



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK BAKTERİYOLOJİ VE ENFEKSİYON HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

**STAPHYLOCOCCUS TÜRLERİNDE METİSİLİN DİRENCİNİN FARKLI
YÖNTEMLERLE SAPTANMASI VE SCC_{mec} TİPLENDİRMESİ**

Dr. Emine SEVGİCAN

UZMANLIK TEZİ

BURSA-2006



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK BAKTERİYOLOJİ VE ENFEKSİYON HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

**STAPHYLOCOCCUS TÜRLERİNDE METİSİLİN DİRENCİNİN FARKLI
YÖNTEMLERLE SAPTANMASI VE SCC_{mec} TİPLENDİRMESİ**

Dr. Emine SEVGİCAN

UZMANLIK TEZİ

BURSA-2006



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK BAKTERİYOLOJİ VE ENFEKSİYON HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

**STAPHYLOCOCCUS TÜRLERİNDE METİSİLİN DİRENCİNİN FARKLI
YÖNTEMLERLE SAPTANMASI VE SCC_{mec} TİPLENDİRMESİ**

Dr. Emine SEVGİCAN

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. Suna GEDİKOĞLU

BURSA-2006

İÇİNDEKİLER

ÖZET	ii
SUMMARY	iii
GİRİŞ	1-3
GENEL BİLGİLER	4-28
GEREÇ VE YÖNTEM	29-33
BULGULAR	34-39
TARTIŞMA VE SONUÇ	40-48
EKLER	49-56
KAYNAKLAR	57-62
TEŞEKKÜR	63
ÖZGEÇMİŞ	64

ÖZET

Metisilin dirençli stafilokoklar, giderek artan sıklıkta ciddi nozokomiyal ve toplum kökenli enfeksiyonlara neden olmaktadır. Antistafilokokal beta-laktam antibiyotiklere fenotipik heterojen ilaç direnci (heterorezistans), duyarlılık testlerinin sonuçlarını etkilemektedir. Rutin oksasilin disk difüzyon testleri, metisiline dirençli stafilokoklarda heterojen direnci belirlemede yetersiz kalabilmektedir.

Bu çalışmada 100 metisiline dirençli *S aureus* (MRSA) ve 100 koagülaz negatif stafilokok klinik izolatında, bir sefamisin antibiyotik olan sefoksitin (30µg) (BD) kullanılarak disk difüzyon yöntemiyle değerlendirilmesi yapıldı. Stafilokoklarda metisilin direncini tarama amacıyla; oksasilin (1 µg) (BD), sefoksitin (30 µg) (BD) disk difüzyon ve oksasilin, sefoksitin E-testi (AB Biodisk Sonia, Sweden) çalışılarak sonuçlar karşılaştırıldı. Farklı yöntemlerin performansları irdelendi ve diğer testler ile karşılaştırıldı. Sonuçlar; sefoksitin disk difüzyon testinin, oksasilin disk difüzyon ve E-test yöntemleri ile irdelendiğinde, metisilin direncini saptamak için rutin çalışmada kullanılabileceğini gösterdi. PCR (Polymerase Chain Reaction) ile *mecA* geninin saptanması altın standart olarak kabul edilmektedir. Metisilin direncini kodlayan *mecA* genini içeren ve staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCCmec) olarak isimlendirilen mobil genetik elementin tiplendirilmesi yapıldı. SCCmec tiplendirilmesinde multiplex PCR yöntemi kullanılarak, 100 MRSA suşundan 93'ünde tip III SCCmec saptandı, beş suş tiplendirilemedi ve 2 suşda *mecA* geni saptanmadı.

Anahtar Kelimeler: Metisilin direnci, SCCmec, multipleks PCR

SUMMARY

Methicillin-resistant staphylococci are responsible for an increasing number of serious nosocomial and community-acquired infections. Phenotypic heterogeneous drug resistance to antistaphylococcal beta-lactams affects the results of susceptibility testing. Routine oxacillin disk diffusion tests often fail to detect heterogeneous methicillin-resistant staphylococcus populations.

In the present study, a recently proposed disk diffusion method that employs a cephamycin antibiotic (cefoxitin 30 µg; BD) was evaluated using 100 clinical isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and 100 clinical isolates of Coagulase-Negative Staphylococci (CoNS). The results were compared with those of other Methicillin-resistant Staphylococci screening techniques: a disk diffusion test with oxacillin 1 µg and cefoxitin 30 µg (BD), an E-test with oxacillin and cefoxitin (AB Biodisk Sonia, Sweden). The performances of the different methods were determined and compared with each other. The results showed that the cefoxitin disk diffusion test is suitable to the oxacillin disk diffusion and E-test method for routine screening to detect methicillin-resistant staphylococci. Detection of the *mecA* gene by polymerase chain reaction was considered the gold standard. SCC*mec* typing analyzes a mobile genetic element called the staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*), which contains the *mecA* gene encoding methicillin resistance. The SCC*mec* types were determined by a multiplex PCR strategy, out of the total of 100 strains, 93 had SCC*mec* type III. Five strains were nontypeable and two strains had not found *mecA* gene.

Key words: Methicillin resistance, SCC*mec*, multiplex PCR

GİRİŞ

Staphylococcus spp. çok sayıda tür içeren, deri ve mukozalarda kolonize olabilen, değişik türleri ile farklı hastalıklar yapan önemli bir bakteri cinsi; *Staphylococcus aureus* (*S aureus*) ise, çok sayıdaki patojenik faktörü ile çeşitli doku ve organlarda ciddi enfeksiyonlar oluşturabilen en önemli türüdür. *S aureus* dışında kalan türler koagülaz negatif stafilokoklar (KNS) olarak isimlendirilir. KNS'lar, geçmişte sadece flora elemanı olarak kabul edilirken; günümüzde özellikle hastane kaynaklı enfeksiyon etkenleri arasında yer almaları nedeniyle, önemleri giderek artmaktadır (1,2). Stafilokokların genom yapısı ile ilgili olarak yapılan çalışmalar, evölüsyonu sırasında farklı bakterilerden gen transferi yaptığını ortaya koymuştur. Transfer ettiği gen bölgeleri patojenitesi yanında antibiyotik direnci ile de ilgilidir. Özellikle hastane kaynaklı suşlar çoklu antibiyotik dirençleri ile tedavi açısından önemli sorunlar oluşturmaktadır. Son yıllarda toplum kaynaklı olarak da dirençli suşların saptanması konunun önemli bir diğer boyutunu oluşturmaktadır (3-6).

S aureus son yarım yüzyıl içinde, spektrumunda yer alan hemen tüm antimikrobiyal ajana karşı direnç geliştirmiştir. Penisilinin yaygın olarak kullanımının ardından kısa sürede penisilin direnci, metisilin kullanımından bir yıl sonra da metisiline karşı direnç tanımlanmıştır (6-8). Metisilin direncinin genetik mekanizması, son yıllarda oldukça ayrıntılı olarak ortaya konmuştur. Metisilin direncini sağlayan *mecA* geni, Staphyococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) adı verilen 21-67 kb bir DNA bölgesinde yer alır. Bakteri kromozomunun replikasyona başlama noktası olan *oriC* bölgesine, SCC*mec* bölgesinin transfer edilmesi ile genoma taşınmakta ve MRSA suşları pratik olarak tüm β -laktam antibiyotiklere dirençli hale gelmektedir (5-7,9-11).

SCC*mec* gen bölgesinin, genom üzerindeki lokalizasyonu önemlidir. Replikasyona başlama bölgesine yakın olarak yer alması, diğer bakteri

cinslerinden gelecek olan ve kendisi için yararlı olacak direnç geni içeren bölgeleri yapısına almasını kolaylaştırmaktadır. SCCmec gen bölgesi mobil genetik elementtir. Faj ilişkili gen, özgül transpozaz ve *tra* genleri içermezler. Hareket edebilmeleri, kaset kromozom rekombinaz A ve B (cassette chromosome recombinase A ve B – *ccrA* ve *ccrB*) gibi iki spesifik gen bölgesi ile sağlanmaktadır. Bu sayede SCCmec kromozomda uygun bölgeye integre olup, ayrılabilir (6,7,9,10,12,13).

SCCmec bölgesi bir genomik adadır. Virulans geni taşımamakla beraber, yapısının büyük olması nedeniyle patojenite adasına benzediği, ancak antibiyotik direnç adası olarak tanımlanmasının daha doğru olacağı görüşü hakimdir. Zira SCCmec bölgesi, *mec* gen kompleksi yanında, non - laktam antibiyotiklere karşı da direnç genleri taşıyabilmektedir (9,10,12,14).

Yapılan çalışmalar, SCCmec gen bölgesinin farklı allotipik formları olduğunu, ancak *ccrA* ve *ccrB* genlerini mutlaka içerdiğini göstermektedir. *mec* gen kompleksinin; IS431*mec*, *mecA* ve regülatör genler olarak *mecR1*, *mecI* temel iki genetik komponenti vardır. Günümüzde, SCCmec gen bölgesi, *mec* gen ve *ccr* gen komplekslerinin kombinasyonuna göre 4 tipe ayrılmaktadır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, Tip I, II ve III sadece hastane kaynaklı izolatlarda saptanmış, toplum kaynaklı MRSA suşlarında ise sadece Tip IV SCCmec varlığı bildirilmiştir (6,9,10,14,15). Bazı çalışma sonuçları, bu özelliğin bir epidemiyolojik marker olarak kullanılabileceği görüşünü ortaya koymuştur (9,14,16).

MRSA izolatlarının çoklu antibiyotik dirençleri nedeniyle, tedavide yarattıkları sorunlar giderek artmaktadır. Metisilin direnci grup direncini temsil ettiği için, MRSA ve MRSE izolatlarında tek tedavi seçeneği glikopeptidler olmaktadır. Glikopeptidlerin yaygınlaşan kullanımları, duyarlılığı azalmış suşlar (GISA) ve enterokoklarda glikopeptid direncini gündeme getirmiştir (5,8,13,17). Hem glikopeptidlerin gereksiz kullanımından kaçınmak hem de

hastaya en kısa zamanda en etkili tedaviyi verebilmek için metisilin/oksasilin duyarlılığının hızlı ve doğru olarak tanımlanması gerekmektedir (5,14).

Çalışmamızın amacı; stafilokoklarda konvansiyonel yöntemlerle saptanan metisilin direncinin, moleküler yöntemler ile araştırılarak sonuçların karşılaştırılması, metisilin/oksasilin duyarlılığını saptamak için laboratuvarımıza en uygun olan yöntemi belirlemek ve SCCmec gen tiplerini belirleyerek literatüre katkıda bulunmaktır.

GENEL BİLGİLER

Stafilokok Türlerinin Genel Özellikleri

Micrococcaceae ailesinde yer alan *Staphylococcus* cinsi bakteriler, 0.5-1.5 µm çapında gram pozitif koklardır. Birden fazla düzlemde bölündüğü için genellikle üzüm salkımı şeklinde kümeler oluşturur. Bazen tek tek, ikili, veya dörtlü kümeler şeklinde görülebilir. Hareketsiz ve sporsuzdurlar. *Staphylococcus saccharolyticus* ve *Staphylococcus aureus subsp. anaerobius* türleri dışında katalaz pozitif, oksidaz negatiftirler. *Staphylococcus saccharolyticus* ve *Staphylococcus aureus subsp. anaerobius* zorunlu anaerob, diğer stafilokokların hepsi aerob veya fakültatif anaerob bakterilerdir. Çoğunluğu %7,5-10 NaCl içeren basit besiyerlerinde ve 18-45°C'de kolaylıkla ürerler. Basitrasin, furazolidon ve lizostafine duyarlı olmalarına karşın, lizozime dirençlidirler. *S aureus* kanlı agarda beta hemoliz oluşturur (1,2,14,18).

Stafilokokların, güncel olarak 35 tür ve 17 alt türü mevcuttur. *S aureus*, *S epidermidis*, *S haemolyticus*, *S lugdunensis*, *S saprophyticus* insanlarda en sık enfeksiyona neden olan türlerdir (2,14,18)

Tür Tanımı

Stafilokoklar, katalaz ve koagülaz enzimlerine sahiptir. Katalaz enziminin saptanması, streptokoklardan ayrımı için önemlidir. Koagülaz, ekstrasellüler bir proenzimdir. Plazmada bulunan Coagulase reacting factor(CRF) ile birleşerek plazmayı pıhtılaştırır. Koagülaz testi insan veya tavşan plazması ile tüpte veya lam üzerinde yapılır. *S aureus* idantifikasyonu için tüp koagülaz testi referans yöntemdir. *S aureus* dışında tüp ve/veya koagülaz pozitif olabilen stafilokok türleri; *S intermedius*, *S hyicus*, *S*

lugdunensis, *S schleiferi subsp. coagulans*, *S schleiferi subsp. Schleiferi*'dir (1,14,19).

S aureus'tan temel olarak koagülaz testinin negatif olması ile ayrılan ve bu nedenle koagülaz-negatif stafilokoklar (KNS) olarak adlandırılan 40'a yakın stafilokok tür ve alt türü bulunur. KNS insan mikroflorasının önemli üyeleridir. Ayrımları için bir seri test yapılması gerekir. *S epidermidis* en sık karşılaşılan ve klinik olarak önemi kabul edilen türdür (2,14,18).

Klinik Önemleri

S aureus, içerdiği çeşitli virulans faktörleri ile stafilokoklar arasındaki en patojen türdür. Pek çok klinik tablodan sorumlu olabilir. Toplum veya hastane kaynaklı oluşuna göre klinik formu, morbidite ve mortalitesi yönünden farklılık gösterir. Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, yara enfeksiyonu, pnömoni, ampiyem, osteomyelit, septik artrit, endokardit, bakteriyeminin yanı sıra, toksin etkisi ile besin zehirlenmesinden toksik şok sendromuna kadar değişen hastalık tablolarına yol açabilir (1,14).

İnvazif işlem uygulanan ve bağışıklık sistemi baskılanmış hasta sayısındaki artışa paralel olarak, KNS türleri ile oluşan özellikle hastane kökenli enfeksiyonların önemi giderek artmaktadır. KNS'lerin neden olduğu enfeksiyonlar arasında yabancı cisim ile ilgili bakteriyemi, şant, protez, pacemaker ve vasküler greft enfeksiyonları, kalp kapakçığı endokarditleri, osteomyelit, septik artrit, ventrikülo-peritoneal şant ve periton diyalizine bağlı peritonit, mediastinit, prostatit sayılabilir (1,2,14,18,20). KNS türleri, klinik mikrobiyoloji laboratuvarında en sık izole edilen bakteriler arasındadır. Ancak normal deri ve mukoza florasında da yer almaları nedeniyle, gerek mikrobiyolog gerekse klinisyen için kontaminant-patojen ayrımını yapmak çoğu zaman zor olabilmektedir (2,14).

MRSA suşları, duyarlı *S aureus*'a göre daha fazla virulans faktörüne sahip olmamakla beraber, önemli bir morbidite nedenidir. Hayatı tehdit eden klinik tablolara yol açabilir ve tedavisi güçtür. Uzun süre hastanede yatma gereği, ciddi mali yük ve mortalite nedeni olur (14,21).

Birçok hastanede endemik hale gelmiş olan MRSA'un bulaşında en önemli neden direkt temastır. Kaynak, sıklıkla MRSA ile kolonize veya enfekte olan hastalar ve MRSA taşıyıcısı olan sağlık çalışanlarıdır. MRSA kolonizasyonu burun, aksilla, perine, kronik yara veya dekübit ülseri üzerinde, gastrostomi veya trakeostomi alanı çevresinde, balgam veya idrarda olabilir. Hastalar ve sağlıklı kişilerde kolonizasyonun en sık görüldüğü yer burundur. Ancak hastaya MRSA bulaşında, sağlık çalışanlarının elleri en önemli aracıdır (14,21). Hastanede yatarken MRSA kolonizasyonu gelişen kişilerde % 30-60 oranında MRSA enfeksiyonu ortaya çıkabilmektedir. MRSA'nın neden olduğu hastane salgınları birçok kuruluş için önemli sorunlar yaratabilir. Küçük salgınların kontrol altına alınması üç ay kadar sürerken, genellikle üçüncü basamak sağlık kuruluşlarında ortaya çıkan daha büyük boyutlu salgınların yıllarca sürdüğü bilinmektedir. Önemli bir boyut da, bir hastanedeki salgının hasta sevk ve nakilleri nedeniyle bölgedeki diğer hastaneleri etkilemesidir. Hasta ile doğrudan teması olan ve hasta bakımı ile ilgili kişiler, alınacak önlemler, önlemlerin uygulanması ve uygulamaların kontrolü konusunda sürekli olarak eğitilmelidir. İzolasyona alınan hasta ve ailesi, izolasyonun nedeni, kontrol önlemleri ve önemi konusunda bilgilendirilmelidir (14).

