



ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
İNFEKSİYON HASTALIKLARI VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN  
STAFİLOKOKLARDA MAKROLİD-  
LİNKOSAMİD- STREPTOGRAMİN B  
DİRENCİNİN FENOTİPİK VE GENOTİPİK  
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

DR. GÜLİZ UYAR GÜLEÇ

DANIŞMAN  
DOÇ. DR. SERKAN ÖNCÜ

**AYDIN-2010**

T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
İNFEKSİYON HASTALIKLARI VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN  
STAFİLOKOKLARDA MAKROLİD-  
LİNKOZAMİD- STREPTOGRAMİN B  
DİRENCİNİN FENOTİPİK VE GENOTİPİK  
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

DR. GÜLİZ UYAR GÜLEÇ

DANIŞMAN

DOÇ. DR. SERKAN ÖNCÜ

**AYDIN-2010**

## ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Asistanlık sürecine başladığım ilk günden bu güne her daim sabırla ve sevgiyle eğitimim için emek veren, bilgi ve beceri kazanmam için bana yol gösteren, İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyolog olmanın önemini ve değerini benimseten, insani ve etik değerleri her zaman göz önüne almamı sağlayan değerli hocam Doç. Dr. Serhan Sakarya'ya,

Üzerimde büyük emeği olan, bilgiye ulaşmada ve paylaşmada desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen, bilimsel araştırma konusunda titiz ve özenli olmanın önemini bana aşıl原因ayan, hekimlik hayatım boyunca her zaman fikirlerine ihtiyaç duyacağımı bildiğim ve bunu benden esirgemeyeceğine inandığım, bu tezin hazırlanmasında büyük pay sahibi değerli hocam Doç. Dr. Serkan Öncü'ye,

Uzmanlık eğitimim döneminde bilgisini ve mesleki tecrübelerini sürekli bizlerle paylaşan, insani değerleri ve meslek ahlakını önde tutmanın hekimliğin ilk kuralı olduğunu öğrendiğim, cana yakın tavırları ile asistanlarının her sorunu ile birebir ilgilenen, sevgisini ve dostluğunu her daim yanımda hissettiğim değerli hocam Yrd. Doç. Dr. M. Bülent Ertuğrul'a,

Uzmanlık eğitimim sürecinde pek çok konuda yardım ve desteğini gördüğüm, bilgi ve tecrübesinden faydalandığım, birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Ş. Barçın Öztürk'e,

Bu zorlu süreçte iyi ve kötü her anı fedakarca paylaşan, bana huzurlu ve mutlu bir iş ortamında çalışma şansını sağlayan, asistanlık ve tez çalışma sürecinde büyük desteklerini gördüğüm, her birine ayrı ayrı büyük sevgi ve saygı duyduğum değerli asistan arkadaşlarım Dr. Çetin Turan, Dr. M. Özlem Ersoy, Dr. Ayşe Ş. Sert ve Dr. Ayşe Ünal Eşiyok'a,

Bir çok laboratuvar becerisini kazanmamı sağlayan, sadece tezin laboratuvar çalışması ve yazım aşamasında değil hemen her konuda güler yüzü ile bana sonsuz yardımları olan, insani ve bilimsel yönü ile örnek aldığım değerli hocam Doç. Dr. Bülent Bozdoğan'a, ayrıca tüm yardımları için Erman Oryasin'e ve Merkez laboratuvarının tüm çalışanlarına,

Tüm hemşire, personel ve sekreter arkadaşlarımıza, Derya'ya ve Bilgen'e,

Zor anlarımda her zaman gülen yüzü ve destek sözleri ile yanımda olan, sabır ve anlayışı ile bu tezin hazırlanmasında ayrı bir emek sahibi, sevgili eşim Sabri Güleç'e,

Tüm yaramazlığı ve sevimliliği ile hayatımı anlamlı kılan, bu tezin bitişine en çok O'nun sevineceğine inandığım, biricik oğlum Arda Çınar'ıma,

Benden desteklerini ve yardımlarını hiç esirgemeyen canım aileme,

*Sonsuz teşekkürlerimle...*

*Dr. Güliz Uyar Güleç*

# İÇİNDEKİLER

<b>1- GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	<b>1</b>
<b>2- GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>3</b>
2.1. Morfoloji ve İdentifikasyon.....	3
2.2. Stafilokokların Yapısı .....	10
2.3. Patogenez ve İmmünite .....	12
2.4. Stafilokokların Etken Olduğu İnfeksiyonlar.....	15
2.5. Stafilokokal İnfeksiyonların Tedavisinde Kullanılan Antibiyotikler .....	20
2.6. Stafiloklarda Antibiyotik Direnci .....	31
<b>3-GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	<b>41</b>
3.1. Çalışmaya Alınacak Suşların Belirlenmesi .....	41
3.2. Stafilokok Suşları İçin Kullanılan Besiyerleri .....	41
3.3. Mikrobiyolojik Yöntemler .....	42
3.4. Antibiyotik Duyarlılık Testleri .....	43
3.5. Moleküler Yöntemler .....	46
<b>4- BULGULAR</b> .....	<b>53</b>
<b>5-TARTIŞMA</b> .....	<b>61</b>
<b>6-SONUÇ VE ÖNERİLER</b> .....	<b>70</b>
<b>7-ÖZET</b> .....	<b>71</b>
<b>8-İNGİLİZCE ÖZET</b> .....	<b>73</b>
<b>9-KAYNAKLAR</b> .....	<b>75</b>
<b>10-EKLER</b> .....	<b>89</b>

## TABLO DİZİNİ

- Tablo I: Stafilokoklar ile mikrokok ve makrokok ayrımı için fenotipik özellikler
- Tablo II: Stafilokların virulans faktörleri
- Tablo III: Klindamisin etkili olduğu bakteriler
- Tablo IV: MLS<sub>B</sub> direnç fenotipleri
- Tablo V: Kanlı agarın içeriği
- Tablo VI: CLSI kriterlerine göre agar dilüsyon testinde antibiyotiklerin MİK duyarlılık sınırları
- Tablo VII: PCR için kullanılan primerler ve referansları
- Tablo VIII: Ünlversal master miksin hazırlanma oranları
- Tablo IX: 16S rRNA PCR işlemine ait ısı döngü ve süre diyagramı
- Tablo X: *nucA* PCR işlemine ait ısı döngü ve süre diyagramı
- Tablo XI: *mecA* PCR işlemine ait ısı döngü ve süre diyagramı
- Tablo XII: *ermA* PCR işlemine ait ısı döngü ve süre diyagramı
- Tablo XIII: *ermB* PCR işlemine ait ısı döngü ve süre diyagramı
- Tablo XIV: *ermC* PCR işlemine ait ısı döngü ve süre diyagramı
- Tablo XV: *msrA* PCR işlemine ait ısı döngü ve süre diyagramı
- Tablo XVI: D test sonuçları
- Tablo XVII: Metisiline direnç durumuna göre MLS<sub>B</sub> direnç fenotiplerinin dağılımı
- Tablo XVIII: Türlerle göre direnç mekanizmalarının dağılımı
- Tablo XIX: Direnç fenotipine göre diğer antibiyotiklerin direnç durumları

## ŞEKİL DİZİNİ

- Şekil 1. Bazı makrolidler ve telitromisinin kimyasal yapısı
- Şekil 2. Linkomisin ve klindamisinin kimyasal yapısı
- Şekil 3. Kinopristin/ dalfopristinin kimyasal yapısı
- Şekil 4. Suşların izole edildiği hastaların kliniklere göre dağılımı
- Şekil 5. Suşların izole edildiği klinik materyale göre dağılımı
- Şekil 6. 16S rRNA ve nucA PCR jel elektroforez görüntüleme örnekleri
- Şekil 7 . Tür düzeyinde stafilokokların dağılımı
- Şekil 8 . Türlerin metisilin direncine göre dağılımı
- Şekil 9. Mik agar dilüsyon testine göre antibiyotiklere direnç oranları
- Şekil 10. Eritromisin direncine göre suşların dağılımı
- Şekil 11. Direnç fenotipine göre türlerin dağılımı
- Şekil 12. MLS<sub>B</sub> direnç fenotiplerine göre genotiplerin dağılımı

## RESİMLER DİZİNİ

- Resim 1. *S.aureus* ve KNS koloni morfolojileri
- Resim 2. Klinik örnek ve besiyerinden hazırlanan Gram boyama preparatı
- Resim 3. Mannitol tuz agar
- Resim 4. Katalaz ve koagulaz deneyleri
- Resim 5. Soldan sağa iMLS<sub>B</sub>, cMLS<sub>B</sub>, MS<sub>B</sub> fenotipleri
- Resim 6. İnokülatör ile plakların inokülasyonu
- Resim 7. Elektroforez jelinin hazırlanması ve elektroforez cihazı
- Resim 8. Sekans analizinin internet üzerinden yapılması
- Resim 9. *ermA*, *ermC* ve *msrA* PCR için bazı örnekler

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

- BOS: Beyin omurilik sıvısı  
CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute  
cMLS<sub>B</sub> : yapısal Makrolid- Linkozamid- Streptogramin B direnci  
DHPS: Dihidropteroat sentaz  
DNase: Deoksiribonükleaz  
GAS: Grup A beta hemolitik Streptokoklar  
GISA: Glikopeptid intermediate *Staphylococcus aureus*  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Hidrojen peroksit  
Ig: İmmunglobulin  
iMLS<sub>B</sub> : indüklenebilir Makrolid- Linkozamid- Streptogramin B direnci  
K/D: Kinopristin/ Dalfopristin  
KNS: Koagulaz negatif stafilokok  
MH: Mueller Hinton  
MLS: Makrolid- Linkozamid- Streptogramin  
MLS<sub>B</sub> : Makrolid- Linkozamid- Streptogramin B  
MRKNS: Metisiline dirençli Koagulaz negatif stafilokok  
MSKNS: Metisiline duyarlı Koagulaz negatif stafilokok  
MRS: Metisiline dirençli stafilokok  
MRSA: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*  
MSS: Metisiline duyarlı stafilokok  
MSSA: Metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus*  
NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards  
PBP: Penisilin bağlayan protein  
PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu  
Pmol: Pikomol  
PVL: Panton Valentine Lökosidin  
SCC: Staphylococcal cassette chromosome  
STSS: Stafilokoksik toksik şok sendromu  
TSA: Triptik Soy Agar  
TSST-1: Toksik şok sendrom toksin 1  
VRE: Vankomisine dirençli enterokok

## **EKLER DİZİNİ**

Ek 1: Tris- Borik asit- EDTA (TBE) tamponu 5X Hazırlanması

Ek 2: Loading Dye Hazırlanması

Ek 3: Marker hazırlanması

EK 4: Etidyum Bromür Stok



## 1.GİRİŞ VE AMAÇ

Stafilokoklar hastane ve toplum kaynaklı infeksiyonların en önemli etkenlerindedir. Normal flora üyesi olarak üst solunum yolu, gastrointestinal ve ürogenital sistem dışında nemli deri kıvrımlarında bulunurlar. Birçok vücut bölgesinde infeksiyona neden olabilirler. (1)

*Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) basit yüzeysel deri infeksiyonundan pnömoni, kan dolaşımı infeksiyonu, postoperatif yara infeksiyonu, sepsis, endokardit gibi ciddi infeksiyonlara kadar değişen çeşitli tablolara neden olabilir. İyi bilinen virülans faktörlerinin yanı sıra, yaygın kullanılan invaziv girişimler, infeksiyon kontrol önlemlerine yeterince uyulmaması, antibiyotiklere dirençli kökenlerin ortaya çıkması ve intravenöz ilaç bağımlılığı gibi nedenler bu bakteriye bağlı infeksiyonların artışında önemli rol oynamaktadır. (2)

Koagülaz negatif stafilokoklar (KNS) insan normal florasının önemli bir bölümünü oluşturmaktadır. Başta kateter infeksiyonları olmak üzere yapay kalp kapak endokarditleri, vasküler greft infeksiyonları, prostetik eklem infeksiyonları, periton diyaliz kateteri ile ilişkili peritonitler, serebrospinal şant infeksiyonları neden olabildikleri infeksiyonların başlıcalarıdır. (3)

Stafilokok infeksiyonlarında makrolid, linkozamid, streptogramin grubu antibiyotikler sıklıkla kullanılmaktadırlar. Bunlar kimyasal yapı olarak farklı antibiyotikler olmalarına rağmen bakteriyel protein sentezini inhibe ederek etkilerini benzer şekilde gösterirler. Makrolidler ve linkozamidler bakteriyel protein sentezini geri dönüşümlü olarak inhibe eden bakteriyostatik antibiyotiklerdir. 70S bakteriyel ribozomun 50S alt biriminde bir bölgeye bağlanırlar. Bu alan peptidil transferazın bağlandığı bölgeye yakın olup bu şekilde protein sentezini engelledikleri düşünülmektedir. Streptograminler protein sentez yolunda farklı aşamaları sinerjik olarak etkileyerek bakterisidal etki gösterirler. (4)

Stafilokoklarda bu antibiyotiklere karşı gelişen makrolid- linkozamid-streptogramin B (MLS<sub>B</sub>) direnci başlıca 3 mekanizma ile oluşmaktadır. (5-6) Ribozomal hedefin değişmesi en sık görülen direnç mekanizmasıdır. (7) *erm* genleri 23S rRNA'nın metilasyonuna neden olarak MLS<sub>B</sub> ajanların ribozoma bağlanmasını engellemektedir. Direnç yapısal (cMLS<sub>B</sub>) ya da indüklenebilir (iMLS<sub>B</sub>) karakterde

olabilmektedir. (8) Stafilokoklarda dirençten sıklıkla *ermA* ve *ermC* sorumludur. (9-12) Bir diğer direnç mekanizması olan aktif effluks mekanizması *msrA* *msrB*, *mefA* genleri tarafından kodlanır ve makrolid ve tip B streptogramin direncine neden olmaktadır. (13) Enzimatik inaktivasyon *ereA*, *ereB*, *mphC*, *linA* genlerinin kodladığı esteraz, fosfotransferaz, nükleotidil-transferazlar ile meydana gelir. (14-15)

İndüklenebilir  $MLS_B$  direnci standart duyarlılık test yöntemleri ile saptanamamaktadır. Direnç fenotipi eritromisin ve klindamisin çift disk testi (D test) ile araştırılmalıdır. (8,16) 15-20 mm ara ile yerleştirilen disklerde eritromisin dirençli iken klindamisinin eritromisine bakan yüzünde kesilme olması (D zonu) indüklenebilir tip  $MLS_B$  direncini göstermektedir. Hem eritromisin hem klindamisine direnç ise yapısal tip direnci göstermektedir. Eritromisin dirençli klindamisin duyarlı izolatlarda D şeklinin olmaması M veya  $MS_B$  efluks fenotipi olarak adlandırılır. Bu basit yöntem ile  $iMLS_B$  direnci erken saptanabilmekte ve böylelikle tedavi başarısızlıkları önlenmektedir. (9)

Son yıllarda giderek artan direnç oranları nedeni ile antibiyotiklerin doğru ve akılcı kullanımı esas olmuştur. Özellikle indüklenebilir tip  $MLS_B$  direnci çift disk testi uygulanmadığında gözden kaçabilmekte ve sonuç olarak zaman kaybı ve tedavi başarısızlıklarına yol açabilmektedir. Diğer yandan, tüm eritromisin dirençli stafilokokları klindamisine de dirençli olarak adlandırmak gerçekte klindamisin duyarlı olan stafilokok infeksiyonlarında klindamisin kullanımını önlemektedir. Bu çalışmada çeşitli klinik örneklerden izole edilen *S. aureus* ve KNS suşlarında  $MLS_B$  direnci ve sorumlu genler araştırılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

Gram-pozitif kok morfolojisindeki bakterilerin önemli bir bölümünü içinde bulunduran *Micrococcaceae* familyasında *Micrococcus*, *Planococcus*, *Staphylococcus* ve *Stomatococcus* cinsleri yer almaktadır. Bunlar arasında klinik önemi olan genus stafilokoklardır. *S.aureus*, stafilokoklar içinde en virulan türdür. KNS'lerden insanda en fazla infeksiyona neden olanlar *S.epidermidis*, *S.haemolyticus*, *S.saprophyticus* ve *S.lugdunensis*'dir. *Micrococcaceae* ailesinin diğer üyelerinin insanda hastalık oluşturması beklenmez veya özel hasta gruplarında nadiren infeksiyona neden olurlar. (17)

Stafilokokları ilk kez 1878'de Robert Koch tanımlamış ve 1880'de Pasteur sıvı besiyerinde üretmiştir. Ardından, 1884'te Rosenbach hasta örneklerinden bu mikroorganizmaları izole etmiş ve beyaz renkli kolonileri "*Staphylococcus albus*", sarı-portakal rengi kolonileri ise "*Staphylococcus aureus*" olarak isimlendirmiştir. (18-19)

Stafilokok ismi Yunanca'da bir salkım üzüm anlamına gelen *staphyle* (üzüm salkımı) ve *coccus* (tane) sözcüklerinden türetilmiştir. Bu yüzden *Staphylococcus*, bu Gram pozitif kokların üzüm tanelerinin kümelenmesine benzer şekildeki üremesini ifade etmek için kullanılmaktadır. Fakat klinik materyallerde bu mikroorganizma tek, çift veya kısa zincirler halinde de görülebilmektedir. (20)

Stafilokoklar başta burun mukozası, nazofarinks, deri ve daha az olmak üzere barsak ve diğer mukozalarda normal flora üyesi olarak bulunabilen bakterilerdir. Stafilokokların çeşitli türleri vücudun değişik yerlerine kolonize olma eğilimindedirler. *S.aureus* toplumun, hastanede yatan hastaların ve sağlık çalışanlarının %10-40'ının burun deliği mukozasında kolonizedir. *S.epidermidis* aksiler, inguinal, perineal bölgeler ve daha az olarak derinin diğer kısımlarında; *S.saprophyticus* ise ürogenital mukoza epiteline yapışma özelliği gösterdiği için daha çok bu bölgelerde kolonize olur. (21)

### 2.1. MORFOLOJİ VE İDENTİFİKASYON

Stafilokoklar; 0.5 – 1.5 µm çapında, hareketsiz, spor oluşturmayan, katalaz üreten Gram pozitif boyanan koklardır. *S.aureus subsp. anaerobius* ve *S. saccharolyticus* dışında fakültatif anaeropturlar. (20)

Stafilokokların üreme ısı aralığı oldukça geniştir (6.5°C-45°C). Optimal üreme ısıları 30°C–37°C olup 7-7.5 pH değerleri arasında iyi ürerler. (19) Dış çevre şartlarına, kuruluğa, yüksek tuz konsantrasyonuna dayanıklıdırlar. Çoğunluğu %10 NaCl'li ortamda üreyebilir. (19,22)

Kanlı agarda, genellikle 24 saatlik inkübasyonun ardından 1 – 2 mm çaplı düz, hafif konveks koloniler oluştururlar. Karotenoit pigmente bağlı sarı/sarı- turuncu pigmentli *S.aureus* kolonilerinin aksine, KNS türleri beyaz – gri renkte koloniler oluştururlar. (Resim 1) KNS kolonilerinin incelenmesinde en iyi yöntem ekim yapılan plakların 35–37°C'de 48–72 saat tutulduktan sonra inkübasyona iki gün daha oda ısısında devam edilmesi şeklindedir. (20)

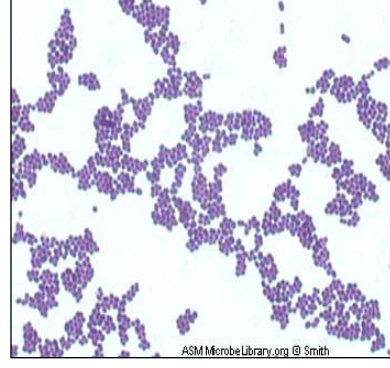
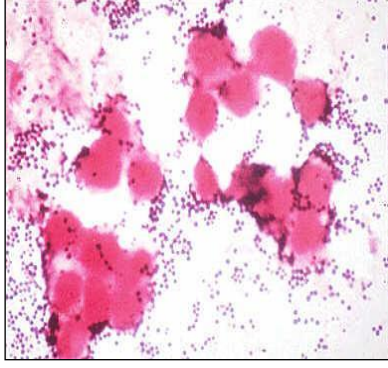
Bazı *S.aureus* ve KNS suşları toksinleri aracılığı ile hemoliz yapabilmektedir. İnkübasyon süresi uzatılırsa beta-hemoliz belirginleşir.



Resim 1. *S. aureus* (sol) ve KNS (sağ) koloni morfolojileri.

### 2.1.1 Gram Boyama

Klinik örneklerden yapılan direkt Gram boyamada 0.5- 1.5 µm çaplı, Gram pozitif kok olarak görünürler. Tek tek, çiftler, kısa zincir veya kümeler halinde PMNL'lerin içinde veya dışında bulunabilirler. Besiyerinden hazırlanan preparatlarda ise genellikle küme, üzüm salkımı yapmış koklar şeklinde görünürler. (17) (Resim2) Ancak eskimiş kültürden yapılan boyamada Gram negatif görünebilirler. Bu nedenle boyamanın taze kültürlerden yapılması önerilir. Gram boyama ile diğer pozitif boyanan koklardan ayrımı yapılamamaktadır. (21)



Resim 2. Klinik örnek ve besiyerinden hazırlanan Gram boyama preparatı.

## 2.1.2 Kullanılan Besiyerleri

### 2.1.2.a Seçici Olmayan Besiyerleri

En çok tercih edilen kanlı agar, seçici olmayan, genel amaçlı bir besiyeridir. Zengin besin içeriği pek çok mikroorganizmanın gelişimine uygundur. pH'nın 6.8 olması hemoliz reaksiyonunun belirgin olmasını sağlar. Taze defibrine koyun kanı hemoliz için en uygun olan kandır. Koyun kanlı agarda mikrokok ve stafilokok türleri farklı koloniler oluştururlar. Stafilokokların çoğu mikrokoklardan daha hızlı ürer ve 24 saat içinde 1-3 mm çapa ulaşırlar. Aynı plak içinde bazı stafilokok suşlarının koloni boyutları birbirinden farklı olabilmektedir. Bu nedenle karışık kültür görünümünü ortaya çıkabilmektedir. (17,19)

Triptik soy agar (TSA), içerdiği aminoasit ve azotlu maddeler ile çeşitli mikroorganizmaların gelişmesini sağlayan seçici olmayan katı bir besiyeridir. İçeriğine kan ilavesi ile müşkülpesent mikroorganizmaların üremesi kolaylaşmaktadır. (23)



Resim 3. Mannitol tuz agar. Solda *S. epidermidis*, sağda *S. aureus*.

### 2.1.2.b Seçici Besiyerleri

Mannitol Tuz Agar: Seçici ayırt edici besiyeridir. Yüksek tuz konsantrasyonu (%7.5) çoğu bakterinin üremesini inhibe eder. Stafilokoklar bu yüksek tuz oranını tolere edebilirler. İçeriğinde bir şeker olan mannitol ve pH indikatörü olarak fenol kırmızısı bulunmaktadır. Mannitol fermente edildiğinde ortaya çıkan asit ürünler pH'ı düşürür. Fenol kırmızısı, pH 6.8'in altında sarı renk alır. Bu nedenle *S. aureus* gibi mannitolü fermente eden kolonilerin etrafında sarı halo oluşur. *S. epidermidis* gibi mannitolü fermente etmeyenlerde agar pembe- kırmızı renkte kalır. (Resim3) MRSA'nın (Metisiline dirençli *S. aureus*) selektif izolasyonu için besiyerine beta laktam antibiyotik eklenebilir. (24)

Kromojenik agarlar: CHROMagar ve IDagar *S. aureus*'ün identifikasyonu için kullanılan ve kromojenik substrat içeren besiyerleridir. Bu besiyerlerinde kolonilerin renklenmesinin nedeni organizmanın ürettiği alfa-glukozidaz enziminin bir sonucudur. (25-26) *S.aureus* kolonileri CHROMagar'da leylak renginde, IDagar'da ise yeşil renkte görülürler. KNS'ler ise bu besiyerlerinde mavi, beyaz veya bej renginde koloniler oluştururlar. (26)

### 2.1.3 Katalaz Testi

Tüm *Micrococcaceae* ailesi üyelerinde sitokrom oksidaz enzimi bulunur. Bu enzim hidrojen peroksiti ( $H_2O_2$ ) su ve oksijene ayrıştırır. Stafilokok kolonilerinin lam üzerinde % 3'lük  $H_2O_2$  ile süspanse edilmesi durumunda oluşan hava kabarcıkları,  $H_2O_2$ 'in su ve oksijene ayrıştığının göstergesidir.

katalaz



Kan içermeyen besiyerinden alınan koloniler ile testin yapılması uygundur. Çünkü eritrositler içinde bulunan enzimler zayıf pozitif katalaz reaksiyonuna neden olabilir. Stafilokokların nadir suşları katalaz negatif olabilir ve bazı enterokoklar pseudokatalaz üreterek  $H_2O_2$  ile zayıf pozitiflik gösterebilirler.

Bu test mikrokok ve stafilokokların; katalaz testi negatif olan diğer Gram pozitif koklardan, özellikle streptokok ve enterokoklardan ayırt edilmesini sağlar. (17,27)

#### **2.1.4 Koagülaz Testi**

*S. aureus*'un diğer stafilokoklardan ayırt edilmesinde en çok önem taşıyan deneydir. Stafilokok kolonisi görüntüsü veren, Gram boyasında Gram pozitif kok saptanan tüm izolatlarda yapılmalıdır. Lamda ve tüpte koagülaz testi olmak üzere iki temel yöntem ile yapılır. (21)

*Lamda Koagülaz Testi:* *S.aureus*'un birçok suşunun hücre duvarı yüzeyinde, bağlı koagülaz veya "clumping faktör" bulunur. Bu faktör plazmada direkt fibrinojen ile reaksiyona girerek hızla hücre aglutinasyonuna neden olur. Yüksek tuz içeriği *S.aureus*'un bazı suşlarında oto-aglutinasyona neden olacağından dolayı bu test "Mannitol tuz agar" gibi yüksek tuz içeriği olan besiyerlerinde üreyen suşlara uygulanmamalıdır. Clumping faktör eksik olan suşlar genellikle serbest koagülaz ürettiklerinden dolayı lam koagülaz testi negatif olan stafilokoklar için mutlaka tüp koagülaz testi de uygulanmalıdır. (17)

*Tüpte Koagülaz Testi:* Bu yöntem ile besiyerinde üreyen stafilokokların oluşturdukları ve besiyerine saldıkları bağımsız koagülaz araştırılır. Bu enzim niteliğindeki madde plazmada 'coagulase reacting faktör' olarak isimlendirilen bir madde ile kompleks yapar ve fibrinojen ile reaksiyona girerek fibrin oluşturur. 35°C'de dört saat inkübasyondan sonra test negatif ise, oda ısısında tutularak 18-24 saat sonra tekrar okunmalıdır. (17)

Hem lam hem de tüp koagülaz yönteminde plazmanın pıhtılaşmasını önleyici olarak sitrat yerine EDTA'lı tavşan plazmasının kullanımı önerilmektedir. İnsan plazması antistafilokokal antikorlar içerebileceğinden koagülaz testi için kullanılmamalıdır. (21,27)

#### **2.1.5 Diğer Testler**

Bugün *S.aureus* identifikasyonu için koagülaz testi dışında özgüllüğü ve duyarlılığı %90'ın üzerinde olan lateks aglutinasyon, pasif hemaglutinasyon, deoksiribonükleaz ve termostabil endonükleaz gibi testler de geliştirilmiştir. (28-29)

##### **2.1.5.a Lateks Deneyleri**

Lateks yöntemlerinin birincisinde fibrinojen kaplı lateks boncukları kullanılır. Fibrinojen latekse bağlanarak clumping faktörü tespit eder.

Diğer yöntemde ise immunglobulin (Ig) kaplı lateks boncukları kullanılır. Stafilokok hücre duvarı proteini olup IgG moleküllerinin Fc bölgelerine bağlanabilen Protein A boncukta bulunan immünoglobulin molekülleri ile tespit edilmektedir. Ağardan alınan koloni ile test süspansiyonları lam üzerinde karıştırılır ve sonuç olarak lateks-organizma süspansiyonunun hızla kümelendiği görülür. (17,21)

#### **2.1.5.b Pasif Hemagglütinasyon**

Bu yöntemde fibrinojenle duyarlılaştırılmış koyun eritrositleri kullanılarak, *S.aureus* hücrelerinin yüzeyindeki clumping faktör tespit edilir. (17)

#### **2.1.5.c Deoksiribonükleaz (DNase) ve Termostabil Endonükleaz Testi**

*S.aureus*'un *nuc* geninin ürünü olan DNase ve termostabil endonükleaz, endonükleolitik ve egzonükleolitik aktivite ile nükleik asiti hidrolize eder. (30)

DNase testi için, mavi renkli metakromatik toluidin blue-O boyası içeren DNase test besiyerine (Toluidin blue- Deoxyribonükleik asit agar = TDA) mikroorganizmanın inokülasyonu yapılır. 35°C'de 24 saat inkübasyondan sonra besiyerinin altında ve inokulum etrafında gök mavisinden pembe- kırmızı veya mor renge dönüşüm DNA'nın hidrolize olduğunu gösterir. Bu test *S.aureus*'un identifikasyonuna yardımcı olmakla birlikte diğer bazı koagülaz negatif stafilokoklar da pozitif DNase reaksiyonu verebilirler. (21,28-29)

#### **2.1.6 Micrococcus Türlerinin Staphylococcus Türlerinden Ayrılması**

*Staphylococcus* ve *Micrococcus* türleri birbirlerinden başlıca dört özellikleriyle ayrılırlar:

- 1) *S.lentus*, *S.sciuri* ve *S.vitulinus* dışındaki *Staphylococcus* türleri oksidaz negatif, *Micrococcus* türleri oksidaz pozitifdir
- 2) *Staphylococcus* türleri basitrasine dirençli, *Micrococcus* türleri duyarlıdır
- 3) 100 µg Furazolidon ile yapılan disk difüzyon testinde *Staphylococcus* türleri furazolidon'a duyarlı, *Micrococcus* türleri dirençlidir
- 4) *Staphylococcus* türleri lizostafin'e duyarlı, *Micrococcus* türleri ise dirençlidir



Tablo I. Stafilokoklar ile mikrokok ve makrokok ayrımı için fenotipik özellikler.

Özellikler	Stafilokok	Mikrokok	Makrokok
Koloni büyüklüğü	0.6-1,5 µm	1-1,8 µm	1.3-2,5 µm
Koloni profili	Kabarık,hafif konveks	Konveks	Hafif konveks,kubbemsi
Büyüme hızı	Yavaş- hızlı	Çok yavaş	Yavaş
Anaerob ortamda glukozdan asit oluşturma	+	-	-
Lizostafin	Duyarlı	Dirençli	Duyarlı
100 µg furazolidon	Duyarlı	Dirençli	Duyarlı
0.04 ünite basitrasin	Dirençli	Duyarlı	Dirençli
Modifiye oksidaz	- #	+	+

\**Micrococcus*, *Kytococcus*, *Dermacoccus*, *Nesterenkonia* ve *Kocuria*' yı içerir.

