)	7/30 (23,3)	11/30 (36,7)
<b>TRİMETOPRİM-SÜLFAMETOKSAZOL</b>	16/30 (53,3)	7/30 (23,3)	7/30 (23,3)
<b>SİPROFLOKSASİN</b>	12/30 (40)	-	18/30 (60)
<b>KLİNDAMİSİN</b>	4/30 (13,3)	14/30 (46,7)	12/30 (40)
<b>ERİTROMİSİN</b>	9/30 (30)	3/30 (10)	18/30 (60)
<b>GENTAMİSİN</b>	11/30 (36,7)	1/30 (3,3)	18/30 (60)

#### **4.2. Vankomisin ve Teikoplaninin mikrodilüsyon sonuçlarına göre duyarlılıklarının belirlenmesi**

Çalışmada kullanılan 30 Stafilokok suşu daha önce vitek 2 otomatize sistem ile tarama yapılan ve vankomisin duyarlı teikoplanine dirençli olduğu görülen suşlardan seçilmiştir. Altın standart olan mikrodilüsyon sonuçlarına göre de hiçbir suşta vankomisin direnci gözlenmemiştir.

**Tablo 4.2. Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MIK) değerleri (n%) ( $\mu\text{g/mL}$ )**

<b>Vankomisin MIK (128 - 0,25 <math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b><i>Staphylococcus sp.</i> n=30 (n%)</b>
1 $\mu\text{g/mL}$	4/30 (%10)
2 $\mu\text{g/mL}$	12/30 (%30)
4 $\mu\text{g/mL}$	14/30 (%60)

Çalışma sonuçlarına göre 16 suşta vankomisin duyarlı bulunmuş, 14 suşta vankomisin orta duyarlılık gösterdiği görülmüştür.

Bu suşların 2 tekrarlı olarak yapılan mikrodilüsyon sonucuna göre teikoplanin için 15 suşun direnç geliştirdiği görülmüştür.

**Tablo 4.3. Teikoplanin Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MIK) değerleri (n%)**

<b>Teikoplanin MIK (128 - 0,25 <math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b><i>S. aureus</i> n=3 (n%)</b>	<b><i>KNS</i> n=27 (n%)</b>
1 $\mu\text{g/mL}$	-	2/27 (%7,41)
2 $\mu\text{g/mL}$	2/3 (%66,67)	2/27 (%7,41)
4 $\mu\text{g/mL}$	-	9/27 (%33,33)
8 $\mu\text{g/mL}$	1/3 (%33,33)	5/27 (%18,52)
16 $\mu\text{g/mL}$	-	1/27 (%3,70)
32 $\mu\text{g/mL}$	-	1/27 (%3,70)
64 $\mu\text{g/mL}$	-	1/27 (%3,70)
128 $\mu\text{g/mL}$	-	6/27 (%22,22)

Teikoplanin MIK sonuçlarına göre 3 *S. aureus* suşunun 2'si Teikoplanin duyarlı 1'i Teikoplanin dirençli olarak saptanmıştır. 27 *KNS* suşunun 13'ü Teikoplanin duyarlı 14'ü Teikoplanin dirençli olarak saptanmıştır. Bu sonuçlara göre teikoplanin direnç geliştiren 15 suşun 14'ünün *KNS*, 1 tanesinin *S. aureus* olduğu bulunmuştur.

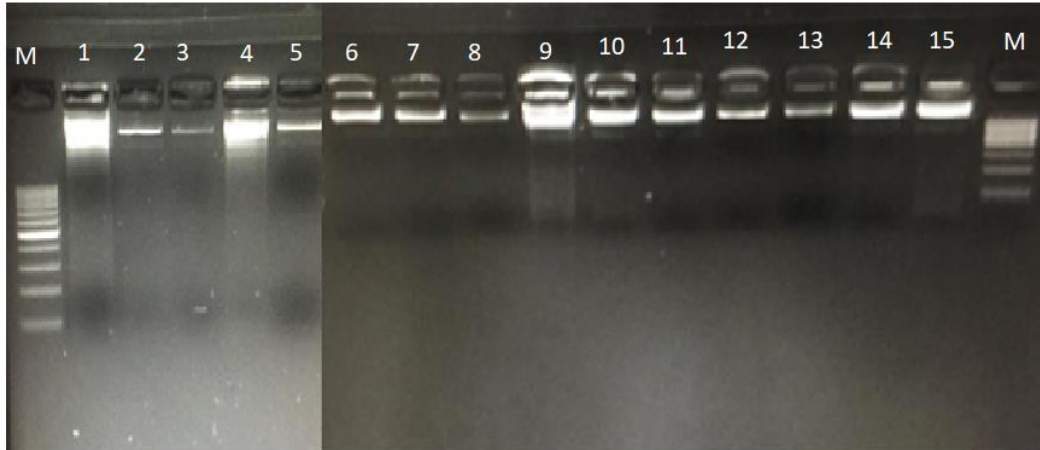
MIK sonuçlara göre teikoplanin dirençli olduğu saptanan 15 suşun metisiline duyarlılık sonuçları incelenmiştir. Bu sonuçlara göre 10 suşun metisilin dirençli olduğu 5 suşun metisilin duyarlı olduğu görülmüştür. Bu 5 metisilin duyarlı suşlardan 1'i MSSA, 4'ünün MSKNS olduğu gözlemlenmiştir.