Enfeksiyon kontrol politikalarının çok önemli bir boyutu antibiyotik kullanımının kontrolüdür. MRSA prevalansının yüksek olduğu ülkelerde, enfeksiyon kontrol önlemlerine ek olarak antibiyotik kullanımının kısıtlanmasının öncelikli bir uygulama olması gerektiği gösterilmiştir. MRSA'nın yaygın olduğu sağlık kuruluşlarında, kapıdaki tehlike glikopeptid direncidir. Glikopeptidlerin kontrollü kullanımı gram pozitif bakterilerde vankomisin direnci

gelişmesi riskinin azaltılması açısından önemlidir. Vankomisin ve teikoplaninin uygun endikasyonda sadece tedavi amacıyla kullanılması, zorunlu özel koşullar dışında profilakside kullanılmaması, taşıyıcılığın tedavisinde yeri olmadığı bilmesi MRSA kontrol programlarının önemli bir amacıdır (14,21-23). MRSA enfeksiyonlarının tedavisi, kullanılan antibiyotiklerin maliyetinin yanı sıra hastanede uzun süre yatış gerektirmesi ve iş gücü kaybı nedeniyle ciddi mali yük oluşturmaktadır. Oysa MRSA kontrol programlarının başarıyla uygulandığı merkezlerde yapılan çalışmalar, bu programların getirdiği mali yükün, enfeksiyonun tedavisi için gerekenden çok daha az olduğunu ortaya koymuştur (14,21).

Bakteri Duvarının Yapısı

Hücre duvarı, bakteri hücrelerine şekil veren ve hücre içi yüksek ozmotik basıncına karşı bakterinin parçalanmasını önleyen önemli bir yapıdır (1,14,24). Diğer Gram pozitif bakterilerde olduğu gibi, stafilokoklarda da hücre duvarı kuru ağırlığının % 50'sini peptidoglikan tabaka oluşturur. Peptidoglikan tabaka ana iskeleti; N-asetilglukozamin (NAG) ve N-asetilmuramik asit (NAM) moleküllerinin β 1-4 bağları ile ard arda bağlanması ile oluşur. N-asetilmuramik asite bağlı olan pentapeptid yan zincirleri, pentaglisin köprüleri ile bir zincirde D-alanin ile diğer zincirdeki L-lizin arasında olacak şekilde birbirlerine bağlanır ve bu yapı çok katlı tabakalanma gösterir. Stafilokokların peptidoglikan tabakası; makrofajdan sitokin salınımını uyarır, komplemanın aktivasyonuna yol açar, trombosit agregasyonuna neden olur. Ayrıca monositlerden interleükin 1(IL-1) salınımını uyararak polimorfonükleer lökositlerin enfeksiyon bölgesine toplanmalarına ve sonuçta apse oluşumuna da yol açar (1,14,18,21). Lizozim (muramidaz) enzimi ter, göz yaşı ve lökositlerde bulunur ve hedefi stafilokok ve diğer gram pozitif bakterilerin peptidoglikan tabakasının β 1-4 bağlarıdır. Stafilokokların peptidoglikan tabakasında bulunan pentaglisin köprülerinin lizostafin enzimine özgül bir duyarlılığı vardır, bu nedenle stafilokok türü

bakterileri tanımlamak amacıyla kullanılır (1,2,14). Bir diğer hücre duvarı komponenti, sadece gram pozitif bakterilerde bulunan ve fosfat içeren polimerler olan teikoik asittir. Teikoik asit, konak mukozalarındaki özgül reseptörleri (fibronektin, fibrinojen, laminin, trombospondin, vitronektin, elastin, sialoprotein ve kollajen) ile birleşerek stafilokokların konağa adherensini sağlar. Teikoik asit tek başına zayıf bir immunojendir, ancak peptidoglikan ile birlikte iken özgül antikor yanıtını uyarabilir (1,2,14,20). Stafilokokların peptidoglikan tabakasının dış yüzeyinde bazı önemli yüzey proteinleri yer alır. Protein A, elastin, kollajen ve fibronektin bağlayan proteinler ile kümeleşme faktörü (clumping faktör), kimyasal yapıları ve hücre duvarı yerleşimleri birbirlerine benzeyen stafilokoksik yüzey proteinleridir. MSCRAMM (microbial surface proteins recognizing adhesive matrix molecules) olarak tanımlanan bu proteinler stafilokokların konak dokularında kolonize olmasında en önemli faktörlerdir. 42.000 Da molekül ağırlığındaki protein A bu grubun prototipidir. En önemli özelliği bazı immunglobulinlerin (IgG₁, IgG₂, IgG₄) Fc reseptörleri ile birleşebilmesidir. Böylece protein A bakteriyi antikora bağlı fagositozdan, ayrıca hücre dışına salgılanan protein A da aynı reseptörlere bağlanarak komplemana bağlı vücut savunmasından korur (1,14,20,25).

Peptidoglikan Yapımı

Peptidoglikan sentezi üç ana basamaktan oluşur: sitoplazmada ilk olarak UDP-N-asetil-glukozamin (NAG) ve UDP-N-asetilmuramil-pentapeptid (NAMP) sentezlenir. N-asetil-muramik aside (NAM) bağlanan pentapeptid yapısı sıra ile; L-alanin, D-glutamik asit, L-lizin, D-alanin, D-alanin şeklindedir. Daha sonra NAG ve NAMP lipidik yapıdaki bir transportör aracılığıyla sitoplazmik membranı geçer. Bu geçiş sırasında NAG ve NAMP birleşerek dimerler oluşturur ve periplazmik aralığa geçer. Ardından bu disakkarid pentapeptidler, transglikozilasyon aracılığıyla birleşerek bir glikan zinciri oluştururlar. Son basamakta, bir pentapeptiddeki son D-alanin ile diğer

pentapeptiddeki L-lizin arasında transpeptidasyon olur, bu reaksiyon sırasında L-lizinin ait olduğu pentapeptiddeki D-alanin, L-lizinden ayrılır. Transglikozilaz, disakkarid pentapeptidlerin birbirlerine bağlanmalarını, transpeptidaz pentapeptid köprüler oluşturarak peptidoglikan yapının retiküler bir yapı kazanmasını ve D-D karboksipeptidaz L-Xaa'nın ait olduğu pentapeptid yapı içindeki son D-alaninin zincirden ayrılmasına neden olur. Beta-laktam antibiyotikler, peptidoglikan sentezini, spesifik olarak karboksipeptidaz ve özellikle de transpeptidazları inhibe ederek durdururlar. Bu enzimlere penisilin bağlayıcı proteinler (PBP) adı verilir, çünkü inhibisyon beta-laktam antibiyotiklerin bu enzimlere fiske olması sonucu gelişir. *S aureus*'da PBP1, PBP2, PBP3, PBP4 olmak üzere dört tane PBP vardır (1,2,14).

Metisilin Direnci

Penisilin 1940'lı yıllarda stafilokokal enfeksiyonların tedavisinde kullanılması morbidite ve mortaliteyi çok kısa bir sürede azaltmış, ancak 1944 yılında İngiltere'de, beta-laktamaz üretimine bağlı ilk penisilin direnci bildirilmiştir. Alternatif ilaçlar olarak kullanılan tetrasiklin, makrolid, sülfonamid gibi ilaçlara da çok kısa zamanda direnç gelişmiştir (6,10,11,14). Avrupa'nın diğer ülkelerinde de durum benzer şekilde seyretmiş, ABD ve Avustralya için 1970'li yılların ortalarına kadar MRSA sorun oluşturmazken, bu tarihten sonra çeşitli merkezlerde neden olduğu salgın ile gündeme girmiştir (6,26).

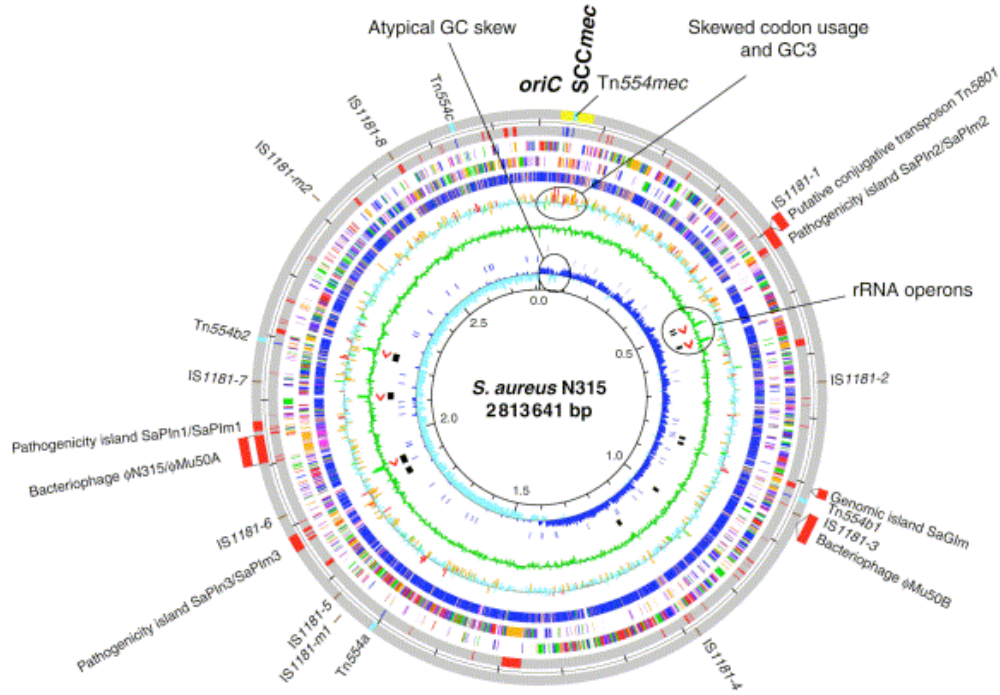
Penisilinaz enziminin amid bağa ulaşımını engellemek amacıyla, benzilpenisilindeki fenoksi grubunun yerine metoksi grubunun eklenmesiyle 1959 yılında metisilin elde edilmiştir. Fakat klinik kullanımdan kısa bir süre sonra, 1961 yılında ilk metisiline dirençli *S aureus* suşu İngiltere'den bildirilmiştir. Penisilin dirençli suşlarda olduğu gibi, metisilin dirençli suşlar da beraberlerinde diğer antimikrobiyallere ait direnç genlerini de taşımaktadırlar (10,11,13,14,27). Kısa sürede hastane kaynaklı MRSA suşları tüm beta

laktamlara dirençli hale gelmiştir (6). Metisilin/oksasilinin minimal inhibitör konsantrasyonunun (MİK) 4 µg/mL üzerinde olması halinde, bakteri metisilin ve tüm beta laktamlara dirençli kabul edilir (3,14,28).

Son 10 yıl içinde metisilin direncinden sorumlu mekanizmaların anlaşılmasına yönelik önemli başarılar elde edilmiş, iki MRSA suşunun tüm gen haritası çıkartılmıştır (11,13,14). Metisilin direncinden sorumlu mekanizmalar; *mecA* geninin kodladığı PBP2a yapımı, PBP'lerin beta –laktam antibiyotiklere afinitelerinde azalma ve beta-laktamazların aşırı yapımı şeklinde özetlenebilir (3,12,14).

Stafilokoklarda metisilin direncinin ortaya çıkması, PBP2a'nın yanı sıra başka faktörlere de bağlıdır. PBP2a, PBP2'nin transglikozilasyon aktivitesine ve çapraz bağlantıda rol oynayan pentaglisin köprüsüne mutlak bağımlıdır. Pentaglisin köprüsünün sentezinde rol oynayan *femABX* genlerinde mutasyon olması halinde PBP2a'ya bağlı metisilin direnci görülmez. Bunun dışında hücrel otolizinlerin aktivitesi çok fazla ise metisilin MİK düzeylerinin düştüğü görülür. Bu faktörlerin etkisiyle metisilin direnci sıklıkla heterojendir, yani 10^4 - 10^8 bakteride bir görülür. Yine *mecA* varlığına rağmen metisilin MİK düzeylerinin düşük olduğu izolatlar bulunmaktadır. Pre-MRSA olarak adlandırılan bu izolatlarda *med – mecR1* düzenleyici genleri işlevseldir. İn vitro ortamda metisilin direnci görülmezken, in vivo ortamda beta-laktam ajanla karşılaşıncaya direnç ortaya çıkar. Bu nedenlerle, heterojen dirençli izolatların saptanması için *mecR1* için daha iyi, hızlı bir indükleyici olan sefoksitin kullanılması, otolizinlerin etkisini azaltmak için besiyerine %2-4 oranında NaCl eklenmesi, *mecA* gen ekspresyonunun artırılması için düşük ısıda uzun süre (tam 24 saat) inkübasyon gibi yöntemler kullanılmaktadır (29).

Nadiren *mecA* negatif olmasına rağmen oksasilin minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerleri 8-16 mg/L civarında olan suşlar bulunabilmektedir. Bunların bir kısmı beta-laktamazın aşırı üretiminden



Şekil-1: *S. aureus* N315 suşunun genomik yapısı ve SCCmec gen kompleksinin yerleşimi (6).

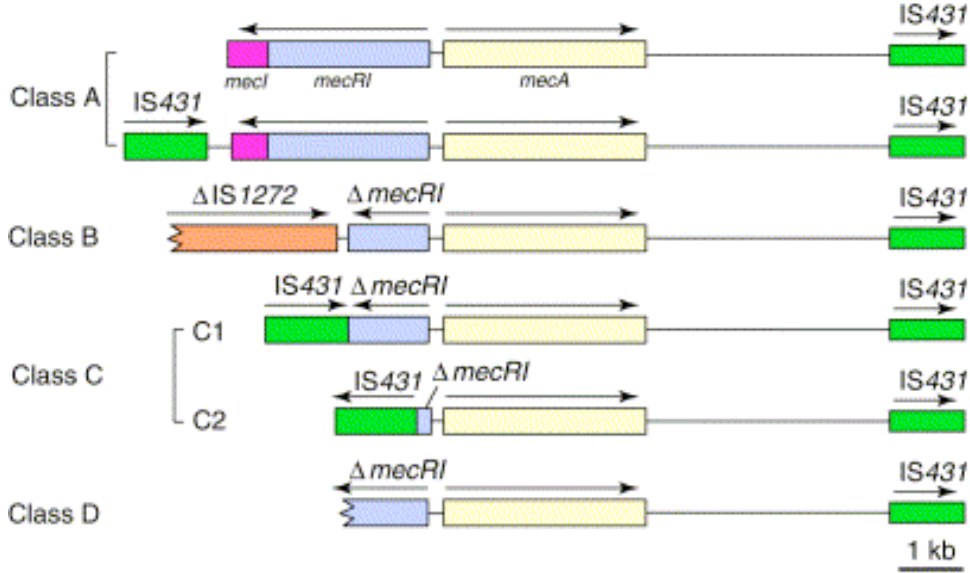
SCCmec gen bölgesi kromozoma (*attB_{scc}*) bölgesinde integre olur. *attB_{scc}*, *orfX* olarak tanımlanan ve fonksiyonu çok iyi bilinmeyen bir open reading frame içerir. Bu yapı klinik *S. aureus* suşlarında iyi korunmuş bir bölgedir. SCCmec; *mec* gen kompleksi ve *ccr* gen kompleksi olmak üzere iki ana genetik komponentten oluşur. *mec* gen kompleksi *IS431_{mec}*, *mecA* ve regüle edici genler olan *mecR1* ile *mecI* dan oluşmaktadır (6,33). İçerdikleri yapılara göre *mec* gen kompleksi dört sınıfta incelenir (6).

- . Sınıf A, *IS431-mecA-mecR1-mecI*
- . Sınıf B, *IS431-mecA-ΔmecR1-IS1272*
- . Sınıf C, *IS431-mecA-ΔmecR1-IS431*
- . Sınıf D, *IS431-mecA-ΔmecR1*

[Borderline resistant *S aureus* (BORSA)], bir kısmı da var olan PBP'lerdeki nokta mutasyonlarından veya PBP4'ün (düşük molekül ağırlıklı PBP) aşırı yapımından kaynaklanabilir (29).

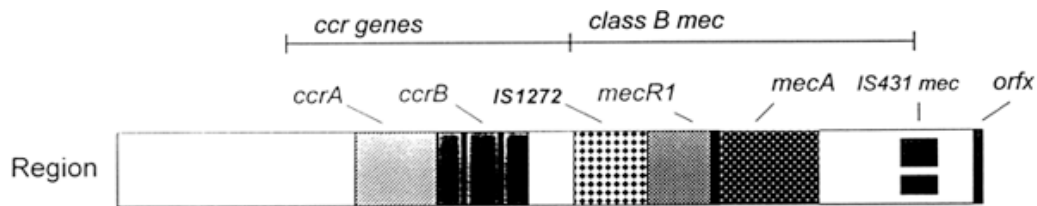
MRSA'nın Ortaya Çıkışı

Metisilin duyarlı *S aureus*'un, stafilokokal kaset kromozom mec (SCCmec) olarak bilinen geniş bir genetik element kazanması ile MRSA doğmuştur. SCCmec, *S aureus*'un replikasyon merkezine yakın bir bölgede MRSA kromozomuna integre olmuş 21-67 kb'lık bir DNA parçasıdır (6,9). SCCmec'in replikasyon merkezine yakın bir bölgede yerleşmesi, antibiyotik direnç genlerini çabuk almasını sağlayarak bakteriye önemli bir avantaj kazandırmaktadır (6,12,14). SCCmec, fajla ilişkili olmayan, spesifik transpozaz ve *tra* genleri içermeyen bir çeşit mobil genetik elementtir (6). SCCmec olarak adlandırılan bu genomik adacıklarda, *mecA* geninin yanı sıra diğer antimikrobiyal ajanlara dirençten sorumlu genler, insersiyon sekansları ve fonksiyonları henüz bilinmeyen genler yer alır. *mecA* geninin *Staphylococcus sciuri*'den köken aldığı düşünülmektedir. *S sciuri*'deki *mec* geni ile MRSA'daki *mec* geninin ürünleri arasında % 88 amino asit homolojisi olduğu belirlenmiştir. Fakat dünyanın farklı coğrafik bölgelerindeki toplum kökenli MRSA izolatlarında eş zamanlı olarak SCCmec tip IV'ün izole edilmesi, başka bir koagülaz negatif stafilokoktan simültane horizontal geçiş olabileceğini de akla getirmektedir (6,7,11,14,30-32).