#*S.sciuri*, *S.lentus* ve *S.vitulinus* haricinde tüm stafilokok türlerinde modifiye oksidaz testi negatiftir.

### 2.1.7 Koagulaz Negatif Stafilokokların Kendi Aralarında Ayrımı

KNS'ler öncelikle novobiosine duyarlılıklarına göre ikiye ayrılırlar. Novobiosine duyarlı olan *S.epidermidis* grubu, dirençli olan ise *S.saprophyticus* grubu olarak adlandırılır. Rutin laboratuvarlarda Novobiosin duyarlılığı dışında KNS'lerde tür tanımlaması, zaman alıcı ve maliyet-etkin olmayan bir yöntemdir. Bu nedenle ancak tedavi başarısızlığı veya bir salgın söz konusu olduğunda tür tanımlaması yapılmaktadır.

*S.epidermidis* kolonileri 2.5–6 mm çapında olup genelde pigmentsizdir. *S.haemolyticus* ve *S.hominis* kolonileri ise daha büyük olup 5–9 mm çapında, düzgün kenarlı, opak, pigmentsiz veya sarı renkte koloniler oluştururlar. *S.lugdunensis* 4–7 mm çapında parlak, beyaz, krem ya da sarı renkli, düzgün, ortası konveks koloniler yaparlar. *S.saprophyticus* ise 5–8 mm çapında, bazen opak olarak gözlenen düzgün parlak konveks koloniler oluşturur.

Bundan sonraki işlem termonükleaz, fosfataz, pirolidonil arilamidaz, ornitin dekarboksilaz, üreaz, β galaktozidaz aktiviteleri, polimiksin direnci, asetoin oluşumu ve karbonhidratlardan asit oluşumu gibi ileri biyokimyasal testler ile tür belirlenmesi yapılmasıdır. Günümüzde tür tanımlamak için geliştirilmiş hızlı ticari yöntemler mevcuttur. (17,20)

## **2.2. STAFİLOKOKLARIN YAPISI**

### **2.2.1 Hücre Duvarı - Peptidoglikan**

Hücre duvarı mikroorganizmaların ozmotik stabilitesini sağlar ve bakteriye şeklini verir. Gram pozitif bakterilerin hücre duvarı ağırlığının yarısını peptidoglikan tabakası oluşturmaktadır. N-asetil muramik aside bağlı pentapeptidler birbirlerine glisin bağıyla bağlanarak peptidoglikanın yapısını oluştururlar. Peptidoglikan endotoksin benzeri aktiviteye sahiptir. Endojen pirojenlerin üretimini, kompleman sistemini, monositlerden interlökin-1 üretimini ve lökositlerin kemotaksisini aktive eder. Vücudun önemli savunma sistemlerinden lizozim enziminin hedefi peptidoglikan tabakadır. (17,20)

### **2.2.2 Hücre duvarı – Teikoik asit**

Sadece Gram pozitif bakteri duvarında bulunan teikoik asit kovalent olarak peptidoglikan tabakaya bağlıdır. Mukozalarda bulunan fibronektin, fibrinojen, laminin, trombospondin, vitronektin, elastin, sialoprotein, kollajen gibi özgül reseptörleri ile birleşerek stafilokokların konağa bağlanmasını sağlar. Teikoik asit zayıf immünojen olmakla birlikte, peptidoglikana bağlandığında özgül antikor cevabını uyarır. Bu antikor cevabının izlenmesi, sistemik stafilokok infeksiyonlarında tanısal olarak kullanılsa da diğer tanısal testlerden daha az duyarlıdır (17,20)

### **2.2.3 Penisilin bağlayan protein (PBP)**

Hücre duvarında bulunan transpeptidaz, karboksipeptidaz ve endopeptidaz gibi enzimler transpeptidasyon reaksiyonu ile peptidoglikan tabakayı oluştururlar. (19) Bu enzimler ayrıca beta-laktam antibiyotiklere kovalent olarak bağlandığı ve yine bu antibiyotikler tarafından inaktive edildikleri için penisilin bağlayan proteinler olarak da isimlendirilirler. (31-32) PBP'lerin inaktivasyonu bakterinin ölümüne yol açarken PBP'nin beta-laktam antibiyotiklere olan affinitesindeki azalma ise direnç neden olur. (33)

### **2.2.4 Kapsüler Polisakkaridler ve Slime Tabakası**

Stafilokokların hücre duvarının en dış tabakası polisakkarit tabakadan oluşmuş bir kapsül ile çevrilidir. Kapsül, fagositozu inhibe ederek bakteriyi korur.

(17,20) Ayrıca genetik faktörler, ortam pH'ı, O<sub>2</sub> perfüzyonu, karbon kaynağı ve ozmolarite gibi değişkenlere bağlı olarak çoğu stafilokoklar tarafından polisakkarit, protein, DNA ve sudan oluşan bir tabaka (slime tabakası= biyofilm) üretilir. Bu ekstrasellüler yapı bakteriyi konak savunmasından ve antibiyotiklerden korur. Dokulara ve kateter, greft, protez kapak, protez eklem ve şant gibi yabancı cisimlere bağlanmasını sağlar. Bu özellik kısmen avirulan olan koagülaz negatif stafilokokların patojenitesinde önemlidir. (34)

### **2.2.5 Protein-A**

Peptidoglikan tabaka ya da sitoplazmik membrana kovalent olarak bağlanan protein-A antifagositik, kemotaktik, mitojenik etkiler gösterir. IgG1, IgG2 ve IgG4'ün Fc reseptörlerine bağlanır. Bu da organizmayı antikor aracılı immun temizlenmeden korur. Başka antijenlere karşı oluşan antikorların nonspesifik bir taşıyıcısı olarak Protein-A'nın kullanımı koaglutinasyon testlerinin temelini oluşturur. *S.aureus* infeksiyonlarında Protein-A'nın saptanması, *S. aureus* için spesifik bir tanı testi olarak kullanılabilir. (20)

### **2.2.6 Koagülaz ve Diğer Yüzey Proteinleri**

Stafilokoklar, çeşitli konak proteinlerine yapışmayı sağlayan birçok yüzey proteini taşırlar. Protein A, clumping faktör A ve B, kollajen bağlayan protein, fibronektin bağlayıcı protein A ve B, plazmin sensitif protein, serin-aspartat tekrarlayıcı protein, *S. aureus* yüzey protein A-K yapışmada rol oynayan yüzey proteinlerinden bazılarıdır. Hepsi "microbial surface component reacting with adherence matrix molecules" olarak adlandırılır. Bu proteinler stafilokokların konak dokusuna kolonize olmasında en önemli faktörlerdir. (17,29,35)

### **2.2.7 Sitoplazma membranı**

Sitoplazmik membran protein, lipid ve az miktarda karbonhidrat bileşiminden oluşmaktadır. Hücrede osmotik bariyer olarak görev yapar. Hücresel biyosentez ve solunum enzimlerinin sentezlenmesinden sorumludur. (20)

## 2.3. PATOGENEZ VE İMMÜNİTE

Stafilokokal infeksiyonların meydana gelmesinde konak dokularına tutunmayı sağlayan yüzey proteinlerinin yanı sıra çeşitli toksin ve hidrolitik enzimlerin rolü vardır.

Tablo II. Stafilokokların virülans faktörleri.

TOKSİNLER	
Sitolitik toksin - membran hasarı	Alfa, Beta, Delta, Gama ve Panton-Valentin Lökosidin (PVL)
Eksfoliyatif toksin	ETA, ETB
Enterotoksin	A, B, C1, C2, C3, D, E ve F
TSST-1	
ENZİMLER	
	Koagulaz, katalaz, hyaluronidaz, lipaz, fibrinolizin, nükleaz, penisilinaz
YAPISAL BİLEŞENLER	
	Kapsül, Peptidoglikan, Teikoik asit, Protein A, Sitoplazmik membran

### 2.3.1 Toksinler

Stafilokoklar etki mekanizmalarına göre gruplara ayrılabilen çeşitli toksinler üretirler. Eksfoliyatif toksin, enterotoksin, toksik şok sendrom toksin-1 (TSST-1) gibi pirojenik toksinler süperantijen yapısındadır. (36)

#### 2.3.1.a Alfa toksin (Alfa hemolizin)

*S.aureus*'un birçok suşu tarafından üretilen en güçlü membran hasarlayıcı protein olup eritrosit, lökosit, hepatosit, trombosit ve damar düz kas hücrelerini içeren birçok hücreye toksik etki gösterir. Konak hücre membranının hidrofobik bölgelerine bağlanarak 1-2 nm'lik porlar oluşturması sonucu osmotik lizis meydana gelir. Havyan modeli deneylerinde miyelin kılıflarında demiyelinizasyon oluşturması sonucunda nörotoksik etkisi gösterilmiştir. Bu toksin koyun kanlı agarda üreyen bazı *S.aureus* kolonilerinin etrafında gözlenen kırmızı kan hücrelerinin hemoliz zonundan sorumludur. (17,20,35)

#### 2.3.1.b Beta toksin (Beta hemolizin)

Stafilokokal sfingomyelinaz C olarak da isimlendirilen, sfingomyelin ve lizofosfatidilkolin için spesifiteye sahip ısıya duyarlı bir proteindir. Duyarlı hücrelerde membran fosfolipitlerinin hidrolizini katalize eder. Fibroblast ve lökositlere de toksik

etki gösterir. Stafilokokal infeksiyonlarda abse oluşumu ve doku zedelenmesinde alfa toksin ile birlikte rol oynadığı düşünülmektedir.

B grubu streptokokların tanısında kullanılan CAMP testinde gözlenen sinerjistik hemolizden, grup B streptokoklarca üretilen CAMP faktör ile birlikte Beta toksin sorumludur. (18,21,34)

### **2.3.1.c Delta toksin (Delta Hemolizin)**

KNS'lerin %50-70'i ve *S.aureus* suşlarının %97'si tarafından üretilen, eritrosit, lökosit, makrofaj, lenfosit ve trombositler üzerine etkili bir polipeptittir. Hücre membranlarında surfaktanı parçalayarak kalıcı membran hasarı yapar. Adenilat siklazı aktivasyonu ve cAMP salınımı ile Stafilokoksik Toksik Şok Sendromu (STSS) ve stafilokokal besin zehirlenmesinde rol oynar. Antijenik değildir. (18,21,34)

### **2.3.1.d Gamma toksin (Gamma hemolizin) ve Panton-Valentin Lökositidin**

Gamma toksin *S. aureus* suşlarının hemen tümü tarafından üretilirken, deri infeksiyonları ile ilişkili ve iki komponentli lökositik toksini olan PVL *S. aureus* suşlarının %5'inden azı tarafından üretilir. PVL bir ekzotoksindir. S (slow eluting proteins) ve F (fast eluting proteins) adında iki polipeptid zincirinden oluşur. Toksin aktivitesi için bu alt birimlerin her ikisi de gereklidir. Sitolitik etki membranlarda por oluşumunu takiben katyon gradyentindeki değişikliklere bağlı gelişen osmotik değişikliklerden kaynaklanır. Nötrofil ve makrofajlar üzerine litik etkisi vardır. PVL üreten stafilokoklar lökositler tarafından fagosite edilseler dahi hücre içerisinde üremeye devam ederler. Gamma toksin insan eritrositleri üzerine orta derecede etkilidir ancak PVL toksininin hemolitik aktivitesi yoktur. Bu toksini bulunduran türlerin infeksiyonlarında hızlı ilerleme, kanama ve nekroz tablosu görülmektedir. (37-38)

### **2.3.1.e Eksfoliyatif Toksin**

Stafilokokkal haşlanmış deri sendromuna neden olurlar. ETA ve ETB olmak üzere, her ikisi de hastalık oluşturabilen biyokimyasal ve immünolojik olarak farklı iki protein tanımlanmıştır. Bu toksinlere maruz kalan epiderminin stratum granulosum tabakasındaki intraselüler köprülerde (desmozom) ayrılma olduğu

gösterilmiştir. Bu toksinler hücre yıkımı veya inflamasyonla ilişkili olmadığından, epidermisin etkilenen tabakasında tipik olarak ne stafilokok ne de lökosit bulunmaz. Bunlara karşı gelişen koruyucu nötralizan antikolar rezolüsyonda etkilidir. Stafilokokal haşlanmış deri sendromu, en fazla küçük çocuklarda görülür. Bunun sebebi ETA ve ETB'nin, duyarlı yenidoğanların epidermisinde bulunup büyük çocuk ve erişkin epidermisinde bulunmayan GM4 benzeri glikopeptitlere bağlanmalarıdır. (17-18,20)

### **2.3.1.f Enterotoksin**

Serolojik olarak 8 farklı stafilokok enterotoksini (A-E, G-I) tanımlanmıştır. Bu toksinler tüm *S.aureus* suşlarının %30-50'si tarafından üretilmektedir. Enterotoksin A hastalıkla ilişkili en yaygın toksindir. Enterotoksinler 100°C'de 30 dakika ısıtmaya, mide ve jejunum enzimlerine karşı dirençlidir. Besin maddesi stafilokoklar ile kontamine olup toksin üretimi gerçekleştikten sonra, gıdanın yeniden ısıtılması ve gastrik asite maruz kalması koruyucu olmamaktadır. Toksin aktivitesinin tam mekanizması bilinmemektedir. Bu toksinler süperantijen olup, sitokin salınımı ve T hücrelerinin nonspesifik aktivasyonunu sağlayabilirler.(17-18,20,39)

### **2.3.1.g Toksik şok sendrom toksin-1 (TSST-1)**

Önceden pirojenik ekzotoksin C ve enterotoksin F olarak isimlendirilen TSST-1, ısı ve proteolize dirençli, süperantijen yapısında, kromozomal kaynaklı bir ekzotoksindir. TSST-1 düşük konsantrasyonlarda endotelial hücrelerden sızıntıya neden olurken, yüksek konsantrasyonlarda hücrelere sitotoksik etki gösterir. TSST-1'in mukozal bariyerlerden penetre olma kabiliyeti TSS'nin sistemik etkisinden sorumludur. TSS'li hastalarda ölüm, hipovolemik şok sonucu gelişen multiorgan yetmezliği nedeniyledir. (40)

### **2.3.2 Enzimler**

Stafilokoklar koagülaz, katalaz, penisilinaz enzimlerinin yanı sıra patogeneizde rolü olan diğer enzimlere de sahiptir.

Hyaluronidaz; bağ dokusunun asellüler matriksinde bulunan hyaluronik asiti hidrolize eder. *S. aureus*'ların % 90'dan fazlası tarafından üretilen bu enzim, *S.aureus*'un dokulara yayılımını kolaylaştırır. (20)

Fibrinolizin; stafilokinaz olarak da isimlendirilir. Hemen tüm *S.aureus* türlerince üretilen fibrinolizin, fibrin pıhtısını eriterek infeksiyonun yayılımını kolaylaştırır. (17,20)

Lipaz; *S.aureus*'un tüm suşları ve KNS'lerin %30'undan fazlası tarafından birkaç farklı yapıda üretilirler. Lipitleri hidrolize eden bu enzim vücudun sebace bölgelerinde, stafilokokların canlılığını devam ettirmesini sağlayan bir fonksiyona sahiptir. Ayrıca kutanöz ve subkutanöz dokularda yüzeysel cilt infeksiyonlarının gelişiminde rol oynar. (19-20)

## **2.4. STAFİLOKOKLARIN ETKEN OLDUĞU İNFEKSİYONLAR**

### **2.4.1 Deri ve Yumuşak Doku İnfeksiyonları**

Folikülit; kıl folikülleri ve çevresinde sınırlı küçük, kırmızı ve ağrılı lezyonlardır. (22,35)

Furonkül; kıl folikülünün sınırlarını aşan, özellikle yüz, boyun, aksilla ve kalçalarda ağrılı, kırmızı, çevresi endürasyonlu, 1-2 cm çapında, nodüler yapılarıdır. (22,35)

Karbonkül; komşu follikülleri etkileyen, inflamatuvar bir kitle oluşturan ve birçok kıl kökünden püy çıkışı ile karakterize bir lezyondur. Genellikle diyabetik hastalarda görülen karbonkül çoğunlukla ensede lokalize olur. Burun ya da nadiren perinede *S. aureus* taşıyıcısı olan kimselerde tekrarlayan ataklar olabilir. Tekrarları önlemede taşıyıcılığın eradike edilmesi önemlidir. (41)

İmpetigo; özellikle çocuklarda görülen yüzeysel bir deri infeksiyonudur. Lezyon iyi sınırlı, çok sayıda, büllöz veya nonbüllöz olabilir. Büllöz impetigo deride soyulmaya yol açan *S.aureus* suşları tarafından oluşturulur. Geçmişte nonbüllöz lezyonlar genellikle streptokoklar tarafından oluşturulurken şu anda tek başına veya kombine halde stafilokoklar sorumlu tutulmaktadır. Kırmızı bir makül şeklinde başlayan lezyon üzerinde ortaya çıkan veziküller hızla rüptüre olur ve ardından sarımsı bir krut tabakasıyla kaplanır. Skar bırakmadan iyileşir. (22,35,41)

Hidradenitis suppurativa; aksiler, perineal, genital bölgelerde bulunan apokrin ter bezlerinin piyojenik infeksiyonudur. Çok sayıda sinus ağzı vardır. Spontan drenajı takiben hipertrofik skar oluşur. (35)

Erizipel; Genelde etken *Streptococcus pyogenes* olmakla birlikte *S.aureus* ya da mikst etkenli olabilir. Erizipelde ciltte sınırları belirgin eritemli alan mevcuttur. Yüksek ateşle birlikte sepsis bulguları bulunabilir. Diabetes mellitus gibi altta yatan hastalığı olanlarda, mikst erizipel ve sellülit görünümü olabilir. (41)

Sellülit; Cilt ve cilt altını tutan bu infeksiyonda lezyon sınırları belirsizdir. Ağrı ve ateş daha belirgindir. (35)

Nekrotizan fasiit; Cilt, cilt altı ve fasyayı etkileyen, hızlı ilerleyen sistemik bir tablodur. Ağrı çok fazladır. Hastalar dezoryante ve letarjiktir. Monomikrobiyal veya (*S.pyogenes*, *S.aureus*) polimikrobiyal (aerob ve anaerob) olabilmektedir. Fasiit acil cerrahi debridman ve drenaj gerektiren ciddi bir tablodur. (41)

#### **2.4.2 Cerrahi Yara İnfeksiyonları**

Stafilokoklar derinin normal flora elemanı olduğundan cerrahi alan infeksiyonlarının major etkenlerindedir. (42) Cerrahi sonrası ikinci ya da daha sonraki günlerde yara etrafında ödem, eritem ve ağrı gelişir. Yaranın dikkatli inspeksiyonu esastır. Protez gibi yabancı cisim olması veya derin dokuların (kemik gibi) tutulması halinde 4-6 hafta gibi uzamış antibiyotik tedavisine ek olarak yabancı cismin çıkarılması gerekebilir. Yara infeksiyonlarında iyileşme hastanın eşlik eden hastalıklarına bağlıdır. (35)

#### **2.4.3 Mastit**

Emziren annelerde genelde doğumdan sonra ikinci, üçüncü haftada %1-3 oranında stafilokokal meme infeksiyonları gelişir. Ağrılı, eritemli nodülden kanaliküler abseye kadar değişen bulgular, yüksek ateş ve sistemik semptomlar olabilir. (35)

#### **2.4.4 Bakteriyemi, Kateter İnfeksiyonu**

Altta yatan bir hastalığı olmayanlarda gelişen bakteriyemi deri ve yumuşak doku infeksiyonu, osteomyelit, artrit, endokardit gibi hemen daima saptanabilir bir infeksiyon odağı ile ilişkilidir. Tedavi primer odağın özelliğine bağlıdır. (22,35)



Toplum kökenli bakteriyemi genellikle sellülit, osteomyelit ve pnömoni gibi bir odaktan kaynaklanırken; hastane kökenli stafilokok bakteriyemileri daha çok intravenöz kateterlerden kaynaklanmaktadır. (43)

KNS'ler nozokomiyal kan akımı infeksiyonlarının en sık nedenidir. Bu infeksiyonların çoğunun nedeni de kateter infeksiyonudur. (44)

#### **2.4.5 Endokardit ve Perikardit**

Geçen iki dekatta protez kalp kapağı, greft, hemodiyaliz kateteri, pacemaker gibi implante cihazı olan ve *S.aureus* bakteriyemisi ve endokarditi açısından yüksek riskli olan hasta sayısı artmıştır. (45)

*S. aureus*, doğal kapak endokarditlerinin %30'unda, damar içi madde kullanıcılarında gelişen endokarditlerin %69'unda, protez kapak endokarditlerinin %20'sinde etkindir. (35) Başlangıç akut ve hızlı ilerler. En çok mitral kapağı tutar, ancak aort kapağı tutulumunda prognoz daha kötüdür. (22) Tanıda Duke kriterleri kullanılır. (46) Kan kültürleri alınır alınmaz empirik antimikrobiyal tedavinin başlanması sadece lokal infeksiyonu kontrol etmekle kalmaz, septik emboli gibi komplikasyon riskini de azaltır. (47-48) Protez kapak endokarditi daha nadir görülmesine karşın sıklıkla KNS'ler tarafından oluşturulur. (44)

Perikardit; genellikle travma veya göğüs cerrahisi sonrası veya hematojen yayılımla meydana gelir. Stafilokokal infeksiyon sırasında ani göğüs ağrısı, kardiyak yetmezlik veya kardiyojenik sok geliştiğinde perikarditten şüphelenilmelidir. (22)

#### **2.4.6 Vasküler Greft İnfeksiyonları**

Greft bölgesine bağlı olarak insidansı %1-6 arasında değişir. En fazla kasık bölgesindeki greftler infekte olur ve bu infeksiyonların en sık nedeni KNS'lerdir. Tanı fizik muayene ve radyolojik görüntüleme ile konur. (44)

#### **2.4.7 Menenjit**

*S. aureus* ve KNS türleri erişkin bakteriyel menenjitinde sık görülen etkenlerden değildir. Erişkin stafilokok menenjiti daha çok bakteriyemi ya da parameningeal infeksiyonu olan veya nöroşirurjik operasyon geçirenlerde görülür. Nöroşirurjik işlemler arasında intrakranyal yabancı cisim yerleştirilmesi stafilokokal

menenjit gelişiminde önemli bir risk faktörüdür. (49) KNS menenjitlerinde çoğunlukla santral sinir sisteminin bütünlüğünü bozan altta yatan bir durum vardır. (35,50)

#### **2.4.8 Pnömoni ve Ampiyem**

*S.aureus* toplumdaki edinilmiş pnömonide sık görülen bir etken olmamasına karşın sağlık hizmeti ile ilişkili pnömonilerde öne çıkmaya başlamıştır. Bakım evinde yaşamak, dekübit ülseri, intravasküler kateter ve intratrakeal entübasyon predispozan faktörlerin bazılarıdır. Toplum kökenli infeksiyon ileri yaş (>75 yaş), diyabetes mellitus, alkolizm gibi predispozan faktörleri olanlarda ve tipik olarak influenza epidemileri sonrasında ortaya çıkar. (51)

Hastane kökenli *S.aureus* pnömonileri genellikle entübasyon sonrası veya aspirasyona bağlı gelişir. Yoğun bakım ünitelerinde en sık görülen infeksiyon ventilatörle ilişkili pnömoni olup bu hastalarda en sık izole edilen bakterilerden biri *S.aureus*'tur. (52) Tipik olarak hızlı seyirli, doku yıkımı ve kavitasyona ilerleyen nekrotizan bir infeksiyon oluşturur. (53)

Ampiyemin en sık etkenlerinden biri *S. aureus*'tur. Genellikle pnömoni alanından direkt yayılım ile oluşur. Ayrıca sıklıkla torasik cerrahinin bir komplikasyonu olarak görülür. (35)

#### **2.4.9 Osteomyelit**

En sık karşılaşılan etkenler *S. aureus* ve *S. epidermidis*'tir. Hematojen osteomyelit en sık puberte öncesi çocuklarda ve yaşlılarda görülür. Genellikle çocuklarda ve adölesanlarda uzun kemiklerin metafizi, yaşlılarda vertebra korpusu tutulur.

Eklem ve yumuşak doku gibi komşu yapılardaki infeksiyonlara sekonder olarak veya travma, kemik cerrahisi sonrası direkt bakteri inokülasyonu ile de osteomyelit gelişebilir. Her yaşta ve en sık uzun kemikler olmak üzere tüm kemiklerde görülebilir. Diyabet ve vasküler hastalıkla ilişkili osteomyelit esasen ayağı etkiler.

Klinik olarak akut ve kronik formda görülebilir. Akut osteomyelit; klinik olarak infeksiyonun yeni tanınması ve patolojik olarak kemik nekrozu ve sekestr bulunmaması, kronik osteomyelit; klinik olarak tekrarlayıcı veya uzun süreli kemik

infeksiyonu, patolojik olarak düşük düzeyde inflamasyon, sekestr varlığı, fistül oluşumu ve bazen involukrum (etkilenen bölgenin kenarında yeni kemik oluşum alanı) varlığı ile karakterizedir. (35,54)

#### **2.4.10 Protez Eklem İnfeksiyonları**

Protez eklem infeksiyonları tipik olarak biofilm üreten mikroorganizmalar tarafından oluşturulur. En sık etken KNS (%30-43), takiben *S.aureus*'tur (%12-23). İmplantasyondan sonra ilk 12 haftada gelişen infeksiyonlar akut veya erken; 12 haftadan 24 aya kadar olan infeksiyonlar gecikmiş; 24 aydan sonra ortaya çıkan infeksiyonlar ise geç dönem infeksiyon olarak adlandırılır. Akut infeksiyonda *S.aureus*, Gram negatif basil gibi virülan organizmalar görülürken, gecikmiş ve geç infeksiyonda KNS, *Propionibacterium acnes* gibi düşük virülanslı organizmalar etken olur. Mikroorganizma genellikle deriden ve olasılıkla operasyon sırasında bulaşır. Kan kültürleri genellikle negatiftir. Eklem sıvı kültürleri esastır ancak negatiflik olabileceği göz önüne alınmalıdır. Protez çıkarılırsa çevre dokudan çok sayıda kültür örnekleri alınmalıdır. (55)

#### **2.4.11 Septik Artrit, Septik Bursit, Piyomiyozit**

Çocuk ve erişkin septik artritinde en sık etken *S. aureus*'tur. Hematojen yolla, bölgesel travma ile veya iatrojenik olarak meydana gelebilir. Akut ağrı ve şişlik olur. Bakterinin kendisi ve konak immun yanıtı sonucu eklem hasarı oluşabilir. Acil tanı için eklem ponksiyonu gerekir. (56)

Septik bursitin etkeni çoğunlukla *S.aureus*'tur. Olekranon, patella gibi basınç alanlarında ortaya çıkar. Lokal ve uzak septik komplikasyonların odağı olabilir.

Piyomiyozit, iskelet kaslarını tutan, subakut, nadir görülen bir infeksiyondur. Büyük çoğunluğunda etken *S. aureus*'tur. (35,57-58)

#### **2.4.12 Santral Sinir Sistemi Şant İnfeksiyonları**

Bu infeksiyonların yarısından fazlasında etken KNS'dir. Operasyondan sonraki iki ay içinde ateş ve şant disfonksiyonu olduğunda infeksiyondan şüphelenilmelidir. Tanı için şanttan alınan Beyin omurilik sıvısı (BOS) ve şantın

kendisi kullanılır. Antimikrobiyal tedavi ile birlikte genellikle şantın değiştirilmesi gerekir. (44)

## **2.5. STAFİLOKOKAL İNFEKSİYONLARIN TEDAVİSİNDE KULLANILAN ANTİBİYOTİKLER**

### **2.5.1 Penisilinaza Dirençli Penisilinler (Antistafilokokal penisilinler)**

Metisilin, nafsilin ve izoksazolil penisilinler (kloksasilin, dikloksasilin, flukloksasilin ve oksasilin) bu grupta yer almaktadır. Bu antibiyotikler beta laktamazların hidrolizine dirençlidirler. Etkinlikleri stafilokok infeksiyonları ile sınırlıdır, bu nedenle 'anti stafilokokal penisilinler' de denilmektedir. Stafilocoklarda metisilin direnci, beta laktamlara genel direncin ifadesidir. Bu nedenle metisiline dirençli stafilocoklarla (MRS) oluşan infeksiyonların tedavisinde beta laktam antibiyotikler önerilmemektedir. (59-62)

### **2.5.2 Beta-laktamaz İnhibitörlü Penisilinler**

Klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam ile ampisilin, amoksisilin, tikarsilin, piperasilin gibi penisilin türevlerinin kombinasyonu beta-laktamaz salgılayan bakterileri etkiler. (58-61)

### **2.5.3 Sefalosporinler**

Etki mekanizmalarını bakteri hücre duvarı sentezinde rol oynayan PBP'lere bağlanarak inhibisyon yoluyla gösterirler. Sefalosporin direnci sıklıkla PBP'lerde değişiklik sonucu gelişir. Yapılarına ve antimikrobiyal etkinliklerine göre dört kuşak altında toplanırlar. Birinci kuşak sefalosporinler, metisiline duyarlı stafilocoklara (MSS) en etkili gruptur. (59-61,63) .

