

222

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

STAPHYLOCOCCUS AUREUS SUŞLARINDAKİ METİSİLİN
DİRENCİNİN ARAŞTIRILMASINDA DİSK DİFFÜZYON, AGAR
TARAMA VE AGAR DİLÜSYON YÖNTEMLERİNİN POLİMERAZ
ZİNCİR REAKSİYONU YÖNTEMİ İLE KARŞILAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ
Dr. İLHAN TAŞ

TEZ YÖNETİCİSİ
Prof. Dr. RIZA DURMAZ

T.C. İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ



02253301

iz: QR 1996.T37

Taş, İlhan

İlhan: Staphylococcus aureus suşlarında metisilin

İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
GELİŞİM VE İZLENİM BÖLÜMÜ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
1- GİRİŞ VE AMAÇ	1
2- GENEL BİLGİLER	3
2.1. Staphylococcus'ların Genel Yapısı	3
2.2. Staphylococcus aureus'un Virulansında Etkili Enzim ve Toksinler	4
2.3. Staphylococcus aureus'a Bağlı Olarak Oluşan Hastalıklar	7
2.4. Staphylococcus aureus'da Direnç Mekanizmaları	9
2.5. Staphylococcus aureus'da Metisilin Direnç Mekanizmaları	12
3- MATERYAL VE METOD	18
3.1. Disk Diffüzyon Yöntemi İle Metisilin Direncinin Araştırılması	18
3.2. Agar Tarama Yöntemi İle Metisilin Direncinin Araştırılması	20
3.3. Agar Dilüsyon Yöntemi İle Metisilin Direncinin Araştırılması	21
3.4. Metisilin'e Dirençli Suşların Tedavide Alternatif Olabilecek Bazı Antibiyotiklere Direnç Durumunun Belirlenmesi	23
3.5. PZR Yöntemi İle Metisilin Direncinin Araştırılması	23
4- BULGULAR	29
4.1. Disk Diffüzyon Yöntemi İle Alınan Sonuçlar	29
4.2. Agar Tarama Yöntemi İle Alınan Sonuçlar	30
4.3. Agar Dilüsyon Yöntemi İle Alınan Sonuçlar	30
4.4. MRSA Suşlarının Alternatif Antibiyotiklere Direnç Durumu	31
4.5. PZR Yöntemi İle Alınan Sonuçlar	32

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
TABLO 1- Klinik Olark Önem Taşıyan Staphylococcus Türlerinin Ayırıcı Özellikleri	7
TABLO 2- S.aureus'un Antimikrobiyal Direnç Genleri	10
TABLO 3- MRSA Suşlarının Değişik Antibiyotik Duyarlılıkları	16
TABLO 4- S.aureus'un MRSA, MODSA ve BORSA Suşlarında Metisilin ve Oksasilin MIC Değerlerinin Dağılımı	17
TABLO 5- Disk Diffüzyon Yöntemi İle MRSA Olarak Saptanan Suşlara Karşı Denenen Antibiyotiklerin Disk Konsantrasyonları ve İnhibisyon Zonlarının Yorumu	23
TABLO 6- Farklı Ortamlardan İzole Edilen Suşların, Disk Diffüzyon Yöntemi İle Oksasilin'e Direnç Durumları	29
TABLO 7- Farklı Ortamlardan İzole Edilen Suşların, Agar Tarama Yöntemi İle Oksasilin'e Direnç Durumları	30
TABLO 8- Farklı Ortamlardan İzole Edilen Suşların, Agar Dilüsyon Yöntemi İle Oksasilin'e Direnç Durumları	31
TABLO 9- Disk Diffüzyon Yöntemi İle MRSA Olarak Saptanan Suşlara Karşı Denenen Antibiyotiklerin Direnç Durumu	32

ŞEKİL LİSTESİ

ŞEKİL 1- Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemi İle Mec A Geni Araştırılan Suşlardan Bazıları	33
ŞEKİL 2- Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemi İle Mec A Geni Araştırılmasında 1.5 ve 1 mM MgCl ₂ Konsantrasyonu İle Alınan Sonuçlar	34

TEŐEKKÜR

Tez yönetiminde bilgi ve desteğini esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. Rıza DURMAZ'a, çalışmada kullanılan pozitif kontrol suşunun temininde gösterdiği ilgiden dolayı Sayın Doç. Dr. Deniz GÜR'e ve çalışma süresince yardımlarını esirgemeyen Sayın Bio. Selami GNAL'a teőekkür ederim.

Dr. İlhan TAŞ

GİRİŞ VE AMAÇ

Sir Alexander FLEMING ' in 1928 yılında Staphylococcus ' lara etkili olduğunu gözlediği Penisilin'i keşfetmesi ile infeksiyon hastalıklarının tedavisinde yeni bir dönem açılmıştır. Bulunan bu ilk antibiyotığın klinik kullanıma girmesi ile özellikle 1940 ' lı yıllarda Penisilin hayat kurtarıcı mucize ilaç olarak ortaya çıkmıştır. Bu yıllarda Staphylococcus'ların Penisilin' e çok duyarlı oldukları tesbit edilmiştir. Minimal inhibitory concentration (MIC): 1-10 ng/ml. Ancak Penisilin'in klinik kullanıma girmesinden kısa bir süre sonra Staphylococcus 'larda Penisilin direnci tesbit edilmiş (MIC: 100 mcg/ml) ve bu direnç hızla yayılmıştır. Bugün bu bakterilerin % 85 ' den fazlası Penisilin ' e dirençlidirler. Direncin sebeplerinden en önemlisi Penisilin ' i parçalayan Beta laktamaz enzimidir. S.aureus ' da Penisilin direncinin hızla yayılmasında kuşkusuz beta laktamaz enzim sentezini sağlayan genin büyük önemi vardır. Bu gen bir plazmid üzerinde taşınmakta ve horizontal olarak çok hızla yayılabilmektedir (1) .

Bilim S.aureus ' un bu meydan okumasına 1960 yılında Beta laktamaza dayanıklı Penisilinlerin keşfi ile cevap vermiştir .Metisilin , Nafsilin , Oksasilin gibi Beta laktamaza dirençli antibiyotiklerin keşfi ile bu bakterilerin neden olduğu hastalıkların kontrolü bir süre mümkün olmuş , ancak 1961 yılında Beta laktamaz enzimi üretmenin dışında yeni bir mekanizma ile başta Metisilin ve Oksasilin olmak üzere bütün Beta laktam antibiyotiklere dirençli olabilen suşlar saptanmış ve bunlar Metisilin 'e rezistan S.aureus (MRSA) olarak tanımlanmıştır. Önce Avrupa'da ; sonra ABD , Avustralya gibi ülkelerde MRSA ' ya bağlı infeksiyonlar ; gerek hastane salgınları şeklinde , gerekse endemik şekilde görülmeye başlanmıştır (2). Başlangıçta büyük eğitim hastanelerinin nazokomiyal patojeni olarak beliren MRSA , hastaneler arası hasta naklinin yaygın olduğu günümüzde yalnızca hastanelerde sorun olmakla kalmayıp , hastane dışı infeksiyonlardan da sorumlu olabilecek duruma gelmiştir (3). Başlangıçta tanı ve tedavideki güçlükler nedeni ile MRSA tüm dünyada önemli bir problem haline gelmiştir. Türkiye 'de yapılan çalışmalarda Metisilin direncinin koagülaz pozitif Staphylococcus'lar içindeki oranı % 18-48 arasında

değişmektedir (4). MRSA suşları sadece Metisilin 'e değil , penem grubu antibiyotikler de dahil olmak üzere , tüm Beta laktam antibiyotiklere dirençlidirler. Bu suşların klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında saptanmaları bu sebeple ayrı bir önem taşımaktadır. MRSA suşlarının duyarlı olarak rapor edilmesi özellikle sepsis ve endokardit gibi ciddi infeksiyonlarda hastanın hayatına mal olabilen başarısızlıklara yol açmaktadır (1,5).

Bu çalışmada MRSA suşlarının tanısında " National Committee for Clinical Laboratory Standards " kuralları dahilinde uygulanan disk diffüzyon , agar tarama , agar dilüsyon yöntemlerinin özgüllük ve duyarlılıklarını Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemine göre karşılaştırmak ,Metisilin'e dirençli suşların kesin olarak saptanmasında yönteminin önemini ortaya koymak ve bu yöntemler kullanılarak Malatya bölgesinde farklı ortamlarda MRSA suşlarının yaygınlığını belirlemek amaçlanmıştır.

aktivite gösterebilir. Ayrıca lokal schwartzman olayına neden olur ve komplemanı aktive eder.

3. Protein A: Mikroorganizmanın yüzeyini kaplayan bu protein ; kovalan bağlar ile peptidoglikan tabakasına ve immünoglobülinlerden IgG'nin Fc reseptör parçasına özel ilgi duyarak bağlanabilmektedir.

4. Teikoik asit: Teikoik asit bir taraftan peptidoglikan tabakasına diğer taraftan sitoplazmik membrana bağlanan kompleks fosfat içeren bir polisakkarittir. Teikoik asit zayıf bir immünojendir. Peptidoglikana bağlandığı takdirde spesifik antikor cevabını stimüle edebilir.

5. Sitoplazmik membran: Sitoplazmik membranın protein , lipid , karbonhidrattan oluşan kompleks bir yapısı vardır. Hücre için ozmotik bir bariyer ; selüler , biyosentetik ve respiratuvar enzimler için bir tutunma yeridir (7).

STAPHYLOCOCCUS AUREUS ' UN VİRÜLANSINDA ETKİLİ ENZİM VE TOKSİNLER :

A-TOKSİNLER:

1. Hemoliziner: Alfa toksin , Beta toksin , Delta toksin ve Gamma toksin olmak üzere dört sitolitik ve membran hasarlayıcı toksin meydana getirirler. Bu sitotoksinler etrafta bulunan , zarar görmüş dokulardan salınan Lizozomal enzimlerle birlikte nötrofilleri eritirler (6-8).

a-Alfa toksin: Bu toksin eritrosit , lökosit , hepatosit, trombosit , insan diploid fibroblastları , Hela hücreleri gibi birçok hücre için sitotoksiktir. Toksin aynı zamanda kan damarlarındaki düz kasları da hasarlandırır. Değişik canlıların eritrositleri alfa toksine farklı duyarlılık gösterirler. Tavşan eritrositleri alfa toksine insan eritrositlerinden yüz defa daha fazla duyarlıdır. Alfa toksin protein yapısında olup, etki mekanizması kesin olarak bilinmemektedir. Bununla beraber, toksinin hücre membranının bütünlüğünü bozduğu düşünülmektedir. Alfa toksinin S.aureus hastalıklarında doku hasarının önemli mediatörü olduğu görüşü hakimdir.

b-Beta toksin: Bu toksin termolabil bir protein olup; eritrositler, lökositler ve makrofajlar için toksik etki gösterir. Katalaz enzimi ile birlikte duyarlı hücrelerin membran fosfolipidlerini hidrolize ederek etki eden bu toksin ; alfa toksin ile birlikte, karakteristik abse oluşumunda doku hasarından sorumlu tutulmaktadır.

c-Delta toksin:Termostabil, büyük, heterojen bir protein olan toksinin geniş spektrumlu sitolitik aktivitesi vardır. Etki mekanizmasının; hücre zarının hasarında deterjan benzeri etki ile oluştuğuna inanılmaktadır.

d-Gamma toksin: İnsan lenfoblastik hücrelerini ve insan , tavşan eritrositlerini eritme yeteneğinde olan bir toksindir.

2-Lökosidin : F ve S olmak üzere iki komponenti bulunan bu toksinin, iki komponenti bir arada iken , lökosit hücre membranını hasarlandırmada ve permeabilitesini artırmada fonksiyonu vardır (8).