Şekil-2: *mec* gen kompleksinin 4 sınıfı (6).

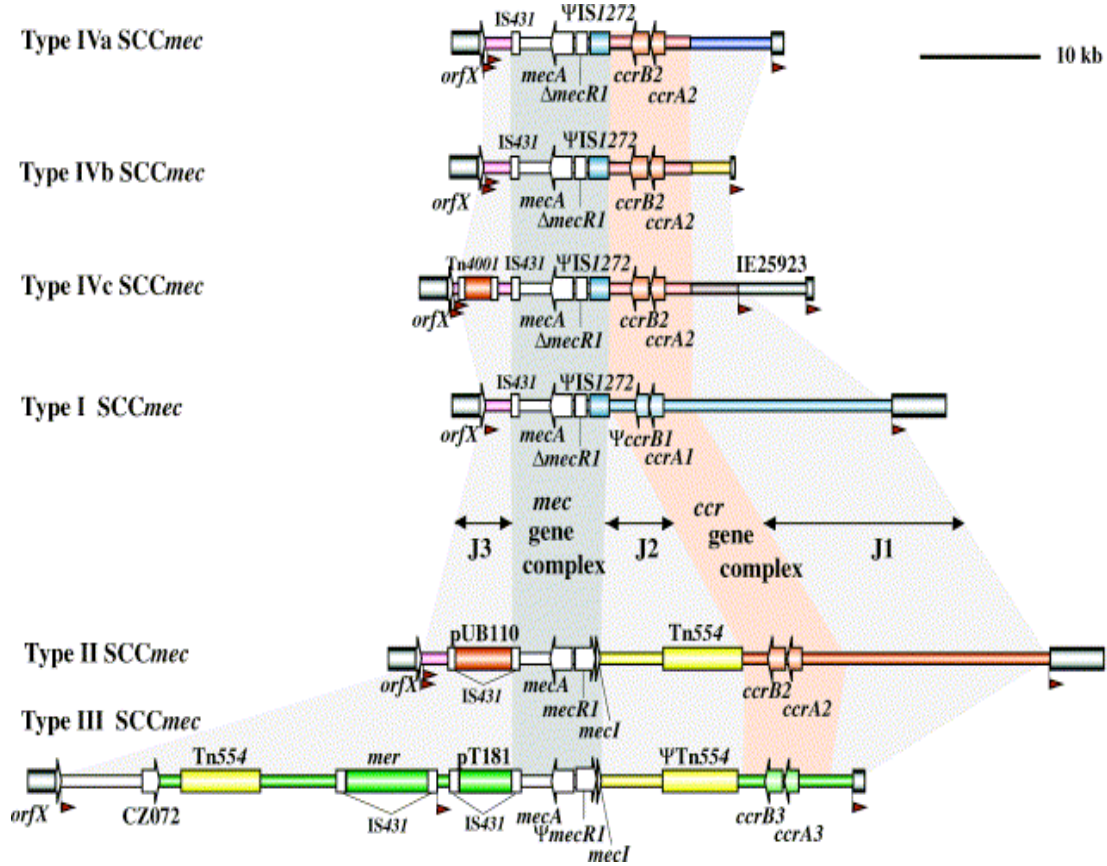
İkinci ana genetik yapı olan *ccr* gen kompleksi iki bölgeye özgü (site-specific) rekombinaz geni içermektedir. Bunlar invertaz/rezolvaz ailesinden *ccrA* ve *ccrB* olarak tanımlanmış iki rekombinazı kodlayan genlerdir. Söz konusu genler *attB_{SCC}* tarafındaki kromozoma ait bölgeye özgü integrasyon ve eksizyondan sorumludur. *ccrA* ve *ccrB* adlı rekombinazlar *SCC_{mec}*'in mobilitesini sağlarlar. *ccrA*, invertaz varlığında *SCC_{mec}* kromozomun doğru bölgesine girer ve *ccrB*, rezolvaz ile kromozomdan tam bir şekilde, eksiksiz olarak ayrılır (6-8,11,14,26).



Şekil-3: *ccr* gen kompleksinin yapısı

SCC*mec*'in geri kalanı, değişik orf bölgeleri içerir. J (junkyard) bölgesi olarak adlandırılır. J bölgeleri; SCC*mec* tipleri ve alt grupları içinde farklılık gösterir ve SCC*mec*'in boyut değişikliklerinin bu nedenle olduğu düşünülmektedir. Bakteri hücresi için esansiyel olmayan çok çeşitli gen veya psödogenleri içerir. Plazmidler veya transpozonlar tarafından kaynaklanan non-beta laktam antibiyotikler veya ağır metallere direnç genleri yer alır (10-11).

Günümüzde 21-67 kb ağırlığında tanımlanmış Tip I, II, III, IV olarak ifade edilen dört farklı SCC*mec* elemanı vardır. SCC*mec* tipleri; içerdikleri sınıf *mec* gen kompleksi ve *ccr* gen kompleksine göre düzenlenir (6,10).



Şekil-4: SCC*mec* tipleri (11).

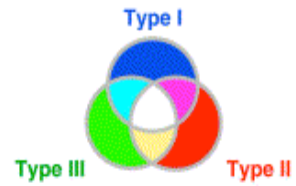
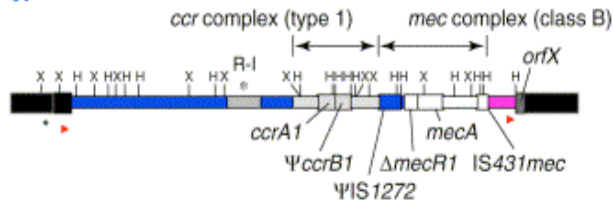
Tip I SCCmec: Sınıf B *mec* gen kompleksi ve tip I *ccr* gen kompleksinden oluşmaktadır. 1961 yılında izole edilen en eski MRSA suşunda bulunmuştur. Tip I SCCmec'in J bölgesi bir yüzey proteinini kodlayan *pls* genini içermektedir. Bu gen fibronektine bakteriyel adherensi etkilemektedir. Bu fonksiyon *S aureus*'un enfeksiyonu başlatılmasında önemlidir. Tip I SCCmec, *mec A* haricinde herhangi bir antibiyotik direnç geni taşımamaktadır (6).

Tip II SCCmec: Sınıf A *mec* gen kompleksi ve tip II *ccr* gen kompleksinden oluşmaktadır. J bölgesinde pUB110 plazmidi ve Tn554 transpozonu bulunmaktadır. SCCmec tip II ve III MRSA suşlarının özelliği, çoklu ilaç direncine neden olmaları ve özellikle hastane ortamında bulunmalarıdır. Bu tipler taşıdıkları direnç genleri ile aminoglikozidler, makrolidler, tetrasiklin ile kadmiyum ve civa gibi ağır metallere karşı dirençli olurlar. Tn554; makrolidlere, klindamisin ve streptogramin B'ye direnci kodlar (6,8,10).

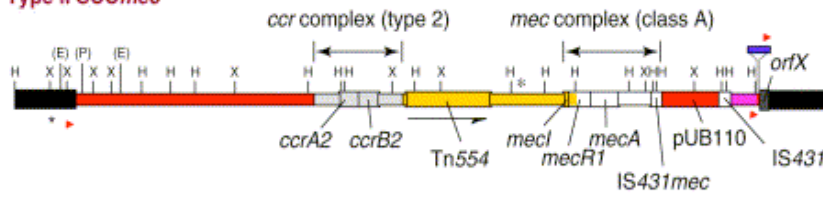
Tip III SCCmec: Sınıf A *mec* gen kompleksi ve tip III *ccr* gen kompleksinden oluşmaktadır. pT181 plazmidi, Tn554 transpozonu ve pseudo Tn554 taşımaktadır. pT181; tetrasikline direnci kodlar (6,8,10,14).

Tip IV SCCmec: Sınıf B *mec* gen kompleksi ve tip II *ccr* gen kompleksi içermektedir. Tip IVa ve IVb, *mecA* geni dışında herhangi bir direnç geni taşımamaktadır. J1 bölgesi diğer SCCmec tiplerine göre oldukça küçüktür. J2 bölgesi ise bulunmamaktadır (6,10).

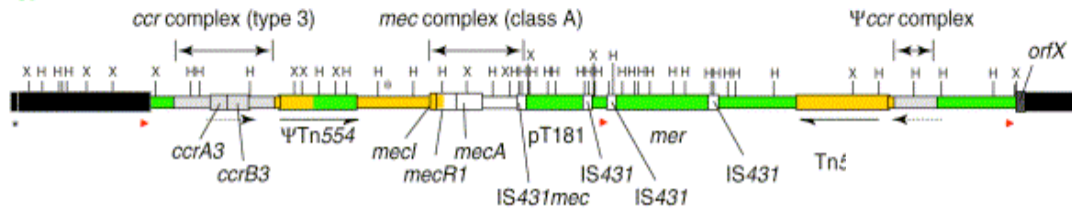
Type I SCCmec



Type II SCCmec

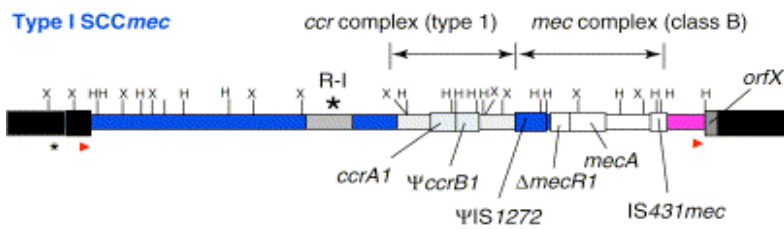


Type III SCCmec

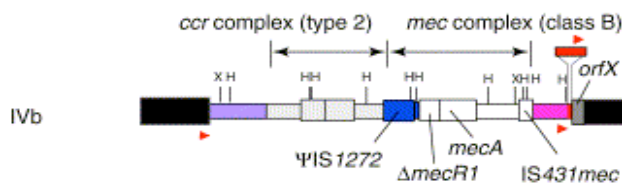
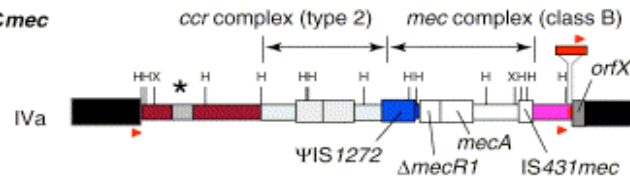


Şekil-5: SCCmec tipleri (6).

Type I SCCmec



Type IV SCCmec



Şekil-6: Tip I ve IV SCCmec yapıları (6).

Ito ve ark. (34,35) tarafından, 3 major SCCmec elementinin yapısı tamamen ortaya konmuştur. İngiltere’de 1961 yılında izole edilen ilk MRSA (NCTC 10442) suşunun tip I, Japonya’da 1982 yılında izole edilen MRSA (N 315) suşunun tip II, Yeni Zelanda’da 1985 yılında izole edilen MRSA (85/2082) suşunun ise tip III SCCmec içerdiği saptanmıştır (34,35). 1990’lı yılların sonlarına doğru izole edilmeye başlanan toplum kökenli MRSA suşlarının tip IV SCCmec içerdiği görülmüştür (36). SCCmec tip IV MRSA, ağırlıklı olarak daha önce hastane ortamında bulunmamış kişilerde saptanmıştır. Bu elemanın diğer üç elemandan en önemli farkı daha küçük ve genetik olarak daha mobil olması ve yanında ek antimikrobiyal direnç geni taşımasıdır(11,14,37-43). Dünya genelinde MSSA epidemilerine neden olan köken çeşidi çok fazla, buna karşın MRSA epidemilerine neden olan köken çeşidi sınırlı sayıdadır. Bu durum mec elemanının geçişinin daha çok horizontal olduğunu düşündürmektedir. MRSA biyotipi ve tek bir kökenin evrimsel profili, alıcı MSSA ile SCCmec’in DNA parmak izi analizi ile ortaya konmuştur (14,44).

PBP2a Ekspresyonunun Regülasyonu

PBP2a, *MecA* geni tarafından kodlanan 76 kDa ağırlığında bir proteindir. Hücre membranına bağlı ve transpeptidasyon reaksiyonunu katalize eden bir enzimdir. Diğer PBP’lerden beta laktam antibiyotiklere ileri derecede azalmış afinitesiyle ayrılır. Beta laktam antibiyotiklerin varlığında diğer PBP’ler inhibe olurken, PBP2a fonksiyon görmeye devam eder. Dolayısıyla bakteri ölmez. PBP2a, PBP2’den glikoziltransferaz ile ayrılır. PBP2a varlığında; metisilin, nafsilin ve oksasilin gibi semisentetik penisilinazlara dirençli beta laktamlara ve tüm sefalosporinlere direnç kazanılır (1,2,9,10,14,30).

mecA transkripsiyonu, birbirine çok benzeyen iki regülatör gen seti tarafından düzenlenir. Regülatör sistemlerden birincisi *mecR1* ve *mecI* genlerinden oluşur. Stafilokok kromozomunda *mecA* geni komşuluğunda *mecR1* ve *mecI* olarak tanımlanan bu iki gen; sırasıyla membrana bağlı sinyal transdüksiyon proteinini (*mecR1*) ve transkripsiyonel regülatörü (*mecI*) kodlarlar (9). *mecA* ve *mecR1* arasında bu genlerin promoterleri ve *mecA* geninin -10 sekansı ile *mecR1*'in -35 sekansı arasında da operatör bölge bulunmaktadır. *mecR1* ve *mecI*'nin, plazmid-aracılı stafilokokal beta-laktamaz geni olan *blaZ*'nin ekspresyonunda rolü olan *blaR1* ve *blaI* ile protein sekans homolojisi yüksektir. Bu da *mecA*'nın regülatör genlerini, *blaZ* sisteminden aldığı düşünmektedir. Fakat beta laktamaz sentezinin aksine PBP2a'nın ekspresyonu normal regülatör genleri (*mecA* ve *mecR1*, *mecI*) taşıyan suşlarda güçlü bir biçimde indüklenemez ve ayrıca indüksiyon da çok daha yavaştır. Nedeni *mecI*'nin *mecA* transkripsiyonunun sıkı bir regülatörü olması ve beta-laktam antibiyotiklerin çoğunun *mecR1*'i etkin bir biçimde aktive edememeleridir. Böylece bazı suşlar *mecA* geni taşımalarına rağmen metisilin duyarlıdırlar ve bu suşlar pre-MRSA olarak tanımlanırlar (9,11,12,14).

mecI inaktivasyonu veya delesyonu, ya da promoter bölgedeki mutasyonlar sonucu antibiyotik baskısı altındaki bazı *S aureus* suşlarında konstitütif PBP2a ekspresyonu gelişebilir (33). Bu mutasyonu taşıyan suşlarda homojen veya heterojen direnç fenotipi gelişir. Homojen direnç fenotipinde, topluluğu oluşturan hücrelerin tümünde yüksek düzeyde metisilin direnci (>128 mg/L) vardır. Heterojen direnç fenotipinde ise, hücrelerin çok küçük bir kısmında yüksek düzeyde metisilin direnci vardır. Bu küçük gruptaki yüksek düzeydeki direncin nedeni *chr* olarak tanımlanan, *mec* elementinin dışındaki bir bölgede; *hmr* lokusunda bulunduğu düşünülen ek kromozomal mutasyonlardır (9,12,14).

Metisilin Direnç Düzeyini Etkileyen Faktörler

Metisilin direnci; *mecI*, *mecR* proteinleri, *blaZ* sisteminin regülatör sinyal verici proteinleri, *fem* (factors essential for resistance to methicilline) gibi metisilin direnci için gerekli olan faktör genleri ve diğer bazı faktörlerce düzenlenir (10,12,14).

Çoğu MRSA suşu heterojen metisilin direnci göstermektedir. Bu fenotipdeki hücrelerin küçük bir kısmında yüksek düzeyde metisilin direnci vardır. Yüksek düzeydeki direnç birçok farklı mekanizmaya bağlı olabilir, ancak bunlardan henüz çok az kısmı tam olarak tanımlanabilmiştir. Yüksek düzeyde direnç gösteren subklonun %1'den az kısmında *lytH* inaktivasyonu vardır (14). *lytH*; asetilmuramil-L-alanin amidaz ile homoloji gösteren bir litik enzimi kodlar ve bu enzim yüksek düzeyli dirence neden olur. Bunun dışında yüksek düzeyli direnç nedeni olan farklı mekanizmalarda bulunabilmektedir (9,12).