### **2.5.4 Karbapenemler**

Beta laktam antibiyotikler içinde en geniş spektruma sahip antibiyotiklerdir. Karbapenemlerin Gram pozitif aerop bakterilere etkileri iyidir. MSS suşlarına etkin, MRS suşlarına etkisizdirler. (59-61,64)

### **2.5.5 Glikopeptidler**

Bu grup antibiyotikler (vankomisin, teikoplanin, ristosetin, avoparsin) Gram pozitif bakterilerin hücre duvarı sentezini, peptidoglikan öncüllerindeki peptidil D-alanin-D-alanin uç kısmına bağlanarak transglikozilaz ve transpeptidaz enzimlerinin hedeflerini bozarak inhibe eder. Glikopeptidler MSS ve MRS suşlarına *in-vitro* olarak çok etkilidir. (59,65)

### **2.5.6 Aminoglikozidler**

Bakteri ribozomunun 30S subunitine bağlanarak protein sentezini bozarlar. Stafilokoklarda plazmid ve transpozonlarda bulunan genler aracılığıyla aminoglikozid modifiye edici enzim sentez edilir. Aerop bakteriler arasında aminoglikozidlere karşı direnç oluşumunda en önemli mekanizma enzimatik inaktivasyondur. Stafilokoklara en etkili aminoglikozidler amikasin ve netilmisindir. (59,61,66)

### **2.5.7 Trimetoprim- sülfametoksazol (TMP-SMZ)**

Sülfonamidler, paraaminobenzoik asit analogları olup bu metabolik yolda dihidropteroat sentaz (DHPS) enzimini, trimetoprim ise dihidrofolat redüktaz enzimini inhibe ederek bakterilerde tetrahidrofolik asit sentezini engeller. En sık gözlenen sülfonamid direnci, bakterinin sülfonamidlere düşük affinite gösteren DHPS sentezlemesi olup bu olay plazmid kontrolündedir. (59,61,67)

### **2.5.8 Kinolonlar**

Nalidiksik asit türevi olan florokinolonlar, DNA girazı ve topoizomeraz IV'ü inhibe ederek DNA'nın 'süpersarmal' oluşturmasını inhibe eder. Siprofloksasin ve ofloksasinin klinik kullanıma girdiği ilk yıllarda *S. aureus*'a karşı çok iyi etkinlik gözlenmiş ancak kısa sürede direnç gelişmiştir. Levofloksasin Gram pozitif ve atipik etkenlere karşı etkinliği artırılmış ofloksasinin daha potent bir izomeridir ve metisilin dirençli kökenlere de etkili olabilir. (68) Florokinolonlara karşı oluşan direnç kromozomal kaynaklı olup etki mekanizması giraz enzimidaki mutasyonlardır. (59,61)

### **2.5.9 Kloramfenikol**

Bakteri ribozomunun 50S subunitine bağlanarak protein sentezini bozarlar. Direnç plazmid kontrolünde sentezlenen ve hücre içi bir enzim olan kloramfenikol asetil transferaz enzim aktivitesi ile gelişir. (59,61,69)

### **2.5.10 Tetrasiklin**

Ribozomun 30S subunitine bağlanıp aminoaçil-tRNA'yı bloke ederek protein sentezini inhibe ederler. Stafilokoklarda tet (K), tet (L), tet (M) olmak üzere üç direnç geni bulunmaktadır. tet(M) geni minosiklin ve doksisisikline kromozomal direnci kodladığı için klinik açıdan önemlidir. (59,61)

Tigesiklin tetrasiklinin sentetik analogu olan ilk glisilsiklidir. MRSA, vankomisin dirençli enterokoklar (VRE) yanı sıra enterobakteriler ve anaeroblara etkindir. (70)

### **2.5.11 Rifampisin**

DNA'ya bağımlı RNA polimeraz enziminin beta alt birimine bağlanarak etki eden, bakterisidal bir ilaçtır. Yüksek intraselüler düzeylere ulaşır ve biyofilme penetre olabilen birkaç antimikrobiyal ajandan biridir. RNA polimeraz enzimini kodlayan rpoB gen bölgesinde oluşan kromozomal mutasyonlar rifampisin direncine yol açar. Monoterapiden ziyade kombinasyon tedavisi direnç gelişimini önleyebilir. (59,61,71)

### **2.5.12 Fusidik asit**

Bakterinin protein sentezini ribozomlara bağlanmadan inhibe eden steroid benzeri bir antibiyotiktir. Etki mekanizmasının özgüllüğü nedeniyle diğer antibiyotiklerle arasında çapraz direnç görülmemektedir. MRS infeksiyonlarında glikopeptit antibiyotiklere oral kullanım kolaylığı ve maliyet açısından alternatif oluşturabilecek bir antibiyotiktir. (59,61,72)

### **2.5.13 Oksazolidinonlar**

Linezolid ve Eperozolid bu grubun iki üyesidirler. Ribozomların 50S alt birimine bağlanıp 70S başlangıç kompleksinin oluşumunu engeleyerek protein sentezinin başlamasını önlerler. Etki mekanizmalarının farklı olması nedeniyle diğer

antibiyotiklerle çapraz direnç göstermezler. Oral ve parenteral kullanılabilme özelliğine sahiptir. Hem metisiline duyarlı hem de dirençli stafilokoklara etkilidir. (73)

#### **2.5.14 Daptomisin**

Sadece Gram pozitif etkinliği olan siklik lipopeptittir. Sitoplazmik membranda iyon iletimini bozarak etki ettiği düşünülmektedir. Farmakodinamiği ilaç konsantrasyonuna bağımlıdır ve belirgin postantibiyotik etkisi vardır. En önemli yan etkisi miyopatidir. (70)

#### **2.5.15 Mupirosin**

Primer ve sekonder deri infeksiyonlarında etken olan stafilokoklara mükemmel in-vitro etkinlik gösterir. Mupirosin kalsiyum % 2 nazal pomadının burun deliğine uygulanmasının, metisiline dirençliler de dahil *S. aureus* nazal taşıyıcılığının eradikasyonunda etkili olduğu bildirilmektedir. (74)

#### **2.5.16 Makrolid- Linkozamid- Streptogramin B Grubu Antibiyotikler**

Stafilokoklarda metisilin direncinin ortaya çıkışı ve diğer bazı antibiyotiklere direnci de beraberinde getirmesi bu mikroorganizmaların neden olduğu infeksiyonların tedavisini ve kontrolünü güçleştirmektedir. Bu direnç problemi alternatif antibiyotiklerin araştırılma ihtiyacını ortaya çıkarmıştır. Makrolid, linkozamid ve streptograminler bu alternatif tedavi seçenekleri arasındadırlar.(75) Makrolid, linkozamid ve streptogramin türevi antibiyotikler farklı kimyasal yapıda olmalarına karşın etki mekanizmaları ve bu grubu etkileyen direnç mekanizmalarının benzerliği nedeniyle aynı grup içerisinde sınıflandırılırlar ve MLS grubu antibiyotikler olarak adlandırılırlar. (76)

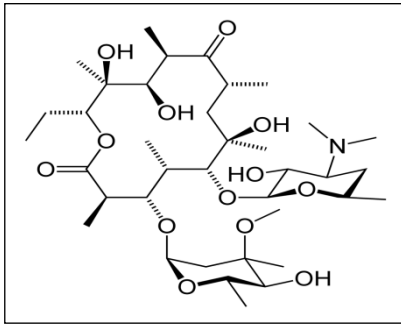
Etkilerini bakteriyel protein sentezini inhibe ederek gösterirler. Bakteri ribozomunun 50S alt ünitesine bağlanarak protein sentezinin elongasyon fazında peptidil tRNA molekülünün ribozamdan erken ayrılmasını stimüle ederler. Bunun sonucunda zincir sonlanır ve protein sentezi geri dönüşümlü olarak durur. Gram negatif bakteriler hücre duvarından hidrofobik bileşiklerin geçememesi ve pompa sistemlerinin varlığı nedeni ile MLS grubu antibiyotiklere doğal olarak dirençlidirler. (61,77)

### 2.5.16.a Makrolid Antibiyotikler

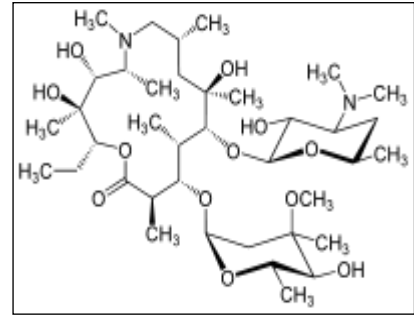
İlk olarak 1952 yılında eritromisin bulunmasının ardından değişik makrolid antibiyotikler kullanıma sunulmuştur. Eritromisin dışında, spiramisin, oleandomisin, josamisin ilk bulunan makrolidlerdir; daha sonra roksitromisin, azitromisin, klaritromisin, diritromisin ve fluritromisin üretilmiştir. (4)

#### A. Yapı

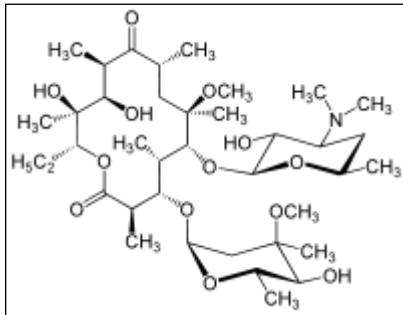
Makrolidlerin ana yapısı makrosiklik bir lakton halkası ile (aglikon), glikozit bağlarıyla buna eklenmiş şekerlerden oluşmaktadır. Eritromisin, 14 üyeli lakton halkasına tutunmuş iki şekerden, kladinoz ve dezozaminden oluşur. Diğer 14 üyeli makrolidler roksitromisin, klaritromisin, diritromisin, fluritromisindir. Azitromisin, eritromisinden elde edilmiş 15 üyeli yarı sentetik bir makroliddir. Yapısı ve diğer özellikleri nedeniyle azalid grubu adında farklı bir grupta yer alması önerilmiştir. Spiramisin, josamisin, rokitamisin, miokamisin 16 üyeli makrolidlerdir. Eritromisinin yapısında bulunan şekerlerden kladinozun çıkartılmasıyla oluşturulan antibiyotiklerden ilki telitromisindir ve ketolid grubu içerisinde yer alır. (78-79)



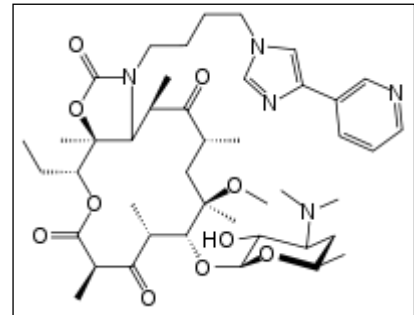
ERİTROMİSİN



AZİTROMİSİN



KLARİTROMİSİN



TELİTROMİSİN

Şekil 1. Bazı makrolidler ve telitromisinin kimyasal yapısı.



## B. Etki Mekanizması

Bakteriyel protein sentezini geri dönüşümlü olarak inhibe eden bakteriyostatik özellikte bir antibiyotik grubudur. Özgül olarak 70S bakteri ribozomlarının 50S alt birimine bağlanırlar. Makrolidler 50S alt üniteye bağlandıklarında oluşan polipeptidin stabil olarak ribozom üzerindeki kanala bağlanmasında etkili olurlar. Sonuçta stabilizasyonu bozulan, yeni oluşmakta olan 10-15 aminoasit ulaşmış polipeptid henüz protein sentezi tamamlanmadan ribozomdan ayrılır ve fonksiyonel protein sentezi inhibe edilmiş olur. (78,80)

## C. Etki Spektrumu

Eritromisin, stafilokok, pnömokok, streptokoklar ve korinebakteriler dahil Gram pozitif bakterilerin çoğuna etkilidir. *Bordetella*, *Bartonella quintana* ve *B.henselae*, bazı riketsialar, *Campylobacter*, *Legionella*, *Treponema pallidum*, *Mycoplasma* ve *Chlamydia* bakterileri üzerine etkilidir. *Haemophilus influenzae* üzerine etkisi kısmen azdır.

Azitromisinin, yapısında halkaya eklenmiş nitrojen sayesinde Gram negatif bakteriler üzerine etkinliği artmıştır. Eritromisine göre *Campylobacter jejuni*, *H.influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Moraxella catarrhalis*, *Borrelia burgdorferi*, *Mycobacterium chelonae*, *M.fortuitum*'a ve *Toxoplasma gondii*'ye karşı daha fazla bir aktiviteye sahiptir. (81)

Klaritromisin, stafilokoklara ve streptokoklara karşı etkilidir. Eritromisine göre *Legionella pneumophila*, *Helicobacter pylori*, *M. catarrhalis*, *Chlamydia trachomatis*, *B. burgdorferi* üzerine daha etkilidir. Atipik mikobakteriler (*M.avium-intracellulare*, *M.kansasii*, *M.gordoniae*, *M.szulgai*, *M.scrofulaceum*, *M.chelonae*, *M.fortuitum*, *M.abscessus*), *M.leprae* ve *T. gondii* üzerine etkilidir.

Roksitromisin'in etkisi eritromisinle benzerlik gösterir, ek olarak *T.gondii* ve *Cryptosporidium* üzerine etkilidir.

Spiramisin eritromisinle aynı etki spektrumuna sahip olmakla birlikte *T.gondii* üzerine etkilidir. (82-83)

#### **D. Klinik Kullanım**

*Üst solunum yolu infeksiyonları:* Grup A streptokok (GAS), klamidya ve mikoplazma tonsillofarenjitlerinde kullanılabilir. GAS tonsillofarenjitli hasta penisiline allerjikse makrolid tercih edilebilir Ülkemizde yapılmış çalışmalarda A grubu streptokoklarda eritromisin direnci %0-23 arasında bildirilmiştir. (84) Ayrıca, otitis media, akut sinüzit, boğmaca ve difteride (tedavi ve profilaksi) kullanılabilir.

*Alt solunum yolu infeksiyonları:* Toplumdan kazanılan pnömonilerin tedavisinde kullanılırlar. Kronik bronşitin akut alevlenmesi ataklarında makrolidler tercih edilebilir.

*Deri ve yumuşak doku infeksiyonları:* Erizipel, sellülit, impetigo, lenfanjit, eritrazma, furonkül tedavisinde etkilidirler. Akne vulgaris tedavisinde de seçenektirler.

*Cinsel yolla bulaşan infeksiyonlar:* Nongonokoksik üretrit (*C.trachomatis*, *Mycoplasma* ve *Ureaplasma*) ve sifiliz makrolidlerin etkili olduğu hastalıklardandır.

*Sindirim sistemi infeksiyonları:* Klaritromisin, peptik ülserde (*H.pylori*) kombinasyon halinde kullanılmaktadır. Eritromisin, *C.jejuni* ishalinde (ilk seçenek) ve azitromisin *Shigella* dizanterisi tedavisinde kullanılabilir.

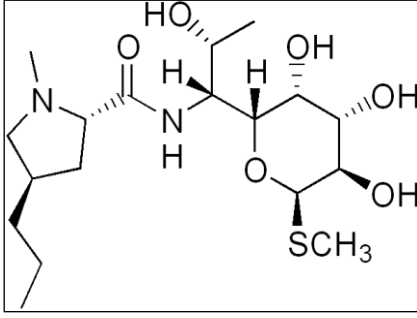
*Profilaktik kullanım:* Akut romatizmal ateş profilaksisi, endokardit profilaksisi ve karın cerrahisi profilaksisi için ağızdan kullanılabilir. Meningokok taşıyıcılığı eradikasyonunda azitromisin ve spiramisin kullanılabilir. (4,78,83)

#### **2.5.16.b Linkozamidler**

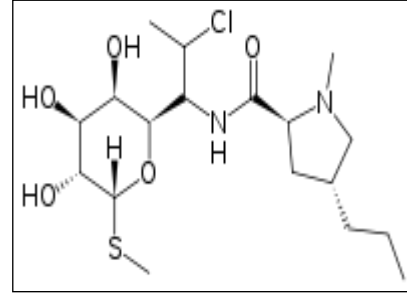
Bu grupta linkomisin ve klindamisin antibiyotikleri bulunmaktadır. (85)

#### **A. Yapı**

Linkomisin *Streptomyces lincolnensis* tarafından üretilir. Linkomisinin yapısında sülfür içeren bir oktoza bağlanmış trans-L-4-n-propilhigrinik asid vardır. Klindamisin ise bir hidroksil grubunun 7. pozisyonundaki klor atomu ile yer değiştirmesiyle elde edilir ve 7-kloro 7-deoksi linkomisin yapısında semisentetik bir maddedir. (86)



LİNKOMİSİN



KLİNDAMİSİN

Şekil 2. Linkomisin ve klindamisinin kimyasal yapısı.

### B. Etki Mekanizması

Makrolidlerde olduğu gibi bakteri ribozomlarının 50S alt kısmına bağlanıp protein sentezini engellerler. Bakteriostatik etki gösterirler. Klindamisin, düşük dozlarda bile opsonizasyon, fagositoz ve hücre içi bakteri öldürülmesini kolaylaştırır. Gram negatif aerop ve fakültatif anaerop çomakçıklar, dış membran geçirgenliği azlığına bağlı olarak intrinsik olarak linkozamidlere karşı dirençlidirler. (83)

Klindamisin Gram pozitif organizmalarda protein sentezinin inhibisyonu yolu ile toksinlerin ve virülans faktörlerinin üretimini inhibe eder. (87)

### C. Antimikrobiyal Aktivite

Linkomisin, stafilokoklar, streptokoklar ve korinebakteriler üzerine etkilidir; anaerop bakterilerden, peptokok ve *Bacteroides* cinsi üzerine kısıtlı etkinlikleri vardır.

Klindamisin, değişik Gram pozitif koklara (stafilokoklar, pnömokoklar, viridans streptokoklar) karşı linkomisinden daha etkilidir ve bu bakteriler üzerine eritromisin kadar etki gösterir. Klindamisin güçlü bir antianaerobik ajandır ve *B.fragilis* ve diğer Gram pozitif ve Gram negatif anaerop bakteriler (*Fusobacterium varium* hariç) üzerine etki gösterir; peptokokların %10-20 kadarı, *Bacteroides spp'nin* %6 kadarı klindamisine karşı dirençlidir; dirençte bölgeler arasında farklılıklar vardır.

Enterokoklar ve Gram negatif enterik bakteriler linkozamidlere karşı dirençlidirler.

Klindamisin ayrıca *Plasmodium falciparum* (*P.vivax* dirençli), *Babesia microti*, *T. gondii*, *Pneumocystis jiroveci* parazitleri üzerine etkilidir. (78,83)

#### D. Klinik Kullanım ve Doz

Klindamisin esas olarak *Bacteroides* ve diğer anaerob bakterilerce oluşan MSS infeksiyonları dışında saf veya mikst infeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır. Klindamisin'in tercihen ve alternatif olarak kullanıldığı infeksiyon etkeni bakteriler Tablo III'te verilmiştir. (88)

Tablo III. Klindamisin'in etkili olduğu bakteriler.

1. Seçenek	Alternatif Seçenek
<i>Bacillus cereus, B.subtilis</i> <i>Capnocytophaga spp</i> <i>Clostridium perfringens</i>	<i>Actinomyces israelii</i> <i>Bacteroides fragilis</i> <i>Campylobacter jejuni</i> <i>Corynebacterium diphtheriae</i> <i>Gardnerella vaginalis</i> <i>Leuconostoc</i> <i>Peptostreptococcus</i> <i>S.aureus</i> (metisiline duyarlı) <i>S.pyogenes</i> ve diğer streptokoklar <i>Streptobacillus moniliformis</i>

Anaerobik akciğer infeksiyonlarında, özellikle beta-laktam antibiyotiklere karşı allerjik olan hastalarda klindamisin iyi bir seçenektir.

Karın ve barsağın penetran yaralanmaları sonrası gelişen karın içi infeksiyonlarda, jinekolojik pelvik infeksiyonlarda ve aspirasyon pnömonilerinde aminoglikozitler veya sefalosporinler ile kombine halde kullanılır.

Stafilokok ve streptokokların deri ve üst solunum yolu infeksiyonlarında klindamisin seçilebilecek ilaçlardan biridir. Polimikrobik diyabetik ayak veya dekübitus ülser infeksiyonlarında kombine halde kullanılabilir.

Kemiğe penetrasyonu çok iyi olduğundan özellikle stafilokoksik osteomyelit kullanım alanlarından biridir.

Kalp kapak hastalarında, dış çekim ve tedavisi işlemleri öncesinde profilakside kullanılabilir.

Bakteriyel vaginosis, klindamisin'in oral veya vaginal krem formları ile tedavi edilebilir.

Akne vulgaris ve akne rozasea'da topikal klindamisin solüsyonları kullanılabilir.

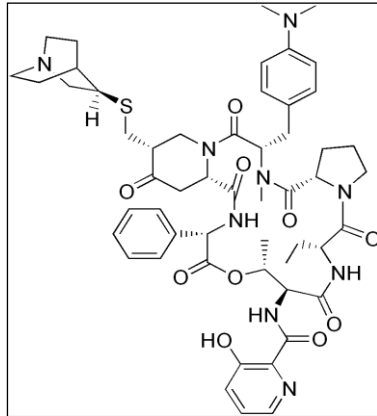
Klindamisin, toksoplazmozda primetaminle, *P.jiroveci* pnömonisinde primakinle, *P.falciparum* sıtması ve babesyozda kininle kombinasyon tedavilerinde başarı sağlamaktadır. (78)

### 2.5.16.c Streptograminler (Kinopristin/ Dalfopristin)

#### A. Yapı

Streptograminler doğal olarak sentezlenirler ve yapı olarak birbirlerinden farklı iki antibiyotiğin sinerjik etkisiyle antibiyotik özelliklerini gösterirler.

Streptogramin A, oksazol çekirdeğe bağlı di-enil-amid grubu içeren bir makrolaktondur. Streptogramin B ise 3-hidroksi-pikolinoil içeren bir heksapeptid siklik yapıdadır. Kinopristin; pristinamisin IA'dan elde edilen bir streptogramin B, dalfopristin ise pristinamisin IIA'dan elde edilen bir streptogramin A'dır. Tek başına oldukça sınırlı bir antibakteriyel etkiye sahip olmalarına karşın birlikte sinerjistik etki oluşturmaları nedeniyle iyi bir antibakteriyel etkinlik gösterirler. Her ikisi de suda çözünen bu semisentetik bileşiklerin % 30 kinopristin - % 70 dalfopristin (30:70,K/D) şeklindeki kombine preparatı, intravenöz formuyla klinik kullanımda bulunmaktadır. K/D kullanımdaki ilk parenteral streptogramindir. (88)



Şekil 3. Kinopristin/ dalfopristinin kimyasal yapısı.

#### B. Etki Mekanizması

K/D bakterilerde ribozomların 50S alt birimine geri dönüşsüz olarak bağlanarak protein sentezini inhibe eder. Dalfopristin aminoasit- tRNA molekülünün ribozama bağlanmasını engelleyerek etkili olur. Böylece uzayan peptid zincirine yeni aminoasitlerin bağlanmasını önleyerek protein sentezinin erken basamağına etkili

olur. Kinopristin ise makrolidler gibi protein sentezinin daha geç dönemine etki eder. Peptid uzamasını önler ve eksik peptid zincirlerinin oluşmasına neden olur. Dalfopiristin ribozomda değişikliğe neden olur ve kinopristinin ribozoma bağlanmasını kolaylaştırır. K/D kombinasyonu, her bir bileşiğin tek etkinliğinden 16 kat daha fazla etkinlik gösterir. Protein sentez yolunda farklı aşamaların önlenmesi ve bu sinerjik etki nedeniyle protein sentezi inhibitörü olan birçok antibiyotiğin aksine bakterisidal etki gösterirler. (80,89)

### C. Etki Spektrumu

Temel olarak etki spektrumu içinde Gram pozitif mikroorganizmalar yer almaktadır. Dar spektrumlu bir antibiyotik olmasına karşın çoğul dirençli Gram pozitif bakteri infeksiyonlarının tedavisinde önemli bir seçenektir. Gram pozitif bakterilerin çoğuna bakterisidal etki gösterirken enterokoklara karşı bakteriyostatik etkiye sahiptir.

Vankomisine duyarlı ve dirençli *E.faecium*, *S.aureus*, KNS, *S.pneumoniae* (penisilin ve eritromisine dirençli kökenler dahil), GAS, viridans streptokoklar, *S.agalactiae* ve *Corynebacterium jeikeium*, *Listeria monocytogenes*'e etkilidir Buna karşın *E. faecalis* kökenleri K/D'ye dirençlidir. Bu nedenle enterokok infeksiyonlarında mutlaka tür tayini yapılması gerekmektedir.

MRSA ve metisiline duyarlı *S. aureus*'a (MSSA) etkinliği arasında önemli bir farklılık yoktur. Ayrıca grup C ve G streptokoklar ve *Leuconostoc* türleri orta derecede duyarlıdır.

Aerop Gram negatif bakterilerden *M. catarrhalis* ve *L. pneumophila*, atipik bakterilerden *M. pneumoniae* ve *C. pneumoniae*, *H.influenzae* K/D'e duyarlı olabilir.

Anaerob mikroorganizmaların çoğu K/D'ye dirençlidir. *Bacteroides* türleri, *Prevotella* türleri, *Fusobacterium* türleri ve *Clostridium difficile* için in-vitro etkinliği iyi değildir.

*Enterobacteriaceae* ailesi, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter* türleri gibi nonfermentatif Gram negatif bakteriler K/D'ye doğal olarak dirençlidir. (90-91)

#### **D. Klinik Kullanım**

Streptograminler 1950'li yıllarda keşfedilmesine rağmen vankomisine dirençli enterokokların ortaya çıkışıyla yeni ilaç arayışı başlamış ve K/D 1999 yılında FDA onayı almıştır. Nozokomiyal pnömoni, komplike deri-yumuşak doku infeksiyonları, kateter ilişkili bakteremiler ve VRE infeksiyonları K/D'inin en önemli kullanım alanlarını oluşturur.

Çoğul dirençli stafilokok, streptokok ve enterokok gibi birçok Gram pozitif bakteri infeksiyonlarında etkilidir. MRSA için deri ve yumuşak doku infeksiyonları, kemik- eklem infeksiyonları ve solunum yolu infeksiyonlarında klinik başarı oranının %70'den fazla olduğu bildirilmiştir.

Hastane kaynaklı pnömonilerin tedavisinde ise aztreonam gibi Gram negatif bakterilere karşı etkili antibiyotiklerle kombine edilerek kullanılabilir. Hastane kaynaklı pnömonilerde vankomisin ve aztreonam ile yapılan kombinasyon kadar etkili bulunmuştur.

Kateter ile ilişkili *S.aureus* ve *S.epidermidis* infeksiyonlarında vankomisin ile yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda benzer etkinlik oranları bildirilmiştir. Bu nedenle stafilokokal bakteremisi olan ve vankomisini tolere edemeyen hastalarda K/D kullanımını önerilebilir.

*S. pyogenes*, MSSA ve MRSA'nın neden olduğu ciddi deri infeksiyonlarında tek başına kullanılabilir. (92-93)

#### **2.6. STAFİLOKOKLARDA ANTİBİYOTİK DİRENCİ**

Penisilinin 1928'de Alexander Fleming tarafından keşfinin ardından 1940 yılında klinik kullanıma girmesiyle stafilokok infeksiyonları başarılı bir şekilde tedavi edilmeye başlandı. 1946'da *S.aureus*'ların %6'sı penisilinaz üreterek penisiline dirençli hale geldi. Ne var ki kloramfenikol, eritromisin, streptomisin ve tetrasiklin gibi diğer doğal antibiyotikler de kullanıma girdi. Başlangıçta hepsi *S.aureus*'a karşı etkiliyken direnç çabuk gelişti ve 1950'lerde dirençli stafilokoklar birçok hastanede sorun olmaya başladı. 1960'ların başında ilk sefalosporinler geliştirildi ve bunu takiben penisilinaza dirençli penisilinler üretildi. Ayrıca daha iyi antistafilokokal aktivitesi olan gentamisin de kullanıma girdi. 1958 yılında kullanıma giren ilk glikopeptid vankomisin olup bunu 1984 yılında teikoplanin izler. İlk metisilin dirençli *S. aureus* 1961'de bulundu. 1996'da ilk glikopeptid- intermediate *S. aureus* (GISA) suşu

Japonya'dan bildirilene kadar glikopeptidler stafilokok infeksiyonlarının tedavisinde aktif olarak kullanılmaktaydı. (2,93-95)

### 2.6.1 Penisilin Direnci

Günümüzde stafilokoklarda penisilin direnci % 90'lara ulaşmıştır. Penisilinazlar, penisilin ile beraber bazı beta-laktam antibiyotikleri de parçaladıkları için genel olarak beta laktamaz olarak adlandırılırlar. Beta laktamaz geni diğer antibiyotik direnç genleri ile birlikte plazmid üzerinde taşınır ve aktarılabilir bir elementtir.

Stafilokoklarda penisilin direncine *blaZ* geni aracılık eder. Bu gen, *blaR1*, *blaR2* (regulator) ve *blaI* (inhibitor) gibi düzenleyici genlerin kontrolü altındadır. Gram negatif bakterilerde olduğu gibi stafilokoklarda da beta laktamaz üretiminin indüklenebilirlik özelliği vardır. İnhibisyondan sorumlu *blaI* geni ortamda beta laktam antibiyotik yokluğunda *blaZ* ve *blaR* gen bölgelerinin çalışmasını baskı altında tutar. Ortamda beta laktam antibiyotik varlığında ise *blaR1* tarafından *blaZ* geni uyarılarak artmış miktarda beta laktamaz üretimi sağlanır. Bu enzim, beta laktam halkasını hidrolize ederek penisilini inaktive eder. (96)

### 2.6.2 Metisilin Direnci

Antibiyotik direnci olmayan bir stafilokokta; PBP1, PBP2, PBP3 ve PBP4 olarak adlandırılan başlıca dört tane PBP olduğu bilinmektedir. Metisiline dirençli suşlarda ise penisilin direncinden sorumlu olan ve beta laktamlara düşük afinite gösteren, 76 kDa ağırlığında, PBP2' ya da PBP2a olarak adlandırılan farklı bir PBP bulunmaktadır. (33)

PBP2a, *mecA* geni tarafından kodlanmaktadır. Bu gen indüklenebilir özellikte ve transdüksiyon ile dirençli suşlardan duyarlı suşlara aktarılabilir. *mecA* geni, regülasyonunu sağlayan *mecI* (represör gen) ve *mecRI* (sinyal dönüştürücü gen) genleriyle beraber stafilokokal kaset kromozomu (staphylococcal cassette chromosome-SCC) adı verilen, stafilokok türleri arasında genetik değişim için aracılık eden genetik yapının üzerinde taşınır. (97-98)



Stafilokoklarda metisilin direncine yol açan diğer mekanizmalar; PBP4'ün aşırı yapımı, PBP2 ve PBP4'te meydana gelen nokta mutasyonlar ve aşırı beta laktamaz üretimidir. (33)

Stafilokoklarda metisilin direnci fenotipik olarak iki farklı biçimde ortaya çıkar.

Homojen direnç; Bakteri kolonisini oluşturan tüm bakterilerin direnç genini eksprese ettiği durumda görülen dirençtir ve hepsinde *mecA* geni fonksiyoneldir. Direnç ortamın pH'sı, ısı, tuz konsantrasyonu, inkübasyon süresi gibi çevresel faktörlerden etkilenmez.