**Tablo 4.4. 15 suşun PCR sırasına göre metisilin durumu**

PCR sırası	Suş ismi	Metisilin duyarlı/dirençli
1.	<i>S. saprophyticus</i>	Dirençli
2.	<i>S. aureus</i>	<b>Duyarlı</b>
3.	<i>S. epidermidis</i>	Dirençli
4.	<i>S. haemolyticus</i>	Dirençli
5.	<i>S. haemolyticus</i>	Dirençli
6.	<i>S. haemolyticus</i>	<b>Duyarlı</b>
7.	<i>S. haemolyticus</i>	<b>Duyarlı</b>
8.	<i>S. epidermidis</i>	Dirençli
9.	<i>S. haemolyticus</i>	Dirençli
10.	<i>S. haemolyticus</i>	Dirençli
11.	<i>S. haemolyticus</i>	Dirençli
12.	<i>S. haemolyticus</i>	Dirençli
13.	<i>S. haemolyticus</i>	Dirençli
14.	<i>S. epidermidis</i>	<b>Duyarlı</b>
15.	<i>S. haemolyticus</i>	<b>Duyarlı</b>

### 4.3. Teikoplanin dirençli bulunan 15 suşun DNA İzolasyonu

MIK sonuçlarına göre teikoplanin dirençli bulunan 15 suş polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile direnç genlerinin varlığının araştırılması için PureLink® Genomic DNA Kiti (İnvitrogen) kullanılarak DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Suşlardan elde edilen DNA örnekleri agaroz jel elektroforeziyle görüntülenmiştir (Şekil 4.1.).



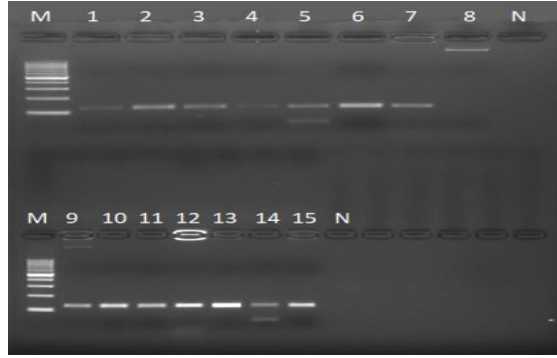
**Şekil 4.1. Teikoplanin dirençli bulunan *Staphylococcus* sp. DNA izolasyonu sonrası agarose jel elektroforez görüntüsü**

#### **4.4. Teikoplanine dirençli operondaki (*tcaRAB*) mutasyonların belirlenmesi**

Teikoplanine dirençli operondaki (*tcaRAB*) mutasyonların varlığı, daha önce yapılan MİK sonuçlarına göre teikoplanine dirençli olduğu görülen, 15 *Stafilokok* suşunda teikoplanin direnç geninde mutasyon olduğu düşünülen bölgelere özgü tasarlanan primerler kullanılarak PCR yöntemiyle araştırılmıştır. *Staphylococcus* ATCC 29213 suşu negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

##### **4.4.1. *tcaR* gen bölgesindeki mutasyon**

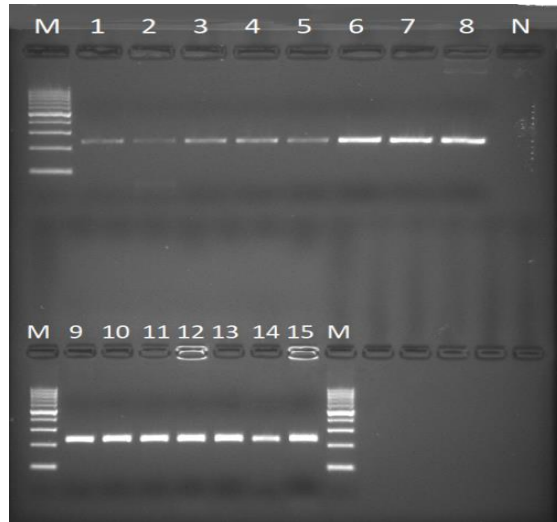
*tcaR* gen bölgesindeki mutasyonun araştırılması için *Staphylococcus* ATCC 29213 suşu negatif kontrol olarak kullanılmıştır. L44V ve G52V mutasyonlarına özgü tasarlanan primerler ile PCR yöntemiyle amplifikasyon işlemi gerçekleştirilmiş ve suş örneklerinin DNA dizileri amplifiye edilmiştir (1,2,3,4,6,7,9,10,11,12,13,15). 5. ve 14.suş örneklerinde amplifikasyon gerçekleşmiş olsa da hafif primer dimer oluşumu gözlenmiştir. 8. suş örneğinde hedef bölge çoğaltılamamıştır. (Şekil 4.2).



**Şekil 4.2. *tcaR* gen bölgesi. M; marker, N; Negatif kontrol**

#### 4.4.2. *tcaA* gen bölgesindeki mutasyon

*tcaA* gen bölgesindeki mutasyonun araştırılması için *Staphylococcus ATCC 29213* suşu negatif kontrol olarak kullanılmıştır. I3N, I390N ve L450I mutasyonunlarına özgü tasarlanan primerler ile yapılan, PCR işlemi gerçekleştirilmiş amplifikasyon gerçekleştirilmiş tüm örneklerde dizi çoğalmıştır. (Şekil 4.3)



**Şekil 4.3. *tcaA* gen bölgesi. M; marker, N; Negatif kontrol**

Teikoplanine dirençli operondaki (tcaRAB) mutasyonların belirlenmesine yönelik gerçekleştirilen PCR aşaması ve agaroz jelde görüntülenmesi sonucunda amplifikasyonun olup olmadığı araştırılmıştır. İstenilen hedef bölgenin çoğaltılmasının tespiti için moleküler dizileme teknolojileri (Yeni nesil dizileme, Masif paralel dizileme, Yüksek kapasiteli dizileme vb.) gibi dizileme teknikleri gerekmektedir. Bu bağlamda tcaR gen bölgesindeki mutasyonlarına (L44V, G52V) ve tcaR gen bölgesindeki mutasyonlarına (I3N, I390N ve L450I) özgü hedef bölgelerin kullandığımız primerler aracılığıyla amplifiye edilip edilmediğinin belirlenmesine yönelik bu tez çalışmasının devamı niteliğinde olan dizi analizi yapılacaktır.