3-Eksfoliyatif toksin : Bu toksine epidermolitik toksin de denilmektedir. Antijenik ve biyolojik özellikleri bakımından en az iki çeşittir. Eksfoliyatif A ; bakteride kromozomal bir gen tarafından oluşturulan termostabil ve EDTA ile inaktive olan bir toksindir. Eksfoliyatif B ise ; bir plazmid tarafından oluşturulan termolabil ve EDTA ' ya dirençli bir toksindir. Eksfoliyatif toksin Stafilokoksik haşlanmış deri sendromunun oluşmasından sorumludur.Toksinin etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir (6,8).

4-Toksik şok sendrom toksin 1 (TSST-1): Pirojenik toksin C veya Enterotoksin F olarak da bilinen bu toksin , birçok Staphylococcus aureus suşu tarafından üretilir.İnsanda ateş, şok ve deskuamatif deri döküntülerine neden olur.

5-Enterotoksinler: Yedi ayrı Staphylococcus aureus enterotoksini vardır: A, B, C₁, C₂, D, E, F. Bunlar mide ve duodenumda enzimatik hidrolize ve 100 ° C 'de 30 dakika süreyle ısıtmaya dayanıklıdır. Enterotoksin A sıklıkla , C ve D genellikle kontamine süt ürünleri ile besin zehirlenmesi yaparlar. Enterotoksin B ise S.aureus ' un sebep olduğu pseudomembranöz enterokolit 'den sorumludur. Toksinin aktivitesinin mekanizması bilinmemektedir. Üretimi çoğunlukla kromozomal genler tarafından kontrol edilir , ancak

üretimin regülasyonunu sağlayan protein plazmid kaynaklı olabilir (6-8).

B-ENZİMLER:

1- Koagülaz: S.aureus türleri bağlı ve serbest koagülaz olmak üzere iki ayrı koagülaz meydana getirirler. Bağlı koagülaz fibrinojeni doğrudan fibrin haline değiştirir ve Staphylococcus aureus' ların küme yapmalarına sebep olur. Serbest koagülaz ise aynı sonuca ; serumda bulunan " Coagulase reacting factor " yardımıyla ulaşır. Koagülaz; Staphylococcus aureus abselerinin çevresinde fibrin tabakası oluşturarak, mikroorganizmanın fagositozdan korunmasını sağlar(6).

2-Hyalüronidaz : Hyalüronik asidi hidrolize ederek Staphylococcus aureus ' un dokulara kolayca yayılmasını sağlar.

3-Katalaz: Hidrojen peroksiti , su ve oksijene kataliz ederek, mikroorganizmayı hidrojen peroksitin toksik etkisinden korur.

4-Fibrinolizin : Stafilokinaz olarak da bilinir.Fibrini eriterek bakterinin yayılmasını kolaylaştırır.

5-Lipazlar: Lipidleri hidrolize eden bu enzim ; Staphylococcus aureus 'un kütanöz dokulara girmesini sağlayarak ; fronkül , karbonkül , bül oluşumuna sebep olur.

6-Nükleaz: Termostabildir.DNA ' yı parçalayarak cerahatin akışkan hale gelmesini sağlar.

7-Beta laktamaz : Beta laktam halkasının hidroksil grubunu parçalayan bir enzimdir(7).

Tablo 1 : Klinik olarak önem taşıyan Staphylococcus türlerinin ayırıcı özellikleri (8).

	S.aureus	S.epidermidis	S.saprophyticus
Pigment	Sarı-portakal	-	- **
Plazma koagülaz enzimi	+	-	-
Kümelenme Faktörü	+	-	-
Mannitolden Asit	+	-	***
Trehalozdan Asit	+	-	+
Novobiosine Duyarlılık (5 mcg)*	Duyarlı	Duyarlı	Dirençli

Tablo 1 ile ilgili açıklamalar:

- * : 16 mm ' ye eşit veya daha küçük çaplı inhibisyon zonu novobiosine direnci gösterir .
- ** : Bazı suşlar açık sarı pigmentlidir.
- *** : Suşların % 11-89 ' unda pozitifdir.

STAPHYLOCOCCUS AUREUS'A BAĞLI OLARAK OLUŞAN HASTALIKLAR :

1.Deri ve Mukoza infeksiyonları : Normal deri ve mukoza florasında bulunan veya dış kaynaklardan gelen mikroorganizma , ter bezlerinin ağzlarından , kıl folliküllerinden ya da kesik , sıyrık gibi travmatik yollarla deri içine girerek; deri ve mukoza infeksiyonlarını oluşturur. Böyle gelişen infeksiyonlar genellikle fronkül veya lokalize abse formundadırlar. Bu tip infeksiyonlarda mikroorganizma irin oluşturur. Plazma koagülazları sayesinde hem kendi hücrelerinin etrafında oluşan fibrin örtüsü ile fagositozdan korunurlar ve hem de buldukları boşluğun etrafını fibrin duvarı ile çevreleyerek , çevresel faktörlerden korunurlar. Abse, fronkül, sikoz, blefarit, panaris, hidroadenit , karbonkül ,hordeolum gibi infeksiyonlar bu mekanizma ile oluşur. Mukozalar yolu ile organizmaya giren

mikroorganizma da lokalize abse veya yaygın iltihaplanmalara yol açabilir. Mikroorganizmayı çevreleyen fibrin engelinin zedelenmesi , mikroorganizmanın periferik yayılma eğilimi ile sonuçlanır. Lokal invazyonlar sonucunda , deri ve deri altı dokusu arasına yayılarak flegmon , büllöz impetigo ve yeni doğanların pemphigus gibi infeksiyonları oluştururlar.Doğum kliniklerinde , yeni doğanlarda , deri lezyonları salgın halinde ortaya çıkabilir (6,7).

2. Yaygın deri döküntülü S.aureus infeksiyonları: Bu grupta S.aureus ' un lokalize infeksiyonları ile seyreden iki tablo yer alır (6-8).

a) S.aureus'a bağlı haşlanmış deri sendromu: Genellikle yenidoğan bebeklerde görülen bu sendrom; S.aureus un epidermolitik toksinine bağlı olarak gelişir. Perioral lokalizasyon ile başlayan eritem , birkaç gün içinde tüm vücuda yayılır. Mortalite oranı düşüktür.

b) Toksik şok sendromu: Lokal çoğalan S.aureus ' un in vivo oluşturduğu toksik şok sendromu toksini sebebi ile gelişir. Klinik tabloya yüksek ateş , hipotansiyon , diyare , deride jeneralize eritem , mental bulanıklık bulguları ile renal yetmezlik hakimdir. Hastalık sıklıkla vaginal hiperabsorbsiyonlu tampon kullanan menstruasyon dönemindeki kadınlarda görülür (6,7).

3.Sepsis ve endokarditler: S.aureus bakteriyemisi akut endokardit ile sonuçlanabilir. Bu valvüler disfonksiyonun da başlangıcıdır.

4. S.aureus sebebi ile gelişen sistem ve organ infeksiyonları:

a) S.aureus'a bağlı olarak gelişen pnömoni: Bakteriyemi ile veya solunum yolundan aspirasyon ile akciğerlere yerleşen S.aureus sebebi ile gelişir.Geniş abse formasyonları ile mikroorganizmanın periferik organlara yayılması sık komplikasyonlardır.

b)Diğer organ ve sistem lokalizasyonları ile: Perikardit, plevra empiyemi, osteomyelit , periostit , septik artrit , bursit , tromboflebit , menenjit , sinüzit , otitis media , üriner sistem infeksiyonları , prostatit , perinefrik abse gibi infeksiyonlar görülebilir.

5.Bzsin zehirlenmeleri ve enteritler: S.aureus ' un oluşturduğu enterotoksinler sebebi ile oluşan gastrointestinal sistem infeksiyonudur(6,7).

S.AUREUS ' DA DİRENÇ MEKANİZMALARI :

1.İlacın bakteride hedef aldığı molekülün değişmesi : Bu tür direnç gelişimi özellikle Beta laktam antibiyotiklere karşı görülür. Örneğin; PBP 2a ' da oluşan kromozomal değişiklik Metisilin'e direnç gelişimine neden olur. Makrolid, Linkozamid , ve Streptogramin B (MLS) direnci de en sık bu tür mekanizma ile oluşmaktadır. MLS antibiyotiklerine dirençli suşlarda 23s rRNA' yı metile eden bir enzim sentezlenmektedir. Bunun sonucunda ribozomda konformasyonel bir değişiklik oluşmakta ve ilacın ribozomal RNA'ya bağlanması azalmaktadır. "*Erythromycin resistance methylase*" (erm) genleri ile yapılan çalışmalar en az sekiz direnç determinant sınıfı olduğunu göstermiştir.S.aureus'da erm A , erm B ve erm C genleri vardır (9).

2.İlacın bakteri hücre sine girişinin engellenmesi : Tetrasiklin ve aminoglikozid'lere direnç kazanılmasında önemli bir mekanizmadır. Aminoglikozid'lere dirençte bu antibiyotikleri modifiye eden enzimler en önemli rolü oynarlar. Etkileri az miktardaki antibiyotiği modifiye ederek Aminoglikozid transport sistemini bloke etmek şeklinde belirlediğinden bu enzimlerle kazanılan direnç bu grupta incelenir. Aminoglikozid'leri modifiye eden enzimler asetiltransferaz (AAC) , fosfotransferaz (APH) ve nukleotidil transferaz (AAD) enzimleridir (9).

3.Bakterinin ilacı inaktive eden enzimler sentez etmesi : Beta laktam antibiyotiklere direnç gelişmesinde Staphylococcus suşlarının oluşturduğu Beta laktamaz enzimleri önemli rol oynar. Beta laktamaz enzimleri Penisilinaz , Sefalosporinaz veya her iki grup Beta laktam antibiyotiği inaktive eden geniş spektrumlu Beta laktamaz enzimleri olabilir. Kloramfenikol , bakteride ribozomların 50 s alt birimine bağlanarak protein sentezini inhibe etmektedir .Bakteride direnç Kloramfenikol'ün 3 ve 1 hidroksil gruplarını asetile eden Kloramfenikol asetiltransferaz (CAT) enziminin sentezlenmesi sonucu oluşmaktadır(9).

4. *Dirençli metabolik yolların geliştirilmesi* : Bu tip direnç mekanizması Sulfonamid ve Trimetoprim direncinde önemlidir . Bakterinin Sulfonamid'lerin düşük affinite gösterdiği değişik bir Dihidrofolat redüktaz enzimi (DHPS) sentezlemesi en sık gözlenen mekanizmadır .Trimetoprim'e karşı kazanılan dirençte en sık gözlenen mekanizma , plazmid veya transpozonlarda bulunan genler tarafından yeni, Trimetoprim'e dirençli bir Dihidrofolat redüktaz (DHFR) enzimi sentezlenmesidir(9).

Staphylococcus'larda antibiyotik direnci, birçok diğer bakteride olduğu gibi kromozom, plazmid veya transpozondaki genlerle sağlanmaktadır. Plazmid kontrolündeki direnç değişik genetik olaylarla bakteriden bakteriye geçebildiği , ayrıca çok defa yüksek konsantrasyonda ilaca direnç sağladığı için daha önemlidir. Transpozonlarda taşınan direnç genleri ise bu genetik elemanın özelliği nedeni ile bakteri kromozomu , faj genomu veya bir başka transpozona aktarılabilir .S.aureus suşlarında çeşitli antibakteriyel maddelere direncin genetik yönleri Tablo 2 de gösterilmiştir (9).

Tablo 2 : S.aureus'un antimikrobiyal direnç genleri .