Heterojen direnç; *mecA* geni taşıyıp metisiline dirençli olduğu halde fenotipik olarak metisiline duyarlı görülen alt popülasyonun bulunduğu durumdur. Heterojen direnç  $10^4$ - $10^8$  bakteriden birinde ortaya çıkar. Stafilokoklarda metisilin heterojen direnci, homojen dirençten daha sık görülmekte; saptanması ise daha güç olmaktadır. Bunun nedeninin *mecA* dışındaki düzenleyici genetik elemanların mutasyonu olabileceği düşünülmektedir. Hem genotipik özellikler hem de çevre şartları ile çok değişken olarak ortaya çıkan heterojen direnç nedeniyle dirençli bakterinin fenotipik olarak duyarlı bulunması tedavi başarısızlıklarıyla sonuçlanmaktadır. (99)

### 2.6.3 Glikopeptid Direnci

Stafilokoklarda glikopeptid direnci de heterojenite göstermektedir. Özellikle, teikoplanine dirençli suşların vankomisine duyarlı olabilecekleri bildirilmektedir. Ayrıca KNS'ler arasında glikopeptid direnci türe özgü özellik göstermektedir. Glikopeptid direnci gösteren başlıca iki tür *S.epidermidis* ve *S.haemolyticus*'tur. (100)

*S.aureus*'ta vankomisin direnci iki mekanizma ile oluşmaktadır. *agr* gen bölgesinin seri mutasyonları sonucu, hücre duvarı öncülleri aşırı sentezlenir ve duvar kalınlığı artar. Vankomisinin bu artmış öncüllere bağlanıp tüketilmesi ile direnç ortaya çıkar. Bu mekanizma ile ortaya çıkan GISA suşları 1998'de yayınlanmıştır. (101)

Diğer mekanizma ise enterokoklarda vankomisin direncine neden olan *vanA* geninin *S.aureus*'a aktarılmasıdır. Bu direnç tipi 2002 yılında bildirilmiş olup yüksek düzey vankomisin direncinden sorumludur. (102)

KNS'lerde ise direnç mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. Direncin; değişmiş duvar öncüllerinin üretilmesi, peptidoglikan tabakadaki çapraz bağlantıların duyarlı suşlara göre farklı olması ve böylece vankomisin hedef bölgesine bağlanmasının engellenmesi ile geliştiği öne sürülmektedir. (100)

#### **2.6.4 MLS<sub>B</sub> Direncinin Klinik Önemi ve Saptanması**

Yapısal MLS<sub>B</sub> dirençli suşlar makrolidler ve klindamisine dirençli olmasıyla kolaylıkla tanınır. Sorun, indüklenebilir direncin standart in vivo duyarlılık testleri ile saptanamamasıdır. Böyle suşlar standart test sonucunda makrolidlere dirençli, klindamisine duyarlı gözükür. İndüklenebilir dirence sahip stafilokok infeksiyonlarının linkozamidler ile tedavisi sırasında, dirençli suşların seleksiyonu ile klinik başarısızlığın ortaya çıktığı olgu sunumları mevcuttur. İlk kez 1969 yılında McGehee ve arkadaşları eritromisin dirençli *S. aureus* infeksiyonu olan ve linkomisin ile tedavi edilen iki olgu sunmuşlardır. Tedavi öncesi her iki izolat linkomisine duyarlı iken tedavi sırasında dirençli hale gelmiştir. (103) Bazı araştırmacılar da tedavi sırasında veya sonrasında indüklenebilir direncin yapısal dirence dönüşebileceğini bildirmişlerdir. (104)

##### **2.6.4.a Fenotipik Yöntemler**

Stafilokoklarda iMLS<sub>B</sub>' nin saptanması ve rapor edilmesi konusu 2004 NCCLS'de (National Committee for Clinical Laboratory Standards) yer almaktadır. Eritromisin ve klindamisin diskleri arasındaki uç uca mesafenin kullanılan yöntemle ilgili olarak ~26 mm veya ~15 mm olması önerilmiştir. Bu yöntem basit ve pahalı olmayan, rutin olarak uygulanabilecek bir yöntem olarak kabul edilmiştir. (105)

Standart duyarlılık test yöntemleri ile eritromisinin ve klindamisinin dirençli bulunması yapısal MLS<sub>B</sub> direnci olarak belirlenir. Her ikisi de dirençli olarak bildirilir.

İndüklenebilir direncin ortaya konması için eritromisin ve klindamisin diskleri kullanılarak yapılan ve D test (Double disk diffusion test) adı verilen özel bir disk yakınlaştırma testi kullanılmaktadır. Eritromisin çok düşük konsantrasyonlarda dahi MLS<sub>B</sub> direncini indüklediği için testte kullanılmaktadır. (106)

Klindamisin inhibisyon zonunun eritromisin inhibisyon zonuna en yakın kısmında bir küntleşme olması D test pozitif olarak yorumlanır. Bu durum

indüklenebilir MLS<sub>B</sub> direncini gösterir. Eritromisin ve klindamisin dirençli olarak rapor edilir. (106-107) NCCLS; ' Bu izolatın indüklenebilir direnç saptanmasına bağlı olarak klindamisine dirençli olduğu varsayılmaktadır. Klindamisin bazı hastalarda hala etkin olabilir.' ifadesine yer veren bir uyarıyı önermektedir. (105)

Klindamisin inhibisyon zonunun eritromisin inhibisyon zonuna en yakın kısmında bir küntleşme olmaması, yani negatif D test sonucunda, klindamisin güvenle duyarlı olarak rapor edilebilir. Bu durum M veya MS fenotipi olarak adlandırılır. Bu durum makrolid ve streptogramin B antibiyotiklerine dirence yol açarken klindamisin etkindir. (108)

İdrardan izole edilen *S. saprophyticus* suşları için rutin D test uygulaması tavsiye edilmemektedir. Akut ve komplike olmayan üriner sistem infeksiyonlarının tedavisinde yaygın olarak kullanılan nitrofurantoin, kotrimaksazol gibi antibiyotikler idrarda yeterli konsantrasyona ulaştığı için D test yapılması gerekli görülmemiştir. (109)

Tablo IV. MLS<sub>B</sub> direnç fenotipleri.

Fenotip	Direnç fenotipi	14,15C mak	16 C mak	Kli	S <sub>B</sub>	Ketolid	Bildirim
D test (+)	iMLS <sub>B</sub>	R	S	S	S	S	E:R Kli:R
D test (-)	MS <sub>B</sub>	R	S	S	R	S	E:R Kli:S
Dirençli	cMLS <sub>B</sub>	R	R	R	R	R	R
Duyarlı	-	S	S	S	S	S	S

Mak: makrolidler, Kli: Klindamisin, E: eritromisin, S<sub>B</sub>:Streptograminler, R: Dirençli, S: Duyarlı

#### **2.6.4.b Moleküler Yöntemler**

Günümüzde hem bilimsel araştırmalar hem de tanısal alanda moleküler yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır. Fenotipik yöntemler klinik önemi olan çok sayıda mikroorganizma için kullanılmakla birlikte bazı sorunlu yönleri de vardır. Bunlar kültür ortamında üremeyen, geç veya zor üreyen patojenlerin varlığı, laboratuvar koşullarına bağlı olarak fenotipik özelliklerde değişim, fenotipik özellikleri benzer farklı organizmaların bulunması gibi durumlardır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) başta olmak üzere birçok moleküler yöntem mikrobiyolojide kullanılmaktadır. (110-111)

PCR, nükleik asitlerin in vitro şatlarda replikasyonu için geliştirilmiş, hedef DNA/ RNA'nın selektif amplifikasyonuna imkan veren bir tüp test sistemidir. DNA

polimeraz enzimi yardımı ile genomun tamamı değil, spesifik bölgelerinin kopyalanması gerçekleştirilerek in vivo çoğalma taklit edilir. Kopyalanılarak çoğaltılacak bölgenin uzunluğu kullanılan polimeraz enzimine göre değişir.

PCR çalışmalarında reaksiyonun gerçekleşmesi için küçük miktarda hedef DNA (1-100 ng) içeren örnek çalışma solusyonuna ilave edilir. Daha sonra örnekteki çift sarmal DNA'nın tek sarmala dönüştürülmesi (denatürasyon) sağlanır. Tek sarmal DNA iplikçiklerinin karşıtı 20-30 baz çifti uzunluğundaki sentetik oligonükleotidler RNA/DNA heterodupleksini oluşturmak üzere primer gibi kullanılır. Primerlerden biri DNA iplikçığı üzerinde başlatıcı bölgeyi oluştururken, spesifik bir bölgenin amplifikasyonu için hedefi sınırlamak amacı ile ikinci primer sonlandırıcı bölgeye bağlanır. (annealing= bağlanma) Taq DNA polimeraz enziminin yardımı ile primerlerin bağlandığı bölgeden itibaren her DNA iplikçığının komplementeri oluşturulur. (extension= uzama) Sonuçta oluşan iki adet çift iplikli DNA yeni amplifikasyon için kalıp görevini görür. Birkaç saat içinde hedefin milyarlarca kopyası elde edilebilir. (112) PCR temel olarak tekrarlayan üç aşamalı bir yöntemdir.

a. Ayrışma (Denatürasyon): Çift iplikli DNA'nın tek iplikli DNA'ya ayrılması işlemidir. Reaksiyon ısı 91-94°C olup işlem 1-2 dakika sürer.

b. Primerlerin bağlanması (Annealing): Birinci aşama sonunda tek iplikli hale gelen DNA sekanslarınının 3' uçlarına primerler bağlanır. Isının birdenbire 50°C düzeyine düşürülmesi ile primerler DNA matrisi üzerinde yoğunlaşır. Isı 37- 65 °C arasında değişir ve bu faz 2-5 dakika sürer.

c. Uzama (extension): Isıya dayanıklı polimeraz enzimi, primer ve kalıp olarak tek iplikli DNA kullanarak çift iplikli DNA'nın sentezlendiği aşamadır. Reaksiyon taq polimeraz için optimal sıcaklık olan 70- 72 °C arasında 2-3 dakikada tamamlanır. Uzama işlemi 5' → 3' yönünde gerçekleşmektedir. (112-113)

### **2.6.5 MLS<sub>B</sub> Direnç Mekanizmaları**

Stafilokoklarda MLS<sub>B</sub> grubu antibiyotiklere direnç üç mekanizma ile gerçekleşmektedir. (76,107,114)

1. Antibiyotiğin hedef bölgesinde değişim
2. Aktif pompa (efluks) sistemleri
3. Antibiyotiğin enzimatik inaktivasyonu

### **2.6.5.a Hedef Bölgede Değişim**

MLS grubu antibiyotiklerde en önemli direnç mekanizması antibiyotiğin hedef bölgesinin değişimidir. Stafilokoklarda 23S rRNA'nın sekonder yapısı incelendiğinde beş ya da altı 'domain' görülür. 'domain 5' MLS<sub>B</sub> direncinde önemlidir.

#### **A. Ribozomal Metilasyon**

Makrolid direncinde en önemli ve en yaygın görülen birinci mekanizma adenin-N<sup>6</sup> metiltransferaz tarafından 23S rRNA'nın posttranskripsiyonel modifikasyonudur. Bu enzimler 23S rRNA fonksiyonel grubunda bulunan tek bir adenine (A2058 *Escherichia coli*) bir veya iki metil grubu eklerler. Bu bölgenin metilasyonu sonucu hedefe bağlanma bozulmaktadır. (13)

Şimdiye kadar farklı tür, genus ve izolatlardan çok sayıda adenin-N<sup>6</sup> metiltransferaz tanımlanmıştır. Genel olarak bu metilazları kodlayan genler istisnalar olsa da *erm* (eritromisin ribozom metilasyon) olarak isimlendirilmiştir.

50S ribozomal alt birimdeki eritromisinin bağlanma bölgesi, daha yeni makrolidler, linkozamidler ve streptogramin B antibiyotiklerinininkisi ile örtüşür. Metilazlar tarafından gerçekleştirilen modifikasyon sonucunda bu üç grup antibiyotiğin bağlanması azalarak MLS<sub>B</sub> direnci ortaya çıkar. (14,115)

*erm* genleri; yapısal ya da indüklenabilir dirence yol açan enzimleri kodlayarak MLS antibiyotiklerin ribozoma bağlanmasını bozarlar. (16)

On dört ve 15 üyeli makrolidler indükleyici antibiyotiklerdir. Ortamda bir indükleyici yokken, mRNA'nın inaktivitesi 5' ucunun yapısına bağlıdır. Bu bölge baz eşleşmesi ile oluşmuş, metilazlar için başlangıç sekanslarını (ribozom bağlanma bölgesi ve başlama kodonu) saklayan 'saç tokası' şeklini oluşturan bir takım yapıları ve bir lider peptidi içerir. Posttranskripsiyonel modifikasyon modeline göre, lider peptidin translasyonu sırasında indükleyici makrolidin ribozoma bağlanması ile indüksiyon gerçekleşir. Bu durum 'saç tokası' şeklinin bozulmasına, başlangıç sekanslarının ortaya çıkışına ve *erm* metilazların translasyonuna neden olur. (16,116)

Yapısal *erm* gen ekspresyonu genellikle 5' sekanslardaki delesyon, duplikasyon ve nokta mutasyonları içeren değişimler ile ilişkilidir. Bu değişimler metilaz genlerinin sürekli ekspresyonuna ve yapısal MLS<sub>B</sub> direncine neden olur.

İndüklenebilir MLS<sub>B</sub> direnci olan suşlar 14 ve 15 üyeli makrolidlere in vitro direnç gösterirken, 16 üyeli makrolidler, linkozamidler ve tip B streptograminlere duyarlı görünürler. Yapısal MLS<sub>B</sub> dirençli suşlar ise tüm bu ajanlara in vitro direnç sergilerler. (10,16)

## **B. erm Genleri**

Son otuz yılı aşkın bir süredir *E.coli*'den *H.influenza*'ya, *S.pneumoniae*'dan *Corynebacterium* spp'ye kadar geniş bir bakteri çeşidinde farklı *erm* genleri izole edilmiştir. Ek olarak çeşitli Gram pozitif ve Gram negatif anaerobların, *B.burgdorferi* ve *Treponema denticola* gibi spiroketlerin *erm* genlerini taşıdığı gösterilmiştir.

Tüm *erm* enzimleri aynı adenin rezidüsünün metilasyonuna neden olarak MLS<sub>B</sub> direnç fenotipinin oluşmasına yol açar. Makrolid dirençli *M.intracellulare*, *M.avium*, *Propionibacterium* spp. ve *H.pylori* de bu adenin (A2058) veya peptidiltransferaz bölgesindeki komşu rezidülerden biri (A2057 veya A2059) mutasyonla başka bir nükleotide değiştirilir.

*erm* genlerinin bazıları plazmidlerde bulunabildiği gibi bazıları da kromozomda yerleşme eğilimi gösteren konjugatif ya da nonkonjugatif transpozonlarda bulunmaktadır. Sıklıkla diğer antibiyotik direnç genleri ile, özellikle de tetrasiklin direnç genleri ile ilişkilidirler. (14,117)

Stafilokoklarda *ermA*, *ermB*, *ermC* olmak üzere üç farklı *erm* geni tanımlanmıştır.

*ermA* geni ilk olarak Wisconsin'de izole edilen *S. aureus* E 1206 suşunda saptanmıştır. Tn554 transpozonu üzerinde bulunur ve *S. aureus* kromozomundaki primer insersiyon alanı olan tek bir spesifik bölgeye girme eğilimindedir.

*ermB* Japonya'da bulunmuştur; tipik olarak,28-kilobazlık bir plazmid olan pl258'in parçası olarak, Tn551 transpozonunda bulunur.

*ermC* Bükreş'te 3.7-kb pE194 plazmidinin bir parçası olarak bulunmuştur. (118-119)

### **2.6.5.b Aktif pompa sistemi (Efluks sistemi)**

Bakterilerde makrolid direncini sağlayan bir diğer mekanizma ilacın dışarı atılımı yani eflukstur. Efluks pompaları, hemen tüm antibiyotik gruplarını da içeren

toksik maddelerin hücre içinden dış ortama atılması ile ilişkili transport proteinleridir. Bunlar antibiyotiği hücre dışına pompalayarak antibiyotiğin intraselüler konsantrasyonunu azaltıp ribozomu antibiyotikten kurtarırlar.(14,120)

Bu proteinler hem Gram pozitif hem Gram negatif bakterilerde ve ökaryot organizmalarda da bulunurlar. Pompalar bir substrat için özgül olabildiği gibi yapısal olarak farklı bileşenleri de taşıyabilir. Bu pompalar çoklu ilaca dirençten sorumludur. Prokaryot alemde beş ana efluks transport ailesi vardır. MF (major facilitator), MATE (multidrug and toxic efflux), RND (resistance-nodulation-division), SMR (small multidrug resistance) ve ABC (ATP binding cassette). Tüm bu sistemler, ATP hidrolizi ile çalışan ABC ailesi hariç, enerji kaynağı olarak proton hareket gücünü kullanırlar. (121-122)

Birtakım farklı antibiyotik direnç genleri transport proteinlerini kodlar. Altmış dört farklı kazanılmış MLS direnç geni tanımlanmıştır. Bunların *mefA*, *mefE*, *ImrA* gibi bazıları MF ailesi ile homoloji göstermektedir. Diğerleri (*msrA*, *carA*, *msrB*, *oleB*, *oleC*, *srmB*, *tlrC*, *vga*, *vgaB*) ABC transporter ailesinin üyeleridir. (14)

Gram negatif bakterilerde kromozomal olarak kodlanan ve makrolid gibi hidrofobik bileşiklere 'doğal dirence' neden olan pompaların varlığı bilinmektedir. (123) Gram pozitif koklar için makrolid ve streptogramin B direncine yol açan üç farklı pompa sistemi tanımlanmıştır. ATP bağımlı pompa proteinlerinin sentezinden *msrA*, *mef* ve *vga*, *vgaB* genleri sorumludur. (124)

*mef* (makrolid efluks) genleri, korinebakteriler, enterokoklar, mikrokoklar ve bazı streptokok türlerini içeren bazı Gram pozitif türlerde tanımlanmıştır ve 14, 15 karbonlu makrolid direncine yol açar. Genlerin birçoğu kromozomla ilişkilidir ve konjugasyonla diğer türlere geçebilir. (125)

*msrA*, *msrSA*, *msrSA'* ve *msrB* grubu, *mef* genlerinden farklıdır. *msrA* geni plasmidde kodlanır ve hem 14, 15 karbonlu makrolidlere hem de streptogramin B antibiyotiklere efluks mekanizması ile direnç sağlar.(126) *msrA* geni ilk olarak *S. epidermidis*'te tanımlanmıştır *msrA* ilişkili gen olan *msrB* de *S. xylosus*'da tanımlanmıştır. (15)

Makrolid dirençli *S. aureus* suşları direnç mekanizmalarından genellikle birini taşıırken, KNS'ler *msrA* ile birlikte *ermC* ya da diğer *erm* genlerinden birisini taşırlar. (126)

Stafilokoklarda streptograminin sinerjik A ve B komponentlerine karşı gelişen direnç hemen daima A bileşenine gelişen direnç ile ilgilidir. Streptogramin A'ya karşı direnç *msrA*'ya ek olarak iki mekanizma ile olabilir. Birincisi; *vga* (*S. epidermidis* plasmidlerinde de saptanmıştır), *vgaB* genleri, eflukstan sorumlu ATP bağımlı pompa proteinlerini kodlar. Diğer mekanizma *vatA* ve *vatB* genlerinin kodladığı asetiltransferazlardır. (10,15,127)

### **2.6.5.c Antibiyotiğin İnaktivasyonu**

Bu mekanizmalar üç grup ilahtan yalnızca birine veya bir bileşenine karşı gelişir.

*vgbB* (virginiamisin faktör B hidrolaz) geni tip B streptograminleri inaktive eden laktonazı kodlar. (14-15,127)

Streptogramin A'ya asetil grubu ekleyerek antibiyotiği modifiye eden *vat* (virginiamisin faktör A asetilasyon), *vatB*, *vatC*, *satA* ve *satG* genleri tanımlanmıştır. Bu genlerin bir çoğu plazmid kaynaklıdır ve *vat*, *vatB* ve *vgbB*, *S. aureus* plasmidlerinde saptanmıştır. (127)

Linkozamid inaktivasyonu ile ilişkili genler *linA* ve *linA'* (linkozamid nükleotidil transferaz) genleridir. Yüksek homoloji gösteren *linA* geni *S. haemolyticus*'da *linA'* *S. aureus*'ta sadece linkozamidlere direnci sağlar. (128)

*ere* (eritromisin esterifikasyon, *ereA*, *ereB*) ve *mph* (makrolid fosfotransferaz) genleri Gram pozitif koklardan ziyade *E. coli*'de saptanmıştır. (14) Ancak *S. aureus*'ta makrosiklik lakton halkasını hidrolize eden *ere* genlerinin ürünü esteraz enzimleri gösterilmiştir. Bu enzimler Gram pozitiflerde 14 ve 16 üyeli, Gram negatiflerde 14 ve 15 üyeli makrolidleri inaktive eder. (129) *mphC* genellikle diğer direnç genleri ile birlikte bulunur. *S. xylosus* ve *Staphylococcus equorum* gibi hayvan patojeni izolatlarda bulunmuştur ve klinik önemi bilinmemektedir. (7)



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. ÇALIŞMAYA ALINACAK SUŞLARIN BELİRLENMESİ

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda, Ağustos 2008–Temmuz 2009 tarihleri arasında çeşitli örneklerden izole edilen infeksiyon etkeni stafilokok suşları çalışmamıza dahil edildi. Aynı hastadan tek örnek olmak üzere toplam 82 suş çalışmada kullanıldı.

#### 3.2. STAFİLOKOK SUŞLARI İÇİN KULLANILAN BESİYERLERİ

##### 3.2.1 Kanlı Agar

Dehidre besiyeri (LabM<sup>®</sup>, İngiltere) üretici firmanın önerileri doğrultusunda hazırlandı.

Tablo V. Kanlı agarın içeriği

Pankreatik kazein	15 gr
Papaik hazmedilmiş soya unu	5 gr
NaCl	5 gr
Agar	15 gr
Distile su	1000 ml

##### 3.2.2 Skim Milk

Çalışmada bakterilerin uzun süre saklanması için Skim Milk (Difco<sup>®</sup> ABD) kullanıldı. Safılaştırılan stafilokok suşları öze ile agar yüzeyinden toplandı ve 500µl skim milk içinde homojen hale getirilerek -20°C'de dondurularak saklandı.

##### 3.2.2 Triptik Soy Agar (TSA)

-20°C'de saklanan stafilokok suşları Triptik Soy Agara (Fluka<sup>®</sup>) ekilerek 37°C'de 18 saat inkübasyonu yapıldı ve yeniden saf kültür elde edildi.

##### 3.2.3 Triptik Soy Broth

Agar dilüsyon testinde kullanılacak inokulum için bakteriler Triptik Soy Broth (Fluka<sup>®</sup>) içinde süspansiyon edilerek 35°C'de 24 saat inkübe edildi.

##### 3.2.4 Mueller Hinton Agar

MİK testi için Mueller Hinton (MH) agar (Oxoid<sup>®</sup> İngiltere) kullanıldı.

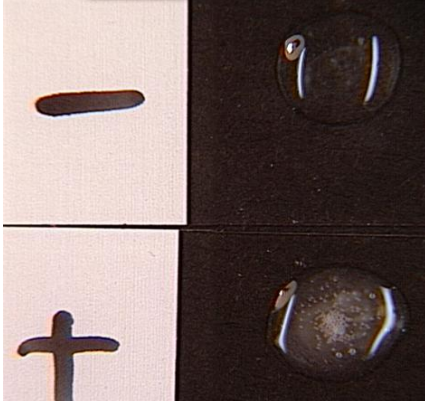
### 3.3. MİKROBİYOLOJİK YÖNTEMLER

#### 3.3.1 Gram Boyama

Kültür plağından alınan koloni lam üzerinde serum fizyolojik ile karıştırıldı. Havada kurutulup, alevde tespit edildikten sonra üzerini kaplayacak şekilde kristal viyole damlatılıp 30 sn beklendi. Su ile yıkanan lam üzerine lugol damlatılıp 60 sn beklendi ve tekrar su ile yıkandı. Alkol ile renksiz sıvı akana kadar yıkanan lam, su ile yıkandıktan sonra sulu fuksin damlatılıp 30 sn beklendi. Su ile yıkanmasının ardından kurutma kağıdı ile kurutulan preparat 100'lük büyütme mikroskop objektifi ile immersiyon yağı damlatılarak incelendi.

#### 3.3.2 Katalaz Testi

Gram boyama ile Gram pozitif kok olduğu görülen suşlara katalaz testi uygulandı. Lam üzerine bir damla %3'lük  $H_2O_2$  damlatıldı. Besiyeri yüzeyinden birkaç koloni besiyerine dokunulmaksızın öze ile alınarak  $H_2O_2$  içinde süspansiyon edildi. Katalaz enzimine sahip bakterilerin  $H_2O_2$ 'den su ve oksijen oluşturması ile hava kabarcığı oluşumu gözlemlendi. Hızlı ve kuvvetli hava kabarcığı oluşumu pozitif sonuç olarak kabul edildi. Bu test ile *Micrococcaceae* ailesinin, katalaz negatif olan streptokoklar ve enterokoklardan ayırt edilmesi sağlandı.



Resim 4. Katalaz ve koagülaz deneyleri.



#### 3.3.4 Koagülaz Testi

Koagülaz deneyi tüp ve lam şeklinde iki temel yöntem ile yapılır. Bu çalışmamızda tüp koagülaz yöntemi kullanıldı.

Bir deney tüpü içine serum fizyolojik ile 1/5 oranında sulandırılmış plazma konuldu. Kanlı agar besiyerinde 24 saatlik inkübasyon sonrasında üremiş bir koloni öze ile

alınıp plazma içerisinde ezilerek emülsifiye edildi. Tüpler 35 °C'de inkübasyonda tutulurken 4'üncü saate kadar her yarım saatte bir pıhtı oluşup oluşmadığına bakıldı. Pıhtı oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirildi.

İlk 4 saat sonunda pıhtı oluşmayan tüpler bir gece oda ısısında bekletildikten sonra yeniden okundu. Bu süre içerisinde de koagülasyon vermeyen suşlar koagülaz negatif olarak kabul edildi. (Resim 4)

### **3.3.3 *Micrococcus* türlerinin *Staphylococcus* türlerinden ayrılması**

Katalaz pozitif, Gram pozitif kok grubundan olan mikrokok ve stafilokokları ayırmak için aşağıdaki testler uygulandı.

*Modifiye Oksidaz Testi*; Dimetil Sülfoksit (DMSO) içinde tetrametil-p fenilendiamin dihidroklorid eriyiği emdirilmiş filtre kağıtları kullanıldı. Besiyerinden alınan koloni diskin üzerine sürtüldüğünde 30 saniye içinde mavi-mor renk oluşumu testin pozitif olduğunu gösterir. Oksidaz negatif suşlar Stafilokok olarak kabul edildi.

*Basitrasine Duyarlılık*; Stafilokoklar disk difüzyon yönteminde basitrasine (0.04 U) dirençlidirler. Mikrokoklar duyarlıdır ve  $\geq 10$  mm zon oluştururlar.

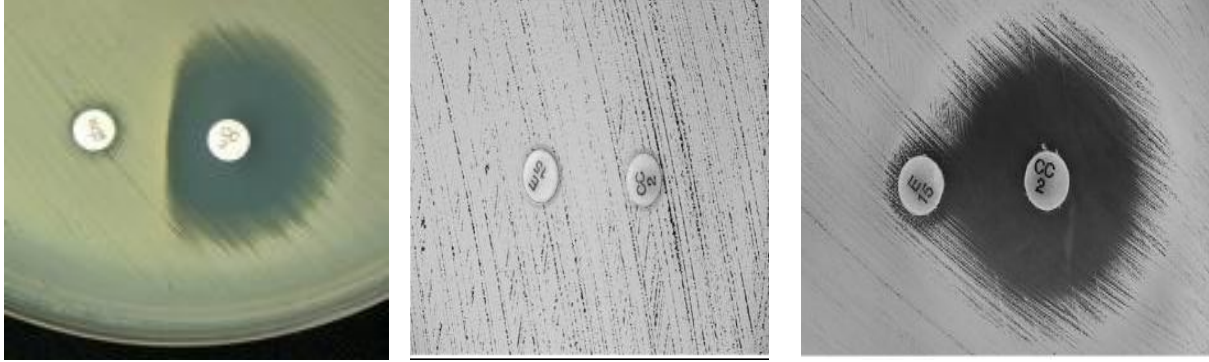
## **3.4. ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTLERİ**

### **3.4.1 D Test Yöntemi**

Çalışmada izole edilen stafilokok suşlarında eritromisin ve klindamisin duyarlılıklarını belirlemek dışında klindamisin direncinin indüksiyonunu saptamak için kuru disk difüzyon yöntemi olan Kirby-Bauer yöntemi kullanıldı. Bakteri süspansiyonu distile su içinde yaklaşık 0.5 McFarland ( $1 \times 10^8$  CFU/ml) bulanıklığa eşit olacak şekilde, direkt koloni süspansiyonu yöntemi ile hazırlandı. Hazırlanan süspansiyon kanlı agar besiyeri yüzeyine yayılarak ekildi. Ekim yapılan plağın üzerine D test için 15 µg'lık eritromisin diski ile 2 µg'lık klindamisin diski 15-20 mm aralıklar ile yerleştirildi ve 24 saat inkübe edildi.

D test değerlendirilmesi: Eritromisine dirençli iken klindamisinin eritromisine bakan yüzünde 'D' harfi şeklinde bir inhibisyon zonu oluşturan suşlar İndüklenebilir MLS<sub>B</sub> dirençli olarak kabul edildi. Hem eritromisin hem klindamisine dirençli suşlar yapısal tip MLS<sub>B</sub> dirençli olarak değerlendirildi. Eritromisin dirençli

klindamisin duyarlı izolatlarda D şeklinin olmaması M veya MS<sub>B</sub> efluks fenotipi olarak kabul edildi. (Resim 5)



Resim 5. Soldan sağa iMLS<sub>B</sub>, cMLS<sub>B</sub>, MS<sub>B</sub> fenotipleri.

### 3.4.2 Agar Dilüsyon Testi ile MİK Değerlerinin Saptanması

Agar dilüsyon ile MİK hesaplanması 'Clinical and Laboratory Standards Institute'nin (CLSI) agar dilüsyon yöntemine uygun olarak gerçekleştirildi.

#### 3.4.2.a Agar Dilüsyon Plaklarının Hazırlanması

Agar dilüsyon testinin yapılacağı MH agar otoklavdan alındıktan sonra 45°C'ye gelene kadar bekletildi. Besiyeri 45°C sıcaklığa gelince antibiyotik sulandırımı dağıtılmadan önce kontaminasyonu değerlendirmek için birkaç adet kontrol plağı döküldü.

