

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**HASTANE İNFEKSİYONU ETKENİ OLARAK İZOLE
EDİLEN METİSİLİNE DİRENÇLİ *STAPHYLOCOCCUS
AUREUS* SUŞLARINDA *qacA/B* DEZENFEKTAN DİRENÇ
GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Tıbbi Biyolog BERNA AYKAN

TEZ YÖNETİCİSİ

Doç. Dr. KAYHAN ÇAĞLAR

2006
ANKARA

ÖNSÖZ

Hastane infeksiyonlarının önlenmesinde ve kontrolünde dezenfektan maddelerden yararlanılmaktadır, ancak etken mikroorganizmalarda görülen dezenfektan direnci dezenfeksiyon uygulamalarında karşılaşılan sorunlardandır. Önemli bir hastane infeksiyonu etkeni olan metisiline dirençli Staphylococcus aureus'ların (MRSA) dezenfektan maddelere direnç gösterebilme özelliğinde oldukları bilinmektedir. Bu sebeple hastane infeksiyonu etkeni olarak izole ettiğimiz MRSA'larda dezenfektan direnç genlerinin varlığını ve dağılımını araştırmayı tez çalışması olarak gerçekleştirdik. Bu çalışmada emeği bulunan herkese teşekkür ederim.

Mikrobiyoloji Anabilim Dalımızın değerli ve seçkin öğretim elemanlarına ve çalışanlarına başta danışmanım ve tez yöneticim olan Doç.Dr. Kayhan Çağlar Bey olmak üzere teşekkür ederim.

Hayatımın her alanında olduğu gibi önemli bir bölümünü oluşturan eğitim hayatımda da maddi ve manevi desteklerini esirgemedikleri için aileme teşekkür ederim.

BERNA AYKAN

İÇİNDEKİLER

Önsöz	ii
Tablo listesi	iv
Şekil ve resim listesi	v
1.1. Giriş	1
1.2. Genel Bilgiler	3
2. Materyal ve Yöntem	34
3. Bulgular	49
4. Tartışma	58
5. Sonuç	74
Özet	76
Summary	79
Kaynaklar	81
Özgeçmiş	93

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 1 Klinik <i>S. aureus</i> türlerinden izole edilen plazmidler ve direnç özellikleri	29
Tablo 2 Çalışmamızda kullandığımız MRSA suşlarının izole edildikleri materyallere göre dağılımı	35
Tablo 3 <i>qacA/B</i> geni pozitif bulunan MRSA'ların izole edildikleri materyallere göre dağılımı	49
Tablo 4 Benzalkonyum klorür ve klorhekzidinin MİK ₅₀ ve MİK ₉₀ değerleri	52
Tablo 5 Hastaneden izole edilen MRSA suşlarında benzalkonyum klorür ve klorhekzidin için MİK değerlerinin dağılımı	52
Tablo 6 <i>qacA/B</i> dezenfektan direnç geni bulunan hastane suşlarında benzalkonyum klorür ve klorhekzidin için MİK değerlerinin dağılımı	52

RESİM VE ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Resim 1. <i>qacA/B</i> geni bulunan çalışmaya alınan MRSA suşlarının ve kontrol suşlarının PZR sonrası jel görüntüsü	50
Şekil 1 Çoklu ilaç dışarı atılım sistemlerinin örnekleri	17
Şekil 2 <i>Staphylococcus aureus</i> sitoplazma membranında 14 transmembran segmenti içeren QacA proteini	27
Şekil 3 Bakteri hücresi sitoplazma membranında 4 transmembran segmenti içeren SMR proteini	31
Şekil 4 NCBI Entrez Nucleotide veritabanı X56628 kodlu kayıt.	38
Şekil 5 Klorhekzidin ve benzalkonyum klorür solüsyonlarının %0.1 ve %1'lik konsantrasyonlarının 30 saniyedeki bakterisidal etkinlikleri	56

1.1. GİRİŞ

Hastane infeksiyonlarının önlenmesinde ve kontrolünde, ortamın ve kullanılan malzemelerin dezenfeksiyonunda uygun dezenfektanlardan yararlanılmaktadır. Ancak hastane infeksiyonu etkeni olan mikroorganizmalarda görülen dezenfektan direnci, dezenfeksiyon uygulamalarında karşılaşılan sorunlardan biridir. Bu sorunun ortadan kaldırılması amacıyla dezenfektan maddelere olan direncin ve bu direncin kaynağının belirlenmesi önem taşımaktadır.

Klinik örneklerden sıklıkla izole edilen ve antibiyotiklere gösterdiği dirençle ciddi infeksiyonlara ve hastane infeksiyonlarına yol açabilen bir bakteri olan *Staphylococcus aureus* suşlarında dezenfektan maddelere karşı direnç ülkemizde ve dünyanın birçok ülkesinde bildirilmektedir. *qacA/B* geni yüksek düzeyde dezenfektan ve antiseptik ajanlara direnç ile ilgilidir, Avrupa ve Asya’da metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşlarında yaygın olarak bulunmaktadır. *qacA/B* geni MRSA’larda en önemli antiseptik ve dezenfektan direnç geni olarak da bilinmektedir. Çeşitli ülkelerde yapılan çalışmalarda MRSA suşları arasında *qacA/B* direnç genlerine %5-72 arasında değişen oranlarda rastlanıldığı bildirilmektedir^(35,41,42). Ülkemizde ise henüz böyle bir çalışma sonucu uluslararası literatüre bildirilmemiştir.