## 5. TARTIŞMA

Stafilokoklar, muköz ve deri membranlarda mikroflora elemanı olarak yaşarlar. Farklı türler ile çeşitli hastalıklar yapabilen klinik açıdan önemli bir bakteri cinsidir. *Staphylococcus aureus*, birden fazla patojenik faktörü ile çeşitli organ ve dokularda riskli enfeksiyonlar oluşturabilen çok önemli bir Stafilokok türüdür. KNS olarak adlandırılan Koagülaz Negatif Stafilokok türleri geçmiş yıllarda yalnızca mikroflora elemanı olarak görülürken, günümüzde hastane kaynaklı enfeksiyon etkenlerinden sayılmaktadır (Gemmel 2004).

Stafilokokların en çok sebep olduğu enfeksiyonlar arasında deri enfeksiyonları, osteomyelit, solunum sistemi enfeksiyonları ve endokardit yer almaktadır. Metisilin direnci hem *S. aureus* hem de KNS suşlarında ciddi bir morbidite ve mortalite nedenidir (Tenover ve diğ. 2004).

Sefalosporinlerin 1970'li yıllardan sonra yaygın kullanılmasıyla metisilin direnci artış göstermiştir. 1980'li yıllardan itibaren MRSA suşları hastane kaynaklı enfeksiyonlarda sorunlara neden olmuş, günümüzde ise toplum kaynaklı enfeksiyonlarda da sorunlar çıkarmaya devam etmektedir (Dündar 2000).

Günümüzde metisilin direnci stafilokoklar için giderek artan bir öneme sahiptir. Bu direnç *mecA* gen bölgesiyle kodlanır ve penisilin bağlayan protein 2a/2'üretilmesi sonucu meydana gelmektedir. Bu proteinin beta-laktam grubu antibiyotiklere afinitesi çok azdır ve bu sebeple bütün beta-laktam ve beta-laktam türevi antibiyotiklere dirence yol açmaktadır (Zhu ve diğ. 2006).

Bu gen bölgesinin tanımlanması ile rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında daima metisilin direnci varlığını tespit etmek sorun teşkil etmiştir. Katı besiyerinde oksasilin bulunan tarama testleri, sefoksitin disk difüzyon yöntemi, sıvı mikrodilüsyon yöntemi, E-test ve *mecA* geni veya onun ürünü olan PBP2a'nın tespit edilmesi gibi yöntemlerle metisilin direnci varlığı saptanır (Perez ve diğ. 2007).

Metisilin direnci belirlemede hatalar oluşması ciddi klinik sorunlara sebep olabilir. Yanlış belirlenen dirençli sonuçlar gereksiz izolasyon tedbirlerinin alınmasına

ve glikopeptitlerin aşırı kullanımına, yanlış belirlenen duyarlı sonuçlar ise tedavide yetersizliğe sebep olmaktadır (Uzun ve diğ. 2013).

Çalışmamızda Kirby Bauer disk difüzyon yöntemi ile 30 µg sefoksitin (FOX) diski kullanılmıştır. İncelenen 30 stafilokok suşunda %60 Metisilin direnci, %40 oranında metisilin duyarlılığı bulunmuştur.

Stafilokokların makrolidlere karşı direnç geliştirmesi hedef bölge modifikasyonu, ilacın inaktivasyonu ve dışa atım pompa aktivasyonu gibi durumlarda ortaya çıkmaktadır. Ülkemizde yapılan birçok çalışma sonuçlara bakıldığında stafilokoklarda eritromisin direnci %40-85, eritromisin duyarlılık durumu %2-27 arasında değişen oranlarda bildirilmiştir. Klindamisin direnci ise %11-64 arasında değişmektedir (Özel ve diğ. 2017).

Çalışmamızda tespit ettiğimiz eritromisin dirençli stafilokok suşu oranı %60, duyarlı stafilokok suşu oranı %30 olarak bulunmuştur. Tespit ettiğimiz oranlar ülkemizde yapılan diğer çalışmalarla uyumlu bulunmuştur.

Bizim çalışmamızda da klindamisin direnç oranı %40 dirençli, %46,7 orta dirençli ve %13,3 duyarlı olarak bulunmuştur. Çalışmamızdaki klindamisin direnç oranlarındaki sonuçlar ülkemizde yapılan diğer çalışmalarla uyumlu bulunmuştur.

Aminoglikozidler, bazı bakteriyel enzimler aracılığıyla etki oranları değiştirilmektedir. Bu enzimler tarafından kodlanmış olan genler transpozonlar ve plazmidler ile bakteriler arasında taşınmaktadır. Bu şekilde gelişen aktarılabılır bir direnç özelliği sergilemektedirler (Topçu ve diğ. 2002). Buna göre ülkemizde yapılan çalışmalara bakıldığında stafilokok suşları için gentamisin direnç oranları %12,8 ve %41,2 arasında olduğu görülmektedir (Turhanoglu ve diğ. 2018).

Çalışmamızda gentamisin için direnç oranlarına bakıldığında %36,7'si gentamisine duyarlı, %3,3'ü gentamisine orta direnç geliştirdiği ve %60'ının gentamisine direnç geliştirdiği görülmektedir. Gentamisine direnç oranının ülkemizde yapılan diğer çalışmalara kıyasla daha fazla çıktığı görülmüştür.