#### 3.4.2.b Antibiyotik Konsantrasyonunun Hazırlanması

Agar dilüsyon testi için eritromisin, linkomisin, vankomisin, linezolid, gentamisin, fusidik asit, levofloksasin antibiyotikleri içeren plaklar hazırlandı. Steril distile su ile sulandırma yapılarak 128 mg/L'den 0.06 mg/L'ye dek seri dilüsyonlarla 12 konsantrasyon elde edildi. İlk tüpe katılması gereken toplam antibiyotik şu şekilde hesaplandı:

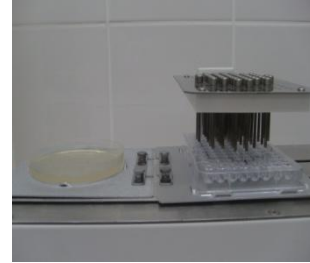
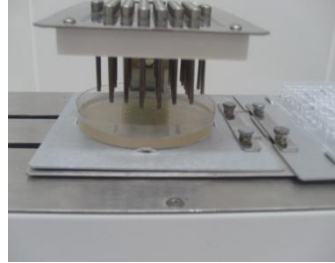
$$20 \text{ ml} \times 0.128 \text{ mg} \times 4 \text{ ml} = 10.24 \text{ mg antibiyotik}$$

Hesaplanan miktarda antibiyotik 4 ml su içeren ilk tüpe eklendi. Elde edilen bu karışımdan 2 ml sıvı, 2 ml su içeren 2. tüpe eklenerek antibiyotik konsantrasyonu ½ oranında azaltıldı. Aynı uygulamaya devam edilerek 12 tüpte 12 konsantrasyon hazırlanmış oldu.

Boş petri plaklarına, hazırlanan her konsantrasyondan 1 ml kondu. Üzerlerine 19 ml MH agar eklendi. Dairesel hareketlerle çevirmek suretiyle karıştırılan plaklar katılaşması için bırakıldı.

### **3.4.2.c İnokulum Hazırlanması**

Standardize inokulum hazırlamak için, sıvı besiyerine ekilen ve etüvde yaklaşık 12 saat inkübe edilen bakteri kültürü kullanıldı.  $10^9$ /ml bakteri içerdiği varsayılan bu kültürden 50  $\mu$ l alınarak 5ml steril distile su içerisine aktarıldı. Böylece  $\mu$ l'de  $10^4$  bakteri içeren inokulum hazırlanmış oldu. Elde edilen mikroorganizma süspansiyonları mikrodilüsyon kuyucuklarına dağıtıldı.



Resim 6. İnokülatör ile plakların inokülasyonu

### **3.4.2.d Agar Dilüsyon Plaklarının İnokülasyonu**

Bakteri süspansiyonu replikatör (Multipoint inoculator. AQS manufacturing LTD) ile plaklara dağıtıldı. (Resim 6) Kullanılacak replikatör çivisinin çapı 3mm olup 2 $\mu$ l sıvı alabilmektedir. Sonuç olarak agar yüzeyindeki son inokulum  $2 \times 10^4$  CFU olmaktadır. Steril replikatör çivileri, mikrodilüsyon kuyucuklarına uyacak şekilde plağın üzerine bırakıldı. Önce antibiyotik içermeyen kontrol plağa, sonra en düşük konsantrasyondaki (0.06  $\mu$ g/ml) plaktan başlayarak giderek artan konsantrasyondaki plaklara sırası ile inokülasyon yapıldı. En son olarak ikinci kontrol plağı kullanıldı. İnoküle edilen plaklar 37°C'de 16-18 saat inkübe edildi. Vankomisin için ise 24 saat beklendi.

### **3.4.2.e Minimal İnhibitör Konsantrasyonların Belirlenmesi**

İnkübasyon sonunda plaklar en küçük konsantrasyondan başlanarak değerlendirildi. Üremenin olmadığı ilk konsantrasyon plağı MİK değeri olarak kabul edildi. Tek koloni üremesi ya da inokulumun neden olduğu izler dikkate alınmadı.

Belirlenen MİK değerleri CLSI kriterlerine göre duyarlı ya da dirençli olarak değerlendirildi. (Tablo VI)

Tablo VI. CLSI kriterlerine göre agar dilüsyon testinde antibiyotiklerin MİK duyarlılık sınırları

Antibiyotik	Duyarlı (mg/L)	Orta duyarlı (mg/L)	Dirençli (mg/L)
Eritromisin	>2	2	≤ 1
Linkomisin	≤ 2	4-8	> 8
Gentamisin	≤ 1	-	> 1
Vankomisin	≤ 4	8	> 8
Teikoplanin	≤ 4	8	> 8
Linezolid	≤ 4	-	> 4
Fusidik Asit	< 1	1	>1
Levofloksasin	≤ 1	2-4	> 4

### 3.5. MOLEKÜLER YÖNTEMLER

İdentifikasyon, D test ve MİK agar dilüsyon yöntemlerinin uygulanmasının ardından moleküler yöntemlere geçildi.

#### 3.5.1 DNA Ekstraksiyonu

Örnek sayısı kadar ependorf tüpü numaralandırılıp (1'den 82'ye kadar), her birinin içine 1 ml steril distile su konuldu. TSA'da üreyen kolonilerden distile su ile süspansiyon hazırlandı.

10000- 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilen süspansiyonda oluşan süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet üzerine 200 µl InstaGene matrix (BioRad®) eklendi. Bu yapılırken InstaGene matrix manyetik karıştırıcıda orta hızda karıştırıldı. Pellet homojenize edildi ve pellet- instaGene karışımı su banyosunda 56°C'de 15-30 dakika inkübe edildi.

56°C su banyosundan alınan örnekler 10 sn süreyle vortekslendikten sonra 100°C'de 8 dakika bekletildi. Çıkarıldıktan sonra 10 sn vortekslendi ve 10000-12000 rpm'de 2-3 dakika santrifüj edildikten sonra -20°C'de saklandı.

PCR yapılacağı zaman -20'den çıkarılan örnekler oda ısısına geldikten sonra 10 sn vortekslendi ve 10000- 12000 rpm'de 2-3 dak santrifüj edildikten sonra 2 µl alınarak PCR için kullanıldı.

### 3.5.2 PCR Yöntemi

#### 3.5.2.a Primerlerin Hazırlanması

Alman MetaBion firmasına sipariş edilen liyofilize durumdaki primerler 100 pikomol (pmol) olacak şekilde distile su ile sulandırıldı. Ufak parmak darbeleri ile karışması sağlandı. (Tablo VII)

Tablo VII. PCR için kullanılan primerler ve referansları

Primer	Sekans	Referans
16S20	5'-AGA-GTT-TGA-TCC-TGG-CTC-AG-3'	Suau, Shagir (130-131)
16S1390	5'-GAC-GGG-CGG-TGT-GTA-CAA-3'	
nucA1	5'-GCG-ATT-GAT-GGT-GAT-ACG-GTT-3'	Shortle (132)
nucA2	5'-AGC-CAA-GCC-TTG-ACG-AAC-TAA-AGC-3'	
mecAP4	5'-TCC-AGA-TTA-CAA-CTT-CAC-CAG-3'	Oliveira (133)
mecAP7	5'-CCA-CTT-CAT-ATC-TTG-TAA-CG-3'	
ermA1	5'-TCT-AAA-AAG-CAT-GTA-AAA-GAA-3'	Sutcliffe (13)
ermA2	5'-CTT-CGA-TAG-TTT-ATT-AAT-ATT-AGT-3'	
ermB1	5'-GAA-AAG-GTA-CTC-AAC-CAA-ATA-3'	
ermB2	5'-AGT-AAC-GGT-ACT-TAA-ATT-GTT-TAC-3'	
ermC1	5'-TCA-AAA-CAT-AAT-ATA-GAT-AAA-3'	
ermC2	5'-GCT-AAT-ATT-GTT-TAA-ATC-GTC-AAT-3'	
msrA1	5'-GCA-AAT-GGT-GTA-GGT-AAG-ACA-ACT-3'	
msrA2	5'-ATC-ATG-TGA-TGT-AAA-CAA-AAT-3'	

#### 3.5.2.b PCR İçin Master Miks Hazırlanması

PCR için master miks hazırlanması ilişikteki tabloya göre yapıldı. Çalışılacak örnek sayısı hesaplandıktan sonra master miks en az 1 örnek fazlası için hesaplanarak hazırlandı.

Tablo VIII. Üniversal master miksin hazırlanma oranları.

Malzeme (Ticari)	İstenen Volüm	1 Tüp için Gereken 30 µl	Kullanılacak Son Vol. 1000
Buffer (10X)	1X	3 µl	100 µl
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2mM	2.4 µl	80 µl
dNTP (10mM)	0.2 mM	0.6 µl	20 µl
Primer 1 (100 pMol)	0.4 pMol	0.12 µl	4 µl
Primer 2 (100 pMol)	0.4 pMol	0.12 µl	4 µl
Taq Polimeraz	0.3 µl / 50 µl	0.18 µl	6 µl
dH <sub>2</sub> O	Son Volüme Tamamla	23.58 µl	786 µl
TOPLAM	-	30 µl	1000 µl

### 3.5.3 16S rRNA PCR' ı

Örneklerin tümüne tür tayini için 16S rRNA PCR çalışıldı. 69.6 nanomol (nmol) olan 16S20 (5'-AGA-GTT-TGA-TCC-TGG-CTC-AG-3'), ve 32.6 nmol olan

16S1390 (5'-GAC-GGG-CGG-TGT-GTA-CAA-3') (130-131) primerleri sırasıyla 696 µl ve 326 µl distile su eklenilerek hazırlandı.

Bir sonraki basamakta; soğutucuda muhafaza edilmiş örnekler oda ısısına geldikten sonra 10 sn vortekslendi ve 10000- 12000 rpm'de 2-3 dak santrifüj edildi. Ardından master miks örnek sayısına göre hesaplanarak hazırlandı. Mikslerle birlikte çalışılacak olan örnekler steril kabine alındı. Ardından 0.2 mL'lik tüpler, örnek adedi (1'den 82'ye) kadar numaralandırılıp, içlerine 28'er µl hazırlanılan MasterMix'ten ilave edildi. Santrifüj edilen örneklerin supernatant kısımlarından 2'şer µl alınıp, ilgili tüplerin içine eklendi ve ağızları sıkıca kapatıldı. Hazırlanan tüpler ardından termal döngüleme cihazına (Eppendorf Master Cycler Gradient) yüklenip, programlandı. Program basamakları tablo IX'da gösterildiği gibidir.

Tablo IX. 16S rRNA PCR işlemine ait ısı döngü ve süre diyagramı.

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süresi
Holding	1	94°C	5 dk.
Denaturing	35	94°C	00:30dk.
Annealing		50°C	00:30dk.
Extension		72°C	1 dk.
Holding	1	72°C	15 dk.
Holding	1	10°C	∞ dk.

Tablo X. *nucA* PCR işlemine ait ısı döngü ve süre diyagramı.

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süresi
Holding	1	94°C	1 dk
Denaturing	37	94°C	00:30dk
Annealing		55°C	00:30dk
Extension		72°C	01:30 dk
Holding	1	72°C	03:30 dk
Holding	1	4°C	∞ dk.

### 3.5.4 *nucA* PCR'ı

Tüm örnekler *S. aureus*'ta bulunan *nucA* geninin saptanması için *nucA* PCR çalışıldı. 21.7 nmol olan *nucA1* (5'-GCG-ATT-GAT-GGT-GAT-ACG-GTT-3') ve 25.8 nmol olan *nucA2* (5'-AGC-CAA-GCC-TTG-ACG-AAC-TAA-AGC-3') primerleri sırasıyla 217 µl ve 258 µl distile su ile 100 pmol olacak şekilde hazırlandı. 16S rRNA



PCR'da anlatıldığı şekilde tüpler hazırlandı. Termal döngüleme cihazına yüklenip programlandı. (Tablo X)

### 3.5.5 *mecA* PCR'ı

Örneklerin tümüne metisilin direncinin saptanması için *mecA* PCR çalışıldı. 43.1 nmol olan *mecAP4* (5'-TCC-AGA-TTA-CAA-CTT-CAC-CAG-3'), ve 57.2 nmol olan *mecAP7* (5'-CCA-CTT-CAT-ATC-TTG-TAA-CG-3') primerleri (Oliveira) sırasıyla 431 µl ve 572 µl distile su ile hazırlandı. 16S rRNA PCR'da anlatıldığı şekilde tüpler hazırlandı. Termal döngüleme cihazına yüklenip programlandı. (Tablo XI)

Tablo XI. *mecA* PCR işlemine ait ısı döngü ve süre diyagramı.

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süresi
Holding	1	95°C	5 dk.
Denaturing	35	95°C	00:30dk.
Annealing		50°C	00:30dk.
Extension		72°C	1 dk.
Holding	1	72°C	5 dk
Holding	1	10°C	∞ dk.

### 3.5.6 Makrolid Direnç Genleri İçin Primerlerin ve Master Misklerin Hazırlanması

MİK agar dilüsyon testi sonuçlarına göre makrolid direnci saptanan 45 adet suşa direnç genlerini saptamak için *ermA*, *ermB*, *ermC* ve *msrA* PCR yapıldı.

*ermA1* (5'-TCT-AAA-AAG-CAT-GTA-AAA-GAA-3'), *ermA2* (5'-CTT-CGA-TAG-TTT-ATT-AAT-ATT-AGT-3') primerleri (Sutcliffe) distile su ile 100 pmol olacak şekilde hazırlandı. 52.7 nmol olan *ermB1* (5'-GAA-AAG-GTA-CTC-AAC-CAA-ATA-3'), ve 65.0 nmol olan *ermB2* (5'-AGT-AAC-GGT-ACT-TAA-ATT-GTT-TAC-3') primerleri (Sutcliffe) sırasıyla 527 µl ve 650 µl distile su eklenilerek sulandırıldı. 37.0 nmol olan *ermC1* (5'-TCA-AAA-CAT-AAT-ATA-GAT-AAA-3'), ve 26.7 nmol olan *ermC2* (5'-GCT-AAT-ATT-GTT-TAA-ATC-GTC-AAT-3') primerleri sırasıyla 370 µl ve 267 µl distile su eklenilerek sulandırıldı. 38.4 nmol olan *msrA1* (5'-GCA-AAT-GGT-GTA-GGT-AAG-ACA-ACT-3'), ve 59.0 nmol olan *msrA2* (5'-ATC-ATG-TGA-TGT-AAA-CAA-AAT-3') primerleri (Sutcliffe) sırasıyla 384 µl ve 590 µl distile su ile

sulandırıldı. 16S rRNA PCR’da anlatıldığı şekilde tüpler hazırlandı. Termal döngüleme cihazına yüklenip programlandı. (Tablo XII, XIII, XIV, XV)

Tablo XII. *ermA* PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı.

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süresi
Holding	1	94°C	4 dk.
Denaturing	35	93°C	00:30 dk.
Annealing		50°C	00:30 dk.
Extension		72°C	00:45 dk.
Holding	1	72°C	5 dk.
Holding	1	4°C	∞ dk.

Tablo XIII. *ermB* PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı.

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süresi
Holding	1	93°C	3 dk.
Denaturing	35	93°C	00:30 dk.
Annealing		52°C	1 dk.
Extension		72°C	1 dk.
Holding	1	72°C	5 dk.
Holding	1	4°C	∞ dk.

Tablo XIV. *ermC* PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı.

Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süresi
Holding	1	94°C	5 dk.
Denaturing	35	94°C	1 dk.
Annealing		50°C	1 dk.
Extension		72°C	1 dk.
Holding	1	72°C	5 dk.
Holding	1	4°C	∞ dk.

Tablo XV. *msrA* PCR işlemine ait ısıl döngü ve süre diyagramı.

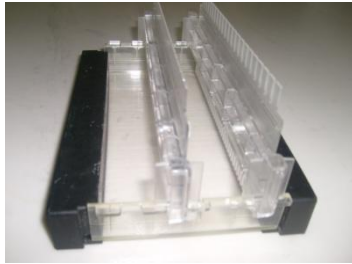
Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süresi
Holding	1	94°C	5 dk.
Denaturing	35	94°C	00:30 dk.
Annealing		50°C	00:30 dk.
Extension		72°C	00:30 dk.
Holding	1	72°C	7 dk.
Holding	1	10°C	∞ dk.

Termal döngüleme cihazlarında PCR işlemleri tamamlanan örnekler; elektroforez (yürütme) için laboratuvarın diğer bir bölümüne alındı.

### **3.5.7 Elektroforez İşlemi**

#### **3.5.7.a Elektroforez Jelinin Hazırlanması**

Kullanılacak olan jeli hazırlamak için; hassas terazide 2 gr. agaroz (Sigma®) tartılıp, 500 ml'lik bir şişe içerisine konuldu. Ardından; bir dereceli silindir mezür ile 100 ml ölçülen 0.5X TBE Buffer (Tris-Borik Asit-EDTA) (bkz.EK1), şişe içerisindeki agarozun üzerine ilave edilerek, karıştırıldı. Mikrodalga fırında yaklaşık 3-5 dk. kaynatılan karışım 50°C'ye kadar soğutuldu. Halen sıvı halde olan karışım, jel kalıbının içerisine yavaşça, kabarcık bırakmayacak şekilde döküldü ve içerisine yükleme kuyucuklarını oluşturacak olan taraklar yerleştirilerek, 15-20 dk. oda ısısında soğumaya bırakıldı. Jel katılaştıktan sonra elektroforez tankına dikkatlice yerleştirildi.



Resim 7. Elektroforez jelinin hazırlanması ve elektroforez cihazı

#### **3.5.7.b Örneklerin Yüklenmesi**

Daha önce hazırlanan 6X'lik elektroforez boyasından (loading dye) (bkz. EK2) 1 µl alınıp parafilm üzerine kondu. Amplikondan 5 µl alınarak yükleme boyası ile karıştırıldı. Karışımın hepsi pipet ile alınarak jeldeki uygun pozisyondaki kuyucuğa yüklendi. Oluşan bantların boylarının tespiti için örneklerden önceki ilk kuyucuğa marker olarak PstI enzimi ile kesilmiş lambda faj DNAsı konuldu. (bkz.EK3)

#### **3.5.7.c Yürütme (Elektroforez)**

Hazırlanmış olan jele, istenilen örnekler ve markerların yüklemesi yapıldıktan sonra, elektroforez tankının kapağı kapatılıp, elektrotlar uygun pozisyonlara bağlanarak, 100 Volt (V)'luk akımda 30 dk. yürütüldü.

### 3.5.7.d Görüntüleme

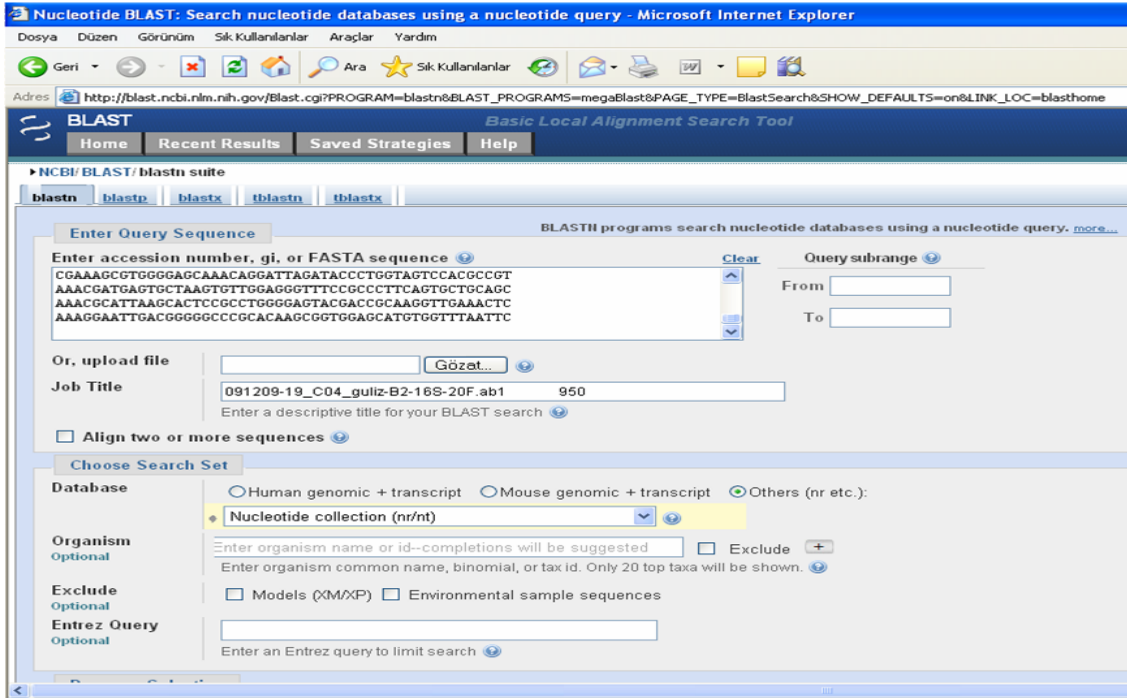
30 dk. lık elektroforezden sonra jel dikkatli bir şekilde elektroforez tankından çıkartılarak etidiyum bromide banyosunda (bkz.EK4) 15 dk boyanmaya yatırıldı. Süre sonunda boyanan jel, bilgisayara bağlı durumdaki transilluminatör cihazındaki (Vilber Lourmat) uygun odacığa yerleştirilerek, UV ışığı altında fotoğraflanıp, değerlendirildi.

### 3.5.8 Amplikonların Sekanslamalarının Yapılması

Yapılan tüm örnek tiplendirilmesi, doğrulamalar, PCR işlemleri ve yürütmelerin ardından, amplikonlar, sekanslarının yapılması ve daha detaylı olarak tiplendirilmek üzere Güney Kore'deki Macrogen firmasına gönderildi. Bu firma sekans için, ABI prism 3700 DNA analyser, (Applied Biosystem, CA) cihazını kullanmıştır.

### 3.5.9 Sekans analizi

Örneklerin sekans dizi sonuçları elektronik posta yolu ile bildirilmiştir. Her bir örnek için aşağıdaki internet sayfası kullanılarak mikroorganizmanın tür düzeyinde adlandırılması yapıldı.

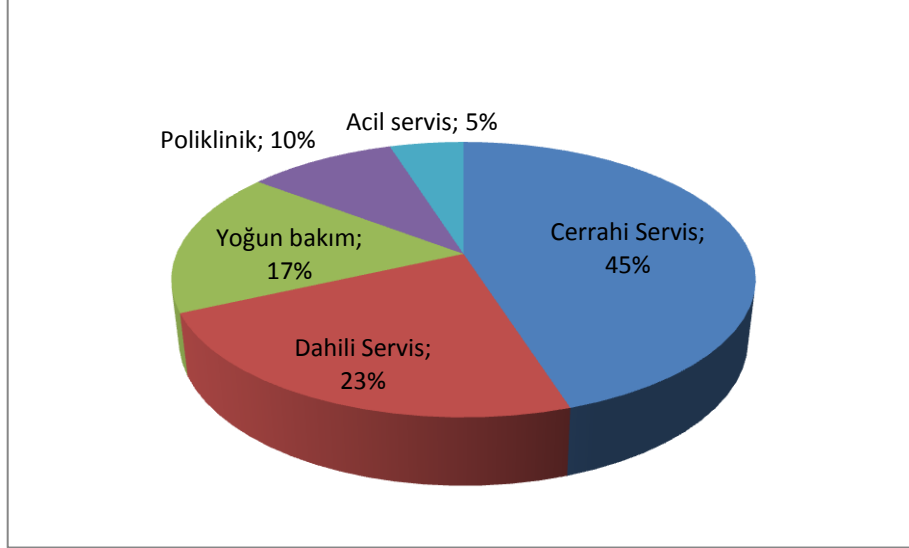


Resim 8 . Sekans analizinin internet üzerinden yapılması.

[http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST\\_PROGRAMS=megaBlast&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&SHOW\\_DEFAULTS=on&LINK\\_LOC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome)

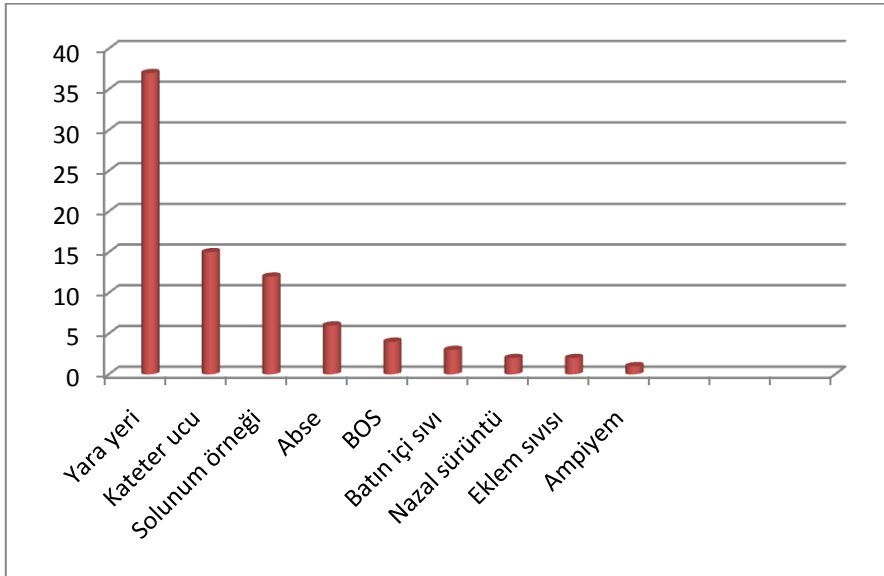
#### 4. BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen Stafilokok suşlarının 37'si cerrahi birimler, 19'u dahili bilimler, 14'ü yoğun bakım, 8'i poliklinik ve 4'ü acil servis hastalarından izole edilmiştir. (Şekil 4)



Şekil 4. Suşların izole edildiği hastaların kliniklere göre dağılımı

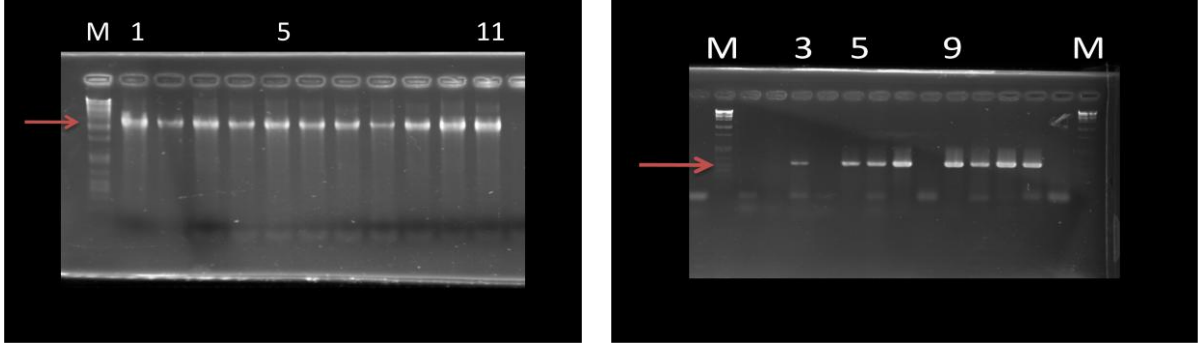
Suşların izole edildikleri klinik materyallere göre dağılımı şekilde görülmektedir. Buna göre stafilokokların en sık izole edildiği örnek yara yeri, bunu takiben kateter ucu olarak belirlenmiştir. (Şekil 5)



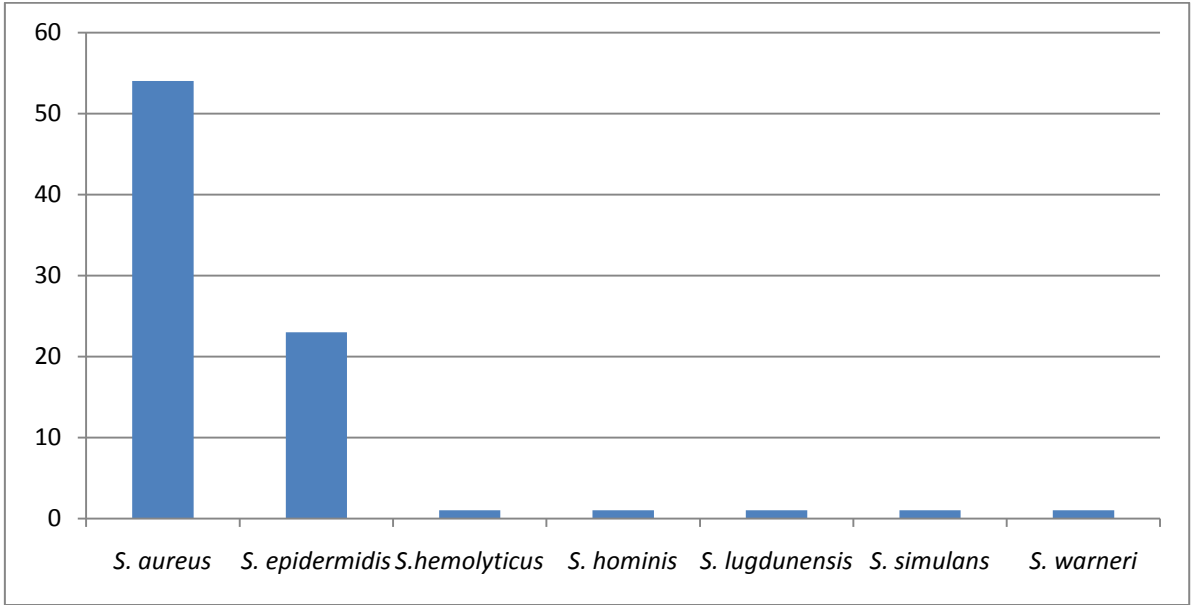
Şekil5. Suşların izole edildiği klinik materyale göre dağılımı.