Metisilin direncinin insertion inaktivasyonu ile kaybının gözlemlendiği deneysel çalışmalar *fem* ve *aux* (auxiliary) diye adlandırılan iki grup genin tanımlanmasına yol açmıştır. Tanımlanan bu faktörler housekeeping genlerdir ve koruyucudurlar. Bunlar *S aureus*'un vahşi tip suşlarının genomlarında bulunur ve aktiviteleri direncin yayılımında çok önemlidir. *fem* veya *aux* faktörlerinin bilinen sayısı 20'den fazladır. Birçoğu direkt veya indirekt yolla peptidoglikan sentezi ve turnoverında rol oynar. Fakat hiçbirinin PBP2a ekspresyonunu etkilediği gösterilmemiştir (9,12).

Metisilin Direncini Etkileyen İnternal Faktörler

Genetik ve biyokimyasal çalışmalar PBP2a'nın fonksiyon görebilmesi için bazı substratlara ihtiyacı olduğunu ortaya koymuştur. Bu substratların

oluşumunu engelleyen bir faktörün metisilin direncini etkileme ihtimali vardır. Yapılan çalışmalarda PBP2a'nın şunlara ihtiyacı olduğu gösterilmiştir (9,12,14).

Belirli Uzunluktaki Glikan Zincirleri: PBP2a, PBP2'nin transglikozilaz aktivitesine bağımlıdır. Beta laktamlar yüksek molekül ağırlıklı PBP'lerin transpeptidaz "domain"ini inhibe ederken transglikozilaz "domain"ine bir etki göstermezler. Transglikozilaz "domain"inin inaktivasyonu daha kısa olan glikan zincirlerin sayısında artışa ve metisilin direncinde belirgin azalmaya neden olur (9,14).

Normal Peptid Konfigürasyonu İçin Gerekli Kök Peptidler: Ortama glisin konulduğunda, peptidoglikan zincirinin sonunda normal koşullarda olması gereken iki alanin rezidüsünün yerini, iki glisin rezidüsünün almasının metisilin direncinde azalmaya ve homojen fenotipin heterojen fenotipe dönüşmesine neden olduğu bilinmektedir. UDP-N-asetil-muramil tripeptid sentetazı kodlayan gen olan *murE* (*femF*)'nin inaktivasyonu sonucunda da metisilin direncinde azalma olur. Nedeni hücre duvarı öncülleri havuzundaki UDP-bağlı muramil pentapeptidlerin azalması ve UDP-bağlı muramil dipeptidlerin birikmesidir. Bu sonuçlar PBP2a'nın doğru uzunlukta ve normal seride peptid elde edilmesi için kök peptidlerine ihtiyaç olduğuna işaret etmektedir (9,14).

İntakt Olmak İçin Gerekli Pentaglisin Çapraz-Köprüleri: Glikan zincirlerini birbirine bağlayan pentaglisin çapraz köprülerinin yapımından *femA*, *femB* ve *femX* (FmhB) sorumludur. *FemX* birinci glisini, *femA* ikinci ve üçüncü glisinleri ve *femB* de dördüncü ve beşinci glisinleri köprüye sokar. *femA* ve *femB* arasında değişme olmadığından bu proteinlerden herhangi birini kodlayan genlerin inaktivasyonu sonucu mono veya tri-glisinli çapraz köprüler oluşur. *femA* veya *femB* genlerinin herhangi birinin inaktivasyonu bakteri için letal olduğundan, FemA ve FemB proteinleri ilaç çalışmalarının yeni hedefleridir (9,14).

Metisilin Direncini Etkileyen Eksternal Faktörler: Tuz konsantrasyonu, pH, ortam kompozisyonu, ozmolarite ve ortam sıcaklığı metisilin direncini etkileyen eksternal faktörlerdendir. Yüksek (%6.5) NaCl konsantrasyonunun ve düşük sıcaklığın (30-35⁰C) metisilin direncini nasıl arttırdığı tam olarak bilinmemektedir. İnkübasyon süresinin 18 saat yerine, 24 saate uzatılmasının da metisilin dirençli suşların saptanma şansını arttırdığı bilinmektedir (14).

Stafilokoklarda Metisilin Direncini Saptamaya Yönelik Yöntemler

Antimikrobiyal ilaçlara karşı duyarlılık birçok yöntem ile saptanabilir. Yöntemler iki genel başlıkta toplanabilir:

A. Direnç Fenotipinin Belirlendiği Yöntemler: Direnç genlerinin ekspresyonu sonrası ortaya çıkan direncin fenotipik olarak belirlendiği yöntemlerdir.

1. Disk difüzyon yöntemi
2. Sulandırım (dilüsyon) yöntemleri
3. Epsilometrik yöntem (E test)
4. Antimikrobiyal ajanları inaktive eden enzimlerin saptanması

B. Genotipik Yöntemler: Direnç genlerinin saptanabildiği yöntemlerdir.

A. Direnç Fenotipinin Belirlendiği Yöntemler

1. Disk difüzyon yöntemi: Bu yöntemde belirli bir miktar antimikrobiyal ajan içeren diskler, bakterinin standart süspansiyonunun yayıldığı agar plakları yüzeyine yerleştirilir. Antibiyotiğin bakteri için inhibitör olan düzeyi, disk çevresinde üreme olmayan alanın çapı ölçülerek belirlenir. Antibiyotik ve bakteri türüne göre farklı olabilen değerler standartlara göre yorumlanır. Sınır

değerler, her antimikrobiyal ajan için MİK ve ulaşılabilir serum düzeyleri göz önüne alınarak belirlenmiştir. Disk difüzyon yöntemi kolay ve ucuzdur. Bu nedenle de rutin laboratuvar uygulamalarında sık olarak kullanılmaktadır. Ancak uluslararası standartlara göre ve kalite kontrolü yapılarak uygulanmalıdır (18,19,45,46).

2. Sulandırım (dilüsyon) yöntemleri: Katı veya sıvı besiyerinde uygulanabilir. İn vitro duyarlılık testleri arasında “altın standart” olarak kabul edilir. Antimikrobiyal ajan iki katlı dilüsyonlar şeklinde artan yoğunluklarda hazırlanır. Tüpte hazırlanan sıvı besiyerinde tüp-makro dilüsyon, mikrotitrasyon plaklarında küçük hacim kullanılarak uygulanıyorsa mikrodilüsyon olarak adlandırılır. Agar dilüsyon yönteminde ise; belirli konsantrasyonlarda antibakteriyel ajan besiyeri içinde yer alır. Belirli dilüsyondaki bakteriden ekim yapılarak, inkübasyon süresi sonunda gözle görülür üremeyi engelleyen en düşük antimikrobiyal ilaç yoğunluğu saptanır. Buna Minimal İnhibitör konsantrasyon (MİK) denir ve (g/ml) şeklinde ifade edilir. MİK değerinin duyarlılığı mı yoksa direnci mi temsil ettiğini belirlemek için, test sonunda saptanan konsantrasyon, duyarlılık sınırı adı verilen bir değer ile karşılaştırılır. MİK değeri bu sınırdan küçük ise, bakteri söz konusu ajana duyarlı olarak değerlendirilir. Duyarlılık sınırı, sağaltım sırasında ulaşılan serum düzeyleri ile duyarlılık özelliği kesin olarak bilinen bakterilerin MİK değerleri göz önüne alınarak belirlenmektedir. Her antimikrobiyal ajan için ayrı bir sınır değeri söz konusudur. Sulandırım temeline dayanan testler kantitatif sonuç verdikleri için tercih edilmektedir. Ancak teknik güçlükleri nedeniyle diğer yöntemler de geliştirilmiştir (18,19,46).

3.Epsilometrik yöntem (E test): Plastik stripler ile MİK değerini saptamayı amaçlayan yeni bir antimikrobiyal duyarlılık yöntemidir. Stripin bir tarafında ilaç belirli ve sürekli bir konsantrasyon değişimi olacak şekilde ve kurutulmuş olarak, diğer yüzünde de antimikrobiyal ajanın stripin ucundan olan uzaklığa karşılık gelen konsantrasyonları bir cetvel gibi sıralanmış olarak

yer alır. Standart bakteri süspansiyonu katı besiyeri üzerine yayıldıktan sonra stripler yerleştirilir. İnkübasyon süresi sonunda, elips şeklindeki inhibisyon alanının stripi kestiği konsantrasyon MİK olarak belirlenir. Günümüzde bu yöntem ile ilgili en önemli problem maliyettir (18,19).

4.Antimikrobiyal ajanları inaktive eden enzimlerin saptanması: Enzimatik aktivitenin saptandığı hızlı yöntemler arasında beta-laktamaz ve kloramfenikol asetil transferaz aktivitesinin saptandığı tarama testleri sayılabilir (18).

MRSA suşlarında metisilin direncinin gösterilmesinde uygun konvansiyonel yöntemin belirlenmesine yönelik çalışmalar bulunmaktadır. Swenson ve ark. (27) Boubaker ve ark. (47) tarafından yapılan çalışmalarda metisilin direncinin rutin saptanmasında sefoksitin disk difüzyon testinin değerlendirilmesi yapılmış, disk difüzyon ile sefoksitin duyarlılığı % 96.5, özgülüğü % 100 olarak saptanmıştır.

Genotipik Yöntemler

Son yıllarda birçok antibiyotik direnç geni tanımlanmıştır. Bu genlerin ekspresyonu sonucunda klinik sağıaltımda kullanılan tüm antimikrobiyal ajanlara karşı direnç gelişebilmektedir. Günümüzde gen ekspresyonu sonucunda direnç gelişimini saptayan ve yukarıda özetlenen fenotipik yöntemler dışında, direnç genlerinin varlığını saptayan genotipik yöntemler de geliştirilmiştir. Bu yöntemler, direnç özelliklerinin kısa sürede ve doğru olarak saptanmasını sağlayarak, hasta ve taşıyıcıların tanımlanması ve sağıaltımına olanak sağlamaktadır (18).

Moleküler tanıda kullanılan yöntemler; Kary Mullis'in kendisine Nobel ödülü kazandıran, nükleik asitlerin in vitro olarak çoğaltılmasına olanak

sağlayan polimeraz zincir reaksiyonunu (Polymerase Chain Reaction-PCR) tanımlamasının ardından olağanüstü bir ivme kazanarak gelişmiştir. Hücre içinde gerçekleşen doğal DNA replikasyonu, PCR ile bir tüp içerisinde taklit edilmektedir. Örneğin replikasyonunun başlayabilmesi için iki DNA zincirinin birbirinden ayrılması gerekir. Ortamın 94°C'ye dek ısıtılması ile iki zincir arasındaki hidrojen bağlarının kırılması sağlanır. PCR ile DNA'nın çoğaltılabilmesi için tepkime karışımında şu maddeler yer almalıdır: Çoğaltılacak olan kalıp DNA; bu DNA'da çoğaltılması planlanan bölgenin iki ucundaki DNA dizisini özgül olarak tanıyıp bağlanacak olan DNA primerleri; primerlere bağlanıp bunlara 3' ucundan nükleotidleri ekleyerek sentez yapacak olan DNA polimeraz; sentezde kullanılacak olan deoksinükleotidtrifosfatlar (dNTP); polimerazın çalışması için gerekli tampon görevi yapacak maddeler ve tuzlar (genellikle tris ve KCl) ve enzim çalışması için önemli bir kofaktör olan Mg⁺⁺ iyonlarıdır (4,48).

PCR, üç değişik sıcaklıkta çalışan basamakların bir döngü halinde tekrarlanması ile gerçekleştirilir. İlk basamak denatürasyondur. 94°C'ye dek ısıtılan DNA'nın iki zinciri birbirinden ayrılır. İkinci basamak birleşmedir (annealing). Sıcaklığın düşürülmesi ile primerler çoğaltılacak bölgenin uçlarında yer alan kendilerine özgül dizileri tanır, hidrojen bağları kurarak bağlanırlar. Primerlerin ortamdaki derişimlerinin, kalıp DNA'dan milyonlarca kez daha fazla olması sayesinde, ayrılan kalıp DNA zincirleri tekrar birbirlerine değil, primerler kalıp DNA zincirlerine bağlanırlar. Primerlerin özgül olarak bağlanması için kullanılan sıcaklık genellikle 50–70°C arasında değişir. Üçüncü basamak primerlerin uzamasıdır. Karışım, DNA polimerazın çalıştığı optimum sıcaklığa getirildiğinde primerlere bağlanmış olan enzim molekülleri, bunların 3' ucuna, kalıp DNA'ya uygun nükleotidleri ekleyerek DNA sentezi yaparlar. Bu üç basamak bir döngüyü oluşturur ve her tekrarlanışında iki primer arasında kalan özgül DNA parçasının her iki zincirinin birer kopyası çıkarılmış olur (4,48).

Çoğaltılan DNA parçaları birçok değişik yöntemle belirlenebilir. Bunlardan en yaygın olarak kullanılanı agaroz jel elektroforezidir. PCR ile elde edilen ürünler agaroz jel kullanılarak elektroforezle ayrıştırılır ve DNA zincirleri etidyum bromür ile boyanarak ultraviyole ışık kaynağında floresans vererek görünür hale getirilir. Elektroforez sırasında bir DNA molekül ağırlık standardı kullanılması ve PCR ürünlerinin büyüklüğü, daha önceden bilinen DNA molekülleri ile karşılaştırılması ile belirlenir. Genellikle kalıp DNA'nın iki primer arasında kalan DNA kısmının uzunluğu önceden bilindiği için elektroforezle saptanan PCR ürünlerinin bu büyüklükte olması, hedeflenen bölgenin doğru bir şekilde çoğaltıldığını gösterir. Elektroforez sonucunda tek DNA bantı görülmelidir. Birden fazla veya beklenen büyüklük dışında DNA bantlarının görülmesi, özgül olmayan bazı çoğaltma ürünlerinin ortaya çıktığını gösterir (4,48).

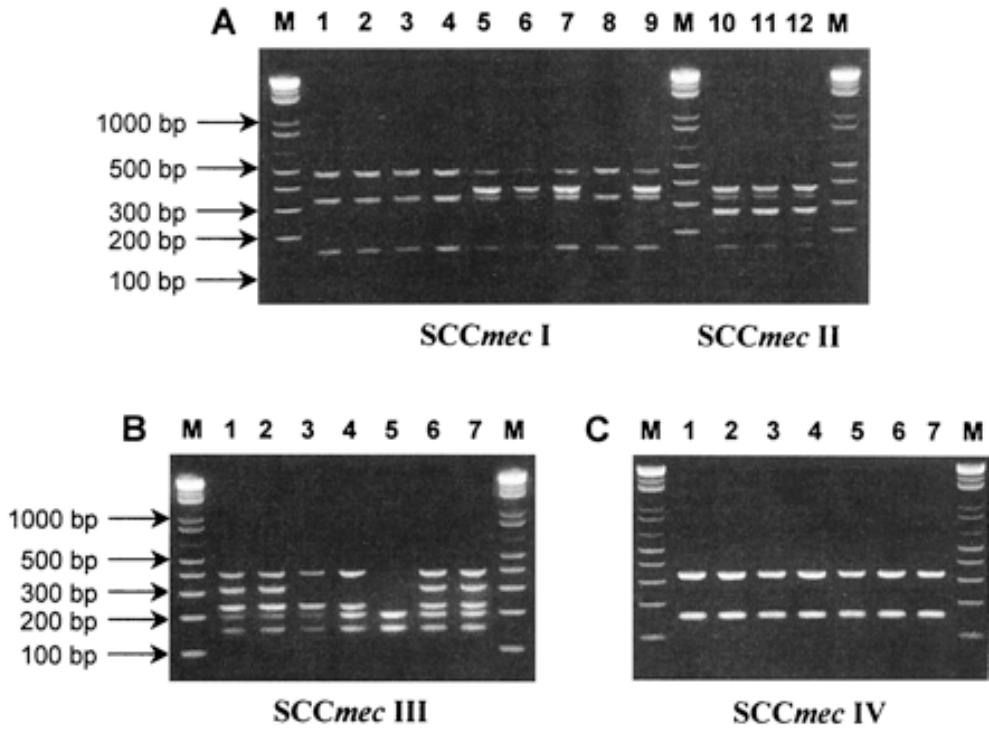
Stafilokoklarda metisilin direncinin belirlenmesi için, moleküler olarak *mecA* geninin saptanması, fenotipik yöntemlere kıyasla daha duyarlıdır. PCR ve DNA hibridizasyon teknikleri ile *mecA* geninin saptanması altın standart olarak kabul edilmektedir (2,4,12,28,45,46,49).

DNA hibridizasyon tekniklerinin bazı dezavantajları vardır; fazla sayıda hücre gerektirir, DNA ekstraksiyonu ve membran üzerinde immobilizasyonu (sabitlenmesi) zaman alıcı işlemlerdir, görüntülenmeleri için radyoaktif probler gerektirirler (50). Spesifik DNA sekanslarının saptanmasında PCR ile DNA'nın in vitro amplifikasyonu, hızlı ve duyarlıdır, ayrıca radyoaktif izotop gerekli değildir (3,50).