GEN	DİRENC	DİRENC MEKANİZMASI	LOKALİZASYON
aacA-aphD	Gm Tm Km	AAC (6 ') APH (2 ")	P, P: :Tn, C: :Tn
aadA	Sm Sp	AAD (3 ") (9)	P
aadE	Sm	AAD (6 ')	P
aadD	Nm Km Pm Tm Ak	AAD (4 ') (4 ")	P
aphA	Nm Km	APH (3 ') III	P, C, (Tn?)
aphC	Sm	APH (3 ")	P
asa	Asa	Efflux	P, C: :P, (Tn?)
asi - ant	Asi Sb	-	P, C: :P, (Tn?)
bis	Bi	-	P
bla	Pc	Beta laktamaz	C, (Tn?)
blaZ (pen P)	Pc	Beta laktamaz	P, C: :P, P: :Tn, S: :Tn
cadA	Cd Zn	Efflux	P, C: :P
cadB	Cd Zn	İyon bağlanması	P
cadC	Cd	Efflux	C, (P?)
cat	Cm	CAT	P

dfrA	Tp	DHFR düşük affinite	P, (Tn?)
dfrB	Tp	DHFR fazla üretimi	C
ermA	MLS (Em)	rRNA metilasyon	C: :Tn
ermB	MLS (Em)	rRNA metilasyon	P: :Tn
ermC	MLS (Em)	rRNA metilasyon	P
fusA	Fa	G faktör azalmış aktivitesi (?)	C
fusB	Fa	Permeabilite azalması	P
lea	Pb	-	P, C: :P
mec	Mc	PBP'de affinite azalması	C: :Tn
mer A	Hg	Mercuric reductase	P, C: :P, (Tn?)
mer B	Om	Organomercurial lyase	P,C: :P, (Tn?)
nov	Nv	DNA gyrase azalmış affinitesi (?)	C
qacA	Ac Eb Qa Pi Dd	Efflux	P
qacB	Ac Eb Qa	Efflux (?)	P
qacC	Eb Qa	Efflux	P
rif	Rf	RNA polimeraz azalmış affinitesi	C
sga	SgA	Streptogramin o-acetyltransferase	P, C
sgb	SgB	Streptogramin hidrolase	P
spc	Sp	AAD (9)	C: :Tn
strA	Sm	Ribozomal Değişim	C
strB	Sm	-	C
sulA	Su	p-amino benzoik asit	C
sulB	Su	DHPS azalmış affinitesi	P
tet	Tc	Efflux (?)	P, C: :P
tmn	Tc Mn	Efflux (?)	C

Tablo 2 ile ilgili açıklamalar:

1. Antimikrobiyal ajanlar: Ac; Acriflavine, Ak; Amikacin, Asa; Arsenate, Asi; Arsenite, Bi; Bismuth, Cd; Cadmium, Cm; Chloramphenicol, Dd; Diamidinodiphenylamine dihydrochloride, Eb; Ethidium bromide, Em; Erythromycin, Fa; Fusidic acid, Gm; Gentamicin, Hg; Cıva, Km; Kanamycin, Mc; Methicillin, MLS; Macrolidler Linkosamidler Streptogramin B, Mn; Minocycline, Nm; Neomycin, Nv; Nnovobiocin, Om; Organik cıva bileşikleri, Pb; Kurşun, Pc; Penicillin, Pi; Propamidine isethionate, Pm; Paramomycin, Qa;

Quaterner amonyum bileşikleri, Rf, Rifampin, Sb; Antimon, Sg A; Streptogramin A, Sg B; Streptogramin B, Sm; Streptomycin, Sp; Spectinomycin, Su; Sulfonamidler, Tc; Tetracycline, Tm; Tobramycin, Tp; Trimetoprim, Zn; Çinko ' nun kısaltmalarıdır .

2.Gen lokalizasyonları: C; Kromozom, P; Plazmid, Tn;Transpozon, C::P; Kromozoma integre plazmid, C::Tn; Kromozoma integre transpozon, P::Tn; Plazmide integre transpozon 'u ifade etmektedir.

STAPHYLOCOCCUS AUREUS'DA METİSİLİN DİRENÇ MEKANİZMALARI:

1.İNTRİNSİK METİSİLİN DİRENCİ:

İntrinsik Metisilin direnci; S.aureus ' da Metisilin direncinin en çok araştırılmış , en iyi belirlenmiş olanıdır. Bu tip direnç gösteren suşlara MRSA suşları denmektedir.MRSA suşlarındaki direncin sebebi ; bu bakterilerin normal Penisilin bağlayan proteinlerden (PBP) farklı olarak Beta laktam antibiyotiklere daha düşük affinitesi olan PBP 2a veya PBP 2' denilen PBP ' leri oluşturmasıdır (5). PBP ' ler S.aureus ' un hücre membranında bulunan , bakteride penisilin etkisinin primer hedefleridirler.Bu proteinler aynı zamanda hücre duvar sentezi sırasında peptidoglikan polimerlerinin çapraz bağlanma reaksiyonunu katalizleyen enzimlerdir. Beta laktam antibiyotikler PBP ' lerin aktif kısımlarına kovalan bağlarla bağlanırlar ve böylece hücre duvarı sentezini inhıbe ederler. PBP 2a yüksek antibiyotik yoğunluğunda muhtemelen bakterideki diğer PBP ' lerin fonksiyonunu da üstlenmektedir; aksi takdirde normal PBP 'in fonksiyon eksikliği nedeni ile bakterinin ölümü söz konusu olacaktır. MRSA suşu , Beta laktam antibiyotik ile karşılaştığı zaman ; diğer tüm PBP 'ler antibiyotik tarafından bloke edilir , ancak PBP 2a düşük affinite sebebi ile Beta laktam antibiyotiği bağlamaz ve tüm fonksiyonları üzerine alarak , bakteri duvar sentezini devam ettirir.Ortamda Beta laktam antibiyotik olsun veya olmasın PBP 2a sentezlenir, ancak ortamda Beta laktam antibiyotik yok ise fonksiyon göstermez. PBP 2a miktarı ile bakterinin Metisilin'e direnç düzeyi arasında bir ilişki yoktur (10).

PBP 2a Metisilin'e dirençli tüm S aureus ' larda gösterilmiştir, ancak Metisilin'e duyarlı olanlarda mevcut değildir (11). MRSA suşlarında PBP 2a oluşturulması kromozomal genlerin kontrolü altındadır.Çoğu zaman Metisilin veya diğer Beta laktam antibiyotiklerin varlığında indüklenebilir ,bazen de yapısaldır.Yapısal oluşturulan PBP 2a içeren MRSA' ların direnç fenotipi homojendir, yani bakteri topluluğundaki tüm bireyler dirençlidirler.İndüklenebilir PBP 2a içeren MRSA ' larda ise direnç fenotipi heterojendir, aynı bakteri topluluğunda dirençli suş oranı $1/10^3$ - $1/10^8$ arasında değişir. Buna heterorezistans' da denir (12).

PBP 2a yapımına bağlı Metisilin direncinin S .aureus'da genetik temeli oldukça iyi anlaşılmıştır. Yapılan genetik çalışmalarda PBP 2a ' nin Mec A geni denilen bir kromozomal genin 2.1 kilobase 'lik bir kısmı ile kodlandığı gösterilmiştir. Mec A geni muhtemelen bir transpozon üzerindedir. Metisilin'e duyarlı S.aureus'larda Mec A'ya uyan alel gösterilememiştir. Yapılan çalışmaların verileri; PBP 2a geninin , S. aureus ' un Beta laktamaz geni ile diğer cins bakterilerin PBP genlerinin füzyonu ile oluştuğunu düşündürmektedir (9).

Bakteride Metisilin direncinin ortaya çıkabilmesi için, Mec A geninin eksprese olması gerekir. Ancak bu ekspresyon, her bakteride aynı şekilde olmamaktadır. Bu nedenle Mec A geni taşıdığı halde Metisiline, değişik düzeylerde dirençli, hatta duyarlı S.aureus suşları olabilmektedir. Yani Mec A geninin varlığı, bu tür Metisilin direnci için mutlak gereklidir , ancak yeterli değildir. Muhtemelen Mec A geninin ekspresyonunu kontrol eden başka bazı genler de direnç oluşumunda etkili olmaktadır. Bu genlerin Mec A geni ile birlikte çalışmaları sonucuna göre PBP 2a nedeniyle meydana gelen Metisilin direnci homojen direnç ve heterojen direnç olmak üzere iki şekilde olabilir:

a-Homojen direnç: Bakteri kolonisini oluşturan tüm bakteriler Mec A genini taşırlar ve hepsinde bu gen eksprese olmuştur, yani fonksiyoneldir. Yüksek düzeyde dirence dirence neden olur.Direncin tesbiti; ortamın PH 'sı, ısı, tuz konsantrasyonu, inkübasyon süresi gibi çevresel faktörlerden fazla etkilenmeyebilir. Ancak klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında

izole edilen *S.aureus*'ların az bir kısmında Metisilin direnci bu şekildedir (13).

b-Heterojen direnç: Klinik uygulamada daha sık görülen ve direnç ekspresyonunun çevresel faktörlerden etkilenmesi sebebi ile tesbiti güç olan direnç türüdür.Koloniye oluşturan tüm bakteriler Mec A genini taşımalarına rağmen direnç ancak 10^3 - 10^8 bakteriden birinde tesbit edilebilmektedir.Bunun Mec A geninin fonksiyonunu kontrol ettiği sanılan; "*Factor essential for methicillin resistance = Fem A*" veya "*Faktör X*" gibi kontrol genlerine bağlı olarak meydana geldiği sanılmaktadır (14,15). Ancak heterojen direncin neden olduğu kesin olarak bilinmemektedir. MRSA suşlarında Meca geninin ekspresyonunu etkileyen , fenotipi belirleyen en az üç regülasyon mekanizması vardır:Bunlardan birincisi ; bakteride hem Mec A geni , hem de Beta laktamaz plazmidini varsa , PBP 2a oluşumunun Beta laktam antibiyotikler tarafından indüklendiği gözlemine dayanmaktadır. Bu nedenle PBP 2a ve Beta laktamaz genlerinin kontrolünün benzer olduğu düşünülmektedir.İkinci regülasyon mekanizması Mec A geni içindeki bir kısmın PBP 2a yapımını regüle ettiği , bunun da fenotipi etkilediğidir. Üçüncü regülasyon mekanizması ise Mec A geni dışında bir yerde lokalize olan Fem A geni tarafından Metisilin direncinin ekspresyonunun belirlendiğidir (16).

S.aureus'da Mec A geninin fonksiyonunu düzenleyen Mec R ve Mec I genleride gösterilmiştir. Mec R geni Mec A genini indükleyen gendir .Mec I geni ise Mec A genini repress eden gendir. Mec R indüktör geninin Mec R₁ - gen 1 ve Mec R₁ -gen 2 olmak üzere iki bölgesi vardır. MRSA suşlarının hepsinde Mec R₁ - gen 1 ve Mec A geni saptanmaktadır . MRSA'ların %73'ünde ise Mec I ve Mec R₁ - gen 2 saptanır. Metisilin'e duyarlı *S.aureus*'ların hiçbirisinde Mec A , Mec R₁ ve Mec I genleri saptanmamıştır. Mec R₁-gen 1, Mec A genine yakındır. Mec R₁- gen 2, Mec I genine yakındır (17).

PZR yöntemi ile *S.aureus* üzerinde yapılan çalışmalarda Mec A geninin yanısıra Fem A , Fem B ve Fem C genleri de araştırılmıştır. Mec A geninin *S.aureus*'da kromozomda lokalize olan strüktürel bir gen olduğu ve bakteride Metisilin direncinin ortaya çıkmasından sorumlu olduğu bilinmektedir. Fem A , Fem B ve Fem C genleri ise Metisilin rezistansının

seviyesini artıran proteinleri kodlayan genlerdir (18). Bu genlerdeki baz sıralamasında ve onun kodlarındaki değişimler; MRSA'larda ve MSSA'larda düzensiz olarak saptanmakta olup genellikle bu mutasyonlar bu genlerin ürünlerinde biyokimyasal fonksiyon artışına sebep olmaktadır .Bu gen bölgelerindeki mutasyonlar Metisilin rezistansının regülasyonunda tek faktör değildir , ancak Mec A ile birlikte fonksiyon görmeleri sebebi ile PZR yöntemi ile yapılan çalışmalarda Fem A ve Fem B genlerinin de araştırılması MRSA tanısı için daha önemli bir göstergedir (19).