Mikrobiyolojik yöntemlerin yanı sıra 16S rRNA sekans analizi ve *nucA* PCR gibi moleküler yöntemler ile tür düzeyinde tanımlama yapılan stafilokokların

%66'sı (n=54) *S.aureus*, %34'ü (n=28) KNS olarak tanımlandı. KNS olarak tanımlanan bakteriler *S. epidermidis* (n=23), *S. haemolyticus* (n=1), *S. hominis* (n=1), *S. lugdunensis* (n=1), *S. simulans* (n=1), ve *S. warneri* (n=1) olarak adlandırılmıştır. (Şekil 6, 7)

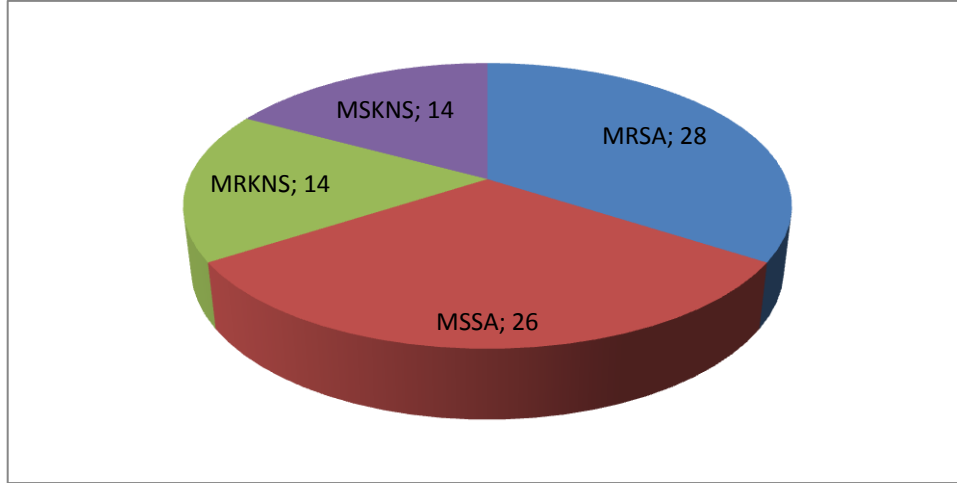


Şekil6. 16S rRNA ve nucA PCR jel elektroforez görüntüleme örnekleri. M:marker, 1-11 pozitif 16S rRNA sonuçları ve 3,5,6,7,9,10,11,12 nolu örneklerde nucA pozitifliği



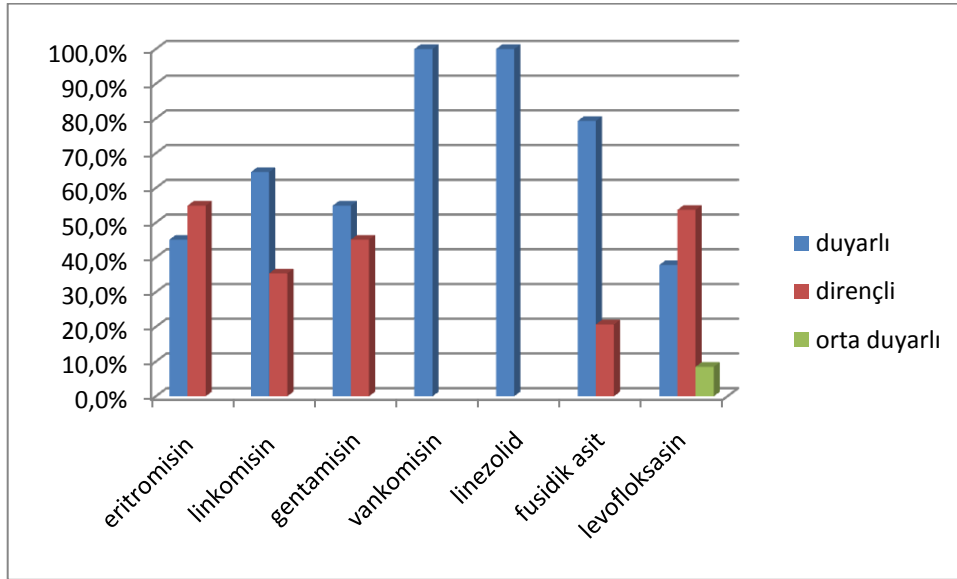
Şekil 7. Tür düzeyinde stafilkokların dağılımı.

*S. aureus* suşlarının %51'i (n=28) metisiline dirençli iken %49'u (n=26) metisiline duyarlı bulundu. KNS suşlarının %50'si (n=14) metisiline dirençli bulundu. Metisiline dirençli suşlar *S. hemolyticus*, *S. hominis* ve *S. epidermidis* (n=12) suşlarından oluşmaktaydı. (Şekil 8)



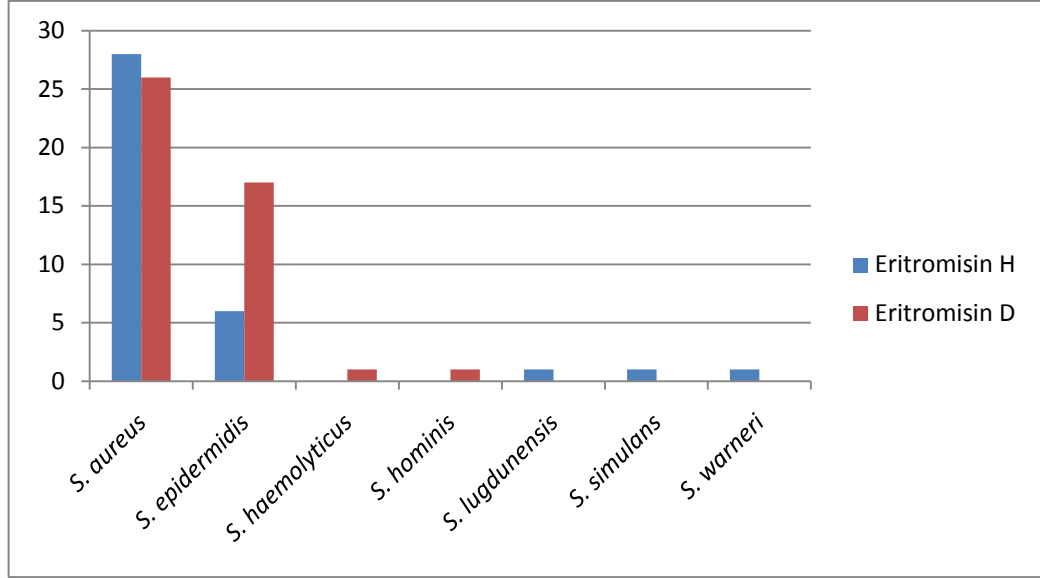
Şekil 8 . Türlerin metisilin direncine göre dağılımı. MRKNS: Metisiline dirençli KNS; MSKNS: Metisiline duyarlı KNS.

MIK değerleri çalışılan suşların hiç birinde vankomisin ve linezolid direnci saptanmadı. Suşların %54.9'u (n=45) eritromisine dirençli iken linkozamid direnci %35.4 (n=29) olarak saptandı. Gentamisin direnç oranı %45.1 (n=37), fusidik aside direnç oranı %20.7 (n=17) ve levofloksasine direnç oranı %53.7 (n=44), levofloksasine orta duyarlı olanların oranı %8.5 (n=7) olarak saptandı. (Şekil 9)



Şekil 9. MIK agar dilüsyon testine göre antibiyotiklere direnç oranları

Eritromisin'e dirençli saptanan suşların %57.7'si (n=26) *S.aureus*, %42.3'ü *S.epidermidis* (n=17) olarak saptandı. *S.hemoliticus* (n=1) ve *S.hominis* (n=1) eritromisine dirençli saptanan diğer suşlardı. (Şekil 10)



Şekil 10. Eritromisin direncine göre suşların dağılımı. H: Hassas, D: Dirençli

Eritromisine dirençli suşların %44.5'i (n=20) MRSA, %13.4'ü (n=6) MSSA, %24.5'i (n=11) MRKNS ve %17.3'ü (n=8) MSKNS olarak tanımlandı.

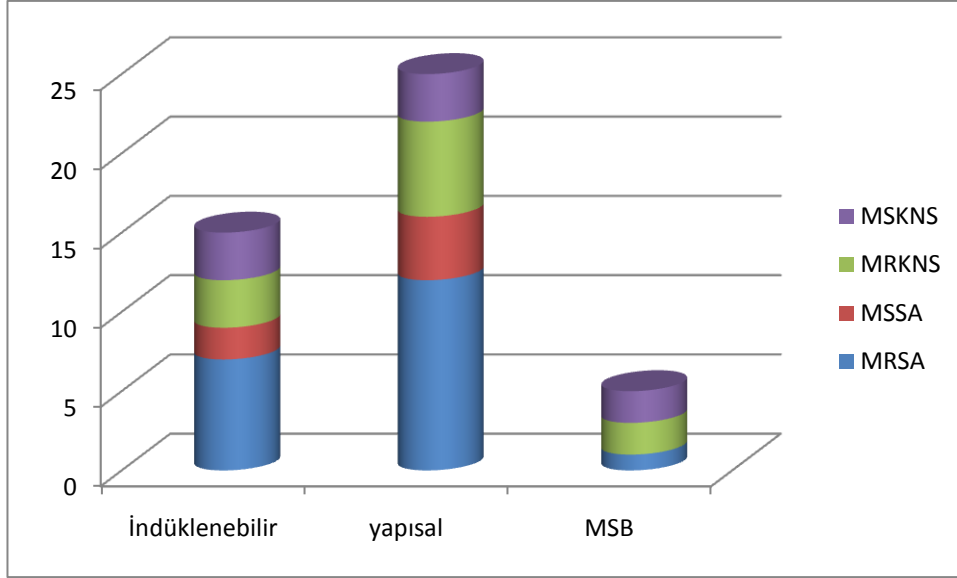
Makrolid direnci olan bakterilerde D test sonuçlarına göre direnç fenotipleri belirlendi. Çalışılan suşların %18.3'ünde (n=15) D test pozitif saptandı. %6.1'inde (n=5) D test negatif ( $MS_B$  fenotipi) saptandı.  $cMLS_B$  olan izolatların oranı % 30.5 (n=25) idi. Suşların %41.5'i (n=34) hem eritromisine hem de klindamisine duyarlı bulundu. Eritromisine duyarlı iken sadece linkomisine direnç gösteren 3 adet suş (%3.6) saptandı.

Tablo XVI. D test sonuçları. (Makrolid direnci olan suşlarda)

Fenotip	Direnç fenotipi	Sayı	Yüzde, %
D test (+)	$iMLS_B$	15	18.3
D test (-)	$MS_B$	5	6.1
Dirençli	$cMLS_B$	25	30.5
Duyarlı	-	34	41.5

D test sonucunda direnç fenotipine göre mikroorganizmaların tür dağılımı şu şekilde belirlendi. İndüklenebilir direnç gösteren 15 suşun %46.6'sı (n=7) MRSA, %20'si (n=3) MSKNS, %20'si (n=3) MRKNS, %13.4'ü (n=2) MSSA idi. Yapısal dirençli suşların %48'i (n=12) MRSA, %24'ü (n=6) MRKNS, %16'sı (n=4) MSSA ve %12'si (n=3) MSKNS idi.  $MS_B$  fenotipinde olanların %40'ünün (n=2) MRKNS, %40'ünün (n=2) MSKNS ve %20'sinin (n=1) MRSA olduğu saptandı. (Şekil 11)





Şekil 11. Direnç fenotipine göre türlerin dağılımı.

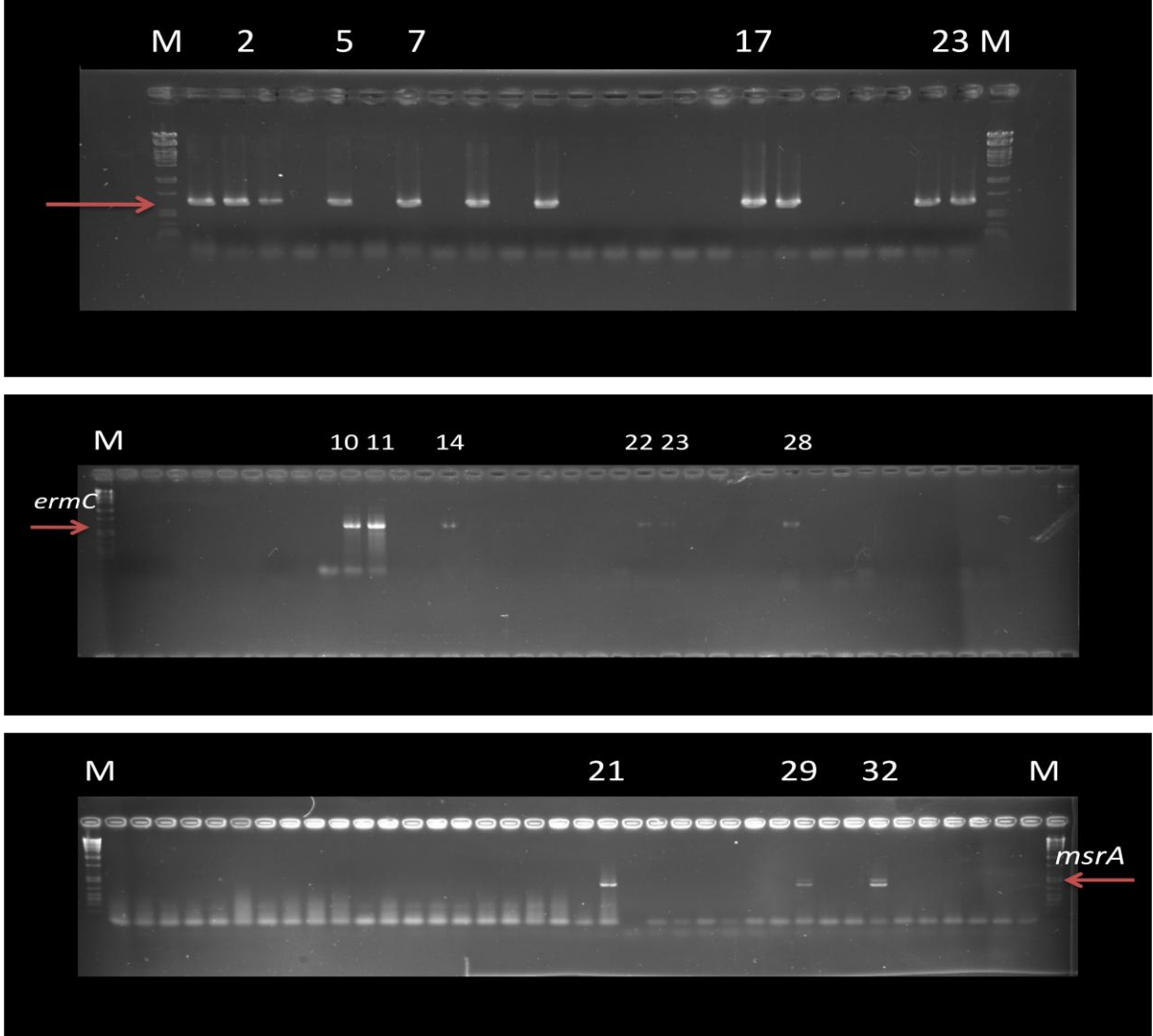
Türlere göre direnç fenotiplerinin dağılımında; *S.aureus* suşlarının %29.6'sında (n=16) yapısal, %16.6'sında (n=9) indüklenebilir, %1.6'sında (n=1) MS<sub>B</sub> fenotipi direnç görüldü. KNS suşları için bu oranlar sırası ile %32.1 (n=9), %21.4 (n=6) ve %14.3 (n=4) olarak bulundu.

MRSA suşlarının %25'inde (n=7) iMLS<sub>B</sub> direnci, %42.9'unda (n=12) yapısal direnç ve %3.5'inde (n=1) MS<sub>B</sub> fenotipi direnç belirlendi. Bu oran MSSA'da %15.3 (n=4) yapısal direnç, %7.7 (n=2) indüklenebilir direnç şeklinde idi. MSSA suşlarında MS<sub>B</sub> fenotipinde direnç gözlenmemiştir. MRKNS suşları için %21.4 (n=3) indüklenebilir, %42.8 (n=6) yapısal direnç, %14.3 (n=2) MS<sub>B</sub> fenotipinde direnç saptandı. MSKNS suşlarının %21.4 (n=3) indüklenebilir, %21.4 (n=3) yapısal, %14.3 (n=2) MS<sub>B</sub> tipi direnç oranları ile MRKNS suşlarına benzer direnç sergilediği belirlendi. (Tablo XVII)

Tablo XVII. Metisiline direnç durumuna göre MLS<sub>B</sub> direnç fenotiplerinin dağılımı.

İzolat	E-R (% (n))	cMLS <sub>B</sub> (% (n))	iMLS <sub>B</sub> (% (n))	MS <sub>B</sub> (% (n))
MRSA (n=28)	71.4 (20)	42.9 (12)	25 (7)	3.5 (1)
MSSA (n=26)	23 (6)	15.3 (4)	7.7 (2)	0
MRKNS(n=14)	78.5 (11)	42.8 (6)	21.4 (3)	14.3 (2)
MSKNS(n=14)	57.1 (8)	21.4 (3)	21.4 (3)	14.3 (2)
Toplam	54.9 (45)	30.5 (25)	18.3 (15)	6.1 (5)

Makrolid direnci saptanan toplam 45 adet izolata direnç mekanizmalarının belirlenmesi için *ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA* PCR yapıldı.



Resim 9. *ermA*, *ermC* ve *msrA* PCR için bazı örnekler.

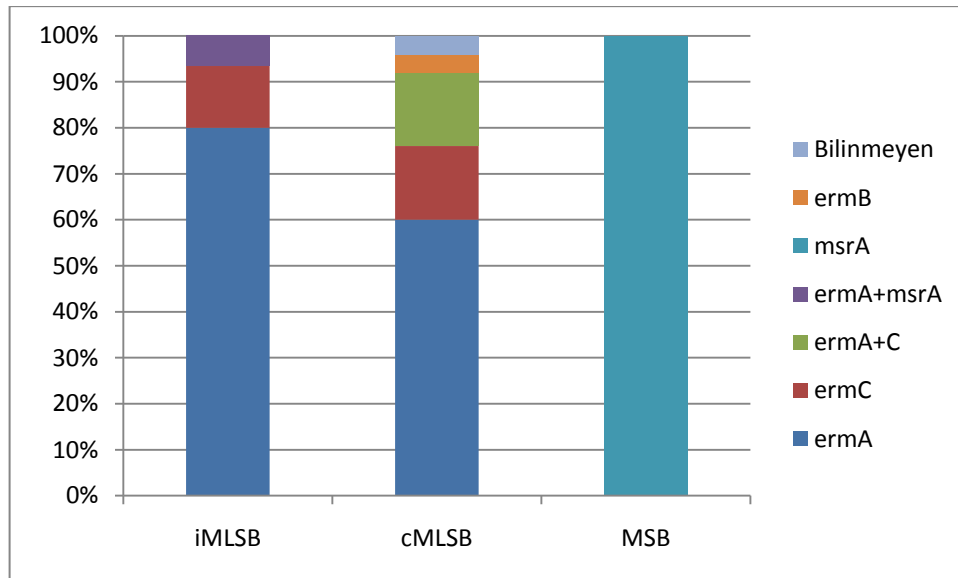
Mikroorganizma tipi ve bulunan direnç genleri tablo XVII'de verilmiştir. Makrolid dirençli bir *S.aureus* suşunda direnç mekanizması belirlenememiştir. *ermB* geni sadece bir *S.aureus* suşunda bulunmuştur. *ermC* geni tek başına *S.epidermidis* suşlarında saptanırken *S.aureus* suşlarında *ermA* ile birlikte saptanmıştır. Bir *S.epidermidis* suşunda *ermA* ile birlikte *msrA* geni de saptanmıştır.

Toplamda *ermA* geninin prevalansı %32.9 (n=27), *ermB* %1.2 (n=1), *ermC* % 7.3 (n=6), *msrA* %6.1 (n=5), *ermA+C* %4.9 (n=4), *ermA+msrA* %1.2 (n=1) olarak hesaplanmıştır.

Tablo XVIII. Türler gere direnç mekanizmalarının dağılımı.

Türler	Direnç mekanizmaları							
	Toplam	<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	<i>ermC</i>	<i>msrA</i>	<i>ermA+C</i>	<i>ermA+msrA</i>	Bilinmeyen
<i>S. aureus</i>	26	20	1		1	3		1
<i>S. epidermidis</i>	17	6		6	3	1	1	
<i>S. hominis</i>	1	1						
<i>S. haemolyticus</i>	1				1			

Fenotip ve genotip ilişkisi değerlendirildiğine indüklenebilir direnç fenotipi gösteren suşların %80'inde (n=12) *ermA*, %13.4'ünde (n=2) *ermC* geni saptanmıştır. *ermA* ve *msrA* genini birlikte taşıyan ve indüklenebilir direnç fenotipi gösteren bir suş tespit edilmiştir. Yapısal direnç fenotipi gösteren toplam 25 suşun %60'ı (n=15) *ermA*, %16'sı (n=4) *ermC*, %16'sı (n=4) *ermA+C*, %4'ü (n=1) *ermB* geni taşımaktadır. Bir tanesinde ise hiçbir direnç geni saptanamamıştır. D test negatif olan yani MS<sub>B</sub> fenotipi gösteren beş suşun tümünde *msrA* geni bulunmuştur.



Şekil 12. MLS<sub>B</sub> direnç fenotiplerine göre genotiplerin dağılımı

Makrolid direnç fenotipine göre metisilin, gentamisin, levofloksasin ve fusidik asid duyarlılıkları tabloda verilmiştir.

Tablo XXIX. Direnç fenotipine göre diğer antibiyotiklerin direnç durumları.

	Gentamisin %(n)		Levofloksasin %(n)			Fusidik asit %(n)	
	<i>dirençli</i>	<i>duyarlı</i>	<i>dirençli</i>	<i>duyarlı</i>	<i>Orta duyarlı</i>	<i>dirençli</i>	<i>duyarlı</i>
E-R	60 (27)	40 (18)	66.6(30)	20(9)	13.4(6)	35.5(16)	64.5(29)
<i>iMLS<sub>B</sub></i>	40 (6)	60 (9)	60 (9)	13.4(2)	26.6(4)	26.6 (4)	73.4(11)
<i>cMLS<sub>B</sub></i>	76 (19)	24 (6)	72(18)	20 (5)	8(2)	28 (7)	72 (18)
<i>MS<sub>B</sub></i>	40 (2)	60 (3)	60 (3)	40 (2)	0	100 (5)	0
E-S	27 (10)	73 (27)	31.8 (14)	71 (22)	2.8(1)	2.7 (1)	97.3(36)
Toplam	45.1(37)	54.9(45)	53.7 (44)	37.8(31)	8.5(7)	20.7(17)	79.3(65)

E-R: Eritromisine dirençli, E-S: Eritromisine duyarlı

## 5.TARTIŞMA

Stafilokoklar hem toplum hem de hastane kaynaklı infeksiyonlarda uzun yıllardan beri önemini kaybetmeyen mikroorganizmalardan biridir. Tıptaki gelişmelerle birlikte santral kateter, kalp kapağı, eklem protezi gibi yabancı cisim kullanımı yaygınlaşmış ve KNS'ler de sorun mikroorganizmalar arasında yerini almıştır. Penisilinin keşfinden bu yana stafilokoklar, çeşitli mekanizmalarla direnç geliştirerek tedavide sorun oluşturmaya devam etmektedirler. Stafilokokal infeksiyonların tedavisi için yeni antibiyotikler gündeme gelse de klindamisin gibi daha eski, ancak etkinliği iyi olan antibiyotikler göz önünde bulundurulmalıdır. Hem metisiline dirençli hem de metisiline duyarlı stafilokokal infeksiyonlarda klindamisin iyi bir tedavi seçeneğidir. Kan ve dokuda ulaşılan konsantrasyonlarının iyi olması dışında böbrek yetmezliğinde doz ayarlaması gerektirmemesi önemli bir avantajdır. Ayrıca penisilin allerjisi olan hastalarda alternatif tedavi seçeneğini oluşturur.

Klindamisin ile tedavide dikkat edilmesi gereken nokta iMLS<sub>B</sub> direncidir. iMLS<sub>B</sub> direncine sahip stafilokok infeksiyonlarında klindamisin kullanımı ile klinik başarı ve başarısızlıklar bildirilmiştir. Linkozamid tedavisi sırasında duyarlı suşların yok edilmesi ile yapısal dirençli suşlar seleksiyona uğramaktadır. En iyi seçim şiddetli infeksiyonlarda linkomisin kullanımından kaçınmaktır. (9)

İndüklenebilir klindamisin direnci makro veya mikrodilüsyon veya agar dilüsyon testi gibi in vitro duyarlılık testleri ile saptanamamaktadır. Eritromisine dirençli ancak klindamisin veya linkomisine duyarlı bir suş saptanırsa iMLS<sub>B</sub> direncini saptamak için D test uygulanmalıdır. Bu suş ya *erm* genine ya da effluks pompalarına sahiptir. D test negatif ise klindamisin ve linkomisin duyarlı rapor edilir. Fakat D test pozitif ise linkozamidlere dirençli şeklinde rapor edilir. Bir başka seçenek ise linkozamidlere duyarlı bildirip uyarı notu eklemektir. (9,134)

MLS<sub>B</sub> direnci ülkeden ülkeye, hatta aynı ülkede merkezler arasında bile farklılık gösterebilmektedir. Ülkemizde ve yurt dışında stafilokoklarda MLS<sub>B</sub> direnç prevalansı ve stafilokokların çeşitli antibiyotiklere direnci ile ilgili yapılmış birçok çalışma mevcuttur.

Çalışmamızda 54 *S. aureus*, 28 KNS'den oluşan toplam 82 suшта makrolid direnci %54.9 (n=45) olarak bulunmuştur. Makrolid direnci olan suşların %44.5'i MRSA, %24.5'i MRKNS, %17.3'ü MSKNS ve %13.4'ü MSSA olarak belirlenmiştir. D

test sonucunda direnç fenotip oranlarımız %30.5 cMLS<sub>B</sub>, %18.3 iMLS<sub>B</sub>, %6.1 MS<sub>B</sub> olarak belirlenmiştir. MRSA'da cMLS<sub>B</sub> direnci %42.9, iMLS<sub>B</sub> direnci %25 ve MS<sub>B</sub> direnci %3.5; MSSA'da cMLS<sub>B</sub> %15.3, iMLS<sub>B</sub> %7.7, MS<sub>B</sub> %0 bulunmuştur. MRKNS suşları için oranlar cMLS<sub>B</sub> %42.8, iMLS<sub>B</sub> %21.4, MS<sub>B</sub> %14.3; MSKNS suşları için iMLS<sub>B</sub> %21.4, cMLS<sub>B</sub> %21.4. MS<sub>B</sub> %14.3 olarak bulunmuştur.

Ülkemizde Azap ve arkadaşlarının (135) yaptıkları bir çalışmada toplam 408 stafilokok suşunda D test ile indüklenebilir klindamisin direnci araştırılmıştır. 105 MRSA'nın %5.7'sinde, 111 MSSA'nın %3.6'sında, 94 MRKNS'nin %30.8'inde, 98 MSKNS'nin %11.2'sinde iMLS<sub>B</sub> fenotipi saptanmıştır. cMLS<sub>B</sub> oranları sırasıyla %64, %4.6, %45.8 ve %14.3 olarak bulunmuştur. Ayrıca D testte eritromisin yerine azitromisin koyduklarında sonuçlarda bir farklılık görülmemiştir.

Uyanık ve arkadaşlarının (136) yaptığı çalışmada 107 *S. aureus* suşunun 57'si (%53) MRSA, 50'si (%47) MSSA olarak bulunmuştur. 32 (%56) MRSA, 2 (%4) MSSA suşunda eritromisin direnci tespit edilmiş ve bunlara D test yapılmıştır. MRSA'da cMLS<sub>B</sub> oranı %21, iMLS<sub>B</sub> %30 ve MS<sub>B</sub> direnci %5 olarak bulunmuştur. MSSA'da %4 oranında iMLS<sub>B</sub> direnci saptanırken yapısal ve MS<sub>B</sub> direnci saptanmamıştır.

Delialioğlu ve arkadaşları (137) klinik örneklerden izole edilen 230 *S.aureus* ve 291 KNS olmak üzere toplam 521 suş ile çalışmışlardır. *S.aureus*'ların %24.3'ünün cMLS<sub>B</sub>, %7.8'inin iMLS<sub>B</sub>; KNS'lerin ise %40.2'sinin cMLS<sub>B</sub>, %14.7'sinin iMLS<sub>B</sub> ve %18.2'sinin MS<sub>B</sub> fenotipi gösterdiğini bulmuşlardır. Diğer yandan MRSA'da %43.7 cMLS<sub>B</sub>, %5.4 iMLS<sub>B</sub> direnci bulunmuştur. MSSA'da %10.7 iMLS<sub>B</sub> direnci saptanırken yapısal ve MS<sub>B</sub> fenotipinde direnç gözlenmemiştir. MRKNS'lerin %53.3'ü cMLS<sub>B</sub>, %15'i iMLS<sub>B</sub>, %13.3'ü MS<sub>B</sub> fenotipi göstermiştir. MSKNS suşlarında ise %18.9 cMLS<sub>B</sub>, %14.4 iMLS<sub>B</sub>, %26.1 MS<sub>B</sub> fenotipi görülmüştür.

Çolakoğlu ve arkadaşları (138) 594 *S. aureus* suşunda iMLS<sub>B</sub> prevalansını araştırmışlardır. Eritromisin dirençli, klindamisin duyarlı 151 suşa D test uygulamışlardır. Sonuçta iMLS<sub>B</sub> prevalansı %19.2 olarak saptanmıştır. Bu oranı MRSA için %27.6, MSSA için %12.1'olarak bildirmişlerdir.

Trabzon'da Yılmaz ve arkadaşlarının (107) çalışmasında ise 883 (%52.3) *S.aureus* ve 804 (%47.7) KNS olmak üzere 1687 suş değerlendirilmiştir. Bu suşların %27.5'ini MRSA, %24.8'ini MSSA, %36.1'ini MRKNS ve %11.6'sını MSKNS

oluşturuyordu. Tüm suşlar arasında makrolid direnci olanların oranı %30.9 olarak bulunmuştur. *S. aureus* için makrolid direnç oranı %12.6, KNS için %18.3'tür. Bu suşlara D test uygulanmıştır. Tüm suşlar arasında iMLS<sub>B</sub> oranı %21.9 ve yapısal direnç oranı %28.3 bulunmuştur. Bu çalışmada metisilin dirençli suşların hem yapısal hem de indüklenebilir direnci daha yüksek oranda sergiledikleri bildirilmiştir. MRSA'da iMLS<sub>B</sub> %24.4 ve cMLS<sub>B</sub> %44.2; MSSA'da iMLS<sub>B</sub> %14.8 ve cMLS<sub>B</sub> %4.5 olarak bulunmuştur. MRKNS'de iMLS<sub>B</sub> % 25.7, cMLS<sub>B</sub> %38.3; MSKNS'de ise iMLS<sub>B</sub> %19.9 ve cMLS<sub>B</sub> %10.2 olarak bulunmuştur.

Isparta'da yapılan ve 160 *S.aureus* ve 372 KNS içeren bir çalışmada makrolid direnç oranı %38.5 olarak bulunmuştur. Makrolid direncinin %44.4 oranı ile KNS'larda daha sık görüldüğü saptanmıştır. Tüm suşlar arasında iMLS<sub>B</sub> oranı %13.9, cMLS<sub>B</sub> oranı %24.6 olarak bulunmuştur. Metisilin direncine göre değerlendirildiğinde MRKNS'de %57.5, MRSA'da %49.2, MSKNS'de %29.1 ve MSSA'da %8.9 makrolid direnç oranı saptanmıştır. cMLS<sub>B</sub> direnci MRKNS'de %45.5, MRSA'da %23.7, MSKNS'de %14, MSSA'da %2 bulunmuştur. iMLS<sub>B</sub> direnci ise MRSA'da %25.4, MSKNS'da %15.1, MRKNS'de %12, MSSA'da %8.9 bulunmuştur. (11)

Hastanemizde 2001 yılında Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim dalında Aydın ve arkadaşları (139) tarafından stafilokokların antibiyotik direnci üzerine yapılan bir çalışmada ise 274 *S. aureus* ve 172 KNS olmak üzere toplam 446 suş değerlendirilmiştir. Kirby- Bauer disk difüzyon yöntemi ile *S. aureus* kökenlerinin %10.9'u, KNS'lerin %38.8'i oksasiline dirençli bulunmuştur. *S. aureus* suşlarında eritromisin ve klindamisin direnci sırasıyla %21.5 ve %14.8 iken; KNS'da %54.8 ve %44.4 oranında saptanmıştır. *S. aureus* ve KNS'lerde direnç oranları sırasıyla siprofloksasin için %7.3 ve %25; fusidik asit için %5.7 ve % 28.1 olarak bulunmuştur.