Multipleks PCR'da farklı hedeflerin amplifikasyonu için iki veya daha fazla primer aynı karışım içerisinde yer alır. Bu teknikle klinik örnekte birden fazla hedef sekans tek bir tüp içinde koamplifiye edilebilir. Multipleks PCR'da kullanılacak primerleri benzer annealing ısısına sahip olmalarında fayda vardır.

Multipleks PCR'in yapılışı daha kompleks olmakla beraber, SCCmec tiplerini belirlemede daha kolaylaştırıcı ve kullanışlı olduğu ifade edilmektedir (4,51).

Oliveira ve ark. (51) genetik yapıları multilocus sequence typing (MLST) ile belirlenmiş 26 MRSA suşunu SCCmec yapıları multipleks PCR yöntemiyle saptamışlardır. Bu yöntemin, MRSA izolatlarının mec elementlerinin yapısal tiplendirmesinde hızlı bir yöntem olduğu düşünülmektedir (38,42,43).



Şekil-7. Oliveira ve ark saptadığı SCCmec tipleri (51).

Ko ve ark. (16) 12 Asya ülkesinden toplanan 74 MRSA suşunu MLST ve multipleks PCR yöntemleriyle irdelemiştir. Multipleks PCR'da Oliveira ve ark.nın (51) çalışmasında kullanılan primerler kullanılmış, Asya bölgesinde izole edilen MRSA suşlarında 2 major genotip olduğu, MLST ile saptanan genotiplerin dağılımının izole edildiği ülkeyle bağlantılı olarak değiştiği görülmüştür. Multipleks PCR ile de Kore ve Japonya'dan izole edilen suşların çoğunun SCCmec tip II, diğer Asya ülkelerinden izole edilen suşların ise SCCmec tip III veya IIIA olarak bulunmuştur.

Arakere ve ark. (52) tarafından Hindistan'da iki farklı hastanede izole edilmiş toplam 82 MRSA suşu kullanılarak multipleks PCR ile SCCmec tipleri irdelenmiştir. İrdelenen suşlardan 49'unun tip III SCCmec, 26'sının tip IIIA SCCmec içerdiği görülmüştür.

Ko ve ark (16) çalışmasındaki Tip III SCCmec içeren suşlar diğer antibiyotik duyarlılıkları açısından irdelenmiş, genellikle, penisilin, siprofloksasin, levofloksasin, klaritromisin, sefuroksim, gentamisin, amoksisilin-klavulonik asite dirençli, trimetoprim-sülfometaksazole duyarlı olarak saptanmıştır.

Tablo-1: Ko ve ark. saptadığı antibiyotik duyarlılıkları (16)

İzole edilen ülke, suş	Ox-MİK (mg/L)	Antibiyoqram ^a								SCC mec tipi
		PEN	CIP	LEV	CLA	CFX	SXT	GEN	AMXC	
Çin Ch B82	256	R	R	R	R	R	S	R	R	III
Ch B87	256	R	R	R	R	R	S	R	R	III
Ch S75	512	R	R	R	R	R	S	R	R	III
Hindistan I 127	128	R	R	I	R	R	R	R	R	III
Singapur SI 56	128	R	R	R	R	R	R	R	R	III
Tayland Th 106	512	R	R	R	R	S	S	R	R	III

^aPEN, penisilin; CIP, siprofloksasin; LEV, levofloksasin; CLA, klaritromisin; CFX,sefuroksim, SXT, trimetoprim-sülfometaksazol; GEN, gentamisin; AMXC, amoksisilin-klavulonat

Arakere ve ark. (52) benzer şekilde yaptıkları çalışmada, suşların metisilin dışındaki antibiyotik duyarlılıklarını da irdelenmiş ve tüm suşların penisilin, eritromisin, gentamisin, tetrasikline dirençli olduğunu saptamıştır.

MRSA izolatlarının çoklu antibiyotik dirençleri nedeniyle, tedavide yarattıkları sorunlar giderek artmaktadır. Metisilin direnci grup direncini temsil ettiği için, MRSA ve MRSE izolatlarında tek tedavi seçeneği glikopeptidler olmaktadır. Glikopeptidlerin yaygınlaşan kullanımları, duyarlılığı azalmış suşlar (GISA) ve enterokoklarda glikopeptid direncini gündeme getirmiştir (5,8,13,17). Hem glikopeptidlerin gereksiz kullanımından kaçınmak hem de hastaya en kısa zamanda en etkili tedaviyi verebilmek için metisilin/oksasilin duyarlılığının hızlı ve doğru olarak tanımlanması gerekmektedir (5,14).

Çalışmamızın amacı; stafilokoklarda konvansiyonel yöntemlerle saptanan metisilin direncinin, moleküler yöntemler ile araştırılarak sonuçların karşılaştırılması, metisilin/oksasilin duyarlılığını saptamak için laboratuvarımıza en uygun olan yöntemi belirlemek ve mec gen tiplerini belirleyerek literatüre katkıda bulunmaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Uludağ Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi'nin (SUAM) değişik kliniklerinden Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı Bakterioloji Laboratuvarı'na gelen kan kültür örneklerinden 1998-2005 yılları arasında izole ve idantifiye edilen 100 adet metisiline dirençli *S aureus* ve 2004-2005 yılları arasında izole edilen 100 adet koagülaz negatif stafilokok (KNS) suşu çalışmaya alındı.

Bakteri suşlarının izolasyon, idantifikasyon ve antibiyogramı: Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı Bakterioloji Laboratuvarı'nda BACTEC 240 Hemokültür sisteminde (Becton Dickinson Company Sparks, USA (BD)) izole edilen gram pozitif kok morfolojisinde ve katalaz pozitif bakterilere lam koagülaz testi uygulandı. 1998-2003 tarihleri arasında Sceptor bakteri tanı ve antibiyogram sisteminde (BD) tanımlanan 42 ve 2003 tarihinden itibaren Phoenix bakteri tanı ve antibiyogram sisteminde (BD) idantifikasyonu yapılan 58 *S aureus* suşu ile 2004-2005 arasında Phoenix bakteri tanı ve antibiyogram sisteminde (BD) idantifikasyonları yapılan 100 koagülaz negatif stafilokok (KNS) suşu çalışmaya alındı. Tüm suşlar çalışmada kullanılmak üzere, Mikrobank (Cryobank mixed, Mast Group Ltd. Merseyside, UK) saklama tüpünde -20°C'de saklandı. Çalışma öncesi; 1998-2003 yılları arasında saklanmış olan suşlar, standardı sağlamak için Phoenix bakteri tanı ve antibiyogram sisteminde (BD) tekrar çalışılarak MRSA olarak doğrulandı.

Besiyerleri: %5 Koyun Kanlı Columbia Agar (BD) ve Muller Hinton II Agar (BD) hazır besiyerleri kullanıldı.

Tüp Koagülaz Yöntemi: Çalışmanın ilk aşamasında tüm suşlara tüp koagülaz testi uygulandı. Kanlı agarda 18 saatlik inkübasyondan sonra 2-3 koloni alınarak 0,5 mL insan plazması içeren tüplere aktarıldı. Sonuçları 4. ve 24. saat olmak üzere iki kez değerlendirildi. Negatif sonuçlar tavşan plazması kullanılarak tekrarlandı (14,19). Tüp koagülaz testinde pozitif kontrol olarak *S aureus* ATCC-25923 (*S aureus spp. aureus*) suşu, negatif kontrolü için *S epidermidis* ATCC-12228 (*S epidermidis*) suşları kullanıldı.

S aureus ve KNS olarak belirlenen suşların hepsi ilk tanı ile uyumlu olarak saptandı.

İdentifikasyon işlemleri tamamlanan ve çalışmaya alınan 200 suşun hepsi tek koloni pasaj yapılarak moleküler çalışmada kullanılmak üzere yeniden mikrobanka pasaj edilerek -20°C'da saklandı.

Duyarlılık Testleri: Antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılabilmesi için Mueller Hinton II Agar (BD) besiyerleri kullanıldı.

Disk difüzyon testi: Bakteri suşu, %5 Koyun Kanlı Columbia agar'da (BD) 18-24 saatlik inkübasyondan sonra steril serum fizyolojik ile 0.5 Mc Farland (10^8 CFU/mL) bulanıklıkta olacak şekilde süspansiyonu hazırlanarak Mueller Hinton II Agar (BD) yüzeyine pamuklu steril çubuk ile sürüldü. Hazırlanan plaklara 1 µg oksasilin diski (BD) ve 30 µg sefoksitin diski (BD) yerleştirildi. 35°C'de 24 saat inkübasyondan sonra değerlendirme yapıldı (19,27,28,38,46,53). Değerlendirmede NCCLS/CLSI tarafından önerilen duyarlılık sınırları kullanıldı.

E test: %5 koyun kanlı Columbia agar (BD) besiyerinde 18-24 saatlik üremeden steril serum fizyolojik ile 0.5 Mc Farland (10^8 CFU/mL) bulanıklıkta olacak şekilde süspansiyon hazırlanarak Mueller Hinton II Agar (BD) yüzeyine pamuklu steril çubuk ile sürüldü. Oksasilin ve sefoksitin E test stripleri (AB

Biodisk Sonia, Sweden) üretici firmanın önerileri doğrultusunda yerleştirildi. 35°C'de 24 saat inkübasyondan sonra değerlendirildi (19,25,28,46,53,54,55).

S aureus'larda CLSI tarafından önerilen duyarlılık sınırları;

	Disk difüzyon			E testi		
	S	I	R	S	I	R
Oksasilin	≥ 13	11-12	≤ 10	≤ 2	-	≥ 4
Sefoksitin	≥ 20	-	≤ 19	≤ 8	16	≥ 32

KNS'larda CLSI tarafından önerilen duyarlılık sınırları;

	Disk difüzyon			E testi		
	S	I	R	S	I	R
Oksasilin	≥ 18	-	≤ 17	≤ 0.25	-	≥ 0.5
Sefoksitin	≥ 25	-	≤ 24			

Moleküler Yöntem

DNA Ekstraksiyonu: Tüm suşlar %5 koyun kanlı Columbia agarda (BD) 18-24 saatlik inkübasyondan sonra 3-4 koloni alınarak 250 µL didistile su içeren mikrosantrifüj tüpü içerisinde süspansiyon edildi. Bakteri süspansiyonları -80°C'de donduruldu. En az 24 saat -80°C'de tutuldu. Amplifikasyon yapılacağı gün çıkartılarak iyice çözünmesi sağlandı. Vortekslenerek homojen hale getirildi. Ardından thermalcyler cihazında (T3 thermocycler Biometra, Germany) 99°C'de 10 dakika kaynatıldı. Soğutmalı santrifüjde (HERMLE Z233MK-2, Germany) 11000 g devirde 3 dakika santrifüj edildi. Oluşan süpernatandan 20 µL volüm PCR çalışmalarında DNA kaynağı olarak kullanıldı (37,38,51,56-58).

Primerler: Oliveira ve ark. (16,39,48,51,52) tarafından kullanılan primerler ticari olarak sentez ettirildi.

<u>Primer</u>	<u>5' – 3' oligonükleotidler</u>	<u>Lokalizasyonu</u>
CIF2 F2	TTCGAGTTGCTGATGAAGAAGG	18398-18419
CIF2 R2	ATTTACCAACAAGGACTACCAGC	18892-18871
KDP F1	AATCATCTGCCATTGGTGATGC	10445-10467
KDP R1	CGAATGAAGTGAAAGAAAGTGG	10728-10707
MECI P2	ATCAAGACTTGCATTCAGGC	42428-42447
MECI P3	GCGGTTTCAATTCACCTTGTC	42636-42617
DCS F2	CATCCTATGATAGCTTGGTC	38011-37992
DCS R1	CTAAATCATAGCCATGACCG	37670-37689
RIF4 F3	GTGATTGTTCGAGATATGTGG	45587-45607
RIF4 R9	CGCTTTATCTGTATCTATCGC	45829-45809
RIF5 F16	TTCTTAAGTACACGCTGAATCG	59573-59594
RIF5 R13	GTCACAGTAATTCATCAATGC	59986-59965
IS431 P4	CAGGTCTCTTCAGATCTACG	49963-49982
pUB116 R1	GAGCCATAAACACCAATAGCC	50343-50323
IS431 P4	CAGGTCTCTTCAGATCTACG	29654-29673
pT181 R1	GAAGAATGGGGAAAGCTTCAC	29976-29956
MECA P4	TCCAGATTACAACCTTCACCAGG	1190-1211
MECA P7	CCACTTCATATCTTGTAACG	1351-1332

PCR Amplifikasyonu: DNA amplifikasyonları, DNA thermalcycler'da üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapıldı. Kullanılan primerlerin guanin-sitozin oranı ve amplifiye edilecek bölgenin büyüklüğüne göre şu parametreler kullanıldı (16,51,52).

Denaturation	94 ⁰ C – 30 saniye
Annealing	53 ⁰ C – 30 saniye
Extension	72 ⁰ C – 1 dakika
Postextension	72 ⁰ C – 4 dakika

Amplifikasyon programı toplam 30 siklus yapıldı. Bu süre sonunda amplifiye olan örneklerden 10 µL volum 5 µL elektroforez tamponu ile karıştırıldı ve agaroz jel elektroforezinde yürütüldü.

Agaroz Jel Elektroforez: % 2'lik olarak 1xTBE ile agarozdan hazırlandı. Dökülmeden hemen önce 10 µL etidyum bromid ile renklendirildi. Örnekler 100 voltda 60 dakika yürütüldü. Sonuçlar uygun bir DNA marker (pUC Mix Marker, 8, Fermentas, Germany) kullanılarak değerlendirildi. Jeldeki sonuçlar ultraviole masasında (BIO-RAD UV transilluminator, 2000, USA) ve BioDocAnalyze (Biometra, Germany) ile değerlendirildi.

BULGULAR

Bakteriyoloji Laboratuvarı rutin işlemleri ile metisiline dirençli bulunan 100 *S aureus* ve 100 KNS suşunun çalışma verileri Ek 1 ve 2’de sunulmuştur.

Oksasilin ve sefoksitin disk difüzyonu ile E test sonuçları tablo 2. de sunulmuştur. En büyük uyumsuzluk KNS suşlarında sefoksitin E test ve disk difüzyon verilerinde gözlenmektedir.

Tablo-2: Phoenix sistemi ile fenotipik yöntemlerin uyumu

	Oksasilin						Sefoksitin					
	Disk Difüzyon			E test			Disk difüzyon			E test		
	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S
<i>S aureus</i>	97	2	1	97	-	3	98	-	2	97	1	2
KNS	97	-	3	97	-	3	94	-	6	82	6	12

Moleküler çalışma sonucunda 2 *S aureus* ve 6 KNS suşunda mecA geni saptanamamıştır (Tablo 3).

Tablo-3: *S aureus* ve KNS suşlarında mecA geni

	MecA	
	+	-
<i>S aureus</i>	98	2
KNS	94	6

mecA geni saptanamayan suşlar, konvansiyonel yöntemlerle duyarlılıkları açısından irdelenerek tablo 4'te sunulmuştur.

Tablo-4: mecA geni saptanamayan stafilokok suşlarının konvansiyonel yöntemlerle duyarlılık sonuçları

Suş no ve türü	Oksasilin DD	Oksasilin E test	Sefoksitin DD	Sefoksitin E test
54 <i>S aureus</i>	Orta duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
71 <i>S aureus</i>	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
104 KNS	Dirençli	Dirençli	Duyarlı	Duyarlı
120 KNS	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
122 KNS	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
153 KNS	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
188 KNS	Dirençli	Dirençli	Duyarlı	Duyarlı
197 KNS	Dirençli	Dirençli	Duyarlı	Duyarlı

mecA geni saptanmış olmakla birlikte 2 *S aureus* ve 11 KNS suşunda konvansiyonel yöntemlerin bazılarıyla farklı duyarlılık sonuçları saptanmış, veriler tablo 5'te sunulmuştur. Buna göre, bir *S aureus* suşunda oksasilin disk difüzyon ve E test sonucu, diğer *S aureus* suşunda sefoksitin E test sonucu uyumsuz olarak bulunmuşken, KNS'larda sefoksitin E test sonuçlarının genellikle uyumsuz olduğu görülmüştür.

Tablo-5: mecA geni içermelerine karşın konvansiyonel yöntemlerle farklı duyarlılık sonuçları saptanan suşlara ait veriler

Suş no ve türü	Oksasilin DD	Oksasilin E testi	Sefoksitin DD	Sefoksitin E testi
86 <i>S aureus</i>	Orta duyarlı	Duyarlı	Dirençli	Dirençli
87 <i>S aureus</i>	Dirençli	Dirençli	Dirençli	Orta duyarlı
106 KNS	Dirençli	Dirençli	Dirençli	Orta duyarlı
116 KNS	Dirençli	Dirençli	Dirençli	Duyarlı
119 KNS	Dirençli	Dirençli	Dirençli	Orta duyarlı
121 KNS	Dirençli	Dirençli	Dirençli	Orta duyarlı
124 KNS	Dirençli	Dirençli	Dirençli	Duyarlı
136 KNS	Dirençli	Dirençli	Dirençli	Duyarlı
141 KNS	Dirençli	Dirençli	Dirençli	Orta duyarlı
162 KNS	Dirençli	Dirençli	Dirençli	Duyarlı
171 KNS	Dirençli	Dirençli	Dirençli	Duyarlı
182 KNS	Dirençli	Dirençli	Dirençli	Orta duyarlı
183 KNS	Dirençli	Dirençli	Dirençli	Duyarlı

Metisilin direncini saptamada altın standart olarak kabul edilen mecA geni varlığı ile KNS suşlarının oksasilin, sefoksitin disk difüzyonu ve E test sonuçlarının uyumu istatistiksel olarak incelenerek tablo 6. da sunulmuştur. *S aureus* suşlarında 4 konvansiyonel testin tamamı mecA ile uyumlu bulunmuştur.