Karadağ ve ark. yaptığı çalışmaya göre *S. aureus*'da ve KNS'ler de penisilin için



antibiyotik direnç oranına bakıldığında sırasıyla %94,6-97,2 olarak bildirilmiştir (Kart ve diğ. 2011).

Bizim çalışmamızda penisilin için direnç oranı, *S. aureus* ve KNS'ler de %93,3 olarak bulunmuş ve bu sonuç diğer çalışmalarla uyumlu bulunmuştur.

Stafilokoklarda antibiyotik dirençlerine bakıldığında, Turhanoğlu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre ülkemizde genel olarak direnç oranları Trimetoprim/Sülfametoksazol için %3,5-27,0; tetrasiklin için %31,2-58,2; siprofloksasine için %45-60; fusidik asit için %3,2-37,5 oranlarında değişmektedir (Turhanoğlu ve diğ. 2018).

Çalışmamızda trimetoprim-sülfametoksazole, tetrasikline ve siprofloksasine sırasıyla %23,3, %36,7 ve %60 dirençli olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar yapılan diğer çalışmalarla uyumlu bulunmuştur. Çalışmamızda fusidik asit direnç oranı %60 olarak bulunmuş ve bu sonuçta ülkemizde yapılan diğer çalışmalardan daha yüksek bulunmuştur.

Türkiye'de vankomisine 1994'te teikoplanine 1996'da kullanım izini verilmiştir. Bu tarihler ile birlikte klinikte kullanımları artmıştır (Ariza ve diğ. 1999).

Glikopeptid antibiyotik olan vankomisin ve teikoplanin özellikle MRSA ve beta laktam direnci gösteren klinik suşlarda kullanılmaktadır. Vankomisine karşı enterekok ve stafilokoklarda direnç gelişmesi ortaya çıkınca glikopeptid antibiyotiklerin duyarlılık durumlarının tespiti önemli hale gelmiştir (Camargo ve diğ. 2011).

Klinik suşlarda glikopeptidlere yüksek MİK değerleri göze çarpmaktadır. Bu da Stafilokokların sebep olduğu infeksiyonlarda glikopeptid ile tedavilerde yetersiz klinik yanıt oluşturmaktadır. Ayrıca farklı çalışmalarda MİK değerlerindeki artışın, klinik yanıtta başarıyı etkilediği ön görülmektedir (Lodise ve diğ. 2008).

Stafilokok suşlarında, vankomisin duyarlılığının belirlenmesinde CLSI M100-S23 rehberi sıvı mikrodilüsyon yöntemini (SMD) önermektedir. Üstelik disk difüzyon yönteminin (DD) vankomisin için güvenilir olmadığını, duyarlı suşları orta derecede duyarlı ya da dirençli suşlarından ayırmak için yetersiz olduğunu bildirmektedir. CLSI

M100-S23 rehberi teikoplanin için zon çapları bildirmektedir. Buna rağmen teikoplanin için de DD yönteminin dirençli ya da orta duyarlı suşları duyarlı suşlardan ayırmada etkinliğinin açık olmadığı belirtilmektedir. (CLSI 2013).

EUCAST rehberi vankomisin ve teikoplanin için DD yönteminde kullanılmak üzere herhangi bir zon çapı sınır değeri önermemektedir. DD yönteminin güvenilir olmadığını bildirmektedir. (EUCAST 2015).

Çalışmamızda da vankomisin ve teikoplanin duyarlılığını belirlemek için sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır. İki tekrarlı olarak yapılan çalışmada sonuçlar birbiriyle uyumlu çıkmıştır.

Japonya'dan Hiramatsu ve arkadaşları 1996 yılında ilk kez sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile vankomisine 8 µg/ml değer ile azalmış duyarlılık gösteren MRSA klinik suşunu tanımlamışlardır (Hiramatsu ve diğ. 1997). Bunun üzerine Japonya'da 6,625 *S. aureus* suşu ile yapılan çalışmada vankomisin direncine rastlanmamıştır (Ike ve diğ. 2001). Fakat daha sonra Fransa'da bir ve Amerika'da iki *S. aureus* suşunda vankomisine azalmış duyarlılık bildirilmiştir (Smith ve diğ. 1999).

Bu olgulara bakıldığında direnç gelişiminden önceki dönemlerde çoğu kez ve uzun süreli olarak vankomisin veya teikoplanin tedavisinin uygulanmış olması ortak özellik olarak sayılabilir.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Vankomisin için MIK değerleri 8 µg/ml olarak saptanan bu suşlara Vancomycin-intermediate *S. aureus*; VISA (vankomisine orta düzeyde duyarlı *S. aureus*) olarak isimlendirmiştir (Ploy ve diğ.1998).

Hiramatsu ve arkadaşları VISA suşlarının yayılmasından kısa bir süre sonra 1997 yılında yaptıkları çalışma sonucunda "heterojen VISA (hVISA)" olarak isimlendirilen yeni bir vankomisin direnç tipi bildirmişlerdir. "Mu 3" olarak isimlendirilen ilk hVISA suşundan sonra farklı ülkelerde değişen oranlarda hVISA suşları bildirilmiştir (Howden ve diğ. 2010).

Türkiye'de ise 1998 yılında Gülay ve ark. tarafından ilkkez hVISA suşu bildirilmiştir (Gülay ve diğ. 1998).

Yapılan çalışmalar sonucunda hVISA suşlarının görülme sıklığı %0.71-65 şeklinde değişkenlik göstermektedir (Sancak ve diğ. 2005).