İstanbul'da Diler ve arkadaşları (140) tarafından hastane ve toplum kaynaklı 1200 stafilokok suşunu içeren bir çalışma yapılmıştır. Bunların 816'sını *S. aureus*, 384'ünü KNS'ler oluşturmaktaydı. *S. aureus* suşlarının 334'ü hastane kökenleri olup, metisilin direnci %30; 482'si toplum kaynaklı olup metisilin direnci %11 olarak bulunmuştur. KNS için metisilin direnci hastane suşlarında %36, toplum suşlarında %19 oranında saptanmıştır. Disk difüzyon yöntemi ile MRSA'da eritromisin direnci %56, klindamisin direnci %32; MSSA için eritromisin direnci %14, klindamisin direnci %13 olarak hesaplanmıştır. MRKNS'lerde eritromisin direnci %17

ve klindamisin direnci %16 oranında saptanmıştır. MSKNS suşlarının %24'ünde eritromisine, %17'sinde klindamisine direnç saptanmıştır.

Gazi üniversitesinde yapılan bir çalışmada kan örneklerinden izole edilen 218 KNS suşu ele alınmıştır. Bunların 84'ü (%38.5) metisiline duyarlı iken 134'ü (%61,5) dirençli bulunmuştur. Disk difüzyon yöntemi ile azitromisin kullanılarak makrolid direnci değerlendirilmiştir. MSKNS ve MRKNS'de azitromisin direnci sırasıyla %24 ve %75; Fusidik asit direnci %11 ve %39; siprofloksasin direnci %5 ve %53; gentamisin direnci 55 ve %48 olarak bulunmuştur. Metisiline dirençli suşlarda duyarlılara kıyasla anlamlı derecede yüksek direnç oranları saptanmıştır. (141)

İstanbul Üniversitesi'nden Arıdoğan ve arkadaşları, (142) yaptıkları bir çalışmada sadece *S.aureus* suşlarını içeren 144 klinik örneğin sonuçlarını bildirmişlerdir. Oksasilin disk testi ile %41'i MRSA, %59'u MSSA olarak belirlenmiştir. Eritromisin direnci MSSA'da %19, MRSA'da %64; Klindamisin direnci MSSA'da %6, MRSA'da %45 bulunmuştur. Eritromisin ve klindamisin dirençli suş oranı %20; MS<sub>B</sub> fenotipi gösteren suş oranı %17 olarak bildirilmiştir.

Doğanay'ın (143) Gram pozitif kokları içeren bir çalışmasında suşların 71'ini *S. aureus*, 97'sini KNS, diğerlerini enterokok ve streptokoklar oluşturmaktaydı. *S. aureus* için metisilin direnci %23.9, KNS için %38.8 bulunmuştur. *S.aureus*'da eritromisin %37.5, klindamisin %9.6 ve *S.epidermidis*'de eritromisin %74.7, klindamisin %48.7 oranında dirençli bulunmuştur.

Yurdakul ve arkadaşlarının (144) çalışmasında hemokültürlerden izole edilen 30 adet *S. aureus* suşunda antibiyotik duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi ile araştırılmıştır. Suşların dördü (%13.3) MRSA, 26'sı (%86.7) MSSA olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada saptanan eritromisin direnci %39.9 olarak bulunmuştur.

MLS<sub>B</sub> direncinin araştırıldığı başka bir çalışmada 161'i MRSA, 58'i MSSA olan toplam 219 *S. aureus* suşunda, disk difüzyon testinde eritromisin direnci görülenlere D test yapılmıştır. cMLS<sub>B</sub> MRSA'da %62.1, MSSA'da %6.8; iMLS<sub>B</sub> oranları MRSA'da %27.9, MSSA'da %6.8, MS<sub>B</sub> fenotipi MRSA'da %3.7, MSSA'da %3.4 olarak bulunmuştur. Fusidik asit duyarlılığı MRSA ve MSSA'da sırasıyla %78.2 ve %89.6, siprofloksasin duyarlılığı %3.1 ve %93.1, gentamisin duyarlılığı %6.2 ve %96.5 bulunmuştur. Metisilin dirençli kökenlerde hem MLS<sub>B</sub> direncinin hem de diğer antibiyotik dirençlerinin daha fazla olduğu dikkati çekmektedir. (145)



Bizim çalışmamızda gentamisin direnç oranı %45.1, fusidik aside direnç oranı %20.7 ve levofloksasine direnç oranı %53.7, orta duyarlı olanların oranı %8.5 olarak saptandı. Bazı çalışmalarla benzer sonuçlar olsa da gentamisin ve levofloksasin direnç oranlarının yüksekliği dikkat çekmiştir. Hastanemizde stafilokokal infeksiyonların tedavisinde fusidik asit alternatif bir seçenek olarak düşünülebilir. Çalışmamızda vankomisin ve linezolid direnci olan suş saptanmamıştır. Tedavide bu antibiyotikler seçilirken direnç gelişiminin önlenmesi konusu göz önüne alınmalıdır.

Tunus'ta yapılan bir çalışmada hematolojik malignitesi olan nötropenik hastaların kan ve kateter kültürlerinden elde edilen *S. epidermidis* izolatlarında makrolid direnci araştırılmıştır. Agar dilüsyon metodu ile eritromisine %62, linkomisine %60, oksasiline %51, gentamisine %61, teikoplanine %6.5 direnç saptanmıştır. Metisiline dirençli olanlar %82 eritromisine, %79.5 klindamisine dirençli; metisiline duyarlı olanlar ise %39.5 eritromisine, %16 klindamisine dirençli bulunmuştur. Metisiline dirençli olanların MLS antibiyotiklere daha yüksek oranda dirençli oldukları görülmüştür. (146)

Yunanistan'da 2002- 2004 yılları arasında yapılan bir çalışmada MRSA'larda cMLS<sub>B</sub> direnci %47, iMLS<sub>B</sub> direnci %15; MSSA'larda ise %13 cMLS<sub>B</sub>, %20 iMLS<sub>B</sub> direnci bulunmuştur. (12)

Güney Kore'de 2004 yılında yapılan bir çalışmada MRSA'da cMLS<sub>B</sub> %79, iMLS<sub>B</sub> %4 oranında saptanırken; MSSA'da cMLS<sub>B</sub> %6 ve iMLS<sub>B</sub> %9 olarak saptanmıştır. MRKNS suşlarında %33 cMLS<sub>B</sub>, %30 iMLS<sub>B</sub> saptanırken MSKNS suşlarında cMLS<sub>B</sub> %9 ve iMLS<sub>B</sub> %21 oranlarında bulunmuştur. (147)

Reyes ve arkadaşları (148) yedi farklı Kolombiya hastanesinden üç yıllık süre içinde *S. pneumoniae*, *S. aureus*, KNS ve enterokokları içeren Gram pozitif koklarda makrolid direncini incelemişlerdir. Örneklerin 348'i *S. aureus*, 175'i KNS idi. *S.aureus*'ta eritromisin direnci %58 ve klindamisin direnci %57 idi. MRSA'da eritromisin direnci MSSA suşlarına oranla daha yüksek bulunmuştur. (%97'ye karşı %5.7) Eritromisin dirençli 195 MRSA'nın tümünün cMLS<sub>B</sub> fenotipinde olduğu görülmüştür. KNS'de eritromisin ve klindamisin direnç prevalansı sırasıyla %63.4 ve %45.1 idi. Diğer çalışmalara benzer şekilde metisiline dirençli kökenlerde daha yüksek direnç oranları bulunmuştur. Baskın fenotip cMLS<sub>B</sub> (%71.2) iken iMLS<sub>B</sub> direnç oranı %10.8 ve MS<sub>B</sub> direnç fenotipi %18 olarak bildirilmiştir. Direnç oranlarının diğer

ülkelere göre ve metisilin dirençlilerde duyarlılara göre belirgin şekilde yüksek olduğu; bu nedenle klindamisinin hastane kökenli MRSA infeksiyonlarında etkin bir seçenek olamayabileceği yorumu yapılmıştır.

Brezilya'da 2007 yılında Perez ve arkadaşları (149) hastanede yatan hastaların kan kültürlerinden elde edilen 200 KNS suşu ile bir çalışma düzenlemişlerdir. Tüm izolatların %66.5'i oksasiline dirençli bulunmuştur. Eritromisine dirençli suş oranı %63, orta duyarlı olanların oranı %3.5 ve klindamisine dirençli olanların oranı %53.5, orta duyarlı olanların oranı %1 olarak belirlenmiştir. Eritromisine dirençli, klindamisine duyarlı fenotipe sahip suş sayısı 27 (%13) olarak saptanmıştır. Bunlara D test yapılmış ve sadece 5'inde (%18.5) pozitif bulunmuştur. Diskler 10 ve 15 mm ara ile yerleştirildiğinde testin daha belirgin olduğu saptanmıştır.

Ciraj ve arkadaşları (150) tarafından Hindistan'da yapılan bir çalışmada değerlendirilen 244 stafilokok suşunun 150'si (%61.5) *S. aureus*, 94'ü (%38.5) KNS olarak tanımlanmıştır. Bu suşların %32'sinde (78 suş) eritromisin direnci saptanmış ve bu suşlara D test uygulanmıştır. Tüm suşlar içinde iMLS<sub>B</sub> oranını %13.1(n=32), cMLS<sub>B</sub> oranını %3.3(n=8) bulmuşlardır. iMLS<sub>B</sub> direnci olanların 16'sı MSSA, 10'u MRSA, 6'sı MSKNS suşlarından oluşmaktaydı. cMLS<sub>B</sub> direnci gösteren 8 suşun 4'ünü MRSA ve diğer 4'ünü MRKNS suşları oluşturmaktaydı.

Schreckenberger ve arkadaşları (151) şehir merkezi ve banliyöde olmak üzere iki farklı hastanede iMLS<sub>B</sub> direncinin insidansını araştırmışlardır. Hastanelere göre insidansları MRSA için %7 ve %12, MSSA için %20 ve %19, KNS için %14 ve %35 oranında bulmuşlardır. Bu insidans farklılıklarına dayanarak stafilokoklarda klindamisin duyarlılık sonucu verirken D testinin yapılmasının gerekliliğini vurgulamışlardır.

Chaieb ve arkadaşları (152) diyaliz sıvıları ve iğnelerinden izole ettikleri KNS'lerle yaptıkları çalışmalarında ATB Staph kit kullanarak eritromisine %34.4, linkomisine %40.6, penisiline %93.8, tetrasikline %68.7, gentamisine %15.6, fusidik asite %46.9, teikoplanine %31.3 oranında direnç saptamışlardır.

Tüm çalışmalar gözden geçirildiğinde cMLS<sub>B</sub> direnci, iMLS<sub>B</sub> direncine kıyasla daha yüksek oranlarda saptanmıştır. Metisiline dirençli suşların, duyarlı olanlarla karşılaştırıldığında daha yüksek direnç oranlarına sahip oldukları gözlenmektedir. Metisilin direnç genlerini taşıyan genetik elemanların diğer antibiyotik

direnç genlerini de beraberinde taşıması ile bu durum açıklanabilir. MSSA suşlarının genel olarak en duyarlı grup olduğu göze çarpmaktadır.

Diğer çalışmalardan farklı olarak çalışmamızda, MLS<sub>B</sub> direnci gösteren suşlarda diğer antibiyotiklere direnç durumu da değerlendirilmiştir. Makrolid direnci olmayan grupta gentamisin, levofloksasin ve fusidik asite yüksek oranlarda duyarlılık mevcuttur. Makrolid direnci olan grupta ise gentamisin ve levofloksasin direnç oranları da yüksek iken fusidik asit direnç oranında artış gözlenmemiştir. iMLS<sub>B</sub> direnci olan grupta levofloksasin dışında direnç oranlarında bir artış saptanmamıştır. cMLS<sub>B</sub> direnci olan grupta gentamisin ve levofloksasin direncinin; MS<sub>B</sub> direnci olan grupta levofloksasin ve fusidik asit direncinin de fazla olduğu görülmektedir. Genel olarak bakıldığında MLS<sub>B</sub> direnci mevcut olan suşlarda özellikle cMLS<sub>B</sub> direnci söz konusu ise, her ne kadar etki ve direnç mekanizmaları farklı olsa da diğer antibiyotiklere artmış direnç olduğu görülmektedir.

Baskın fenotip bizim çalışmamızda diğer çalışmalara benzer şekilde cMLS<sub>B</sub> direncidir. *S.aureus* suşlarında metisilin direnci olanlarda hem yapısal hem de indüklenebilir direnç oranları metisilin duyarlı olanlara göre daha yüksek oranlarda saptanmıştır. KNS suşlarında ise hem metisilin dirençli hem de duyarlı olanlarda üç direnç fenotipi de birbirine benzer oranlarda bulunmuştur. Metisilin dirençli suşlarda MLS<sub>B</sub> direnç oranlarının daha yüksek düzeylerde saptanması linkozamid grubu antibiyotiklerin glikopeptid grubu ve diğer yeni grup antibiyotiklere alternatif olma olasılığını azaltmaktadır. Buna karşın, klindamisin ucuz olması dışında hem parenteral hem de oral uygulanabilir olması nedeniyle iyi bir seçenek olduğu düşünülecek olursa, D testinin tüm antibiyogramlarda mutlak uygulanma gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

Çalışmamızda MLS<sub>B</sub> direnç genlerinin prevalansı da araştırılmıştır. *ermA* geninin prevalansı %32.9, *ermB* %1.2, *ermC* % 7.3, *msrA* %6.1, *ermA+C* %4.9, *ermA+msrA* %1.2 olarak bulunmuştur. Baskın genotip hem *S. aureus* hem de KNS suşlarında *ermA*'dır.

Bouchami'nin (146) çalışmasında toplam 77 *S. epidermidis* suşunun 34'ü eritromisine dirençli bulunmuş ve bunlarda direnç genleri araştırılmıştır. En sık *ermC* (%53), takiben *ermA* (%32) ve *msrA* (%15) iken *ermB* ve *mefA* genleri saptanmamıştır. *ermA* veya *ermC* taşıyanlarda eritromisin MİK değerlerinin *msrA*

taşıyanlardan yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada MLS<sub>B</sub> fenotip ve genotipi arasında %100 korelasyon bulunmuştur.

KNS suşları ile yapılan başka bir çalışmada makrolid direnç genleri araştırılmıştır. 32 suşun %12.5'i *ermA*, %31.3'ü *ermB*, %53.1'inin *ermC* ve %68.8'inin *msrA* geni taşıdığı saptanmıştır. *mef* geni taşıyan suş saptanmamıştır. *ermC* geni taşıyan ancak eritromisine duyarlı 11 suş bulunmuştur. Konvansiyonel yöntemlerin antibiyotik direncini saptamada yetersiz kalabileceği veya direnç genlerinin saptanamayan küçük plazmidlerde olabileceği öne sürülmüştür. (152)

Reyes ve arkadaşlarının (148) çalışmasında eritromisin dirençli 195 MRSA'nın tümünün cMLS<sub>B</sub> fenotipinde olduğu ve 153 suşun *ermA*, 38'inin *ermC*, dördünün *ermA*+ *msrA* taşıdığı bulunmuştur. KNS suşlarında PCR ile izolatların %63.1'inin *ermC*, %9'unun *ermA*, %16.2'sinin *msrA* ve %1.8'inin *ermA*+ *msrA*, %9.9'unun *ermC*+ *msrA* taşıdığı bulunmuştur. Her iki türde baskın fenotipin cMLS<sub>B</sub> ve baskın genlerin *ermA* ve KNS'de *ermC* olduğu sonucuna varılmıştır.

Japonya'da yapılan bir çalışmada MRSA izolatlarında yapısal direnç fenotipinin ve *ermA* geninin baskın olduğu (%95 MRSA ve %53.3 MSSA); MSSA suşlarında ise iMLS<sub>B</sub> fenotipinin(%94) ve *ermC*'nin (%42) ağırlıkta olduğu rapor edilmiştir. (6)

Almanya'da Gatermann ve arkadaşları (7) makrolid direnç genlerini araştırdıkları çalışmada sadece KNS suşlarını ele almışlardır. Sıklık sırasına göre en sık *ermC* (%65.6) ve *msrA* (%23.6), *ermA* (%5.3) ve *ermB* (%2.3) bulunmuştur. Diğer çalışmaların aksine KNS'de yapısal direnç fenotipini en sık bulmuşlardır.

İtalya'da makrolid dirençli 100 stafilkok suşunda *ermA*, *ermC* ve *msrA* genleri araştırılmıştır. *S. aureus* suşlarında iMLS<sub>B</sub> olanlarda *ermC* ve cMLS<sub>B</sub> olanlarda *ermA* geninin baskın olduğu saptanmıştır. KNS suşlarında ise *ermC* hakimiyetini gözlemişlerdir. (153) Bizim çalışmamızda olduğu gibi MS<sub>B</sub> fenotipinde olan tüm suşlarda *msrA* genini bulmuşlardır. cMLS<sub>B</sub> ve iMLS<sub>B</sub> olanların tümünde ise *erm* genlerinden birini bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda cMLS<sub>B</sub> olan bir *S. aureus* suşunda direnç mekanizması belirlenememiştir. Bizim çalışmada saptanmayan *ermC*+ *msrA* gen kombinasyonu bu çalışmada KNS suşlarında saptanmıştır. Bizim çalışmamızda indüklenebilir dirence sahip bir *S. epidermidis* suşunda *ermA*+ *msrA* gen kombinasyonu bulunmuştur.

Yirmi dört Avrupa üniversite hastanesinden eritromisin dirençli 851 *S. aureus* suşu *ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA/B*, *ereA* ve *ereB* genleri açısından PCR ile incelenmiştir. En sık *ermA* (%67), takiben *ermC* (%23) ve *msrA/B* (%6) bulunmuştur. Metisilin dirençli kökenlerde *ermA*, metisilin duyarlılarda ise *ermC* baskındır. cMLS<sub>B</sub> suşlarda *ermA*, iMLS<sub>B</sub> fenotipi sergileyenlerde de *ermC* hakimiyeti gözlenmiştir. Bizim çalışmamızdan farklı olarak *msrA/ msrB* geni sadece MSSA kökenlerinde saptanmıştır. Makrolid inaktivasyon geni kodlayan *ereB* geni %1 oranında cMLS<sub>B</sub> fenotipi sergileyen MRSA izolatlarında bulunmuştur. *ermA+ermC* kombinasyonu %3 oranında saptanmıştır. (154)

Stafilokoklarda MLS<sub>B</sub> direncinin genetik mekanizmaları ile ilgili ülkemizde yapılan yayınlar araştırıldığında üç adet yayına ulaşılmıştır.

İstanbul'da Aktaş ve arkadaşlarının (155) çalışmasında eritromisin dirençli 78 KNS, 24 *S. aureus* suşunda eritromisin direncinin prevalansı ve genetik mekanizmaları araştırılmıştır. KNS suşlarının en sık (%57.8'i) yapısal, %20.6 indüklenebilir, %21.6 MS<sub>B</sub> fenotipi sergilediği; PCR ile %78.2'sinin *ermC*, %8.9'unun *ermA*, %6.4'ünün *ermB* ve %11.5'inin *msrA* genini taşıdığı gösterilmiştir. *S. aureus* suşlarında yapısal fenotipin daha sık saptandığını ve yine *ermC*'nin en sık olduğunu rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise *ermA* geni en sıklıkla bulunan genidir.

Ankara'dan Sarıbaş ve arkadaşlarının (156) çalışmasında 122 MLS<sub>B</sub> dirençli *S. aureus* izolatında *erm* genlerinin prevalansı araştırılmıştır. Yetmiş sekizi yapısal, 44'ü indüklenebilir direnç gösteren suşlarda baskın genotipin *ermA+ ermC* olduğu bulunmuştur. MSSA izolatlarında iMLS<sub>B</sub> fenotipi ve *ermC* geninin, MRSA'da ise cMLS<sub>B</sub> fenotipi ve *ermA+ ermC* genotipinin ön planda olduğu görülmüştür.

İstanbul'da yapılan diğer bir çalışmada ise metisiline dirençli 28'i KNS, 28'i *S. aureus* olan 56 suşta *ermA* ve *ermC* genleri araştırılmıştır. MRSA' da %71.4 *ermA* geni daha sıklıkta görülürken, *ermC* geni *S. aureus* ve KNS suşlarında %64.3 oranlarında görülmüştür. (114)

*ermA* ve *ermC*, tipik olarak stafilokokkal gen sınıflarıdır.(9) Yapılan çalışmalarda genel olarak *ermC* geni fazla iken bizim çalışmamızda farklı olarak *ermA* geni hakimiyeti mevcuttur.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

MLS<sub>B</sub> direnç fenotiplerinin ve bunlara neden olan genetik mekanizmaların ülkeler, şehirler hatta aynı şehirde hastaneler arasında bile farklılık gösterdiği yapılan çalışmalarda görülmektedir. Bu nedenle her merkez kendi direnç profilini ortaya çıkarmalı ve empirik antibiyotik tedavi seçiminde bu durumu göz önüne almalıdır.

Direnç fenotipini saptamada D test yapılması kolay, maliyeti az olan bir yöntemdir. Rutin duyarlılık testi için disk difüzyon metodu kullanılıyorsa, aynı esnada eritromisin ve klindamisin diskleri yan yana yerleştirilerek D test de kolayca uygulanabilir. Böylece eritromisin ve klindamisin dirençleri yanı sıra MLS<sub>B</sub> direnci olup olmadığı, varsa hangi tipte direnç olduğu belirlenebilir. Klindamisini doğru ve etkin şekilde kullanabilmek için D testi mutlaka uygulanmalıdır.

Bizim çalışmamızda 82 adet stafilokok suşu değerlendirildi. 54 adet *S. aureus* dışında, 23 *S. epidermidis*, bir *S. haemolyticus*, bir *S. hominis*, bir *S. lugdunensis*, bir *S. simulans* ve bir *S. warneri* olmak üzere 28 KNS tanımlandı. Suşların 28'i MRSA, 26'sı MSSA, 14'ü MRKNS ve 14'ü MSKNS idi. Eritromisin direnç oranı %54.9 (n=45 suş) idi. Makrolid direnci olan grupta gentamisin ve levofloksasin direnç oranlarının da yüksek olduğu gözlemlendi. Metisiline dirençli olan suşlarda MLS<sub>B</sub> direncinin daha yüksek oranda olduğu saptandı.

D test yapıldığında indüklenebilir MLS<sub>B</sub> direnci %18.3, yapısal MLS<sub>B</sub> direnci %30.5, MS<sub>B</sub> fenotipi % 6.1 olarak belirlendi.

PCR yöntemi direnç genlerinin saptanması için altın standart bir yöntemdir. Kısa sürede sonuç alınması avantajlı yanıdır. Ancak her laboratuarda olmaması, deneyimli personel ve ekipman gereksinimi de dezavantajlarıdır.

16S rRNA, metisilin direnci ve makrolid direnç genlerinden bazısı bu çalışmamızda PCR ile araştırılmıştır. Toplamda *ermA* geninin prevalansı %32.9, *ermB* %1.2, *ermC* % 7.3, *msrA* %6.1, *ermA+C* %4.9, *ermA+msrA* %1.2 olarak hesaplanmıştır. D test ile pompa sistemine bağlı ve klindamisin aktivitesini etkilemeyen direnç fenotipi (MS<sub>B</sub> fenotipi) ile direnç mekanizması (*msrA* varlığı) %100 oranında doğru tespit edilmiştir.

Ülkemizden direnç genlerinin durumu ile ilgili az sayıda yayın olması bu konu üzerinde daha fazla çalışma yapılmasının gerekliliğini ortaya koymaktadır.

## 7. ÖZET

### Klinik Örneklerden İzole Edilen Stafilokoklarda Makrolid- Linkozamid- Streptogramin B Direncinin Fenotipik ve Genotipik Yöntemlerle Araştırılması

**Amaç:** Klinik örneklerden izole edilen stafilokoklarda, MLS<sub>B</sub> direnç fenotipinin ve dirençten sorumlu genlerin araştırılması amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Mikrobiyolojik yöntemler ve 16S rRNA sonuçlarına göre stafilokok olarak tanımlanan suşlar çalışmaya alınmıştır. MİK agar dilüsyon yöntemi ile eritromisin ve klindamisin yanı sıra vankomisin, linezolid, gentamisin, levofloksasin ve fusidik asit duyarlılıkları belirlenmiştir. MLS<sub>B</sub> direncini fenotipik olarak saptamak için D test yapılmış ve suşlar indüklenebilir MLS<sub>B</sub>, yapısal MLS<sub>B</sub>, MS<sub>B</sub> ve duyarlı olarak belirlenmiştir. Eritromisine dirençli olan suşlarda, direnç mekanizmalarının saptanması için PCR ile *ermA*, *ermB*, *ermC* ve *msrA* genleri araştırılmıştır.

**Bulgular:** Elli dört *S. aureus* ve 28 KNS olmak üzere toplam 82 suş çalışmaya alınmıştır. Metisilin direncine göre 28 suş MRSA, 26 suş MSSA, 14 suş MRKNS ve 14 suş MSKNS olarak tanımlanmıştır. MİK agar dilüsyon testine göre direnç oranları eritromisin %54.9, linkozamid %35.4, gentamisin %45.1, fusidik asid %20.7 ve levofloksasin %53.7 olarak saptanmıştır. D test sonucunda en yüksek oranda yapısal MLS<sub>B</sub> direnci bulunmuştur. 25 suшта yapısal MLS<sub>B</sub> direnci (tüm suşların %30.5'i, makrolid dirençlilerin %55.5'i). 15 suшта indüklenebilir MLS<sub>B</sub> direnci (tüm suşların %18.3'ü, makrolid dirençlilerin %33.3'ü). 5 suшта MS<sub>B</sub> direnci saptanmıştır. MS<sub>B</sub> dirençlilerin tümünde PCR ile *msrA* geni bulunmuştur. Toplamda *ermA* geninin prevalansı %32.9, *ermB* %1.2, *ermC* % 7.3, *msrA* %6.1 saptanmıştır. Gen kombinasyonu olarak *ermA+C* %4.9, *ermA+msrA* %1.2 oranında bulunmuştur. Bir suшта direnç mekanizması belirlenememiştir.

**Sonuç:** Rutin duyarlılık testleri ile belirlenemeyen indüklenebilir MLS<sub>B</sub> direnci D test ile kolaylıkla belirlenebilir. Bunun sonucunda stafilokokal infeksiyonlarda iyi bir seçenek olan klindamisin kullanımına daha doğru şekilde karar

verilebilir. Direnç genlerinin saptanması için hızlı sonuç veren bir yöntem olan PCR kullanılabilir.

**Anahtar kelimeler:** Stafilokok, MLS<sub>B</sub> direnci, D test, *ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA*.

**İletişim adresi:** Dr. Güliz Uyar Güleç

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi İnfeksiyon  
Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Aydın/ Türkiye  
gulizuyar@yahoo.com



## 8. İNGİLİZCE ÖZET (SUMMARY)

### Investigation of Macrolide- Lincosamide- Streptogramin B resistance in clinical staphylococci isolates by phenotypical and genotypical methods

**Purpose:** The purpose of the present study was to determine the type and the responsible genes for the MLS<sub>B</sub> resistance in Staphylococci isolated from clinical samples.

**Methods:** The isolates were identified to the species level using microbiological methods and 16S rRNA sequencing. Resistance rates for erythromycin, clindamycin, vancomycin, linezolid, gentamycin, levofloxacin, fusidic acid were determined with MIC agar dilution method. MLS<sub>B</sub> resistance phenotypes were investigated by the D test. PCR was used to detect the presence of *ermA*, *ermB*, *ermC* and *msrA* genes in erythromycin resistant isolates.

**Results:** The study included 82 staphylococcal clinical isolates consisting of 54 *S. aureus* (28 MRSA and 26 MSSA) and 28 coagulase negative staphylococci. (14 MRCoNS and 14 MSCoNS) Resistance rates were as follows; clindamycin 35.4%, gentamycin 45.1%, fusidic acid 20.7% and levofloksasin 53.7%. The most frequently detected resistance phenotype among the total staphylococcal isolates was the constitutive type. Of 82 isolates, 54.9% were resistant to erythromycin; 30.5% (25 strains) of the isolates exhibited a constitutive phenotype (cMLS<sub>B</sub>) whereas 18.3% (15 strains) expressed an inducible resistance phenotype (iMLS<sub>B</sub>). Five strains showed MS<sub>B</sub> phenotype. All of the five isolates with MS<sub>B</sub> phenotype harboured *msrA* gene. The prevalence of resistance genes were as follows; *ermA* 32.9%, *ermB* 1.2%, *ermC* 7.3% and *msrA* 6.1%. Gene combinations of *ermA-ermC* was 4.9% and *ermA-msrA* was 1.2%. In one strain resistance mechanism could not be determined.

**Conclusion:** Inducible MLS<sub>B</sub> resistance which can not be determined with routine susceptibility tests can be determined easily by the D test. As a result the use

of clindamycin which is a good option for staphylococcal infections can be decided more accurately. For detection of resistance genes a PCR method that provides rapid results can be also used.

**Key words:** Staphylococci, MLS<sub>B</sub> resistance, D test, *ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA*.

**Communication address:** Dr. Güliz Uyar Güleç  
Adnan Menderes University Faculty of Medicine Department of Infectious  
Diseases and Clinical Microbiology. Aydın/ Turkey  
gulizuyar@yahoo.com

## 9. KAYNAKLAR

- 1.Çetinkol Y, Altındış M, Çetinkaya Z, Aktepe C. Stafilokoklarda metisilin direncinin farklı yöntemlerle araştırılması ve çoklu antibiyotik direncinin saptanması. Mikrobiol Bült. 2008; 42: 119- 124.
- 2.Livermore D. Antibiotic resistance in staphylococci. International Journal of Antimicrobial Agents 2000; 16: 3-10.
- 3.Pfaller MA, Herwaldt LA. Laboratory, clinical, and epidemiological aspects of coagulase- negative staphylococci. Clin Microbiol Rev 1988; 1(3): 281-99.
- 4.Yalçın AN. Makrolidler. Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S (Ed.ler). Güncel bilgiler ışığında antibiyotikler, Ankara: Bilimsel tıp yayınevi, 2008: 377-86.
- 5.Novotna G, Adamkova V, Janata J, Melter O, Spizek J. Prevalence of resistance mechanisms against macrolides and lincosamides in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in the Czech Republic and occurrence of an undefined mechanism of resistance to lincosamides. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49 (8): 3586-9.
- 6.Otsuka T, Zaraket H, Takano T, Saito K, Dohmae S, Higuchi W. Macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance phenotypes and genotypes among *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Japan. Clin Microbiol Infect 2007; 13 (3): 325-7.
- 7.Gatermann SG, Koschinski T, Friedrich S. Distribution and expression of macrolide resistance genes in coagulase-negative staphylococci. Clin Microbiol Infect 2007; 13(8): 777-81.
- 8.Patel M, Waites KB, Moser SA, Cloud GA, Hoesley CJ. Prevalence of inducible clindamycin resistance among community- and hospital-associated *Staphylococcus aureus* isolates. J Clin Microbiol 2006; 44(7): 2481-4.
- 9.Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. Clin Infect Dis 2002; 34: 482-92.
- 10.Strommenger B, Kettlitz C, Werner G, Witte W. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2003; 41(9): 4089-94.