Epidemik ve nonepidemik MRSA suşlarının PZR yöntemi ile yapılan incelemeleri; Protein A geninin X bölgesinin , protein A'nın Fc bağlayan bölgesinin daha iyi ortaya çıkmasını sağladığı ve konak yüzeyinde epidemik suşların kolonize olmalarını kolaylaştırdığını göstermiştir (20) . Epidemik MRSA suşlarının insidansı artış eğilimindedir (21-23).

MRSA suşlarında PBP 2a üretimi Metisilin direncinin ortaya çıkması için esastır fakat suşun Beta laktamaz üretim seviyesi suşun Metisilin için MIC değeri ile doğru orantılıdır (24).

İntrinsik olarak Metisilin'e dirençli S.aureus suşları sadece Beta laktam antibiyotiklere değil , pekçok başka antibiyotiğe de dirençlidir. MRSA suşlarının çoğunun makrolid antibiyotikler , Klindamisin , Kloramfenikol , Tetrasiklinler ve Aminoglikozid antibiyotiklere dirençli olabilecekleri gösterilmiştir (25). Bu nedenle bu antibiyotikler için duyarlılık testleri de mutlaka yapılmalıdır. MRSA suşlarının değişik antibiyotik duyarlılıkları Tablo 3'de özetlenmiştir (26-28).

Tablo 3 : MRSA'ların diğer antibiyotiklere karşı direnç durumu:

Genellikle Duyarlı	Genellikle Dirençli	Dirençli Olabilir
Vankomisin	Penisilinler	Makrolidler
Rifampisin	Sefalosporinler	Kлиндamisın
TMP-SMX	Diğer β -Laktam antibiyotikler	Tetrasiklin
Kinolonlar		Kloromfenikol
Minosiklin		Aminoglikozidler

2-BORDERLINE METİSİLİN DİRENCİ :

Buna kazanılmış Metisilin direnci de denmektedir. Metisilin'e karşı bakteri direncinin azalmasının bir diğer mekanizması; 1984 yılında tanımlanan, S.aureus ' un aşırı Beta laktamaz üretimine bağlı dirençliliğidir. Bu suşlar Metisilin'e sınırda direnç gösterdiği için bunlara Borderline S.aureus suşları denmektedir (29,30). Penisilinaza dirençli Penisilinler aslında S.aureus ' un Penisilnaz enzimlerinin hidrolitik etkilerine dayanıklıdır. Bazı S.aureus suşları aşırı miktarda Penisilnaz oluşturarak Metisilin ve Oksasilin ' i yavaş fakat önemli ölçüde parçalarlar.Ortama Sulbaktam veya Klavulanat eklendiğinde bu suşlara karşı Penisilinaza dirençli Penisilinlerin minimum inhibütör konsantrasyonları birkaç misli düşmektedir. Borderline S.aureus suşları PBP 2a oluşturmamaları ve direnç kontrolünün plazmide bağımlı olması ile Metisilin'e dirençli S.aureus suşlarından farklıdır (31,32) .

3-İNTERMEDIATE METİSİLİN DİRENCİ :

S.aureus ' da modifiye PBP ' lere bağlı olarak , Metisilin'e duyarlılık azalması olmasıdır. Bu tip direncin mevcut olduğu suşlarda normal yapıda PBP 1 ve PBP 2 bulunur, ancak bu PBP lerin Beta laktam antibiyotiklere affiniteleri düşüktür. Ayrıca yine bu suşlarda

normalden fazla miktarda PBP 4 vardır (5). Bakteri disk diffüzyon ya da mikrodilüsyon testi ile Oksasilin dirençli , Amoksisilin + Klavulanik asite duyarlı ise , aşırı Beta laktamaz yapımı nedeniyle direnç söz konusudur. Bakteri hem Oksasilin hem de Amoksisilin + Klavulanik asite dirençli ise , direnç PBP 2a veya muhtemelen var olan PBP ' lerde Beta laktam antibiyotiklere afinitenin azalmış olması nedeniyle olabilir. Ancak rutin laboratuvarında basit testlerde bunu göstermek mümkün olmadığından bu suşlar Oksasilin ' e intrinsik dirençli olarak kabul edilmelidirler . Metisilin'e dirençli S.aureus (MRSA), Borderline S.aureus (BORSA) ve intermediate Metisilin direnci (MODSA) saptanan S.aureus suşlarının Metisilin ve Oksasilin ' e MIC değerleri Tablo 4'de yer almaktadır:

Tablo 4: S.aureus ' un MRSA , MODSA ve BORSA suşlarında Metisilin ve Oksasilin MIC değerlerinin dağılımı (5, 32) :

Kategori	Mekanizma	Beklenen MIC Değeri (mcg/ml)	
		Metisilin	Oksasilin
MRSA	PBP 2a üretimi	16	4
BORSA	Aşırı β -Laktamaz üretimi	2 - 4	1 - 2
MODSA	Normal yapıda düşük affiniteli; PBP 1, PBP 2 ve PBP4 oluşumu	4	1 - 2

MATERYAL VE METOD:

S.aureus suşları: Araştırma dört farklı kaynaktan izole edilerek idantifiye edilen 200 S.aureus suşu üzerinde yapıldı. Bu suşların 50 tanesi İnönü Üniversitesi Araştırma ve Uygulama hastanesinde yatarak tedavi gören hastalardan , 50 tanesi poliklinikte ayakta tedavi gören hastalardan , 50 tanesi bu hastanede görevli personelin burun sürüntülerinden ve kalan 50 tanesi de hastane dışı ortamdaki sağlıklı kişilerin burun sürüntülerinden izole edildi. Mikroorganizmaların identifikasyonunda katalaz ve koagülaz testleri ile koloni morfolojisi, hemoliz özelliği, pigmentasyon durumu ve gram boyama özellikleriyle preparattaki görünümünden yararlanıldı.

A. DİSK DİFFÜZYON TESTİ İLE METİSİLİN DİRENCİNİN

ARAŞTIRILMASI:

a) Materyal:

1.Mikroorganizmalar : Disk diffüzyon testine alınan mikroorganizmaların 18 - 24 saat süreyle üremiş olmalarına dikkat edildi. Örneklerin ilk inokülasyonunda koyun kanlı agar besiyeri kullanıldı.

2.Besiyeri: Disk diffüzyon yönteminde Mueller - Hinton agar kullanıldı. Bunun tercih edilmesinin sebepleri; bu besiyeri ile yapılan duyarlılık testlerinde tekrarlanabilir sonuçların alınması, S. aureus'un üremesi için yeterli olması, bu besiyeri ile yapılan duyarlılık testleri ile ilgili çok sayıda verinin mevcut olması ve antibiyotiklerle besiyerinin kimyasal yapısı arasında herhangi bir olumsuz etkileşimin olmamasıdır.

Mueller-Hinton agar'ın hazırlanması: Ticari olarak satılan preparattan (Oxoid) üreticinin önerilerine uyularak hazırlandı. Otoklavda steril edilen besiyeri su banyosunda 45 - 50 ° C ' ye kadar soğutuldu ve düzgün bir yüzeydeki steril cam petri kaplarına derinliği 4 mm olacak şekilde döküldü. Agar katılaşmaya kadar bekletildi ve aynı gün kullanılmayacak olan besiyerleri + 4 ° C 'de buzdolabında saklandı. Besiyerlerinin kullanılmasından önce seçilen bir tanesi 35 ° C 'de 24 saat süreyle bekletilerek sterilite

kontrolü yapıldı. Hazırlanan besiyerlerinin pH' sı , pH metre ile kontrol edildi. Kullanımdan hemen önce besiyerinin yüzeyinde nem gözlenmemesine dikkat edildi.

3. Antibiyotik diskleri: Üretici firmadan hazır ticari olarak (Oxoid) sağlanan diskler buzdolabında dondurucu bölümde saklandı. Hemen kullanılacak miktardaki disk bir hafta süreyle + 4 ° C ' de saklandı. Üretici tarafından belirtilen son kullanma tarihini geçen diskler kullanılmadı. MRSA suşlarının saptanması için seçilen disk 1 mcg ' lık Oksasilin diskidir. Oksasilin diskleri , Metisilin disklerine göre daha stabildirler. Nafsilin ve Kloksasilin diskleri de tercih edilmemektedir.

4. İnokulum için gerekli bakteri yoğunluğu : İnokulum yoğunluğunun standardize edilmesi için 0.5 Mc Farland standardı kullanıldı. Bu standard 1×10^8 cfu/ml bakteri yoğunluğuna eşittir.

Bu standard şu şekilde hazırlandı:0.5 ml 0.048 M $BaCl_2$ (%1.175 w/u $BaCl_2 \cdot 2H_2O$) 99.5 ml 0.18 M (0.36 N) H_2SO_4 'e (% 1 u/v) eklendi. Bu karışım 5 ml miktarda vidalı kapaklı tüpe konularak karanlıkta ve oda ısısında saklandı. Kullanılmadan hemen önce vortex'de iyice karıştırıldı.

b) Metod :

1. Bakteri yoğunluğunun hazırlanması ve inokülasyonu: Bir gece inkübe edilmiş kanlı agar besiyerindeki saf kültür halindeki bakteri kolonilerinden , 5 ml serum fizyolojik içerisinde homojenize edilerek hazırlanan ve 0.5 Mc Farland bulanıklığına ayarlanan mikroorganizmalar inokülasyonda kullanıldı. Steril eküvyon çubuk , bakteri süspansiyonuna daldırılıp sıvının fazlası tüp yüzeyine bastırılarak uzaklaştırıldı ve sonra eküvyon çubuk besiyerinin tüm yüzeyine sürüldü.

2.Disklerin yerleştirilmesi: Diskler steril bir pens ile besiyeri yüzeyine yerleştirildi ve üzerlerine hafifçe bastırılarak besiyerine tamamen temas etmeleri sağlandı.

3.İnkübasyon: Disklerin yerleştirilmesinden sonra plaklar ters çevrilerek 35 °C' de etüve kaldırıldı.

4.Sonuçların değerlendirilmesi:Yirmidört saatlik inkübasyondan sonra disklerin

etrafında oluşan inhibisyon zon çapları cetvel ile ölçüldü ve sonuçlar NCCLS ' nin önerilerine göre; duyarlı , orta derecede duyarlı ve dirençli olarak değerlendirildi. Bu sınırlar S.aureus' un değerlendirilmesinde 1 mcg içeriği olan Oksasilin diski için inhibisyon zon çapı 10 mm ' den az ise dirençli , 11-12 mm ise orta derecede duyarlı , 13 mm ' den büyük ise duyarlı ' dır.

5.Yöntemin denetlenmesi: S.aureus ATCC 25923 suşu kontrol suşu olarak kullanıldı.Bu suş adi jelozda + 4 ° C ' de saklandı ve haftada bir kez pasajlandı. Kontrol suşları ile ardarda yapılan 20 testten birinde belirtilen kontrol sınırlarının dışında sonuçların alınması kabul edilebilir.Buna karşın bir defadan fazla , bu sınırların dışında sonuç alınrsa test tekrar gözden geçirilmelidir. Ayrıca tek bir testte bir zon çapı , belirtilen sınırların ortalamasından (Maksimum - Minimum zon çapı) 4 standard sapmadan az yada çok olursa test yeniden gözden geçirilmelidir. Mueller - Hinton agar ' da yapılan disk diffüzyon testlerinde S.aureus ATCC 25923 kontrol suşu ile elde edilmesi gereken zon çaplarının milimetre sınırları Oksasilin 1 mikrogram içerikli disk için 18 - 24 milimetre 'dir. Kullanılan Mueller Hinton agar yada antibiyotik diskleri her değiştirilişlerinde , S.aureus 25923 suşu ile kontrol edildiler (34,35).