Stafilokok suşlarında görülen bu vankomisine artan direnç gelişimini takiben Michigan'da 2002 yılında bir diyaliz hastasında ilk kez vankomisine dirençli *S. aureus* (VRSA) suşu bildirilmiştir. Şimdiye kadar birden fazla VRSA infeksiyonu olduğu bildirilmiştir. Glikopeptid direnç mekanizmaları VRSA'larda ve VISA/hVISA suşlarında birbirinden farklılık gösterir. Bu vakaların hepsinde PCR ile *vanA* geni tespit edilmiştir. Bu gen, vankomisine dirençli enterokoklardan (VRE) plazmid ile Stafilocoklara aktarıldığı düşünülmektedir (Gould 2011).

hVISA ve VISA suşlarında *vanA* geni bulunmaz. Bu suşlarda vankomisin direncinden sorumlu olan mekanizma tam olarak açıklık kazanmamıştır. Yapılan birçok çalışma sonucunda hVISA ve VISA suşlarında hücre duvarının, vankomisine duyarlı olan Stafilocok suşlarında daha kalın olduğu gözlemlenmiştir (McAleese ve diğ. 2006).

*S. aureus* için vankomisin MİK sınır değerleri,  $\leq 4$   $\mu\text{g/ml}$  duyarlı, 8-16  $\mu\text{g/ml}$  orta duyarlı ve  $\geq 32$   $\mu\text{g/ml}$  dirençli olarak kabul edilmiştir. İn vitro duyarlılık sonuçları ile elde edilen klinik sonuçlar arasındaki korelasyonu artırabilmek için 2006 yılında CLSI MİK direnç sınır değerlerini düşürmüştür. Günümüzde direnç sınır değerlerine göre MİK  $\leq 2$   $\mu\text{g/ml}$  olan izolatlar duyarlı, 4-8  $\mu\text{g/ml}$  olan izolatlar VISA ve  $\geq 16$   $\mu\text{g/ml}$  olanlar VRSA olarak kabul edilmektedir. Buna göre daha önceden hVISA olarak tanımlanmış olan suşlar yeni belirlenmiş olan değerlere göre VISA olarak kabul edilmektedir (CLSI 2010).

2009 yılında "European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)" VISA tanımını tamamen kaldırarak vankomisin MİK değeri  $> 4$   $\mu\text{g/ml}$  olan tüm *S. aureus* izolatlarını vankomisine dirençli olarak kabul etmiştir (EUCAST 2015).

VISA, hVISA ve VRSA suşlarının yanı sıra son yıllarda özellikle farklı merkezlerde ortaya çıkan vankomisin MİK değerlerinde görülen yükselme başka bir problem olarak görülmektedir. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen stafilocok suşlarında vankomisin MİK değerleri, CLSI direnç sınır değerlerinin altında olmasına

rağmen, yıllara göre değerlendirme yapıldığında vankomisin MIK değerlerinde yükselmeler olduğu gözlenmiştir (Moise ve diğ. 2009).

Bizim çalışmamızın MIK sonuçlarına göre de vankomisin için direnç gelişmediği görüldü. Fakat MIK değeri 4 µg/ml olan suş oranının %60 olduğu bulunmuştur. Bu oranın vankomisin MIK değerinde yükselmeler olduğu görülmektedir.

Bakthavatchalam ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre Hindistan'da metisiline duyarlı (MS) *S. haemolyticus* kan akımı infeksiyonu olan ve teikoplanine direnç ve vankomisin ara direnç profili gösteren ilk olgu bildirilmiştir (Bakthavatchalam ve diğ. 2017).

Bizim çalışmamızda metisilin, vankomisin duyarlı teikoplanin dirençli 5 suş tespit edilmiştir. Bu suşlardan 1 tanesi MSSA 4 tanesi MSKNS olduğu yapılan analizler sonucunda tespit edilmiştir.

Bakthavatchalam ve ark. izole ettikleri *S. haemolyticus* suşunun gen dizisini çıkarmış ve sonuç olarak tcaRAB operonunda tcaA ve tcaR gen bölgelerinde yer değiştirme mutasyonları olduğunu bildirmişlerdir. Bu gen dizisinde bulunan yer değiştirme mutasyonunda, vankomisine direnç gelişimi ile ilgili aday genlerin bulunduğunu tespit etmişlerdir. Teikoplanin direncinin bu nedenle vankomisin direnci yolunu hazırladığı düşünülmektedir (Bakthavatchalam ve diğ. 2017).

Çalışmamızda Bakthavatchalam ve arkadaşlarının tespit ettiği yer değiştirme mutasyonlarına denk gelecek primerler tasarlanmıştır. Bu primerle ile teikoplanin direnci bulunan 15 suş PCR ile analiz edilmiştir. Bu suşlardan 10 tanesi metisilin dirençli, vankomisin duyarlı ve teikoplanin dirençli, 5 tanesi metisilin, vankomisin duyarlı teikoplanin dirençli olarak tespit edilmiştir.

Glikopeptid duyarlılığının belirlenmesinde teikoplanine dirençli operon (tcaRAB) önemli bir rol oynamaktadır. Bu operonun genomik bir bölgesinin silinmesi veya mutasyonunun teikoplanin direnci seviyesini arttırdığı bildirilmiştir. Glikopeptid direnci, metisiline dirençli *S. haemolyticus* popülasyonunda sık görülen bir olaydır fakat nadiren metisiline duyarlı *S. haemolyticus*'te teikoplanin direnci bildirilmektedir

(Bakthavatchalam ve diğ. 2017).

TcaA'nın inaktivasyonu, silinmesi veya mutasyonu teikoplanin direncini artırır. tcaA'nın inaktivasyonunun kombine mekanizmasını teikoplanin direnci seviyesini artırabileceğini göstermektedir (Vimberg ve diğ. 2017).

Bizim çalışmamızda teikoplanin direnci tcaRAB lokusundaki mutasyonlara özgü primerler tasarlanmış ve firmadan ticari primerler temin edilmiştir. Bu primerlerle PCR yöntemi kullanılarak hedef bölgeye özgü dizilerin amplifikasyonu incelenmiştir.