- 11.Cetin ES, Gunes H, Kaya S, Aridogan BC, Demirci M. Macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance phenotypes in clinical staphylococcal isolates. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 31(4): 364-8.
- 12.Fokas S, Tsironi M, Kalkani M, Dionysopouloy M. Prevalence of inducible clindamycin resistance in macrolide-resistant *Staphylococcus* spp. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11(4): 337-40.
- 13.Sutcliffe J, Grebe T, Tait-Kamradt A, Wondrack L. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40(11): 2562-6.
- 14.Roberts MC, Sutcliffe J, Courvalin P, Jensen LB, Rood J, Seppala H. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(12): 2823-30.
- 15.Lina G, Quaglia A, Reverdy ME, Leclercq R, Vandenesch F, Etienne J. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(5): 1062-6.
- 16.Fiebelkorn KR, Crawford SA, McElmeel ML, Jorgensen JH. Practical disk diffusion method for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol* 2003; 41(10): 4740-4.
- 17.Winn W, Alen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. The gram-positive cocci: Part 1: Staphylococci and related organism. Koneman E, Alen S, Janda W, Schreckenberger P, Winn W, Woods G, Procop G. (Eds). In: *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams &Wilkins, 2006: 624-71.
- 18.Bilgehan H. *Staphylococcus*. Bilgehan H (Ed). *Özel bakteriyoloji ve bakteri enfeksiyonları*, İzmir: Fakülteler kitabevi, Barış yayınları, 2000: 240-66.
- 19.Cengiz AT. *Staphylococcus*. Ustaçelebi Ş (Ed). *Tıp ve diş hekimliğinde genel ve özel mikrobiyoloji*, Ankara: Güneş kitabevi, 2004: 339-46
- 20.Bannerman TL. *Staphylococcus, Micrococcus* and other catalase positive cocci that grow aerobically. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Phaller MA, Tenover FC (Eds). In: *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. Washington DC: ASM Press, 2003: 384-404.

- 21.Bilgehan H. Gram olumlu koklar. Bilgehan H (Ed). Klinik mikrobiyolojik tanı, 3. baskı, İzmir: Barış yayınları, Fakülteler kitabevi, 2002: 495- 506.
- 22.Dündar V, Dündar DÖ. Stafilokok Enfeksiyonları. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. (Ed). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri, 2008: 2065-77.
- 23.Bilgehan H. Besiyerleri, ayıraçlar ve deneyler. Bilgehan H. (Ed). Klinik mikrobiyolojik tanı, 3. baskı, izmir, Fakülteler kitabevi, Barış yayınları, 2002: 649-713.
- 24.Smyth RW, Kahlmeter G. Mannitol salt agar-cefoxitin combination as a screening medium for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2005; 43(8): 3797-9.
- 25.Kluytmans J, VanGriethuysen A, Willemse P, VanKeulen P. Performance of CHROMagar selective medium and oxacillin resistance screening agar base for identifying *Staphylococcus aureus* and detecting methicillin resistance. J Clin Microbiol 2002; 40(7): 2480-2.
- 26.Kipp F, Kahl BC, Becker K, Baron EJ, Proctor RA, Peters G. Evaluation of two chromogenic agar media for recovery and identification of *Staphylococcus aureus* small-colony variants. J Clin Microbiol 2005; 43(4): 1956-9.
- 27.RSHM. Klinik örneklerden *Staphylococcus aureus* tanımlaması ve metisilin direncinin belirlenmesi için laboratuvar standart uygulama prosedurleri. <http://www.rhsm.gov.tr/28.12.2009>.
- 28.Töreci K. Stafilokokların sınıflandırılması ve laboratuvar tanısı. Klimik dergisi 1989; 2(2): 80-6.
- 29.Tünger A. *Staphylococcus aureus*: mikrobiyoloji, patogenez ve epidemiyoloji. Ulusoy S, Usluer G, Ünal S (Ed.ler) Önemli ve sorunlu gram-pozitif bakteri infeksiyonları, Ankara, Bilimsel tıp yayınevi, 2004: 9-22.
- 30.Brakstad OG, Aasbakk K, Maeland JA. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. J Clin Microbiol 1992; 30(7): 1654-60.
- 31.Vahaboğlu MH. Antibiyotik direnç mekanizmaları. Klimik dergisi 1993; 6(1): 6-8.
- 32.Georgopapadakou NH, Liu FY. Penicillin-binding proteins in bacteria. Antimicrob Agents Chemother 1980; 18(1): 148-57.

- 33.Hartman BJ, Tomasz A. Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 1984; 158(2): 513-6.
- 34.Öztürk ŞB. Bakteri yüzey slime yapısındaki moleküllerin, bakteri adheransı ve antibiyotik direncine etkisi. Uzmanlık tezi, Aydın: Adnan Menderes Üniversitesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji, 2006.
- 35.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, 6th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2005: 2321-52.
- 36.Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med 1998; 339(8): 520-32.
- 37.Morgan MS. Diagnosis and treatment of Panton-Valentine leukocidin (PVL)-associated staphylococcal pneumonia. Int J Antimicrob Agents 2007; 30(4): 289-96.
- 38.Tinelli M, Monaco M, Vimercati M, Ceraminiello A, Pantosti A. Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in skin and soft tissue infections, Northern Italy. Emerg Infect Dis 2009; 15(2): 250-7.
- 39.Fraser JD, Proft T. The bacterial superantigen and superantigen-like proteins. Immunol Rev 2008; 225: 226-43.
- 40.Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Rev 2000; 13(1): 16-34.
- 41.Stevens DL, Bisno AL, Chambers HF, Everett ED, Dellinger P, Goldstein EJ. Practice guidelines for the diagnosis and management of skin and soft-tissue infections. Clin Infect Dis 2005; 41(10): 1373-1406.
- 42.Giacometti A, Cirioni O, Schimizzi AM, DelPrete MS, Barchiesi F, D'Errico MM. Epidemiology and microbiology of surgical wound infections. J Clin Microbiol 2000; 38(2): 918-22.
- 43.Turnidge JD, Kotsanas D, Munckhof W, Roberts S, Bennett CM, Nimmo GR. *Staphylococcus aureus* bacteraemia: a major cause of mortality in Australia and New Zealand. Med J Aust 2009; 191(7): 368-73.
- 44.Rogers KL, Fey PD, Rupp ME. Coagulase- negative Staphylococcal infections. Infect Dis Clin N Am 2009; 23: 73-98
- 45.Fowler VG, Miro JM, Hoen B et al. *Staphylococcus aureus* endocarditis: a consequence of medical progress. JAMA 2005; 293(24): 3012-21.

46. Durack DT, Lukes AS, Bright DK. New criteria for diagnosis of infective endocarditis: utilization of specific echocardiographic findings. Duke Endocarditis Service. *Am J Med* 1994; 96(3): 200-9.
47. Westphal N, Plicht B, Naber C. Infective endocarditis--prophylaxis, diagnostic criteria, and treatment. *Dtsch Arztebl Int* 2009; 106(28-29): 481-9.
48. Peetermans W, Hill E, Hereijgers P, Herregods MC. *Staphylococcus aureus* Endocarditis: New Data 2007. <http://www.sbimc.org/28.12.2009>.
49. Chang WN, Lu CH, Huang CR, Chuang YC, Tsai NW, Chen SF, Chang CC, Wang HC, Chien CC, Wu JJ. Epidemiology of adult staphylococcal meningitis in southern taiwan: a clinical comparison of *Staphylococcus aureus* infection and coagulase- negative staphylococcal infection. *Jpn J Infect Dis* 2007; 60: 262-6.
50. Huang CR, Lu CH, Wu JJ, Chang, HW, Chien CC, Lei CB. Coagulase-negative staphylococcal meningitis in adults: clinical characteristics and therapeutic outcomes. *Infection* 2005; 33(2): 56-60.
51. Webster D, Chui L, Tyrrell GJ, Marrie TJ. Health care-associated *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2007; 18(3): 181-8.
52. Athanassa Z, Siempos II, Falagas ME. Impact of methicillin resistance on mortality in *Staphylococcus aureus* VAP: a systematic review. *Eur Respir J* 2008; 31(3): 625-32.
53. Roberts JC, Gulino SP, Peak KK, Luna VA, Sanderson R. Fatal necrotizing pneumonia due to a Panton-Valentine leukocidin positive community-associated methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* and Influenza co-infection: a case report. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2008; 7: 5.
54. Gençer S. Toplum kökenli enfeksiyonların tedavisi: Kemik ve eklem enfeksiyonları, <http://www.ekmud.org/28.12.2009>.
55. Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med* 2004; 351(16): 1645-54.
56. Yuan HC, Wu KG, Chen CJ, Tang RB, Hwang BT. Characteristics and outcome of septic arthritis in children. *J Microbiol Immunol Infect* 2006; 39(4): 342-7.
57. DeLaTorre G, Nava-Zavala I. Gonococcal and nongonococcal arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 2009; 35(1): 63-73.

58. Visser S, Tupper J. Septic until proven otherwise: approach to and treatment of the septic joint in adult patients. *Can Fam Physician* 2009; 55(4): 374-5.
59. Rice LB, Sahm D, Bonomo RA. Mechanism of resistance to antimicrobial agents. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Phaller MA, Tenover FC, Tenover FC (Eds). *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. Washington DC: ASM Press, 2003; 1074-1101.
60. Gülay Z. Antibakteriyel ilaçların etki mekanizmaları. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. (Ed.ler). *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2008: 227-43.
61. Gür D. Bakterilerde Antibiyotiklere Karşı Direnç. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. (Ed.ler). *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2008: 243-57.
62. Ayaz C. Beta laktamların genel özellikleri ve penisilinler. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. (Ed.ler). *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2008: 266-78.
63. Sakarya, S. Sefalosporinler. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. (Ed.ler). *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2008: 278-88.
64. Şenol E. Karbapenemler ve Monobaktamlar. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. (Ed.ler). *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2008: 288-94.
65. Arman D. Glikopeptidler, streptograminler ve lipopeptidler. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. (Ed.ler). *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2008: 326-37.
66. Topçu AW. Aminoglikozidler. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. (Ed.ler). *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2008: 294-303.
67. Aksu HSZ, Candevir A. Sulfonamidler, Trimetoprim ve Trimetoprim-Sulfametoksazol. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. (Ed.ler). *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2008: 368-72.
68. Trampuz A, Wenk M, Rajacic Z, Zimmerli W. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of levofloxacin against *Streptococcus pneumoniae* and



- Staphylococcus aureus* in human skin blister fluid. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44(5): 1352-5.
- 69.Mutlu B. Kloramfenikol. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. (Ed.ler). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2008: 303-8.
- 70.Fraser TG, Hansen C, Long JK. Newer antibiotics for serious gram-positive infections. *Cleve Clin J Med* 2006; 73(9): 847-53.
- 71.Perlroth J, Kuo M, Tan J, Bayer AS, Miller LG. Adjunctive use of rifampin for the treatment of *Staphylococcus aureus* infections: a systematic review of the literature. *Arch Intern Med* 2008; 168(8): 805-19.
- 72.Yazgı H, Ertek M, Aktaş O. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen stafilokok suşlarının fusidik asite duyarlılıklarının araştırılması. *Türk mikrobiyol cem derg* 2003; 33: 12-5.
- 73.Zhanel GG, Shroeder C, Vercaigne L, Gin A, Embil J, Hoban DJ. A critical review of oxazolidinones: An alternative or replacement for glycopeptides and streptogramins? *Can J Infect Dis* 2001; 12(6): 379-90.
- 74.Felek S. Mupirosin. Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S (Ed.ler). Güncel bilgiler ışığında antibiyotikler, Ankara: Bilimsel tıp yayınevi, 2008: 525-9.
- 75.Çetin ES, Güneş H, Aynalı A, Kaya S, Cicioğlu Arıdoğan B, Demirci M. Makrolid-Linkozamid-Streptogramin B Direnci Gözlenen Klinik Stafilokok izolatlarında Fusidik Asitin in-Vitro Aktivitesinin değerlendirilmesi. *ANKEM Derg* 2008; 22(2): 59-63.
- 76.Janapatla RP, Yan JJ, Huang AH, Chen HM, Wu HM, Wu JJ. Inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates causing bacteremia at a university hospital in southern Taiwan. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 58(2): 203-9.
- 77.Yüce A. Antimikrobik ilaçlara direnç kazanma mekanizmaları. *Klinik dergisi* 2001; 14(2): 41-6.
- 78.Sivapalasingam S, Steigbigel NH. Macrolides, clindamycin, and ketolides. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (Eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 6th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2005: 396-411.
- 79.Küçükbasmacı Ö. Ketolid grubu ilk antibiyotik: telitromisin. *Türk mikrobiyol cem derg* 2008; 38(3-4): 156-61.

- 80.Tenson T, Lovmar M, Ehrenberg M. The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. *J Mol Biol* 2003; 330(5): 1005-14.
- 81.Girard AE, Girard D, English AR, Gootz TD, Cimochoowski CR, Faiella JA. Pharmacokinetic and in vivo studies with azithromycin (CP-62,993), a new macrolide with an extended half-life and excellent tissue distribution. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31(12): 1948-54.
- 82.Willke A. Antibakteriyel kemoterapi. <http://www.infeksiyon.org/28.12.2009>.
- 83.Aydın K. Makrolidler ve linkozamidler. *ANKEM derg* 2007; 21(ek 2): 57-61.
- 84.Uyanık MH, Yazgı H. A Grubu Beta-Hemolitik Streptokoklarda Eritromisin direnci. *Ankem Derg* 2008; 22(2): 85-8.
- 85.Macleod AJ, Ross HB, Ozere RL, Digout G, Van R. Lincomycin: A New antibiotic active against staphylococci and other Gram-positive cocci: Clinical and laboratory studies. *Can Med Assoc J* 1964; 91:1056-60.
- 86.Kılıç S. Linkozamidler. Lelebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S (Ed.ler). *Güncel bilgiler ışığında antibiyotikler*, Ankara: Bilimsel tıp yayınevi, 2008: 397-413.
- 87.Herbert S, Barry P, Novick RP. Subinhibitory clindamycin differentially inhibits transcription of exoprotein genes in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 2001; 69(5): 2996-3003.
- 88.Bayındır Y. Streptograminler: Kinupristin- Dalfopristin. Lelebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S (Ed.ler). *Güncel bilgiler ışığında antibiyotikler*, Ankara: Bilimsel tıp yayınevi, 2008: 415-27.
- 89.Champney WS, Tober CL. Specific inhibition of 50S ribosomal subunit formation in *Staphylococcus aureus* cells by 16-membered macrolide, lincosamide, and streptogramin B antibiotics. *Curr Microbiol* 2000; 41(2): 126-35.
- 90.Ulusoy S. Streptograminler (Kinopristin/dalfopristin). *ANKEM Derg* 2004; 18 (ek 2): 174-7.
- 91.Livermore DM. Quinupristin/dalfopristin and linezolid: where, when, which and whether to use? *J Antimicrob Chemother* 2000; 46(3): 347-50.
- 92.Rubinstein E, Bompert F. Activity of quinupristin/dalfopristin against gram-positive bacteria: clinical applications and therapeutic potential. *J Antimicrob Chemother* 1997; 39SupplA: 139-43.

- 93.Pechere JC. Current and future management of infections due to methicillin-resistant staphylococci infections: the role of quinupristin/dalfopristin. J Antimicrob Chemother 1999; 44Supp A: 11-8.
- 94.Smith TL, Pearson ML, Wilcox KR, Cruz C, Lancaster MV, Robinson-Dunn B. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. Glycopeptide-Intermediate *Staphylococcus aureus* Working Group. N Engl J Med 1999; 340(7): 493-501.
- 95.Sipahi OR, Ulusoy S. Glikopeptidlere dirençli *Staphylococcus aureus* infeksiyonlarına yaklaşım. Arman D, Vahaboğlu H. (Ed.ler). Dirençli mikroorganizma infeksiyonlarına yaklaşım, Ankara: Bilimsel tıp yayınevi, Ames matbaacılık, 2009: 55-72.
- 96.Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. J Clin Invest 2003; 111(9): 1265-73.
- 97.Hanssen, AM, Ericson Sollid JU. SCCmec in staphylococci: genes on the move. FEMS Immunol Med Microbiol 2006; 46(1): 8-20.
- 98.Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin Microbiol Rev 1997; 10(4): 781-91.
- 99.Ryffel C, Strassle A, Kayser FH, Berger-Bachi B. Mechanisms of heteroresistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 1994; 38(4): 724-8.
- 100.Srinivasan A, Dick JD, Perl TM. Vancomycin resistance in staphylococci. Clin Microbiol Rev 2002; 15(3): 430-8.
- 101.Hiramatsu K. The emergence of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Japan. Am J Med 1998; 104(5A): 7-10.
- 102.Whitener CJ, Park SY, Browne FA, Parent LJ, Julian K, Bozdogan B. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the absence of vancomycin exposure. Clin Infect Dis 2004; 38(8): 1049-55.
- 103.Lewis JS, Jorgensen JH. Inducible clindamycin resistance in Staphylococci: should clinicians and microbiologists be concerned? Clin Infect Dis 2005; 40(2): 280-5.

- 104.Siberry GK, Tekle T, Carroll K, Dick J. Failure of clindamycin treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* expressing inducible clindamycin resistance in vitro. Clin Infect Dis 2003; 37(9): 1257-60.
- 105.NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing 14th informational supplement. M100-S14. Wayne, PA: 2004.
- 106.Steward CD, Raney PM, Morrell AK, Williams PP, McDougal LK, Jevitt L. Testing for induction of clindamycin resistance in erythromycin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2005; 43(4): 1716-21.
- 107.Yilmaz G, Aydin K, Iskender S, Caylan R, Koksall I. Detection and prevalence of inducible clindamycin resistance in staphylococci. J Med Microbiol 2007; 56(Pt 3): 342-5.
- 108.O'Sullivan MV, Cai Y, Kong F, Zeng X, Gilbert GL. Influence of disk separation distance on accuracy of the disk approximation test for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus* spp. J Clin Microbiol 2006; 44(11): 4072-6.
- 109.CLSI. Clinical and laboratory standards institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, fifteenth informational supplement. M100-S15. Wayne, PA. USA: 2005.
- 110.Durmaz R. Polimeraz zincir reaksiyon yönteminin bakteriyolojide kullanımı. Durmaz R. (Ed.). Uygulamalı moleküler mikrobiyoloji, İstanbul: Print center, 2001: 75-83.
- 111.Persing DH, Relman DA, Tenover FC. Genotypic detection of antimicrobial resistance. In: Persing DH (Ed.). PCR protocols for emerging infectious diseases: a supplement to Diagnostic Molecular Microbiology, Washington: ASM press, 1996: 33-58.
- 112.Köksal F. Nükleik asit çoğaltma yöntemleri Durmaz R. (Ed.). Uygulamalı moleküler mikrobiyoloji, İstanbul: Print center, 2001: 15-34.
- 113.Türkyılmaz S, Esendal ÖM. Polimeraz zincir reaksiyonu ve mikrobiyolojide kullanım alanları. Kafkas univ. Vet. Fak. Derg 2002; 8(1): 71-6.
- 114.Ardic N, Ozyurt M, Sareyyupoglu B, Haznedaroglu T. Investigation of erythromycin and tetracycline resistance genes in methicillin-resistant staphylococci. Int J Antimicrob Agents 2005; 26(3): 213-8.

115. Bouchami O, Achour W, Ben Hassen A. Prevalence of resistance phenotypes and genotypes to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics in Gram-positive cocci isolated in Tunisian Bone Marrow Transplant Center. *Pathol Biol (Paris)* 2009.
116. Daurel C, Huet C, Dhalluin A, Bes M, Etienne J, Leclercq R. Differences in potential for selection of clindamycin-resistant mutants between inducible *erm(A)* and *erm(C)* *Staphylococcus aureus* genes. *J Clin Microbiol* 2008; 46(2): 546-50.
117. Smith LK, Mankin AS. Transcriptional and translational control of the *mlr* operon, which confers resistance to seven classes of protein synthesis inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(5): 1703-12.
118. Thakker-Varia S, Jenssen WD, Moon-McDermott L, Weinstein MP, Dubin DT. Molecular epidemiology of macrolides-lincosamides-streptogramin B resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31(5): 735-43.
119. Murphy E. Nucleotide sequence of *ermA*, a macrolide-lincosamide-streptogramin B determinant in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 1985; 162(2): 633-40.
120. Rouveix B. Clinical implications of multiple drug resistance efflux pumps of pathogenic bacteria. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59(6): 1208-9.
121. Webber MA, Piddock LJ. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51(1): 9-11.
122. Borges-Walmsley MI, McKeegan KS, Walmsley AR. Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs. *Biochem J* 2003; 376(Pt 2): 313-38.
123. Li XZ, Livermore DM, Nikaido H. Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to tetracycline, chloramphenicol, and norfloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38(8): 1732-41.
124. Ojo KK, Striplin MJ, Ulep CC, Close NS, Zittle J, Luis H. *Staphylococcus* efflux *msr(A)* gene characterized in *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Corynebacterium*, and *Pseudomonas* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(3): 1089-91.
125. Luna VA, Coates P, Eady EA, Cove JH, Nguyen TT, Roberts MC. A variety of gram-positive bacteria carry mobile *mef* genes. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44(1): 19-25.

- 126.Matsuoka M, Endou K, Kobayashi H, Inoue M, Nakajima Y. A plasmid that encodes three genes for resistance to macrolide antibiotics in *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol Lett 1998; 167(2): 221-7.
- 127.Allignet J, Aubert S, Morvan A, El Solh N. Distribution of genes encoding resistance to streptogramin A and related compounds among staphylococci resistant to these antibiotics. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40(11): 2523-8.
- 128.Brisson-Noel A, Delrieu P, Samain D, Courvalin P. Inactivation of lincosaminide antibiotics in *Staphylococcus*. Identification of lincosaminide O-nucleotidyltransferases and comparison of the corresponding resistance genes. J Biol Chem 1988; 263(31): 15880-7.
- 129.Wondrack L, Massa M, Yang BV, Sutcliffe J. Clinical strain of *Staphylococcus aureus* inactivates and causes efflux of macrolides. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40(4): 992-8.
- 130.Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon JJ, Gibson G, Collins MD. Direct rDNA community analysis reveals a myriad of novel bacterial lineages within the human gut. Appl Environ Microbiol 1999; 65: 4799-807.
- 131.Sghir A, Antonopoulos D, Mackie RI. Design and evaluation of a lactobacillus group-specific ribosomal RNA-targeted hybridization probe and its application to the study of intestinal microecology in pigs. Syst Appl Microbiol 1998; 21: 291-6.
- 132.Shortle D. A genetic system for analysis of staphylococcal nuclease. Gene 1983; 22(2-3): 181-9.
- 133.Oliveira D, Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the mec element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2003; 46(7): 2155-61.
- 134.Moellering RC. Current treatment options for community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. Clin Infect Dis 2008; 46(7): 1032-7.
- 135.Azap OK, Arslan H, Timurkaynak F, Yapar G, Oruc E, Gagir U. Incidence of inducible clindamycin resistance in staphylococci: first results from Turkey. Clin Microbiol Infect 2005; 11(7): 582-4.
- 136.Uyanık MH, Yazgı H, Bilici D, Özden K, Karakoç E. Hastane kökenli *Staphylococcus aureus* türlerinde makrolid-linkozamid-streptogramin B direncinin araştırılması. ANKEM Derg 2009; 23(2): 66-70.

- 137.Delialioglu N, Aslan G, Ozturk C, Baki V, Sen S, Emekdas G. Inducible clindamycin resistance in staphylococci isolated from clinical samples. Jpn J Infect Dis 2005; 58(2): 104-6.
- 138.Çolakoğlu Ş, Alışkan H, Turunç T, Demiroğlu YZ, Arslan H. *Staphylococcus aureus* suşlarında indüklenebilir klindamisin direnç prevalansı [Poster]. Klimik XIII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları kongresi. 2007.
- 139.Aydın N. Klinik örneklerimizden izole edilen stafilocokların antibiyotik direnci. ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi 2001; 2(3): 21-6.
- 140.Diler M, Kocabeyoğlu Ö. Değişik kaynaklardan izole edilen 1200 stafilocok suşunun türlere ve metisilin direncine göre dağılımı ile beta-laktam dışı bazı antibiyotiklere duyarlılık oranları. Klimik dergisi 1998; 11(3): 112-5.
- 141.Doğruman-Al F. Kan örneklerinden soyutlanan stafilocok suşlarının antibiyotiklere direnç durumları. ANKEM Derg 2005; 19(1): 14-6.
- 142.Arıdoğan A. Klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarının antibiyotiklere dirençleri. Türk mikrobiyol cem derg 2004; 34: 20-3.
- 143.Doğanay V, Kizirgil A. Kinopristin/ Dalfopristin ve diğer sekiz antimikrobiyal ajanın Gram pozitif koklar üzerine in vitro etkinliği. Fırat Üniversitesi sağlık bilimleri dergisi 2007; 21(3): 129-32.
- 144.Yurdakul A, Çalışır HC, Atasever M, Ordulu L, Öğretensoy M. Hemokültürlerden elde edilen *Staphylococcus aureus* suşlarında antibiyotik duyarlılığı. Solunum Hastalıkları 2001; 12: 107-11.
- 145.Kişioğlu S, Karataş A, Aygün G, Midilli K, Altaş K. *Staphylococcus aureus* kökenlerinde Makrolid- Linkozamid- Streptogramin direnci. Klimik dergisi 2001; 16(1): 351.
- 146.Bouchami O, Achour W, Ben Hassen A. Prevalence and mechanisms of macrolide resistance among *Staphylococcus epidermidis* isolates from neutropenic patients in Tunisia. Clin Microbiol Infect 2007; 13(1): 103-6.
- 147.Lim H, Lee H, Roh K, Yum J, Yong D, Lee K. et al. Prevalence of inducible clindamycin resistance in staphylococcal isolates at a Korean tertiary care hospital. Yonsei med J 2006; 47(4): 480-4.

- 148.Reyes J, Hidalgo M, Diaz L, Rincon S, Moreno J, Vanegas N et al. Characterization of macrolide resistance in Gram-positive cocci from Colombian hospitals: a countrywide surveillance. *Int J Infect Dis* 2007; 11(4): 329-36.
- 149.Perez LR, Caierao J, Antunes AL, d'Azevedo PA. Use of the D test method to detect inducible clindamycin resistance in coagulase negative staphylococci (CoNS). *Braz J Infect Dis* 2007; 11(2): 186-8.
- 150.Ciraj AM, Vinod P, Sreejith G, Rajani K. Inducible clindamycin resistance among clinical isolates of Staphylococci. *Indian J Pathol Microbiol* 2009; 52(1): 49-51.
- 151.Schreckenberger PC, Ilendo E, Ristow KL. Incidence of constitutive and inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci in a community and a tertiary care hospital. *J Clin Microbiol* 2004; 42(6): 2777-9.
- 152.Chaieb K, Zmantar T, Chebab O, Bouchami O, Hasen AB, Mahdouani K, Bakhrouf A. Antibiotic resistance genes detected by multiplex PCR assays in *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from dialysis fluid and needles in a dialysis service. *jpn.j.infect. dis* 2007; 60: 183-7.
- 153.Gherardi G, De Florio L, Lorino G, Fico L, Dicuonzo G. Macrolide resistance genotypes and phenotypes among erythromycin-resistant clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci, Italy. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2009; 55(1): 62-7.
- 154.Schmitz FJ, Sadurski R, Kray A, Boos M, Geisel R, Kohrer K et al. Prevalence of macrolide-resistance genes in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* isolates from 24 European university hospitals. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45(6): 891-4.
- 155.Aktas Z, Aridogan A, Kayacan CB, Aydin D. Resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics in staphylococci isolated in Istanbul, Turkey. *J Microbiol* 2007; 45(4): 286-90.
- 156.Saribas Z, Tunckanat F, Pinar A. Prevalence of *erm* genes encoding macrolide-lincosamide-streptogramin (MLS) resistance among clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in a Turkish university hospital. *Clin Microbiol Infect* 2000; 12(8): 797-9.



## 10. EKLER

### **EK 1: Tris- Borik asit- EDTA (TBE) tamponu 5X Hazırlanması**

Tris baz.....54 g                      800 ml deiyonize suda çözülür  
Borik asit.....27,5 g                      Son hacim 1000 ml ye tamamlanır.  
0,5 M EDTA ph 8,0... 20 ml

0,5 M EDTA: 186,1 G Na-EDTA + 800 ml deiyonize su. Manyetik karıştırıcı üzerine konan karışıma tedrici olarak NaOH pelletleri eklenir. NaOH eklenmesi ile birlikte EDTA çözülmeye başlar. pH kontrol edilerek çözelti 1000 ml'ye tamamlanır. Otoklavda steril edilir.

### **EK 2: Loading Dye Hazırlanması**

4 g sukroz + 2,5 mg bromophenol blue + 6 ml Tris- EDTA (TE) tamponu içerisinde çözülür. TE tamponu ile hacim 10 ml ye tamamlanır.

Tris- EDTA tamponu pH 8,0 10X : Tris HCl (istenilen pH da) 10 ml  
EDTA pH 8,0 2 ml  
Deiyonize su 88 ml

1X TE: 1 birim 10X TE çözeltisi 9 birim deiyonize su ile karıştırılır.

### **EK 3: Marker hazırlanması**

30 µl Lambda DNA (Fermentas® 0,3 µg/µl )

30 µl PstI buffer (Fermentas®)

4 µl PstI

236 µl distile su

37°C de 1 saat inkübasyon. Sonrasında 30 µl 6X loading dye eklenir.

### **EK 4: Etidyum Bromür Stok**

Deiyonize su içinde 10 mg/ml konsantrasyonunda hazırlanır. (1 g etidyum bromür + 100 ml deiyonize su) Manyetik karıştırıcıda karıştırılır. Solüsyonun bulunduğu şişe alimünyum folyo ile sarılmalı ve 4°C de saklanmalıdır. Mutajenik bir kimyasaldır. Çevre kontaminasyonu olmamasına dikkat edilmeli ve eldiven ve maske kullanılmalıdır.