B. AGAR TARAMA TESTİ İLE METİSİLİN DİRENCİNİN

ARAŞTIRILMASI :

a) Materyal :

1.Mikroorganizmalar : Agar tarama testi; disk diffüzyon testinde kullanılan 200 S.aureus suşu üzerinde yapıldı .

2.Besiyeri: Mueller-Hinton agar kullanıldı .Besiyerinin hazırlanmasında ticari olarak satılan preparatta (Oxoid) üreticinin önerilerine uyuldu . Besiyerine %4 oranında NaCl eklendi (36). Otoklavda steril edilen besiyeri 45-50 ° C 'ye kadar soğutuldu .Altı gram toz Oksasilin , 100 ml. distile suda çözüldü ve 900 ml. besiyerine eklendi .Oksasilin' in 6 mcg/ml konsantrasyonu elde edildi .Besiyerleri düzgün bir yüzeydeki steril cam petri kaplarına

kalınlığı 4 mm. olacak şekilde döküldü(37).Besiyerlerinin saklanması , sterilite kontrolleri, pH ayarlamaları disk diffüzyon testinde anlatılan kurallar dahilinde yapıldı. Agar tarama yönteminde kullanılan besiyerlerinin stabilitesi beş gün olup , besiyerleri beş gün içinde tüketilebilecek sayıda hazırlanmalıdır .

3.Antibiyotik : Toz Oksasilin (Oxoid) direkt olarak üretici firmadan temin edildi . Farmakolojik preparatlar potenslerinin farklı olabilmeleri sebebi ile tercih edilmediler .

4.Bulanıklık standardı: İnokulum yoğunluğunun standardize edilmesi için 0.5 Mc Farland standardı kullanıldı . Bu standard 1×10^8 cfu/ml bakteri yoğunluğuna eşittir .Bu yoğunlukta hazırlanan bakteri süspansiyonu 1/100 oranında sulandırılarak 10^6 cfu/ml yoğunluk elde edildi.

b) Metod:

1.Bakterilerin inokülasyonu : Bir gece inkübe edilmiş kanlı agar besiyerindeki saf kültür halindeki bakteri kolonilerinden , 5 ml serum fizyolojik içinde homojenize edilerek hazırlanan ve 10^6 cfu/ml. yoğunluğuna ayarlanan mikroorganizmalar inokülasyonda kullanıldı . Çapı 4 mm. olan standard öze ile, bir öze dolusu (10 mikrolitre) alınarak besiyeri yüzeyinde 3 cm. çaplı bir alana inokülasyon yapıldı. Herbir besiyeri plağında 10 ayrı alan üzerinde , 10 ayrı suş çalışıldı .

2.İnkübasyon : Plaklar ters çevrilerek 24 saat süreyle $35 \text{ }^\circ\text{C}$ ' de bekletildi .

3.Sonuçların değerlendirilmesi : 24 saatlik inkübasyondan sonra ekim yapılan alanda gözlenebilen üremeler dirençli mikroorganizmaların göstergesi olarak değerlendirildi (35,38).

C.AGAR DİLÜSYON YÖNTEMİ İLE METİSİLİN DİRENCİNİN ARAŞTIRILMASI :

A)Materyal :

1.Mikroorganizmalar : Disk diffüzyon testinde ve agar tarama testinde kullanılan 200 S.aureus suşu üzerinde yapıldı.

2.Besiyeri :Mueller-Hinton agar kullanıldı.Otoklavda steril edilen besiyeri 45-50 °C' ye kadar soğutuldu .Besiyerinde 2 ve 4 mcg/ml Oksasilin konsantrasyonlarının elde edilmesi amacıyla ; Oksasilin'in 10 kat yoğunlukta çözeltileri hazırlandı .Bu konsantre antibiyotik çözeltileri ayrı ayrı , önceden hazırlanmış ve steril edildikten sonra 45-50 °C'ye soğutulmuş olan Mueller-Hinton besiyerine 1/10 oranında seyreltilecek şekilde eklendiler. Hazırlanan besiyerleri düzgün bir yüzeydeki steril cam petri kaplarına derinliği 4 mm. olacak şekilde döküldü. Besiyerlerinin saklanması , sterilite kontrolleri, pH ayarlamaları, disk diffüzyon testinde anlatılan kurallar dahilinde yapıldı .

3.Bulanıklık Standardı : İnokulum yoğunluğunun standardize edilmesi için 0.5 Mc Farland standardı kullanıldı. Bu standarda uygun bakteri süspansiyonu 1/100 oranında steril distile suda dilüe edildi. Böylece 1×10^6 cfu/ml yoğunluğunda bakteri süspansiyonu elde edildi .

b) Metod:

1.Bakteri inokülasyonu :Hazırlanan 1×10^6 cfu/ml yoğunluktaki bakteri süspansiyonundan çapı 4 mm. olan standard öze ile , bir öze dolusu alınarak (10 mikrolitre) besiyeri yüzeyinde 3 cm. çaplı bir alana inokülasyon yapıldı .Herbir besiyeri plağında 10 ayrı alan üzerinde 10 ayrı suş çalışıldı .

2.İnkübasyon: Plaklar ters çevrilerek 24 saat süreyle 35 °C' de bekletildi .

3.Sonuçların değerlendirilmesi : MIC değeri üremenin tamamen engellendiği en düşük Oksasilin konsantrasyonudur .Oksasilin ' in S.aureus için MIC değerleri 2 mcg/ml duyarlı ve 4 mcg / ml dirençlidir .

4.Sonuçların Denetlenmesi: S.aureus ATCC 29213 suşu sonuçların denetlenmesinde kullanıldı.Yirmi testten birinde MIC değerinin belirtilen sonuçların dışında olması kabul edilebilir olarak değerlendirildi. Bu sayıdan fazla olması halinde test koşulları yeniden gözden geçirildi. S.aureus ATCC 29213 suşu için Oksasilin ' in kabul edilebilir MIC sınırları 0.12 - 0.5 mcg/ml ' dir (35) .

D) METİSİLİNE DİRENÇLİ SUŞLARIN TEDAVİDE ALTERNATİF OLABİLECEK BAZI ANTİBİYOTİKLERE DİRENÇ DURUMUNUN BELİRLENMESİ :

Mueller Hinton agar besiyerinin pH 'sı 7.2 ye ayarlandı.Otoklavda steril edildikten sonra 4 mm. kalınlıkta steril petri kaplarına döküldü . Disk diffüzyon yöntemi ile Metisilin'e dirençli olduğu belirlenen S.aureus suşlarının 18 saatlik kültürlerinden steril serum fizyolojik içinde , Mc Farland ' ın 0.5 numaralı standardı bulanıklığına uygun süspansiyon hazırlandı. Disk diffüzyon yönteminde uyulan kurallar dahilinde steril eküvyon ile inokülasyon yapıldı. Deneyde kullanılan antibiyotik disklerinin içerdiği madde miktarı ve deney sonucunu değerlendirme kriterleri Tablo 5 ' de verilmiştir .

Tablo 5: Disk diffüzyon yöntemi ile MRSA olarak saptanan suşlara karşı denenmiş antibiyotiklerin disk konsantrasyonları ve inhibisyon zonlarının yorumu (35).

Antibiyotik	Disk İçeriği (mcg)	Zon Çapı		
		Dirençli	Orta duyarlı	Duyarlı
Vankomisin	30	≤ 9	-	≥ 12
Amoksisilin + Klavulanik asit	20 + 10	≤ 19	-	≥ 20
Azitromisin	15	≤ 13	14 - 17	≥ 18
Norfloksasin	10	≤ 12	-	≥ 17
Gentamisin	10	≤ 12	-	≥ 15
Penisilin G	10 ünite	≤ 28	-	≥ 29
Seftriakson	30	≤ 13	14 - 20	≥ 21

E) PZR YÖNTEMİ İLE METİSİLİN DİRENCİNİN ARAŞTIRILMASI :

a) Materyal :

Disk diffüzyon yöntemi ile dirençli olarak saptanan suşlardan 30'u , orta duyarlı

olarak saptanan 1 suş ve duyarlı olarak saptanan suşlardan 40'ında PZR yöntemi ile Mec A geni araştırıldı .

KULLANILAN TAMPON VE ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI :

1) TE Tamponu:

10 mM Tris HCl ve 1 mM EDTA hazırlanması : Total hacim 200 ml için , a) 10 mM Tris Cl için 315,12 mg Tris Cl 150 ml steril distile suda çözüldü. Toplam hacim 200 ml 'ye tamamlandı . b)Yukandaki çözelti içinde 1 mM EDTA hazırlamak için; 74,45 mg EDTA çözeltiye eklendi. İyice çözüldükten sonra pH 8.0 ayarlandı.

2) % 2' lik SDS hazırlanması :

2 g SDS 90 ml distile suda çözüldü , iyice çözünmesi için 68 ° C 'deki su banyosunda bekletildi. Sonra total hacim 100 ml ' ye tamamlandı.Bir normal HCl ilave edilerek pH 7.2' ye ayarlandı.

3) Sodyum hidroksit - Sodyum sitrat stok çözeltisi hazırlanması :

a) 1 N NaOH için 40 g NaOH 1000 ml distile suda çözüldükten sonra otoklavda steril edildi.

b) Tri Sodyum Sitrat stok solüsyonu

Tri sodyum Sitrat.5H₂O; 17.6 g alınarak 500 ml distile suda çözüldü.

a ve b'den eşit hacimde karıştırılarak otoklavda steril edildi. Buzdolabında saklandı.

c) Çalışma solüsyonu: Kullanmadan hemen önce hazırlandı. 100 ml NaOH- Na sitrat için 0.25 g N - acetyl - L - cysteine konuldu .

4) 1 N HCl hazırlanması :

8.5 ml konsantre HCl 91,5 ml distile suyun üzerine ilave edilerek hazırlandı .

5) 0,067 M Fosfat tamponu (pH 6,8) hazırlanması :

a) Stok alkali tampon ;

Na₂HPO₄ .2 H₂O = 5.935 g

Distile su = 500 ml

b) Stok asit tamponu :

K_2HPO_4 = 4,535 g

Distile su = 500 ml

a ve b ayrı ayrı iyice çözüldükten sonra eşit hacimde birbirine karıştırıldı. pH 'sı 6,8' e ayarlandıktan sonra kullanılmaya kadar buzdolabında bekletildi .

6) 1 M HCl - 1 M Tris HCl hazırlanması :

1 M HCl için 17 ml konsantre HCl + 183 ml distile su ile hazırlandı. 200 ml 1 M HCl' ye 31,5 g Tris HCl eklenerek iyice çözüldü. Buzdolabında saklandı.

7) TBE Buffer (Tris Base - Borik asit - EDTA) hazırlanması :

Stok solüsyon : (5 X konsantre) 54 g Tris base, 27.5 g borik asit, 20 ml 0.5 M EDTA (pH 8,0)

Hazırlanması : Tris base ve borik asit belirtilen miktarlarda tartıldı ve 980 ml distile suda çözüldü. Üzerine 0.5 M EDTA' dan 20 ml ilave edildi. İyice karıştırıldı. Oda sıcaklığında saklanan materyalde , kullanım esnasında presipitat oluşmamış olmasına dikkat edildi .

8) 0,5 M EDTA hazırlanması :

37.22 gram EDTA . $2H_2O$ alınarak 160 ml distile suda manyetik karıştırıcı yardımı ile çözüldü. pH' nın 8'e ayarlanması için NaOH peleti ilave edildi. pH 8' de EDTA tamamen çözüldü. Otoklavda steril edildikten sonra buzdolabında saklandı .

9) Ethidium bromide çözeltisi hazırlanması :

100 mg Ethidium bromide (Sigma Chemical Co) ve 100 ml Distile su manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak çözüldü. Renkli şişeye konuldu. Şişenin çevresi alüminyum foil ile kapatıldı. Ethidium bromide mutajenik bir madde olduğu için dikkatli çalışılması gereklidir :

a) Tartımlarda mutlaka eldiven giyilmelidir .

b) Mutlaka maske kullanılmalıdır .

c) Çalışılan ortamın kontamine edilmemesine çalışılmalıdır .