Metisilin, vankomisin duyarlı teikoplanin dirençli olan 5 suş Bakthavatchalam ve ark. bulduğu yer değiştirme mutasyonlarına özgü tasarlanan primerlerle yapılan PCR işlemine göre gen bölgesi varlığı tespit edilmiştir. Bakthavatchalam ve ark. çalışmasından farklı olarak bizim çalışmamızda, tcaR ve tcaA gen bölgesi için tasarlanan primerler kullanılarak PCR yöntemiyle metisilin duyarlı Staphylococcus aureus da da tespit edilmiştir. Ayrıca metisilin dirençli olan Stafilokok suşlarında da gen bölgesi varlığı tespit edildiği görülmüştür.

İleride Namık Kemal Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarında yapılacak olan hücre kültürü ve moleküler genetik çalışmalarında söz konusu mutasyonların etkilerinin çalışılabilmesi için gerekli veriler oluşturulmuştur.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Metisilin dirençli stafilokok infeksiyonlarında glikopeptid antibiyotikler kullanılmaktadır. Antibiyotik kullanımının artmasıyla direnç gelişimi bilindiktir. Fakat metisilin duyarlı stafilokok suşlarında glikopeptidlere direnç geliştirmesi ileri derecede glikopeptid direnci oluşumunun endişesini yaratmaktadır. Metisilin direncinin değerlendirilmesi bu durumda önem kazanmakta ve klinik suşlarda direncin belirlenmesinde eş zamanlı uygulamalar yapılması önerilmektedir.

Teikoplanin direncinin gelişmesi, vankomisin direncinin oluşmasına zemin hazırladığı düşünülmektedir. Bakteriler arasında plazmid ile genlerin aktarılması tespit edilen mutasyonların farklı suşlarda taşınabileceğini göstermektedir. Bu nedenle stafilokok infeksiyonlarında metisilin, vankomisin ve teikoplanin direncini belirlemede daha dikkatli olunmalıdır.

Stafilokoklarda teikoplanin direnci tcaRAB lokusunda delesyonlar ve mutasyonlar ile ilişkili olduğu bildirilmektedir. Çalışma sonuçlarımızda gösterdiğimiz metisilin, vankomisin duyarlı teikoplanin dirençli olan 5 suшта, yer değiştirme mutasyonlarına özgü tasarlanan primerlerle yapılan PCR işlemine göre gen bölgesi varlığı tespit edilmiştir. Bu da metisilin ve vankomisin direnci gelişmeden teikoplanin direnci gelişebileceğini göstermektedir. Vankomisin direncinin önceki adımı olarak düşünülen teikoplanin direncini, bu mutasyonların tespitinin önemini göstermektedir. Bu mutasyonlar ile ilgili daha kapsamlı çalışmalar yapıp mutasyonların tanımlanması, teikoplanin direncinin daha hızlı ve başarılı bir şekilde analizini sağlayabilir.

## 7. KAYNAKLAR

Archer GL, Climo MW. *Staphylococcus epidermidis and other coagulase-negative Staphylococci*. In Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, ed. Gerald L. Mandell; John E. Bennett; Raphael Dolin. 6<sup>th</sup> ed. 2005, Philadelphia, Pennsylvania: Churchill Livingstone. p. 2352-2360.

Ariza J, Pujol M, Cabo J: Vancomycin in surgical infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with heterogeneous resistance to vancomycin, *Lancet* 1999;353:1587-8.

Baba T, Takeuchi F, Kuroda M et al. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet*, 2002; 359: 1819-1827.

Bannerman TL. *Staphylococcus, Micrococcus* and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In Murray PR., Baron EJ., Jorgensen JH., Tenover FC., Tenover FC. (Ed.) *Manual of Clinical Microbiology* . 8<sup>th</sup> Ed. Washington: DC, 2003: 384-404.

Bannerman TL, Peacock SJ. *Staphylococcus, Micrococcus ve Diğer Katalaz Pozitif Koklar*. Çeviren: Başustaoğlu A. Klinik Mikrobiyoloji. 9. Basım, Atlas Kitapçılık Tic.Ltd.Şti., Ankara;2009, s:393-396.

Camargo CH, Mondelli AL, Villas Bôas PJF. Comparison of teicoplanin disk diffusion and broth microdilution methods against clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *S. epidermidis*, *Braz J Microbiol* 2011;42(4):1265-8.

CLSI - Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI Document M100-S23. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. (2013).

Çavuşoğlu C, Hilmioğlu S, Dibek MA, Afşar İ. Kan kültürlerinden soyutlanan *Staphylococcus aureus* suşlarının in vitro antibiyotik duyarlılıkları, *İnfeksiyon Derg* 1999;13(4):497-500.

Çiftçi İ.H, Altındış M, Çetinkaya Z, Aşık G, Aktepe OC. Klinik örneklerden izole edilen stafilokoklarda mecA varlığının araştırılması. *The Medical Journal of Kocatepe* 2009;10: 17-20.

Dündar V. Metisiline dirençli stafilokok infeksiyonları, *Klinik Derg* 2000;13(Ek 1):26-7.

Elçi SD. Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus* Suşlarının Antibiyotik Duyarlılıkları ve Pulsed Field Jel Elektroforezi ile Tiplendirilmesi. Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2005, Ankara (Danışman: Prof. Dr. N. Aköz).

EUCAST MİK ve zon çapı değerlendirmek için sınır değer tabloları, 2018.

Fışkırma İA, Bektaş M, Kimyon U, Ergin Ç. Steteskoaplarda metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* kolonizasyonunun araştırılması. *Pamukkale Tıp Dergisi*, 2011, 4: 116-118.

Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, et al. *CDC definitions for nosocomial infections, 1988*. *Am J Infect Control*, 1988. 16(3): p. 128-40.

Gemmel C.G. Glicopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*: is it a real threat? *J Infect Chemother* 2004; 10: 69- 75

Gould IM. Clinical activity of anti-Gram-positive agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66(Suppl 4): iv17-21.



Gülay Z, Atay T, Küçüküven M, Yuluđ N: *Staphylococcus aureus* strains heterogeneously resistant to vancomycin at a hospital in Turkey, Program and Abstracts of the Thirty-eighth Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Diego, CA, USA. Abstract C-136. Am Soc Microbiol, Washington DC (1998).

Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S, Fukuchi Y, Kobayashi I. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* 1997; 350: 1670–73.

Howden BP, Davies JK, Johnson PD, Stinear TP, Grayson ML. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23(1): 99-139.

Ike Y, Arakawa Y, Ma X et al: Nationwide survey shows that methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains heterogeneously and intermediately resistant to vancomycin are not disseminated throughout Japanese hospitals, *J Clin Microbiol* 2001;39:4445-51

Jawetz, E., 1995, Antimicrobial chemotherapy. Medical Microbiology Appleton and Lange. Connecticut. 40-51.

Kart Yařar K, Aybar Bilir Y, Pehlivanouđlu F, Őengöz G. Stafilokok suşlarında slaym faktör pozitifliđi, metisilin ve antibiyotik direnci, *ANKEM Derg* 2011;25(2):89-93.

Kılıç SS, Abbasođlu U, Çevikbař A. Deri ve yumuşak doku infeksiyonları. İçinde: Abbasođlu U, Çevikbař A, eds. Farmasötik Mikrobiyoloji. 1.Basım ,Ankara: Efil Yayınevi; 2011. s:286-287.

Kutlu BS. Çeşitli Materyallerden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarında Metisilin Direnci ve E-test ile Vankomisin MİK Değerlerinin Araştırılması. T.C. Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Uzmanlık Tezi, 2006, İstanbul (Danışman: Uzm. Dr. Ö.Nazlıcan).

Kim DK, Yoo TH, Ryu DR, et al. Changes in causative organisms and their antimicrobial susceptibilities in CAPD peritonitis: a single center's experience over one decade. *Perit Dial Int*, 2004. 24(5): p. 424-32.

Kim JW, Chung GT, Yoo JS, Lee YS, Yoo JI. Autolytic activity and molecular characteristics of *Staphylococcus haemolyticus* strains with induced vancomycin resistance. *J Med Microbiol* 2012;61:1428–34.

Lodise TP, Graves J, Evans A et al. Relationship between vancomycin MIC and failure among patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia treated with vancomycin, *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52(9):3315-20.  
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00113-08>

Lowy FD: *Staphylococcus aureus* infections, *N Engl J Med* 1998;339(8):520-32.

The gram-positive cocci: Part 1: Staphylococci and related organism. In: Alen S, Koneman E, Janda W, Schreckenberger P, Winn W, Woods G, Procop G. Eds. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5<sup>th</sup> Ed, Philadelphia: Lippincott Williams &Wilkins, 2006: 539-576.

Peacock SJ. *Staphylococcus*. In Borriello SP, Murray PR, Funke G. (Ed). *Topley &*

*Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. 10<sup>th</sup> Ed. Hodder Arnold, London, United Kingdom. 2005: 771-832.

Shopsin B, Kreiswirth BN. Molecular epidemiology of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis*, 2001; 7:323-326.

Moreillon P, Que Y, Glauser MP. *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock) In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6<sup>th</sup> Ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2005; 2321-2351.

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

Marshall SA, Wilke WW, Pfaller MA, Jones RN. *Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci from blood stream infections: frequency of occurrence, antimicrobial susceptibility, and molecular (mecA) characterization of oxacillin resistance in the SCOPE program*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 1998. 30(3): p. 205-14.

Mermel LA, Farr BM, Sherertz RJ, et al. *Guidelines for the management of intravascular catheter-related infections*. *Clin Infect Dis*, 2001. 32(9): p. 1249-72.

McAleese F, Wu SW, Sieradzki K, et al. Overexpression of genes of the cell wall stimulon in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* exhibiting vancomycin-intermediate- *S. aureus*-type resistance to vancomycin. *J Bacteriol* 2006; 188(3): 1120-33.

McGirt MJ, Zaas A, Fuchs HE, et al. *Risk factors for pediatric ventriculoperitoneal shunt infection and predictors of infectious pathogens*. Clin Infect Dis, 2003. 36(7): p. 858-62.

Moise PA, North D, Steenbergen JN, Sakoulas G. Susceptibility relationship between vancomycin and daptomycin in *Staphylococcus aureus*: facts and assumptions. Lancet Infect Dis 2009; 9(10): 617-24.

O'Grady NP, Alexander M, Dellinger EP, et al. *Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections*. Centers for Disease Control and Prevention. MMWR Recomm Rep, 2002. 51(RR-10): p. 1-29.

Öncül O. Vankomisin ve Teikoplanin Hikayesi. Ankem Derg 2010;24(2): 101-109.

Usluer G. *Staphylococcus aureus*'un neden olduğu infeksiyonlar. İçinde: Ulusoy S, Usluer G, Ünal S, eds. Önemli ve Sorunlu Gram-Pozitif Bakteri İnfeksiyonları. 2.baskı. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2004, s:39-53.

Ünal S, Akhan SA. Deri ve yumuşak doku infeksiyonları. İçinde: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, eds. İnfeksiyon Hastalıkları. Nobel Kitapevleri Ltd. Şti., İstanbul; 1996, s: 773-778.