Tablo-6: KNS suşlarında oksasilin ve sefoksitin test uyumu

	Oksasilin		Sefoksitin	
	Disk difüzyon	E test	Disk difüzyon	E test
McNemar sonuçları	0.250	0.250	1.000	0.031*

* p<0.05 ise anlamlıdır

S aureus ve KNS suşlarının oksasilin ve sefoksitin disk difüzyon ile E test sonuçlarının duyarlılık ve özgüllükleri tablo 7. de sunulmuştur.

Tablo-7: *S aureus* ve KNS suşlarında oksasilin ve sefoksitin için disk difüzyon ve E testlerinin duyarlılığı ile özgüllüğü

	Oksasilin				Sefoksitin			
	Disk Difüzyon		E test		Disk Difüzyon		E test	
	duyarlılık	özgüllük	duyarlılık	özgüllük	Duyarlılık	özgüllük	duyarlılık	Özgüllük
KNS	100	50	100	50	100	100		
<i>S aureus</i>	98.97	100	98.97	100	100	100	100	100

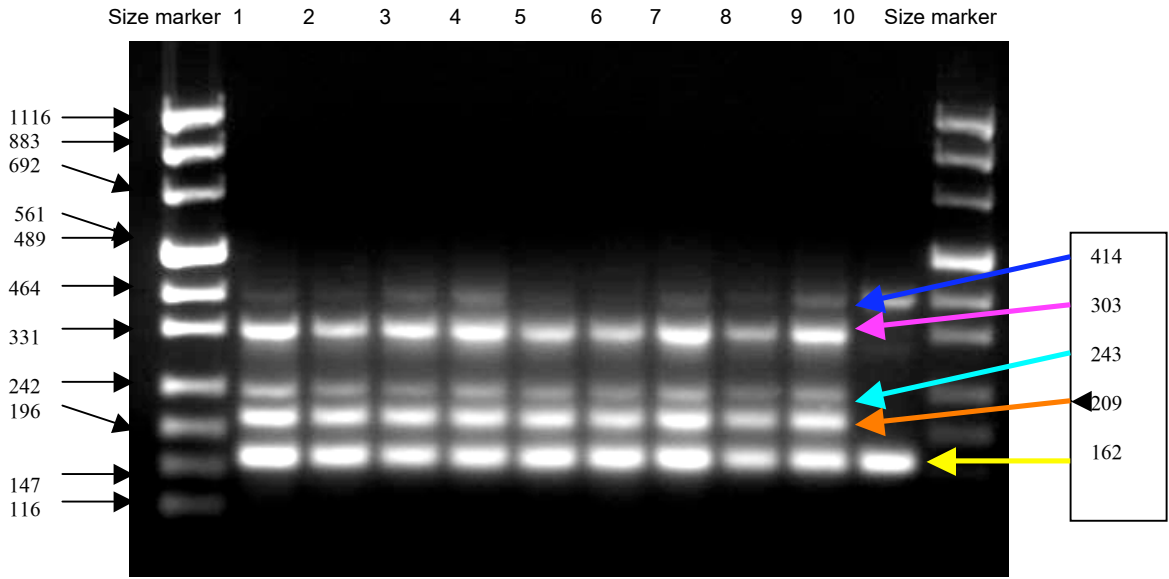
mecA ile sefoksitin E testi karşılaştırıldığında, fazla sayıda orta duyarlı suş olduğundan sonuçların etkilendiği gözlemlendi. O nedenle orta duyarlı suşlar dirençli veya duyarlı kabul edilerek ya da analiz dışı bırakılarak duyarlılık ve özgüllükleri hesaplandı. Buna göre;

a) Orta duyarlı suşlar dirençli kabul edildiğinde; duyarlılık: % 95.74, özgüllük: % 100 olarak bulundu, McNemar testine göre anlamlı değildi (p=0.125).

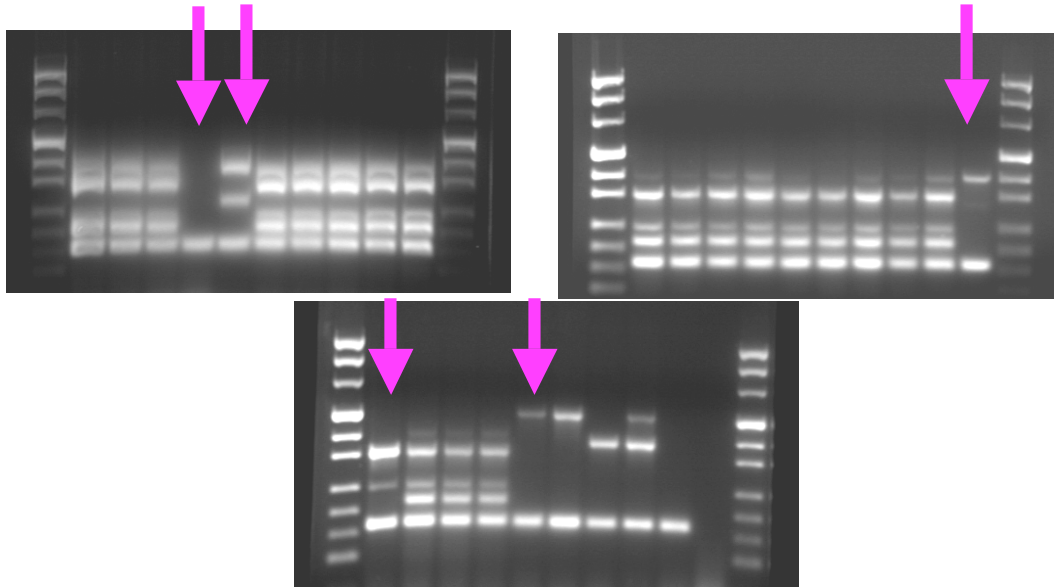
b) Orta duyarlı suşlar duyarlı kabul edildiğinde; duyarlılık: % 89.36, özgüllük: % 100 olarak saptandı, McNemar testine göre anlamlı idi (p=0,002). Yanlış negatif sayısının fazla olması nedeniyle bu sonuç elde edildi.

c) Orta duyarlı suşlar analizden çıkartıldığında; duyarlılık: % 95.45, özgüllük: % 100 olarak bulundu, McNemar testine göre anlamlı değildi (p= 0.125).

MRSA suşları multiplex PCR ile Oliveira ve ark. tarafından kullanılan primerler ile SCCmec yapılarına göre tiplendirildi. 93 MRSA suşunda 209, 243, 303, 414 bp bantlar oluştu (şekil 8). MRSA suşlarından 2'sinde mecA geni saptanamazken, 5 MRSA suşunda ise (suş no; 85, 86, 87, 91, 95) mecA geni varolmasına karşın moleküler tiplendirme yapılamadı (şekil 9).



Şekil-8: *S aureus* suşlarında multiplex PCR sonuçları



Şekil-9: mecA saptanmasına karşın tiplendirilemeyen suşlar

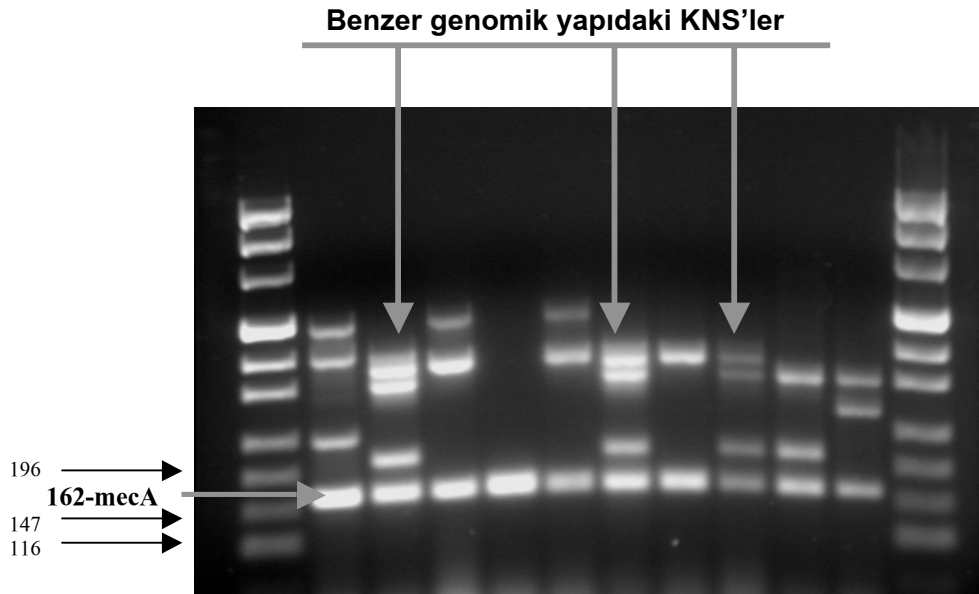
Tip III SCCmec taşıyan *S aureus* suşlarında olası antibiyotik dirençleri açısından, Phoenix tanı sistemi ile saptanan penisilin G, siprofloksasin, ofloksasin, eritromisin, gentamisin, trimetoprim-sülfometaksazol ve amoksisilin-klavulanat % direnç oranları Tablo 8'de sunulmuştur.

Tablo-8: *S aureus* suşlarının Phoenix tanı sistemi ile saptanan antibiyotik direnç oranları

	Dirençli (%)
Penisilin G	100
Siprofloksasin	96
Ofloksasin	96
Eritromisin	81
Trimetoprim-Sülfometaksazol	1
Gentamisin	95
Amoksisilin-klavulanat*	100

* toplam 68 suşta amoksisilin-klavulanat duyarlılığı çalışıldı, hepsinde dirençli olarak saptandı.

KNS'larda, Oliveira ve ark. (51) tarafından kullanılan primerler ile Multiplex PCR sonrası oluşan bantlar incelenmiş ve şekil 10'da sunulmuştur.



Şekil-10: KNS'larda multiplex PCR ile elde edilen görüntü

TARTIŞMA VE SONUÇ

S aureus son yarım yüzyıl içinde, spektrumunda yer alan hemen tüm antibakteriyel ajana karşı direnç geliştirmiştir. Penisilinin yaygın olarak kullanımının ardından 1944 yılında penisilin direnci, metisilin kullanımından bir yıl sonra da metisiline direnç tanımlanmıştır (6-8). Metisiline dirençli *S aureus* (MRSA) suşları pratik olarak tüm β -laktam antibiyotiklere dirençli olarak kabul edilmekte, bu durum beraberinde tedavi zorlukları getirmektedir (5-12,21). Metisiline dirençli stafilokoklar sıklıkla eritromisin, klindamisin, kloramfenikol, tetrasiklin, gentamisin gibi değişik antibakteriyel ajana da dirençlidir. Bu direnç profili nedeniyle glikopeptid antibiyotikler, tedavide tek seçenek olarak karşımıza çıkmaktadır. Vankomisin 1958 yılında gram-pozitif bakteri enfeksiyonlarının tedavisi için klinik kullanıma girmiş, metisilin direncine paralel olarak tüm dünyada vankomisin kullanımı da belirgin ölçüde artmıştır. Bunun sonucunda gelişen vankomisin direnci, önce 1959 ve 1983 yıllarında klinik örneklerden izole edilen iki KNS türünde gösterilmiş, 1997 yılında da Japonya'da vankomisin duyarlılığı azalmış ilk *S aureus* suşu bildirilmiştir. Bu ilk bildiri diğer ülkelerden gelen bildirimler izlemiştir(14).

Metisilin direncini saptamada MecA geninin gösterilmesi altın standart olarak kabul edilmektedir. Ancak rutin uygulamada, yakın zamana kadar oksasilin duyarlılığını belirleyen testler referans yöntem olarak kullanılmıştır. Son yıllarda, sefoksitin metisilin duyarlılığını belirlemede alternatif olarak kullanılabilmesi yönünde çalışmalar bulunmaktadır. Sefoksitin, özellikle heterojen dirençli suşların saptanmasında *mecR1* için daha iyi ve hızlı bir indükleyici olduğu düşünülmekte, bu nedenle kullanılması önerilmektedir (19,27-29,59,60).

S aureus için sefoksitin disk testi, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI/NCCLS) 2005 klavuzunda oksasilin ile duyarlılık ve özgüllük

yönünden eşdeğer olarak gösterilmektedir. KNS suşlarında ise sefoksitin disk difüzyon testinin, oksasilin MİK testlerine göre aynı duyarlılıkta, buna karşın daha yüksek özgüllükte olduğu ifade edilmekte, sefoksitin disk difüzyon testinin oksasiline duyarlı suşları tanımlamada oksasilin MİK testinden daha doğru sonuç verdiği bildirilmektedir (19,27,28,60).

Çalışmamızda yer alan 100 *S aureus* ve 100 KNS suşunun metisilin duyarlılığı moleküler ve konvansiyonel yöntemler ile araştırıldı. Phoenix otomatize tanı sisteminde metisiline dirençli suşlar seçilerek çalışmaya alınmış olmakla beraber, bazı farklı sonuçlar elde edildi (tablo 2-5). Sistem direnç belirlemede oksasilin ve sefoksitin MİK değerlerine göre CLSI önerilerini göz önüne alarak kural işletmekte ve sonuç yorumu yapmaktadır. Özellikle KNS'da MİK sınır değerleri düşürülerek yanlış negatifliklerin önüne geçilmeye çalışılmaktadır. mecA negatif suşlarda, fenotipik olarak dirençli bulunan suşların aşırı β -laktamaz yapımı, metisilini inaktive eden enzimlerin varlığı, PBP2a dışında penisilin bağlayan proteinlerin bulunması gibi farklı mekanizmalar ile açıklanabileceği ifade edilmektedir (29,61,62). Ayrıca otomatize sistemler ile yanlış negatif sonuçlara rastlanmadığı, düşük oranda da olsa yanlış pozitif sonuçların elde edilebileceği, çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (19,63).

Çalışmamızda, oksasilin ve sefoksitin disk difüzyon ve E test sonuçlarının, metisilin direncini saptamada altın standart olarak kabul edilen mecA geni varlığı ile uyumu istatistiksel olarak incelendiğinde, *S aureus* suşlarında dört konvansiyonel testin tamamı uyumlu bulundu. KNS'ların sefoksitin E testi dışındaki testleri de mecA ile uyumlu idi. Ancak, sefoksitin E testi sonuçları mecA ile uyumlu değildi ve bu durum istatistiksel olarak anlamlı bulundu (tablo 6). Bu testlere ait duyarlılık ve özgüllükler incelendiğinde (tablo7), *S aureus*'da sefoksitin disk difüzyon ve E testi, duyarlılık ve özgüllük açısından yüksek, oksasilin için özgüllük aynı, duyarlılığın ise daha düşük olduğu gözlemlendi. KNS'da ise, sefoksitin disk difüzyon ile saptanan duyarlılığın

oksasiline eşdeğer olduğu, sefoksitin özgüllüğünün ise daha yüksek olduğu görüldü. Sefoksitin E test ise, orta duyarlı suşların fazla olması nedeniyle mecA ile uyumlu bulunmadı. Swenson ve ark. (27) KNS ve *S aureus* suşlarında oksasilin ve sefoksitin için disk difüzyon ve E testi ile duyarlılıkları araştırmış, testlerin duyarlılık ve özgüllük oranları; *S aureus* için; disk difüzyon ile oksasilin duyarlılığı % 98, özgüllüğü % 99, E test ile oksasilin duyarlılığı % 98, özgüllüğü % 100, disk difüzyon ile sefoksitin duyarlılığı % 98, özgüllüğü % 100, E test ile oksasilin duyarlılığı % 99, özgüllüğü % 99 olarak; KNS suşları için disk difüzyon ile oksasilin duyarlılığı % 99, özgüllüğü % 89, E test ile oksasilin duyarlılığı % 98, özgüllüğü % 91, disk difüzyon ile sefoksitin duyarlılığı % 99, özgüllüğü % 97, E test ile sefoksitin duyarlılığı % 98, özgüllüğü % 97 olarak saptanmıştır. Boubaker ve ark. (47) metisilin direncinin rutin saptanmasında sefoksitin disk difüzyon testini değerlendirmeyi amaçladıkları bir çalışmada, 115 MRSA ve 350 metisiline duyarlı *S aureus* (MSSA) suşunda metisilin direncinin saptanmasında oksasilin ve sefoksitin disk difüzyon testini kullanmış, referans yöntem olarak mecA geni gösterilmiştir. Bu çalışmada; disk difüzyon ile oksasilin duyarlılığı % 90.4, özgüllüğü % 99.1, disk difüzyon ile sefoksitin duyarlılığı % 96.5, özgüllüğü % 100 olarak saptanmıştır. Bizim çalışmamızla karşılaştırıldığında sonuçların benzer olduğu gözlenmektedir. Ancak bizim bulgularımızda, KNS'larda sefoksitin E testinde orta duyarlı suşlarımızın fazla olması nedeniyle duyarlılık ve özgüllükleri hesaplanamamış, farklı olasılıklar göz önüne alınarak irdelenmiş, orta duyarlı suşlar duyarlı kabul edilecek olursa istatistiksel olarak anlamlı bulunurken, analiz dışı bırakıldığı veya dirençli kabul edildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu konuda yapılan çeşitli çalışmalarda sefoksitin disk difüzyon testinin oksasiline alternatif olabileceği (27,47,64,65), bazı çalışmalarda ise daha büyük serilerin çalışılarak irdelenmesi gerektiği belirtilmektedir (60,64). KNS'larda cefoksitin E testinin duyarlılık sınırlarının daha fazla suş ile yapılan çalışmalarla geliştirilmesi gerekeceği görüşünü bizim bulgularımız da desteklemektedir.