Biz de hastanemizden hastane infeksiyonu etkeni olarak izole ettiğimiz MRSA suşlarında dezenfektan direnç genlerinin varlığını ve dağılımını araştırmayı amaçladık. Çalışmamızda MRSA suşlarının klorheksidin ve benzalkonyum klorür gibi dezenfektanlara duyarlılığı, *qacA/B* direnç genlerinin varlığı ve bu genlerin fenotipik olarak dezenfektan direncine yol açıp açmadığı veya ne ölçüde yol açtığıda araştırılmıştır.

1.2. GENEL BİLGİLER

1.2.1. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'un klinik önemi:

Staphylococcus aureus ülkemiz de ve tüm dünyada en yaygın hastane infeksiyonu etkenlerindendir^(6,8). 1960'lı yıllarda penisiline dirençli türler için yarı sentetik penisilinlerden metisilin kullanıma girmesiyle Avrupa'da metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) suşları saptanmış, 1980 sonrasında da MRSA tüm dünyada hastane infeksiyonu etkenleri arasında önemli bir yer almıştır⁽¹⁵⁾.

MRSA suşları, β laktam ve β laktam dışındaki çok sayıda antibiyotiğe dirençli olmaları, tedavide problem yaratan hastane infeksiyonlarına yol açmalarından dolayı oldukça önemlidirler. MRSA suşlarının esas kaynağı infekte veya kolonize hastalar ve hastane personelidir. Hastane içerisinde MRSA taşıma yolu hasta ya da kolonize hastalardan sağlık personeline, sağlık personelinin kontamine elleri ve giysileri aracılığıyla yeni hastalara bulaşma yoluyla olmaktadır, burada sağlık personeli geçici taşıyıcıdır^(15,20). MRSA taşıyıcılığında önemli olan burun taşıyıcılığıdır, burun taşıyıcılığı invaziv stafilokok infeksiyonu gelişimi için risk faktörü olarak bilinmektedir^(6,28,44). Aseptomatik *Staphylococcus aureus* burun taşıyıcılığı normal toplumda %40'lara, sağlık personelinde ise %70'e ulaşmıştır, bu oran *S. aureus* burun taşıyıcılığının hastane ortamıyla sınırlı kalmadığını toplumun genelini etkilediğini göstermesi açısından önemlidir^(20,28,44).

Hastanelerde MRSA infeksiyonlarının önlenmesi kadar kolonizasyonlarının önlenmesi önemlidir. Kolonizasyon riski hastanede uzamış yatış süresi, antibiyotik tedavisi, predispozan sebepler, yüksek riskli bir serviste bulunma, infekte ya da kolonize hasta ya da personelle temas durumlarında artmaktadır⁽¹⁵⁾.

Klinik uygulamalarda alınacak hijyenik önlemler bakterilerin yayılmasını önlemede önemlidir. Bu önlemlerden bakteri ile kontamine olan odaların, aletlerin ve eşyaların dekontaminasyonu ise oldukça önemlidir. Hastanelerde ve diğer sağlık kuruluşlarında MRSA'nın neden olabileceği infeksiyonların önlenmesinde antiseptik ve dezenfektan maddeler yaygın olarak kullanılmaktadır. MRSA'ların hastanelerde bu kadar yaygın bulunması, dezenfeksiyon ve antisepsi işlemlerinin de zaman zaman yetersiz yapılması nedeniyle sağlık çalışanlarının ellerinden veya cansız objelerden hastalara MRSA'lar bulaşmakta ve sonuçta ciddi hastane infeksiyonları gelişebilmektedir. MRSA'ların aynı zamanda infeksiyonlarının önlenmesi amaçlı kullanılan dezenfektan ve antiseptik maddelere klinik olarak kanıt bulunmasa da direnç gösterebildikleri bilinmektedir. Bu çalışmada MRSA'ların dezenfektanlara direnç oluşturma mekanizmaları ve direnç durumunun gösterilmesi üzerine çalışılmıştır.

1.2.2. Dezenfektan maddeler ve çalışmamızda kullandığımız dezenfektan maddelerin özellikleri

Hastanelerde ve diğer sağlık kuruluşlarında sıklıkla kullanılan, etki düzeyleri ve kullanım alanları farklılıklar gösteren dezenfektan maddelerin ya da yaygın kullanılan bir ifadeyle biyositlerin genel olarak sınıflandırılması⁽⁴⁵⁾;

- Sıvı fazlı kimyasal bileşikler; alkoller, aldehidler, fenol ve fenol bileşikleri, halojenler, iyodoforlar, peroksijenler, kuarterner amonyum bileşikleri gibi.
- Buhar fazlı kimyasal bileşikler; etilen oksit, propilen oksit, formaldehit, metil bromür gibi.