Hazırlanan bu çözeltiden her 100 ml agaroz' a 50 mikrolitre eklendi .

10) "Gel Loading Dye" solüsyonunun hazırlanması :

4 mg/ml Bromochlorophenol blue (Sigma Chemical Co) oranının hazırlanması için;
40 mg Bromochlorophenol blue, 5 ml Gliserol, 1.5 ml 0.5 M EDTA, 3.5 ml Distile su
eklenerek total hacim 10 ml'ye tamamlandı.

Hazırlandıktan sonra 500 mikrolitre olarak 1.5 ml'lik mikrotüplere dağıtılarak
buzdolabında saklandı .

11) % 1.5 ' luk Agarose hazırlanması : 1.5 gram agarose, 100 ml 1 x TBE içinde
manyetik karıştırıcı yardımı ile iyice çözüldükten sonra buna 100 mikrolitre Ethidium
bromide çözeltisi ilave edildi(39).

b) Metod :

1. BAKTERİYEL LİZİS VE DNA EKSTRAKSİYONU :

1) 1 ml TE tamponu içerisinde 24 saatlik bakteri kültüründen birkaç koloni alınarak
0.5 Mc Farland bulanıklığında (1×10^8 cfu/ml) bakteri süspansiyonu hazırlandı.

2) Bu süspansiyon mikrosantrifüj tüpüne aktarılarak 13000 g devirde 5 dakika
süreyle santrifüjlendi. Üzerindeki sıvı atılarak çökelti üzerine 100 mikrolitre lizis solüsyonu
eklendi.

Lizis solüsyonunun hazırlanması:

TE tamponu içerisinde ; 20 miligram / ml lysozym (Boehringer Mannheim GmbH -
W.-Germany 13000 E / mg) ve 100 mikrogram / ml lysostaphin (Sigma chemical co ; 900
U / mg solid) bulunmaktadır (40).

3) Üzerine 100 mikrolitre lizis solüsyonu eklenerek süspanse edilen materyal 35 °C '
de 6 saat inkübe edildi . Bundan sonra üzerine 100 mikrolitre %2 ' lik SDS eriyiği
eklenerek 95 °C'de 10 dakika bekletildi ve oda sıcaklığına kadar soğutuldu .Üzerine 50
mikrolitre 1 M HCl - 1 M Tris HCl ilave edildi .Bu esnada karıştırılınca kaybolan presipitat
oluştı . Süspansiyon oda ısısında 13000 g' de 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Süpernatant

yeni bir ependorf tüpüne alınarak üzerine 450 mikrolitre sature fenol eklendi .Vorteks ile karıştırıldıktan sonra 13000 g' de 5 dakika süreyle santrifüj edildi.Üst faz yeni bir ependorf tüpüne alınarak bir kez daha fenol işlemi tekrar edildi .Bu işlemin ardından yeni bir ependorf tüpüne alınan üst fazın üzerine 450 mikrolitre kloroform eklendi .Vorteks ile karıştırıldıktan sonra 13000 g'de 5 dakika süreyle santrifüj edildi .Üst faz yeni bir ependorf tüpüne aktarılarak üzerine % 100 ' lük etanol eklendi. Vorteks ile karıştırıldıktan sonra oda ısısında 5 dakika bekletildi ve 13000 g' de 5 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı atıldı.Yüzde yetmişlik etanol ile tüpün dibindeki DNA yıkandı. 13000 g' de 5 dakika süreyle santrifüj edildikten sonra üzerindeki sıvı kısım dökülerek pelet kurumaya bırakıldı. Kuruduktan sonra üzerine 20 mikrolitre steril bidistile su (Sigma water) konularak iyice karışması için pipetaj yapıldı(39).

2. AMPLİFİKASYON :

Örneklerden hazırlanan DNA çözeltisinden 5 mikrolitre alınarak 45 mikrolitre amplifikasyon çözeltisine karıştırıldı. Amplifikasyon çözeltisinde 1.5 mM MgCl₂, 2 U Taq DNA polymerase , 0.2 mM herbir dNTP (dATP , dCTP , dGTP , dTTP) , % 1 (wt / v) Triton X - 100 , 0.1 mikrogram / mikrolitre bovin serum albümin 10 mM Tris - HCl , 50 mM KCl ve 50 pikomol herbir primer bulunmaktadır .Primer dizimleri şöyledir :

Mec A₁ : 5 '-GAT GAA ATG ACT GAA CGT CCG ATA A-3 '

Mec A₂ : 5 '-CCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTA A-3 '

(39,41). Bu karışım thermal cyler (Ericomp , Delta cyler TM^{II} system) kullanılarak ; 94 °C'de 4 dakika tutuldu. Bundan sonra 30 siklus ; 94 °C'de 45 saniye , 50 °C'de 45 saniye , ve 72 °C'de 60 saniye uygulandı .Bundan sonra 72 °C'de 2 dakika tutuldu (42,43).

Uygun MgCl₂ konsantrasyonunu saptamak amacıyla amplifikasyon çözeltisindeki MgCl₂ konsantrasyonu 1 mM ve 1.5 mM olarak hazırlanarak pozitif kontrol suşu üzerinde

amplifikasyon denendi.

MRSA kontrolü olarak S.aureus SR 1587 suşundan elde edilen DNA ; MSSA kontrolü olarak S.aureus 25923 standart suşundan elde edilen DNA ve negatif kontrol olarak da bidistile su kullanıldı .

Amplifikasyon ürününün gözlenmesi için ; amplifikasyon ürününden 9 mikrolitre ve Bromochlorophenol blue indikatöründen 3 mikrolitre alınarak dilüsyon yapıldı .Bu karışımın 10 mikrolitresi Ethidium bromide içeren % 1.5 ' luk agarozda elektroforeze tabi tutuldu .150 V 'da 60 dakika yürütüldükten sonra UV ışıklı transilluminatör ile sonuçlar değerlendirildi. Marker olarak QX 174 DNA / Hae III kullanıldı. Üçyüz on bp ürününün gözlenmesi Mec A geni için pozitif olarak değerlendirildi (44,45).

BULGULAR:

a) Disk diffüzyon yöntemi ile alınan sonuçlar :

Hastane polikliniklerine başvuran hastaların klinik örneklerinden izole edilen 50 S.aureus suşundan 16'sı (%32) Oksasilin'e dirençli ve 34'ü (%68) duyarlı olarak değerlendirildi .Orta duyarlı suş saptanmadı . Hastanede yatarak tedavi gören hastalardan izole edilen 50 S.aureus suşundan 17'si (%34) Oksasilin'e dirençli ; biri (%2) orta duyarlı ve 32'si (%64) duyarlı olarak bulundu .

Hastanede yoğun bakım ve yataklı hasta bakımı servislerinde görevli doktor, hemşire ve personelin burun sürüntülerinden izole edilen S.aureus'ların 13'ü (%26) Oksasilin'e dirençli ve 37'si (%74) duyarlı olarak değerlendirildi .Orta duyarlı suş saptanmadı. Hastane dışı , normal popülasyondan izole edilen S.aureus'ların 12'si (%24) dirençli ve 38'i (%76) duyarlı olarak bulundu (Tablo 6) .

Tablo 6 : Farklı ortamlardan izole edilen suşların, disk diffüzyon yöntemi ile Oksasilin'e direnç durumları .

	Dirençli		Orta Duyarlı		Duyarlı	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Poliklinik hastalarından izole edilen suşlar	16	(%32)	0	(% 10)	34	(% 68)
Yatan hastalardan izole edilen suşlar	17	(%34)	1	(% 2)	32	(% 64)
Hastane personelinden izole edilen suşlar	13	(%26)	0	(% 0)	37	(% 74)
Normal popülasyondan izole edilen suşlar	12	(%24)	0	(% 0)	38	(% 76)
Toplam	58	(%29)	1	(%0.05)	141	(% 70.5)

b) Agar tarama yöntemiyle alınan sonuçlar :

Hastane polikliniklerine başvuran hastaların örneklerinden izole edilen suşların Oksasilin direnci agar tarama yöntemi ile çalışıldığında ; 17 suş (%34) dirençli ve 33 suş (%66) duyarlı olarak değerlendirildi . Hastanede yatarak tedavi gören hastalardan izole edilen suşlar için bu değerler sırasıyla 19 suş (%38) ve 31 suş (% 62) olarak bulundu . Hastanede görevli personelin burun sürüntülerinden izole edilen suşların 13 ' ü (%26) dirençli ve 37'si (%74) duyarlı olarak bulundu . Hastane dışı , normal populasyon şahıslarından izole edilen suşların 10'u (%20) dirençli ve 40'ı (%80) duyarlı olarak değerlendirildi (Tablo 7) .

Tablo 7 : Farklı ortamlardan izole edilen suşların agar tarama yöntemi ile Oksasilin'e direnç durumları

	Dirençli		Duyarlı	
	Sayı	%	Sayı	%
Poliklinik hastalarından izole edilen suşlar	17	(%34)	33	(% 66)
Yatan hastalardan izole edilen suşlar	19	(%38)	31	(%62)
Hastane personelinden izole edilen suşlar	13	(%26)	37	(%74)
Normal populasyondan izole edilen suşlar	10	(%20)	40	(%80)
Toplam	59	(%29.5)	141	(%70.5)

c)Agar dilüsyon yöntemiyle alınan sonuçlar :

Hastane polikliniklerine başvuran hastaların örneklerinden izole edilen suşların Oksasilin direnci agar dilüsyon yöntemi ile çalışıldığında 16 suş (% 32) dirençli ve 34 suş

(% 68) duyarlı olarak değerlendirildi . Hastanede yatarak tedavi gören hastalardan izole edilen 50 S.aureus suşundan 19'u (% 38) dirençli ve 31'i (% 62) duyarlı bulundu.Hastanede yoğun bakım ve yataklı hasta bakımı servislerinde görevli doktor, hemşire ve personelin burun sürüntülerinden izole edilen suşların 14'ü (% 28) dirençli ve 36'sı (% 72) duyarlı olarak değerlendirildi . Hastane dışı , normal populasyon şahıslarından izole edilen suşların 12 'si (%24) dirençli ve 38'i (%76) duyarlı olarak saptandı (Tablo 8) .

Tablo 8 : Farklı ortamlardan izole edilen suşların agar dilüsyon yöntemi ile Oksasilin'e direnç durumları

	Dirençli		Duyarlı	
	Sayı	%	Sayı	%
Poliklinik hastalarından izole edilen suşlar	16	(%32)	34	(%68)
Yatan hastalardan izole edilen suşlar	19	(%38)	31	(%62)
Hastane personelinden izole edilen suşlar	14	(%28)	36	(%72)
Normal populasyondan izole edilen suşlar	12	(%24)	38	(%76)
Toplam	61	(%30.5)	139	(%69.5)

2 mcg / ml Oksasilin konsantrasyonu için 2 suş dirençli bulunmuş olup , bu suşlar yatan hastalardan izole edilen suşlardır .

d) MRSA olarak saptanan S.aureus'ların alternatif antibiyotiklere direnç durumu:

MRSA olarak saptanan suşların Amoksisilin + Klavulanik asit, Vankomisin,

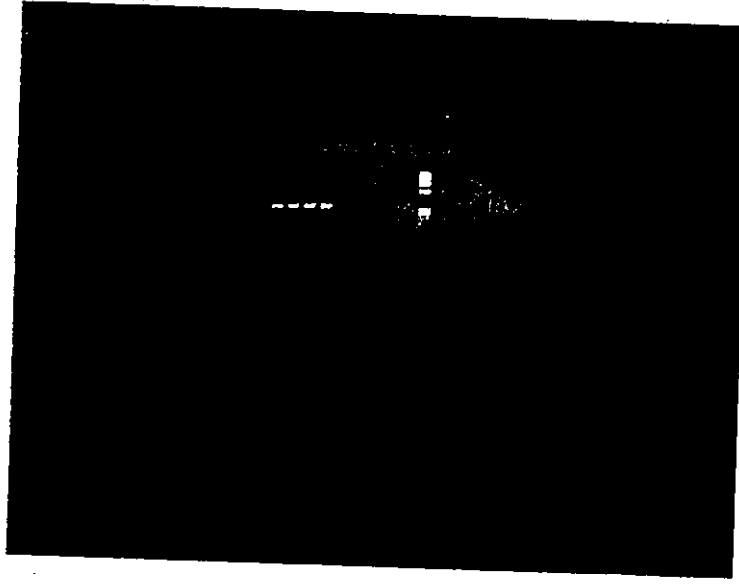
Gentamisin, Norfloksasin, Azitromisin, Penisilin G , Seftriakson antibiyotiklerine direnç durumu Tablo 9 'da özetlenmiştir .