Pavoni GL, Giannella M, Falcone M, et al. *Conservative medical therapy of prosthetic joint infections: retrospective analysis of an 8-year experience*. Clin Microbiol Infect, 2004. 10(9): p. 831-7.

Peacock SJ. *Staphylococcus*, Topley&Wilson's Microbiology and Microbial Infections. 10th Edition, p. 771-831, John Wiley&Sons Pub, New York, (2006).

Perez LR, Antunes AL, Barth AL, d'Azevedo PA. Variations of agar screen tests for detection of methicillin resistance in staphylococci: focus on cefoxitin. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; 26(4): 267-70.

Ploy MC, Grelaud C, Martin C, de Lumley L, Denis F. First clinical isolate of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a French hospital. *Lancet* 1998; 351(9110): 1212.

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

Sancak B. *Staphylococcus aureus* ve antibiyotik direnci. *Mikrobiyol Bul* 2011;45(3): 565-576.

Sancak B, Ercis S, Menemenlioglu D, Colakoglu S, Haşçelik G. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin in a Turkish university hospital. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56(3): 519-23.

Sancak B. MRSA direnç mekanizmaları: dünyada ve Türkiye'de epidemiyolojisi. *Ankem Derg* 2012;26(2): 38-47.

Sievert DM, Boulton ML, Stoltmant G, Johnson D, et al. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin (VRSA)- USA, 2002. *MMWR* 2002; 51(26): 565-67.

Smith TL, Pearson ML, Wilcox KR, et al. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med* 1999; 340(7): 493-501.

Souvenir D, Donald E, Anderson JR, et al. *Blood cultures positive for coagulase-negative staphylococci: antisepsis, pseudobacteremia, and therapy of patients*. *J Clin Microbiol*, 1998. 36(7): p. 1923-6.

Sünbül, M., 2001, Glikopeptidler, *İnfeksiyon Dergisi*. 199-202.

Şardan Y. Ç., 2002, Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* enfeksiyonlarının epidemiyolojisi ve kontrolü, Sterilizasyon Dezenfeksiyon ve Hastane Enfeksiyonları, Günaydın, M., Esen, Ş., Seriş, A., Leblebiciođlu, H., SİMAD Yayınları, 1, 317-335.

Tenover FC, Weigel M, Appelbaum PC, McDougal LK, and et al. Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolate from a Patient In Pennsylvania. *Antimicrobial Agents And Chemothe- rapy*. 2004; 48: 275- 280.

*The gram-positive cocci: Part I: Staphylococci and related organisms*. In Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, Alen S, Koneman E, Janda W, Schreckenberger P, Winn W, Woods G, Procop G. eds. 5<sup>th</sup> ed. 2006, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. p. 539-576.

The European Commitee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interp- retation of MICs and zone diameters. Version 5.0, 2015. <http://www.eucast.org>

Tünger A. *Staphylococcus aureus*: Mikrobiyoloji, patogenez ve epidemiyoloji. İçinde: Ulusoy S, Usluer G, Ünal S, eds. Önemli ve Sorunlu Gram-Pozitif Bakteri İnfeksiyonları. Bilimsel Tıp Yayınevi;1.baskı Ankara; 2004,s:10-49.

Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. s. 165-1507, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul (2002).

Vedel, G., Leruez, M., Leman, F., Hraoui, E., Ratovohery, D., 1990, Prevalence of *S. aureus* and coagulase negative staphylococci with decreased sensitivity to glycopeptides as assessed by determination of MIC's, *European Journal Clinical Microbiology*

Infectious Diseases. 9, 820.

Vladimir Vimberg, Jorunn Pauline Cavanagh, Oldřich Benada, Olga Kofroňová, Erik Hjerde, Leona Zieglerová, Gabriela Balíková Novotná. Teicoplanin resistance in *Staphylococcus haemolyticus* is associated with mutations in histidine kinases VraS and WalK. 2017

Vural A, Afşar İ, Kurultay N, Demirci M. *Staphylococcus aureus*'da metisilin direncinin saptanmasında disk difüzyon, oksasilin agar tarama, mikrodilüsyon ve pbp2a lateks aglütinasyon testlerinin karşılaştırılması. *Ankem Dergisi*, 2011, 25: 145-149.

Yamuna Devi Bakthavatchalam, Thambu David Sudarsanam, Priyanka Babu, Elakkiya Munuswamy, Dhiviya Prabaa Muthuirulandi Sethuvel, Naveen Kumar Devanga Ragupathi, and Balaji Veeraraghavan. Methicillin-Susceptible Teicoplanin-Resistant *Staphylococcus haemolyticus* Isolate from a Bloodstream Infection with Novel Mutations in the *tcaRAB* Teicoplanin Resistance Operon. 458–460, 2017

Yener ÖZEL<sup>1</sup>, Kazım Batuhan BÜYÜKZENGİN<sup>2</sup>, Mehmet Tevfik YAVUZ<sup>2</sup> KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN METİSİLİNE DİRENÇLİ VE DUYARLI *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* SUŞLARININ ANTİBİYOTİK DİRENÇ PROFİLİNİN ARAŞTIRILMASI. *ANKEM Derg* 2017;31(2):41-47

Zhu LX, Zhang ZW, Wang C, Yang HW, Zhang Q, Cheng J. Evaluation of the CLSI cefoxitin 30-microg disk-diffusion method for detecting methicillin resistance in staphylococci. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12(10): 1039-42.

Wolff M, Witchitz S, Chastang C, et al. *Prosthetic valve endocarditis in the ICU. Prognostic factors of overall survival in a series of 122 cases and consequences for treatment decision.* *Chest*, 1995. 108(3): p. 688-94.