Stafilokoklardan penisilinazı aşırı üreten suşlarda disk difüzyon testlerinde küçük bir inhibisyon zonu oluşabileceği ya da hiç zon oluşturmayacağı bildirilmektedir. mecA aracılığıyla oluşan direnç PCR veya lateks testleri ile doğrulanabilir. Bazı aşırı penisilinaz üreten suşlar özellikle oksasilin disk difüzyonu ile zon oluşturmazlar ve bu durum onların yanlışlıkla MRSA olarak tanımlanmalarına neden olur. Ancak sefoksitin ile yapılan testlerin penisilinazı aşırı üreten suşlardan aynı şekilde etkilenmediği gözlenmiştir (19). Bizim çalışmamızdaki 54 no'lu (*S aureus*) suşumuzun mecA geni taşımamasına rağmen oksasilin diski ile orta duyarlı bulunması (zon çapı 12 mm) aşırı penisilinaz üretmesiyle ilişkili olabilir (Tablo 4).

Metisilin direncinin saptanmasında CLSI-2005 klavuzunda; mecA ve mecA'nın kodladığı PBP2a'nın saptanmasının, metisiline direncin belirlenmesi için kesin yöntemler olduğu belirtilmekte, ağır enfeksiyonlarda izole edilen stafilokok suşlarında disk difüzyon testi sonuçlarının doğrulanması için kullanılabileceği ifade edilmektedir. mecA genini taşıyan stafilokoklar metisiline dirençli olarak, mecA geni içermeyen veya PBP2a sentezlemeyen izolatlar metisiline duyarlı olarak bildirilmeli, mecA dışındaki bazı ender direnç mekanizmalarının da bulunması nedeniyle, disk difüzyon testiyle birlikte MİK testleri yapılmışsa, oksasilin MİK'leri ≥ 4 µg/mL olup, mecA veya PBP2a negatif izolatların oksasiline dirençli olarak bildirilmesi önerilmektedir (28).

mecA geninin gösterilmesinde PCR altın standart yöntemdir (4,12,66,67). Birden fazla primerin birlikte tek tüp içinde kullanılmasına olanak sağlayan multipleks PCR yöntemi, 1988 yılında Chamberlain ve ark. (70) tarafından geliştirilmiştir. Bu teknik, MRSA'ları spesifik olarak tanımlamak, *S aureus* ve KNS'larda metisilin direncini ortaya koymak, bazı direnç determinantları ile stafilokoksik toksinleri göstermek amacıyla kullanılabilmektedir (51,57,68-70).

Metisilin duyarlı *S aureus*'un, stafilokokal kaset kromozom mec (SCCmec) olarak bilinen geniş bir genetik element kazanması ile MRSA doğmuştur. SCCmec, *S aureus*'un replikasyon merkezine yakın bir bölgede MRSA kromozomuna integre olmuş 21-67 kb'lık bir DNA parçasıdır (6,9). SCCmec'in replikasyon merkezine yakın bir bölgede yerleşmesi, antibiyotik direnç genlerini çabuk almasını sağlayarak bakteriye önemli bir avantaj kazandırmaktadır (6,12,14). SCCmec olarak adlandırılan bu genomik adacıklarda, mecA geninin yanı sıra diğer antimikrobiyal ajanlara dirençten sorumlu genler, insersiyon sekansları da yer alır. Günümüzde 21-67 kb ağırlığında tanımlanmış Tip I, II, III, IV olarak ifade edilen dört farklı SCCmec elemanı vardır. SCCmec tipleri; içerdikleri sınıf mec gen kompleksi ve ccr gen kompleksine göre düzenlenir (6,7,10,11,14,30-32).

Ito ve ark. (34,35) tarafından yapılan çalışmalarda SCCmec olarak refere edilen 3 major mec elementinin tüm yapısı gösterilmiştir. İngiltere'de 1961 yılında izole edilen ilk MRSA (NCTC 10442) suşunun tip I, Japonya'da 1982 yılında izole edilen MRSA (N 315) suşunun tip II, Yeni Zelanda'da 1985 yılında izole edilen MRSA (85/2082) suşunun ise tip III SCCmec içerdiği ve yapıları ayrıntılı bir şekilde ortaya konmuştur (34,35). 1990'lı yılların sonlarına doğru izole edilmeye başlanan toplum kökenli MRSA suşlarının tip IV SCCmec içerdiği görülmüştür (36). Tip IV SCCmec suşların mecA dışında direnç geni içermediği, yapısal olarak diğer tiplerden daha küçük olduğu saptanmıştır (11,38-43).

Oliveira ve ark. (51) daha önce genetik yapıları multilocus sequence typing (MLST) ile ortaya konmuş, farklı kökenlerden gelen 28 MRSA suşunun mec elementlerinin yapısı multipleks PCR yöntemiyle çalışmışlardır. Multipleks PCR yönteminin, MRSA izolatlarının mec elementlerinin yapısal tiplendirmesinde hızlı bir yöntem olduğu ifade edilmektedir (42,43,51). Çalışmamızda SCCmec tiplerini belirlemek amacı ile Oliveira ve ark. tarafından önerilen primerleri kullandık. mecA geni saptanan 98 MRSA

suşundan 93 tanesinde 209, 243, 303, 414 bp bantların oluştuğunu, bu bantların Oliveira ve ark.'nın (51) sınıflamasına göre tip III SCCmec'i temsil ettiğini saptadık (Şekil 8, 9).

Ko ve ark. (16) tarafından yapılan çalışmada 12 Asya ülkesinden toplanan 74 MRSA suşu MLST ve multipleks PCR yöntemleriyle irdelenmiş, multipleks PCR'da Oliveira ve ark.'nın (51) çalışmasında kullanılan primerler kullanılmıştır. Asya bölgesinde izole edilen MRSA suşlarında 2 major genotip saptanmış, MLST ile saptanan genotiplerin dağılımının izole edildiği ülkeyle bağlantılı olarak değiştiği görülmüştür. Kore ve Japonya'da CC5; Çin, Hindistan, Endonezya, Filipinler, Suudi Arabistan, Singapur, Sri Lanka, Tayvan, Tayland ve Vietnam'ı içeren diğer Asya ülkelerinde ise CC239 genotipleri saptanmıştır. Multipleks PCR ile de Kore ve Japonya'dan izole edilen suşların çoğunun SCCmec tip II, diğer Asya ülkelerinden izole edilen suşların ise SCCmec tip III veya IIIA olduğu görülmüştür. Arakere ve ark. (52) tarafından yapılan çalışmada Hindistan'da iki farklı hastanede izole edilmiş toplam 82 MRSA suşu kullanılarak multipleks PCR ile SCCmec tipleri irdelenmiştir. Suşlardan 49'unun tip III SCCmec, 26'sının tip IIIA SCCmec içerdiği görülmüştür. Her iki çalışmada elde edilen bulgular, bizim sonuçlarımız ile benzerlik göstermektedir. Chung ve ark. (71) tarafından Florida-Amerika'da yapılan bir çalışmada, 202 MRSA suşu MLST, PFGE ile epidemiyolojik olarak değerlendirilmiş ve Oliveira ve ark.'nın (51) çalışmasında kullanılan primerler ile multiplex PCR yöntemiyle SCCmec tipleri araştırılmıştır. Florida'nın iki hastanesinden toplanan suşlarda ağırlıklı olarak tip II (n=107), yanı sıra daha az sayılarda tip I (n=5), III (n=2), IIIA (n=1) ve IV (n=73) SCCmec saptanmış, 4 suşda ise tiplendirme yapılamamıştır. Bu çalışmada bizim çalışmamızdan farklı olarak tüm SCCmec tipleri saptanmış ve tip IV SCCmec içeren suşların sayısı dikkat çekici olarak fazla bulunmuştur. Tip II SCCmec'in ağırlıklı olarak görülmesi, bizim çalışmamıza göre bir diğer fark olarak karşımıza çıktı. Yunanistan'da Sousa ve ark. (72) tarafından yapılan bir diğer çalışmada aynı hastanede izole edilen 118 MRSA suşunda MLST ve multiplex PCR ile

SCCmec tipleri araştırılmış. Toplanan 118 suşta tip III (n=30), tip IIIA (n=41) ve tip IV (n=46) SCCmec saptanmış. Bu çalışmada bizim suşlarımızdan farklı olarak, sadece kan izolatları değil, katater ilişkili enfeksiyonlar ve yara örneklerinden izole edilen suşlar ile toplum kökenli MRSA kullanılmış, hastane kökenli MRSA izolatlarında bizim çalışmamızda da saptanmış olan tip III SCCmec varlığı gösterilmiştir. Coğrafi olarak birbirine çok yakın iki ülkedeki suşların aynı klondan köken almış olabileceğini düşündürmektedir. Ko ve ark. (16) ile Arakere ve ark. (52) yaptığı çalışmalarda da genellikle bir ülkede aynı tip SCCmec saptandığı görülmüştür. Çalışmamızda aynı tip SCCmec içeren MRSA'ların saptanmış olması, tüm izolatların aynı hastanede yatmakta olan hastalardan alınmış olması ile de açıklanabilir. Ülkemizde farklı bölgelerden toplanan izolatlar ile yapılacak çok merkezli bir çalışma bu konuda Türkiye'nin profilini göstermesi açısından anlamlı olacaktır.

Çalışmamızda MRSA suşlarından 5 tanesinde (suş no; 85, 86, 89, 91, 95) mecA geni bulunmakla birlikte, kullandığımız primerler ile tiplendirme yapılamadı (Şekil 9). Ko ve ark. (16), Arakere ve ark (52) ile Chung ve ark. (71) tarafından yapılan çalışmalarda da, bizim sonuçlarımıza benzer şekilde tiplendirilemeyen suşlar bulunmaktadır. Bu tür suşlarda henüz tanımlanmamış bazı gen yapılarının bulunması olasıdır.

Ko ve ark. (16) Tip III SCCmec içeren suşları diğer antibiyotik duyarlılıkları açısından irdemişlerdir (Tablo 1). Benzer şekilde Arakere ve ark.(52) metisilin dışındaki antibiyotik duyarlılıklarını irdemiş ve tüm suşların penisilin, eritromisin, gentamisin, tetrasikline de dirençli olduğunu saptamışlardır. Metisilin dışı antibiyotik duyarlılıkları açısından bakıldığında bizim suşlarımızın da diğer tip III SCCmec içeren suşlar ile benzer sonuçlar verdiği gözlenmektedir (Tablo 8). Bizim bazı suşlarımızın eritromisine duyarlı olduğu, diğer suşlarımızın özellikle Çin ve Tayland suşları ile benzerlik gösterdiği dikkati çekmektedir.

KNS'lerde mecA geni varlığı irdelendiğinde, 94 suşta mecA saptandı. KNS'larda daha önce yapılmamış olmakla beraber, Oliveira ve ark. (51) tarafından kullanılan primerler ile MRSA'lardaki gibi bir tiplendirme yapmayı amaçladık. Elde edilen sonuçlar bilinen tipler ile uyum göstermedi, ancak Multiplex PCR sonrası oluşan bantlar incelendiğinde çeşitli suşların aynı bant fenotiplerini gösterdiği gözlemlendi. Bu durum bize söz konusu suşların benzer genomik yapılarının ve direnç genlerinin olabileceğini düşündürdü. Bu suşların ileride PFGE ile yeniden irdelenmesinin yararlı olacağını düşünmekteyiz.

Sonuç olarak,

- Çalışmamızda, hem *S aureus* hem de KNS suşlarında metisiline direncin gösterilmesinde, referans yöntem olan mecA geninin varlığı ile kıyaslandığında, fenotipik yöntemlerin sefoksitin E testi dışında uygun olduğu, sefoksitin E testinin MRSA izolatlarında daha duyarlı sonuçlar verirken, KNS'larda kullanımının bizi yanıltabileceği sonucuna varıldı. Fenotipik yöntemler arasında olup, son yıllarda kullanımı önerilen sefoksitin disk difüzyon testinin, hem duyarlılık hem özgüllük açısından daha iyi olduğu ve metisilin direncini belirlemede oksasilin disk difüzyon ve E test yöntemlerine alternatif olarak ve/veya birlikte kullanılabilmesi ortaya konuldu.
- Çalışmada kullanılan suşların rutin olarak kullanılan otomatize sistem ile metisiline dirençli olarak saptanmasına karşı, çok küçük bir oranda da olsa mecA geni içermemesi; mecA yönünden yanlış pozitif sonuçlar elde edilebileceğini, ancak farklı direnç mekanizmalarının bu durumun sebebi olabileceği, o nedenle dikkatli olmak gerektiğini gösterdi.
- Multipleks PCR yöntemiyle SCCmec tiplerini araştırdığımızda, tiplendirilebilen suşlarımızın Tip III SCCmec ile uyumlu olduğu, yapılan benzer çalışmalarda da aynı bölgeden toplanan izolatlarda genellikle aynı Tip SCCmec bulunduğunu, bu nedenle sonuçlarımızın literatüre katkı yapacak nitelikte olduğunu söyleyebiliriz.

- Suşlarımızın diğ̈er antibiyotiklere direnç durumu incelendiğ̈inde, SCCmec Tip III'de olması gereken direnç özelliklerini yansıttığı, dolayısıyla benzer bir plazmid yapısına sahip olabilecekleri düşünöldü. Bu yönden ileri çalışmaların yapılmasının uygun olacağı sonucuna varıldı.
- Tiplendirme açısından farklı bölgelerden toplanan izolatlarla yapılacak çok merkezli çalışmaların, Türkiye'nin genel profilini ortaya koymak bakımından yararlı olacağı kanısına varıldı.

EKLER

Ek-1: *S aureus* suşlarının duyarlılık sonuçları ve mecA geni varlığı

Suş No	Ox-DD	Cef-DD	Ox-E test	Cef-E test	mecA
1	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
2	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
3	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
4	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
5	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
6	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
7	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
8	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
9	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
10	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
11	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
12	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
13	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
14	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
15	6 mm-R	12 mm-R	256-R	96-R	+
16	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
17	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
18	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
19	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
20	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
21	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
22	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
23	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+

24	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
25	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
26	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
27	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
28	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
29	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
30	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
31	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
32	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
33	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
34	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
35	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
36	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
37	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
38	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
39	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
40	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
41	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
42	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
43	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
44	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
45	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
46	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
47	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
48	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
49	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
50	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
51	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
52	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
53	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+

54	12 mm-I	29 mm-S	2-S	6-S	Negatif
55	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
56	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
57	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
58	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
59	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
60	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
61	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
62	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
63	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
64	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
65	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
66	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
67	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
68	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
69	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
70	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
71	18 mm-S	28 mm-S	0,5-S	6-S	Negatif
72	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
73	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
74	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
75	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
76	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
77	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
78	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
79	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
80	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
81	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
82	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
83	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+

84	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
85	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
86	11 mm-I	14 mm-R	2-S	32-R	+
87	6 mm-R	17 mm-R	16-R	16-I	+
88	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
89	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
90	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
91	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
92	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
93	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
94	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
95	6 mm-R	6 mm-R	256-R	16-I	+
96	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
97	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
98	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
99	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
100	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+

Ek-2: KNS suşlarının duyarlılık sonuçları ve mecA geni varlığı

Suş No	Ox-DD	Cef-DD	Ox-E test	Cef-E test	mecA
101	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
102	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
103	6 mm-R	15 mm-R	3-R	32-R	+
104	17mm-R	33 mm-S	0,38-R	3-S	Negatif
105	6 mm-R	15 mm-R	6-R	48-R	+
106	6 mm-R	18 mm-R	8-R	16-I	+
107	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
108	6 mm-R	15 mm-R	4-R	64-R	+
109	6 mm-R	15 mm-R	6-R	48-R	+
110	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
111	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
112	6 mm-R	13 mm-R	12-R	48-R	+
113	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
114	6 mm-R	14 mm-R	16-R	32-R	+
115	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
116	15 mm-R	22 mm-R	1-R	8-S	+
117	16 mm-R	15 mm-R	4-R	32-R	+
118	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
119	6 mm-R	19 mm-R	2-R	24-I	+
120	19 mm-S	31 mm-S	6,125-S	3-S	Negatif
121	16 mm-R	19 mm-R	15-R	12-I	+
122	26 mm-S	33 m-S	6,125-S	1-S	Negatif
123	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
124	16 mm-R	22 mm-R	1-R	8-S	+
125	6 mm-R	18 mm-R	6-R	32-R	+