Tablo 9 : Disk diffüzyon testi ile MRSA olarak saptanan suşlara karşı denenen antibiyotiklerin direnç durumu .

Antibiyotik	Duyarlı		Dirençli	
	Sayı	%	Sayı	%
Amoksisilin + Klavulanik asit	24	41	34	59
Vankomisin	58	100	0	0
Gentamisin	15	26	43	75
Norflaksasin	35	60	23	40
Azitromisin	18	31	40	65
Penisilin G	0	0	58	100
Seftriakson	32	56	26	44

e) PZR yöntemi ile alınan sonuçlar :

Disk diffüzyon yöntemi ile duyarlı olarak saptanan ve PZR yöntemi ile incelemeye alınan kırk suştan ikisinde , orta duyarlı olarak saptanan bir suşta ve dirençli olarak saptanan otuz suşun hepsinde Mec A geni pozitif bulundu. Şekil 1'de pozitif ve negatif sonuç alınan örneklerden birkaçı kontroller ile birlikte görülmektedir. Amplifikasyon için uygun MgCl₂ konsantrasyonunu saptamak amacı ile pozitif kontrol suşu üzerinde yapılan deneyler 1.5 mM 'ın 1 mM konsantrasyondan daha iyi sonuç verdiğini gösterdi (Şekil 2) .



Şekil 1 : PZR yöntemi ile Mec A geni araştırılan suşlardan bazıları .

Şekil 1 ile ilgili açıklama;

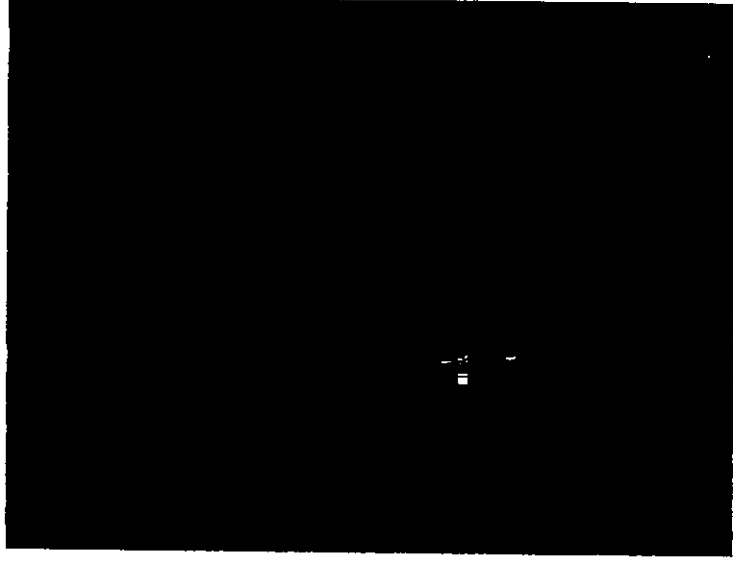
1. Pozitif kontrol S.aureus SR 1587 suşu; 2,3 ve 4. MRSA suşları ; 5. Negatif kontrol S.aureus ATCC 25923 suşu; 6, 7 ve 8. MSSA suşları; 9. Steril bidistile su; 10. Marker (OX 174 DNA/Hae III)

1. Pozitif kontrol S.aureus SR 1587 suşu; 2. Negatif kontrol S.aureus ATCC 25923 suşu; 3. Steril bidistile su; 1.5 mM MgCl₂ konsantrasyonu ile galisilmiştir. (OX 174 DNA/Hae III); 5. Pozitif kontrol S.aureus SR 1587 suşu; 6. Negatif kontrol S.aureus ATCC 25923 suşu; 7. Steril bidistile su; 1 mM MgCl₂ konsantrasyonu ile galisilmiştir.

Şekil 2 ile ilgili açıklama;

konsantrasyonu ile alınan sonuçlar

Şekil 2 : PZR yöntemi ile Mec A geni araştırılmasında 1.5 ve 1 mM MgCl₂



TARTIŞMA

Tüm dünyada tanı ve tedavi güçlüğü sebebi ile problem haline gelen MRSA 'un sebep olduğu infeksiyonların tedavisinde kullanılabilecek kısıtlı sayıda antibiyotik mevcuttur ve bu antibiyotiklerin önemli yan etkileri vardır (46).

Metisilin direncinin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerdeki değişikliklerin farklı sonuçlara sebep olması nedeni ile tüm deney koşullarında standardizasyon sağlanmalıdır (47).

Bu çalışmada NCCLS ' nin önerdiği koşullar sağlanarak disk difüzyon , agar tarama ve agar difüzyon yöntemleri uygulanmıştır .Bu deneylerden alınan sonuçlar kendi aralarında ve PZR yöntemi ile kıyaslanmıştır .

Disk difüzyon , agar tarama ve agar difüzyon yöntemlerinde uygulamada; besiyerinin pH 'ı , NaCl konsantrasyonu , inkübasyon süresi ve sıcaklık gibi farklı koşulların etkileri özellikle heterorezistan suşların tanımlanabilmesi amacıyla birçok çalışmada denenmiştir(48-50). Bu çalışmada uygulanan NCCLS' nin önerdiği koşullar Metisilin direncinin saptanması için optimal koşullar olarak belirlenmiştir.

Kirby-Bauer disk difüzyon testi ile MRSA araştırılması birçok klinik mikrobiyoloji laboratuvarında rutin olarak kullanılmakta olup , bu yöntemin ucuz olması , özel gereçler gerektirmemesi ve alternatif ilaçlar için de kullanılabilirliği avantajlarıdır.Bu yöntemin uygulanma koşullarından kaynaklanan hatalarının bilinerek , hatalı sonuçların alınmamasına çalışılmalıdır .Bu yöntem ile yapılan çalışmalarda; Mueller-Hinton agarın hatalı hazırlanması, besiyeri kalınlığının uygun olmaması , süresi geçen besiyeri plaklarının kullanılması, farklı firmalar tarafından üretilen Mueller - Hinton agarlar arasında olabilecek farklılıklar, disklerin hatalı yerleştirilmesi yada oda ısısına gelmeden kullanılmaları, inokulum yoğunluğunun standarda göre ayarlanmaması, plaklara inokülasyonun doğru şekilde yapılmaması, inokulum hazırlandıktan sonra plaklara inoküle edilmesi için gereken sürenin uzatılması, plaklara inokülasyon yapıldıktan sonra disklerin geç yerleştirilmesi, inkübasyonun yanlış

derecede veya yüksek CO₂ konsantrasyonunda yapılması, sonuçların erken okunması, inhibisyon zon çaplarının hatalı okunması, test edilen kültürlerin karışık olması ve kontrol suşlarının düzenli kullanılmaması sık rastlanan hata sebepleridir. Bu yöntemle yapılan çalışmalarda inhibisyon zonu içinde tek tük üremelerin olup olmadığı dikkatle aranmalıdır. Bu bölgedeki üreme de direncin göstergesidir (51). Yöntemde bir hata varsa ,bu sıklıkla duyarlı olan suşların yanlış olarak dirençli şeklinde değerlendirilmesidir. Tessten alınan sonuçların agar tarama testi ile doğrulanması yararlıdır. Disk difüzyon testi ile yaptığımız çalışmada dirençli suş oranı % 29 , orta duyarlı suş oranı % 0.5 bulunmuştur .Agar tarama yöntemi ile yaptığımız çalışmada dirençli suş oranı % 29.5 bulunmuştur. Agar dilüsyon testi ile MRSA araştırılması için 2 ve 4 mikrogram / mililitre Oksasilin konsantrasyonlarını içeren Mueller-Hinton agar ile , en az iki seri çalışma yapılması önerilmektedir. Yaptığımız çalışmada dirençli suş oranı % 30.5 bulunmuştur. Metisilin'e direncin araştırılmasında; disk difüzyon , agar tarama ve agar dilüsyon yöntemleri ile yapılan çalışmalarda farklı ortamlardan izole edilen suşlar arasında Metisilin direnci yönünden istatistiki fark olmadığı saptanmıştır ($p > 0.05$).

İnönü üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesinde yatarak veya poliklinikten tedavi gören hastalardan izole edilen S.aureus suşlarının Metisilin'e direnç durumları ile hastane personelinden ve normal populasyondan izole edilen S.aureus suşlarının Metisilin'e direnç durumları arasında fark olmaması , hastane infeksiyon kontrol komitesinin başarılı çalışmalarının sonucu olarak yorumlanabilir .

Metisilin'e direncin araştırılmasında , üç konvansiyonel yöntem arasında fark olup olmadığı incelendiğinde ; farklı ortamlardan izole edilen S.aureus suşlarında Metisilin direncini tesbit eden yöntemler arasında istatistiki fark saptanmamıştır ($p > 0.05$) .

PZR yöntemi referans yöntem olarak alındığında ; disk difüzyon yönteminin PZR yöntemine göre duyarlılığı (Sensitivite) % 90.9 ve seçiciliği (Spesifite) %100 bulunmuştur. Disk difüzyon yöntemi Mec A geni pozitif olan suşların % 9.1'inde direnci tesbit edememiş, ancak Mec A geni negatif olan suşların tamamını duyarlı olarak tesbit etmiştir. Üç

direnci oldukları göstermiştir .Bu bulgular , agar dilüsyon yöntemi ile bu suşlarda saptadığı 2 - 4 mikrogram / mililitre MIC değerlerinin sebebiyle Beta taktamaz üretilmiş olduğunu düşündürmektedir (29).

Rutin klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında , uygulanan yöntemin duyarlılık ve seçiciliği yanısıra ucuz ve pratik olması ve aynı zamanda alternatif ilaçlar için de kullanılabilir olmasının tercih edilmesi sebebi ile uygun ortam koşullarının sağlanması koşulu ile , disk difüzyon testinin S.aureus suşlarında Metisilin direncinin tesbit edilmesi amacı ile kullanımı önerilebilir. Agar tarama testi ; çok sayıda bakteriye karşı az sayıda antibiyotik değerlendirebildiği deneyler için önerilebilir. Agar dilüsyon yöntemi ; çok sayıda suşu çalışmaya imkan vermesi ve BORSA - MODSA suşları hakkında daha iyi fikir vermesi bakımından yararlı olmaktadır. PZR yöntemi yüksek duyarlılık gerektiren çalışmalarda tercih edilmelidir (59).

S.aureus suşlarında Metisilin'e direncin giderek arttığı, Türkiye 'de yapılan çalışmalarda direnç oranının % 31.7-59 arasında değiştiği (4) , İspanya 'da % 13.9 , İngiltere 'de % 24.1 olduğu bildirilmiştir (4,25).Bu çalışmadan elde edilen oran Türkiye 'de bildirilen değerler arasındadır. Direnç oranı ülkeler arasında olduğu gibi , aynı ülkedeki hastaneler arasında da farklılıklar göstermektedir. Değişik sonuçların alınmasında hasta popülasyonlarının farklı olması , hastanelerdeki antibiyotik kullanım politikalarındaki farklılıklar , enfeksiyon kontrol aktiviteleri gibi faktörler yanında S.aureus suşlarının biyolojik karakterleri , araştırma yöntemleri arasındaki farklılıkların ve araştırma yapılan yılın da rolü vardır (60-62).