126	6 mm-R	11 mm-R	8-R	256-R	+
127	6 mm-R	6 mm-R	16-R	256-R	+
128	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
129	11 mm-R	16 mm-R	1,5-R	32-R	+
130	6 mm-R	15 mm-R	12-R	32-R	+
131	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
132	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
133	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
134	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
135	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
136	13 mm-R	23 mm-R	1-R	6-R	+
137	6 mm-R	13 mm-R	256-R	48-R	+
138	6 mm-R	16 mm-R	256-R	32-R	+
139	6 mm-R	16 mm-R	4-R	32-R	+
140	6 mm-R	12 mm-R	6-R	64-R	+
141	6 mm-R	18 mm-R	2-R	16-I	+
142	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
143	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
144	6 mm-R	13 mm-R	4-R	64-R	+
145	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
146	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
147	6 mm-R	13 mm-R	16 mm-R	64 mm-R	+
148	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
149	6 mm-R	15 mm-R	3-R	32-R	+
150	6 mm-R	16 mm-R	2-R	32-R	+
151	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
152	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
153	25 mm-S	33 mm-S	0,19-S	3-S	Negatif
154	6 mm-R	14 mm-R	6-R	48-R	+
155	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+

156	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
157	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
158	6 mm-R	15 mm-R	12-R	32-R	+
159	6 mm-R	18 mm-R	6-R	32-R	+
160	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
161	6 mm-R	16 mm-R	256-R	32-R	+
162	13 mm-R	23 mm-R	1-R	6-S	+
163	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
164	6 mm-R	15 mm-R	256-R	48-R	+
165	6 mm-R	13 mm-R	256-R	64-R	+
166	11 mm-R	21 mm-R	1,5-R	12-R	+
167	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
168	6 mm-R	26 mm-R	2-R	48-R	+
169	6 mm-R	17 mm-R	256-R	32-R	+
170	6 mm-R	18 mm-R	4-R	32-R	+
171	13 mm-R	23 mm-R	0,75-R	8-R	+
172	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
173	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
174	6 mm-R	18 mm-R	2-R	32-R	+
175	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
176	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
177	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
178	6 mm-R	16 mm-R	4-R	48-R	+
179	6 mm-R	26 mm-R	256-R	32-R	+
180	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
181	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
182	16 mm-R	23 mm-R	2-R	16-I	+
183	16 mm-R	22 mm-R	1-R	8-S	+
184	6 mm-R	16 mm-R	6-R	32-R	+
185	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+

186	9 mm-R	21 mm-R	2-R	16-I	+
187	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
188	12 mm-R	29 mm-S	1,5-R	2-S	Negatif
189	12 mm-R	15 mm-R	1,5-R	32-R	+
190	6 mm-R	12 mm-R	12-R	96-R	+
191	6 mm-R	17 mm-R	48-R	32-R	+
192	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
193	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
194	8 mm-R	17 mm-R	3-R	32-R	+
195	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
196	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+
197	16 mm-R	27 mm-S	0,75-R	4-S	Negatif
198	6 mm-R	14 mm-R	256-R	48-R	+
199	6 mm-R	14 mm-R	256-R	48-R	+
200	6 mm-R	6 mm-R	256-R	256-R	+

16. Ko SK, Lee JY, Suh JY et al. Distribution of Major Genotypes among Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clones in Asian Countries. *J Clin Microbiol* 2005;43:421-6.
17. Enright MC, Robinson DA, Randle G et al. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *PNAS* 2002;99:7687-92.
18. Cengiz AT. *Staphylococcus*. In: Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. 1. baskı. Ankara: Güneş Kitapevi; 1999. 339-47.
19. Brown DFJ, Edwards DI, Hawkey PM et al. Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Antimicrob Chemother* 2005;56:1000-18.
20. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* Infections. *The New England Journal of Medicine* 1998;8:520-32.
21. Lodise TP, McKinnon PS. Clinical and economic impact of methicillin resistance in patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2005;52:113-22.
22. Robinson DA, Enright MC. Evolutionary Models of the Emergence of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3926-34.
23. Hiramatsu K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. *The Lancet Infectious Disease* 2001;1:147-55.
24. Rohrer S, Bachi BB. FemABX Peptidyl Transferases: a Link between Branched-Chain Cell Wall Peptide Formation and β -Lactam Resistance in Gram-Positive Cocci. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:837-46.
25. Rossi J, Bischoff M, Wada A, Bachi BB. MsrR, a Putative Cell Envelope-Associated Element Involved in *Staphylococcus aureus sarA* Attenuation. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:2558-64.
26. Haley RW, Hightower AW, Khabboz RF et al. The emergence of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in United States Hospitals. 1982;97(3):297-308,
27. Swenson JM, Tenover FC. Results of Disk Diffusion Testing with Cefoxitin Correlate with Presence of *mecA* in *Staphylococcus spp.* *J Clin Microbiol* 2005;43:3818-23.
28. CLSI/NCLS-2005;25:44-115.
29. Gülay Z. Beta-laktamlara Direnç Mekanizmaları. In: Ulusoy S. Beta-laktamazlar ve Klinik Önemi. 1th baskı. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2005. 9-34.
30. Hiramatsu K, Kuroda M, Baba T, Ito T, Okuma K. Application of Genomic Information to Diagnosis, Management, and Control of Bacterial Infections: the *Staphylococcus aureus* Model. In: Persing DH. et al. *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice*. Washington: ASM Press; 2004. 407-18.

31. Wisplinghoff H, Rosato AE, Enright MC, Noto M, Craig W, Archer GL. Related Clones Containing SCCmec Type IV Predominate among Clinically Significant Related Clones Containing SCCmec Type IV Predominate among Clinically Significant *Staphylococcus epidermidis* Isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3574-9.
32. Juuti K, Ibrahim S, Julkunen AN, Varkila JV, Kuusela P. The *pIs* Gene Found in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains Is Common in Clinical Isolates of *Staphylococcus sciuri*. *J Clin Microbiol* 2005;43:1415-9.
33. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. Genetic organization of the Chromosome Region Surrounding *mecA* in Clinical Staphylococcal Strains: Role of IS431-Mediated *mecI* deletion in Expression of Resistance in *mecA*-Carrying, Low Level Methicillin-Resistant *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1955-63.
34. Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C, Hiramatsu K. Structural comparison of Three Types of Staphylococcal Cassette Chromosome in Methicillin resistant Staphylococcus. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1323-36.
35. Ito T, Katayama Y, Hiramatsu K. Cloning and Nucleotide Sequence Determination of the Entire *mec* DNA of Pre-Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1449-58.
36. François P, Renzi G, Pittet D et al. A Novel Multiplex Real-Time PCR Assay for Rapid Typing of Major Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Elements. *J Clin Microbiol* 2004;42:3309-12.
37. Shukla SK, Stemper ME, Ramaswamy SV et al. Molecular Characteristics of Nosocomial and Native American Community-Associated Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Clones from Rural Wisconsin. *J Clin Microbiol* 2004;42:3752-7.
38. Tristan A, Ying L, Bes M, Etienne J, Vandenesch F, Lina G. Use of Multiplex PCR to Identify *Staphylococcus aureus* adhesins Involved in Human Hematogenous Infections. *J Clin Microbiol* 2003;41:4465-67.
39. Sousa MA, Lencastre H. Evolution of Sporadic Isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Hospitals and Their Similarities to Isolates of Community-Acquired MRSA. *J Clin Microbiol* 2003;41:3806-15.
40. Rybak MJ, LaPlante KL. Community Associated Methicillin resistant Staphylococcus. *Pharmacotherapy* 2005;25(1):74-85.
41. Vandenesch F, Naimi T, Enright MC et al. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Carrying Panton-Valentine Leukocidin Genes: Worldwide Emergence. *Emerging Infectious Diseases* 2003;9(8):978-84.
42. O'Brien FG, Lim TT, Chong FN, Coombs GW, Enright MC, Robinson DA. Diversity among Community Isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Australia. *J Clin Microbiol* 2004;42:3185-90.

43. Fey PD, Salim BS, Rupp ME et al. Comparative Molecular Analysis of Community- or Hospital-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:196-203.
44. Okuma K, Iwakawa K, Turnidge JD et al. Dissemination of New Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Clones in the Community. *J Clin Microbiol* 2002;40:4289-94.
45. Turnidge JD, Ferraro MJ, Jorgensen JH. Susceptibility Test Methods: General Considerations. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. Washington DC: ASM Press; 2003.1102-7.
46. Jorgensen J.H, Turnidge J.D. Susceptibility Test Methods: Dilution and Disk Diffusion Methods. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. Washington DC: ASM Press; 2003.1108-27.
47. Boubaker BB, Abes RB, Abdallah HB et al. Evolution of a cefoxitin disk diffusion test for the routine detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 2004;10:762-5.
48. Kocagöz T. Polimeraz Zincirleme Tepkimesi. *Medikal Biyoteknoloji ve Moleküler Tıp Dergisi* 1996;1(3):112-8.
49. Lim TT, Coombs GW, Grubb WB. Genetic organization of *mecA* and *mecA*-regulatory genes in epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Australia and England. *J Antimicrob Chemother* 2002;50:819-24.
50. Ünal S, Hoskins J, Flokowitsch JE, Wu CYE, Preston D, Skatrud PL. Detection of Methicillin-Resistant Staphylococci by Using the Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol* 1992;30:1685-91.
51. Oliveira DC, 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* 2002;46:2155-61.
52. Arakere G, Nadig S, Swedberg G, Macaden R, Amarnath SK. Genotyping of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains from Two Hospitals in Bangalore, South India. *J Clin Microbiol* 2005;43:3198-202.
53. Tveten Y, Jenkins A, Digranes A, Melby KK, Allum AG, Kristiansen BE. Comparison of PCR detection of *mecA* with agar dilution and Etest for oxacillin susceptibility testing in clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Infect* 2004;10:462-65.
54. Ferreira RBR, Iorio NLP, Malvar KL et al. Coagulase-negative Staphylococci: Comparison of Phenotypic and Genotypic Oxacillin Susceptibility Tests and Evaluation of the Agar Screening Test by Using Different Concentrations of Oxacillin. *J Clin Microbiol* 2003;41:3609-14.
55. Weller TMA, Crook DW, Crow MR, Ibrahim W, Pennington TH, Selkon JB. Methicillin susceptibility testing of staphylococci by E test and

- comparison with agar dilution and *mecA* detection. J Antimicrob Chemother 1997;39:251-3.
56. Japoni A, Alborzi A, Rasouli M, Pourabbas B. Modified DNA Extraction for Rapid PCR Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococci*. Iran Biomed J 2004;8(3):161-5.
 57. Zhang K, Sparling J, Chow BL et al. New Quadriplex PCR Assay for Detection of Methicillin and Mupirocin Resistance and Simultaneous Discrimination of *Staphylococcus aureus* from Coagulase negative Staphylococci. J Clin Microbiol 2004;42:4947-55.
 58. Adams DN, Shortcut Method for Extraction of *Staphylococcus aureus* DNA from Blood Cultures and Conventional Cultures for use in Real-Time PCR Assays. J Clin Microbiol 2005;43:2932-3.
 59. Wannet WJB, Spalburg E, Heck MEOC, Pluister GN, Willems RJL, Neeling AJ. Widespread Dissemination in The Netherlands of the Epidemic Berlin Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clone with Low-Level Resistance to Oxacillin. J Clin Microbiol 2004;42:3077-82.
 60. Frigatto EAM, Machado AMO, Pignatari ACC, Gales AC. Is the Cefoxitin Disk Test Reliable Enough to Detect Oxacillin Resistance in Coagulase-Negative Staphylococci? J Clin Microbiol 2005;43:2028-9.
 61. Spanu T, Sanguinetti M, D'Inzeo T et al. Identification of methicillin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci responsible for blood stream infections with the Phoenix™ system. Diagn Microbiol Infect Dis 2004;48:221-7.
 62. Tenover FC, Jones RN, Swenson JM, Zimmer B, McAllister S, Jorgensen JH. Methods for Improved Detection of Oxacillin Resistance in Coagulase-Negative Staphylococci: Results of a Multicenter Study. J Clin Microbiol 1999;37:4051-8.
 63. Frebourg NB, Nouet D, Lemee L, Martin E, Lemeland JF. Comparison of ATB Staph, Papid ATB Staph, Vitek, and E-Test Methods for Detection of Oxacillin Heteroresistance in Staphylococci Possessing *mecA*. J Clin Microbiol 1998;36:52-7.
 64. Cauwelier B, Gordts B, Descheemaeker P. Evaluation of a Disk Diffusion Method with Cefoxitin (30 µg) for Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2004;23:389-92.
 65. Felten A, Grandry B, Lagrange PH, Casin I. Evaluation of Three Techniques for Detection of Low-Level Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a Disk Diffusion Method with Cefoxitin and Moxalactam, the Vitek 2 System, and the MRSA-Screen Latex Agglutination Test. J Clin Microbiol 2002;40:2766-71.
 66. Francois P, Pittet D, Bento M et al. Rapid Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Directly from Sterile or Nonsterile Clinical Samples by a New Molecular Assay. J Clin Microbiol 2003;41:254-60.
 67. Sakuolas G, Gold HS, Venkataraman L, Degirolami PC, Eliopoulos GM, Oian Q. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Comparison

- of Susceptibility Testing Methods and Analysis of *mecA* Positive Susceptible Strains. *J Clin Microbiol* 2001;39:3946-51.
68. Nunes ELC, Santos KGN, Mondino PJJ, Bastos MCF, deMarval MG. Detection of *ileS-2* Gene Encoding Mupirosin Resistance in Meticillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by Multiplex PCR. *Diag Microbiol Infect* 1999;34:77-81.
69. Griethuysen A, Loo I, Belkum A, Grauls CV, Wannet W, Keulen P, Kluytmans J. Loss of the *mecA* Gene during Storage of Meticillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. *J Clin Microbiol* 2005;43:1361-5.
70. Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res* 1988;16:11141-56.
71. Chung M, Dickinson G, Lencastre H, Tomasz A. International Clones of Meticillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Two Hospitals in Miami, Florida. *J Clin Microbiol* 2004;42:542-7.
72. Sousa MA, Bartzavali C, Spiliopoulou I, Sanches IS, Crisostomo MI, Lencastre H. Two International Meticillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clones Epidemic in a University Hospital in Patras, Greece. *J Clin Microbiol* 2003;41:2027-32.

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim sırasında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım hocalarım sayın Prof Dr Kaya Kılıçturgay'a, Prof Dr Feridun Gökırmak'a, Prof Dr Okan Töre'ye, Prof Dr Safiye Helvacı'ya, her konuda ilgisini ve desteğini gördüğüm, deneyimlerinden yaralandığım, tezimin oluşumu ve yürütülmesinde büyük emeği olan tez danışmanım sayın Prof Dr Suna Gedikoğlu'na, yetişmemde büyük emekleri olan hocalarım sayın Prof Dr Güher Göral'a, Prof Dr Reşit Mistik'a, Prof Dr Beyza Ener'e, Prof Dr Halis Akalın'a, Doç Dr Barbaros Oral'a, Doç Dr Cüneyt Özakin'a, Yrd Doç Dr Yasemin Heper'e, Yrd Doç Dr Melda Sınırtaş'a, Yrd Doç Dr Emel Yılmaz'a, Uzm Dr Sevim Akçağlar'a, Uzm Dr Oktay Alver'e, Uzm Dr Canan Evcı'ye, birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum sevgili asistan arkadaşlarıma, tez çalışmamın her aşamasında yakın ilgi ve desteğini gördüğüm teknisyen arkadaşlarıma, tezimin istatistik analizlerini yapan sayın Semra Akgöz'e, tüm Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji çalışanlarına teşekkür ederim. Ayrıca bugünlere gelmemde büyük emekleri olan, sevgilerini, desteklerini her zaman yanımda hissettiğim biricik aileme, beni kızları olarak kabul edip, sevgilerini, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen ikinci ailem olan eşimin anne ve babasına ve büyük fedakarlıklara katlanarak bana hep destek olup sevgisini, yardımını her zaman yanımda bulduğum çok değerli eşim Ufuk Sevgican'a, yaşam sevincim, ışığım, biricik oğlum Can'a teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

15.09.1970 tarihinde Denizli’de doğdum. İlköğrenimimi Ankara Bayrak Garnizonu İlkokulu, Erzurum Atatürk İlkokulu ve Bandırma 17 Eylül İlkokulunda, ortaöğrenimimi Bandırma Atatürk Ortaokulunda, lise öğrenimimi Bandırma Şehit Mehmet Gönenç Lisesi’nde tamamladım. 1987 yılında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesini kazandım. 1993 yılında mezun olduktan sonra Mecburi hizmetimi Konya İli Akşehir İlçesinde SSK Kurumu Sağlık İstasyonunda tamamladım. 1996-98 yıllarında Bandırma SSK Hastanesi, 1998-2000 yıllarında İstanbul SSK Süreyyapaşa Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Hastanesinde görevime devam ettim. 2000 yılında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda uzmanlık eğitimime başladım. Halen aynı bölümde araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım. Evliyim ve bir çocuk annesiyim.