Disk difüzyon yöntemi ile MRSA olarak saptanan suşların % 59'unda Amoksisilin + Klavulanik asit'e, %75' inde Gentamisin'e, % 40'ında Norfloksasin'e, % 65 ' inde Azitromisin'e , % 100 'ünde Penisilin G ' ye ve % 44 ' ünde Seftriakson ' a direnç saptanmış , bu suşların hiçbirisinde Vankomisin ' e direnç saptanmamıştır. Bu bulgular birçok araştırmacının bulguları ile de uyum göstermektedir (25,63).

MRSA suşlarına bağlı enfeksiyonların sık görülmesi ve bu bakterilerin birçok

antibiyotik direnç göstergeleri nedeni ile Metisilin direncinin yansira diğer antibiyotiklere karşı direnç de sapması , tedavi ve infeksiyon kontrol programları için yararlıdır. Hastane infeksiyon kontrol birimlerinin aktif faaliyetleri , özellikle bu noktada önem taşımaktadır(64-66).

SONUÇLAR

1. İnönü Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nde yatan 50 hastadan , polikliniklerde takip edilen 50 hastadan , hastanede görevli 50 personelden ve normal popülasyondan 50 kişiden izole edilen toplam 200 S.aureus suşunun NCCLS kuralları dahilinde disk difüzyon , agar tarama ve agar dilüsyon yöntemleri ile incelenmeleri sonucunda ; MRSA suşlarının sıklığı sırası ile % 29, % 29.5 , % 30.5 olarak bulundu.

2.Farklı kaynaklardan izole edilen S.aureus'larda saptanan Metisilin'e direnç oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p > 0.05$).

3.MRSA suşlarının incelenmesinde kullanılan üç konvansiyonel yöntem arasında anlamlı fark saptanmadı ($p > 0.05$).

4.PZR yöntemi referans yöntem olarak alındığında; üç konvansiyonel yöntemin spesifitesi %100 , sensitivitesi % 90.9 bulundu.

5.Disk difüzyon yöntemi ile MRSA olarak değerlendirilen 30 suşun hepsinde , orta duyarlı olarak değerlendirilen 1 suşta ve MSSA olarak değerlendirilen 40 suşun 2'sinde PZR yöntemi ile Mec A geni bulundu.

6.PZR yöntemi ile Mec A geni araştırılmasında ; amplifikasyon tüpündeki 1.5 mM $MgCl_2$ 'ün , 1 mM konsantrasyondan daha iyi sonuç verdiği saptandı.

7.MRSA suşlarının alternatif antibiyotiklere direnç durumları disk difüzyon yöntemi ile değerlendirildiğinde, Amoksisilin + Klavulanik asit'e % 59 , Gentamisin 'e % 75, Norfloksasin'e % 40 , Azitromisin 'e % 65 , Penisilin G 'ye % 100 , Seftriakson 'a % 44 oranında direnç bulunurken , Vankomisin 'e direnç saptanmadı.

ÖZET

Bu çalışmada İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama hastanesinde yatan 50 hastadan , polikliniklerde takip edilen 50 hastadan , hastanede görevli 50 personelden ve normal populasyondan 50 kişiden izole edilen toplam 200 S.aureus suşunda Metisilin direncinin araştırulmasında; disk difüzyon, agar tarama ve agar dilüsyon yöntemlerinin spesifite ve sensitiviteyi kendi aralarında ve PZK yöntemi ile karşılaştırıldı. Malatya bölgesinde MRSA oranı % 29-30.5 arasında bulundu. İzole edilen suşların kaynakları arasında fark saptanmadı ($p > 0.05$). Üç konvansiyonel yöntem arasında spesifite ve sensitivite farkı saptanmadı. Ancak bu yöntemler PZK yöntemi ile kıyaslandıklarında % 90.9 oranında sensitif ve % 100 oranında spesifik bulundular.

Disk difüzyon yöntemi ile MRSA suşlarının Amoksisilin + Klavulanik asit, Vankomisin, Gentamisin, Norfloksasin, Azitromisin, Penisilin G ve Seftriakson' a direnç durumları araştırıldı. MRSA suşlarının Amoksisilin + Klavulanik asit 'e % 59, Gentamisin 'e % 75 , Norfloksasin'e % 40 , Azitromisin'e % 65 , Penisilin G 'ye % 100 Seftriakson'a % 44 oranında dirençli oldukları , hiçbirinin Vankomisin'e direnç göstermediği saptandı .

SUMMARY

This study was done at İnönü University Medical Faculty, Research and Application Hospital. For the study, 50 inpatients, 50 outpatients, 50 hospital staff and 50 people not related to the hospital were chosen. Methicillin resistance was detected from the total of 200 *S. aureus* strains isolated from the people mentioned above.

In this study, the specificities and sensitivities of disc diffusion, agar dilution and agar screen methods were compared with themselves and with the PCR method.

There was no significant specificity and sensitivity difference between those three conventional methods. However; if those three methods were compared with the PCR method, it was found that, they were 90.9 % sensitive and 100 % specific.

By using this method, the frequency of MRSA strains; isolated from different sources and their resistance to Amoxycillin + Clavulanic acid, Vancomycin, Gentamycin, Norfloxacin, Azithromycin, Penicillin G and Ceftriaxone were detected.

It was also found that, MRSA ratio in Malatya is 29-30.5 %. There was no significant difference between the origins of isolated strains ($p > 0.05$).

MRSA strains had resistance, 59 % to Amoxycillin + Clavulanic acid, 75 % to Gentamycin, 40 % to Norfloxacin, 65 % to Azithromycin, 100 % to Penicillin G and 44 % to Ceftriaxone. None of the MRSA strains had resistance to Vancomycin.

KAYNAKLAR

1. Francioli M , Bille J , Glauser MP , Moreillon P . Beta lactam resistance mechanisms of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* . *J Infect Dis.* 1991 ;163:514 - 23
2. Boyce JM. Should we vigorously try to contain and control Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*? *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1991 ; 12 : 46 - 54
3. Struelens MJ , Mertens R. National survey of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in Belgian hospitals : Detection methods , prevalence trends and infection control measures . *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1994 ; 13 (1) : 56 - 63
4. Gürler N , Töreci K. Stafliokoklarda antibiyotiklere direnç gelişimi ve yarattığı sorunlar. *Infek Derg.* 1990 ; 4(4) : 699 - 716
5. Tomasz A , Drugeon HB , De Lencastre HM , Jabes D et al. New mechanism for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: Clinical isolates that lack the PBP 2a gene and contain normal penicillin binding proteins with modified penicillin binding capacity. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989 ; 33 (11) : 1869 - 74
6. Kılıçturgay K. Klinik Mikrobiyoloji , 2. Baskı . Güneş - Nobel Kitabevi - 1994 .
7. Jawetz E , Melnick JL , Adelberg EA , Brooks GF et al. *Medical Microbiology* , 19 th edition . Prentice - Hall International , London (1991)
8. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyoloji. Doğruluk matbaası. İzmir ,1992 .
9. Lyon BR , Skurray R. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* :Genetic basis. *Microbiol Rev.* 1987 ; 51(1) : 88 - 134
10. Kagawa S , Yamashida K , Matsuoka A . MRSA - Detection of Mec A and its regulatory genes . *Rinsho Byori.* 1993 ; 41(11) : 1223 - 31
11. De Lencastre HM , De Jange BL , Matthews PR , Tomasz A . Molecular aspects of Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* . *J Antimicrob Chemother.* 1994 ; 33(1) : 7-24
12. Hansen SL , Freedy PK. Variation in the abilities of automated, commercial , and

49.Trzcinski K , Boruc J , Kowalik Z , Tyski S et al. Evaluation of different methods for detecting resistance of *Staphylococcus aureus* strains to Methicillin. *Med Dosw Mikrobiol.* 1994 ; 46(3) : 113 - 31

50.Ünal S , Werner K , DeGironi P , Barsanti F et al. Comparison of tests for detection of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in a clinical microbiology laboratory. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994 ; 38(2) : 345 - 7

51.Baker CN , Huang MB , Tenover FC. Optimizing testing of Methicillin resistant *Staphylococcus* species. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1994 ; 19(3) : 167 - 70

52.Archer GL , Pennell E. Detection of Methicillin resistance in *Staphylococci* by using a DNA probe. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990 ; 34(9) : 1720 - 4

53.Coia JE , Thomson CF , Baird D , Platt DJ et al. Characterisation of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* by biotyping , immunoblotting and restriction enzyme fragmentation patterns. *J Med Microbiol.* 1990 ; 31(2) : 125 - 32

54.Jones RN , Barry AL. Detection of *Staphylococcal* resistance to penicillinase resistant penicillins.A comparison of two widely used disk diffusion methods. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1989 ; 12(5) : 381 - 4

55.Milne CM , Crow MR , Emptage AG , Seikou JB. Effects of culture media on detection of Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase negative *Staphylococci* by disc diffusion methods. *J Clin Pathol.* 1993 ; 46(5) : 394 - 7

56.Mulligan ME , Citron DM , Kwok RY , Wheelock JP et al. Impact of prolonged incubation on disk diffusion susceptibility test results for *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 1987 ; 25(5) : 840- 4

57.Geha DJ , Uhl JR , Gustafarro LA , Persing DH. Multiplex PCR for identification of Methicillin resistant *Staphylococci* in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol.* 1994; 32(7) : 1768 - 72

58.Archer GL , Niemeyer DM , Thanassi JA , Pucci MJ. Dissemination among

Staphylococci of DNA sequences associated with Methicillin resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994 ; 38(3) : 447 - 54

59.Durmaz K. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) teknolojisi ve mikrobiyolojide kullanımı. *Mikrobiol Bül.* 1995 ; 29 : 304 - 20

60.Duekworth GJ , Lothian JL , Williams JD. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* : Report of an outbreak in a London teaching hospital. *J Hospital Infect.* 1988 ; 11:1-15

61.Wakefield DS , Pfaller M , Massanari M , Hammons GT. Variation in Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* occurrence by geographic location and hospital characteristics. *Infection Control.* 1987 ; 8(4) : 151 - 7

62.Blanc DS , Lugeon C , Wenger A , Siegrist HH. Quantitative antibiogram typing using inhibition zone diameters compared with ribotyping for epidemiological typing of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 1994 ; 32(10) : 2505 - 9

63.Wakefield DS , Helms CM , Massanari RM , Mori M et al. Cost of nosocomial infection ; relative contributions of laboratory , antibiotic and per diem costs in serious *Staphylococcus aureus* infections. *Am J Inf Control.* 1988 ; 6(5) : 185 - 92

64.Martin MA. Methicillin resistant *Staphylococcus* : The persistent resistant nosocomial pathogen. *Curr Clin Top Infect Dis.* 1994 ; (14) : 170 - 91

65.Tuffnell DJ , Cronon RS , Hemingway DM , Hartley MN et al. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ; The role of antisepsis in the control of an outbreak. *J Hospital Infect.* 1987 ; (10) : 255 - 9

66.Cooke EM , Casewell MW , Emmerson AM , Gaston M et al. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in the UK and Ireland A questionnaire survey. *J Hospital Infect.* 1986 ; (8) : 143 - 8

(EK: B2)

Jüri Başkanı

UYGUNDUR

Adı Soyadı (İmza)

Jüri Üyesi

UYGUNDUR

Adı Soyadı (İmza)

Jüri Üyesi

UYGUNDUR

Adı Soyadı (İmza)

Jüri Üyesi

UYGUNDUR

Adı Soyadı (İmza)

Jüri Üyesi

UYGUNDUR

Adı Soyadı (İmza)