Biyositlerin etki mekanizmalarına göre sınıflandırılması⁽¹⁰⁾;

- Elektrofilik olanlar; Halojenler, peroksijen bileşikleri, formaldehit, formol salan ajanlar, Cu, Hg, Ag.
- Membrana etkili olanlar; kuarterner amonyum bileşikleri, biguanidler, fenoller, alkoller, parabenler, zayıf asitler gibi.

Oksidan ajanlardan halojenler ve peroksijenler bakteri hücrelerini hızla ölüme götürürler, gümüş, bakır ve civa gibi inorganik iyonlar ve formaldehit gibi organik biyositler ise enzimleri inaktive ederler ve hücre içi radikallerin

salınımına neden olarak bakteri hücrelerini ölüme götürürler. Zayıf asitler, membran pH dengesini bozarak metabolizmanın bozulması yoluyla etkilidirler. Kuarterner amonyum bileşikler, biguanidler ve alkoller bakteri hücreleri membranına etkilidirler ve hücreyi hızla lizise götürürler⁽¹⁰⁾.

Çalışmamızda kullandığımız dezenfektan maddeler bu sınıflandırmalara göre sıvı fazlı bileşiklerdir ve bakteri hücreleri membranına etkilidirler, bu maddelerden ayrıntılı olarak aşağıda bahsedilecektir.

Klorhekzidin:

Bisfenoldür, iki fenol halkası içerir. Geniş spektrumlu etkiye sahiptir, çok yaygın olarak tıpta, diş hekimliğinde ve farmakoloji alanında kullanılmaktadır. Asetat (diasetat), hidroklorid ya da glukonat tozu halinde ticari olarak bulunmaktadır⁽⁶⁴⁾.

Özellikle gram pozitif koklar üzerine bakterisit etkili, klorlu fenol türevidir. Bakteri hücrelerinde hücre duvarı ve sitoplazma zarına etkilidir. Hücre duvarını ve dış membranını pasif difüzyon ile geçerek, bakteri sitoplazması zarı veya iç membranına etki eder. Sitoplazma zarına yapışarak oksidaz ve dehidrogenaz enzimlerini geri dönüşümsüz şekilde inaktive eder ve küçük moleküllerin hücre dışına sızmasına neden olur. Yüksek yoğunluklarda kullanıldığında ise bakteriye ait protein ve nükleik asitlerin presipite olmasına neden olur^(14,37).

Benzalkonyum klorür:

Kuarterner amonyum bileşigidir, katyonik deterjanlardır ve yüzey aktif etkilidir. Bakteri hücresinde hücre duvarı ve sitoplazma membranı üzerinde etkilidir. Katyonik deterjanların hidrofilik bölümü pozitif elektrik yüklüdür, mikroorganizma ile karşılaştıklarında sitoplazma ve dış membran fosfolipidlerinin negatif fosfat kökü ile reaksiyona girer, hidrofobik bölümü ise membranın hidrofobik bölümü ile etkileşir, böylece sitoplazma membranının yapısı bozulur. Hücre içi düşük molekül ağırlıklı maddeler hücre dışına çıkar, protein ve nükleik asit degravasyonu olur ve otolitik enzimler tarafından hücre lizisi gerçekleşir. Sonuçta bakterileri hücresinin yapısı ve membran bütünlüğü bozulur^(14,36,37). Kuarterner amonyum bileşikleri alkali pH'da asit pH'ya göre daha etkilidirler⁽⁶³⁾.

Kuarterner amonyum bileşikleri 1930'lu yılların ortalarından beri medikal alanlarda, farmakolojide ve diğer alanlarda yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır⁽⁶³⁾. Bu bileşiklerden benzalkonyum klorür de geniş spektrumlu antimikrobiyal etkisi ve yüzey aktif etkisi nedeniyle son yıllarda artan şekilde klinik ve endüstriyel çevrede bakteriyel üremeyi kontrol amaçlı kullanılmaktadır⁽³⁶⁾.

Kuarterner amonyum bileşiklerinin CDC (Centers for Disease Control and Prevention) tarafından antiseptik değil de dezenfektan olarak kritik

olmayan yüzeylerde (zemin, mobilya, duvar gibi) kullanımı önerilmektedir⁽⁴⁵⁾.

1.2.3. Bakterilerde dezenfektan ve antiseptik maddelere direnç:

Dezenfektan maddelerin günümüzde başlıca hastaneler ve diğer sağlık kuruluşlarında hastane infeksiyonlarının önlenmesi ve kontrolü amaçlı kullanımının yanı sıra veterinerlik, kozmetik ve gıda sanayisinde kullanımlarının artmasıyla bu maddelere karşı direnç gelişiminin olup olmadığı gündeme gelmiş ve son yıllarda direnç sorunu önemli bir araştırma konusu olmuştur^(16,37,59,62). Dezenfektan maddeler içerisinde alkoller, aldehytler, biguanidler (klorhekzidin gibi.), diamidinler, halojen salan maddeler (sodyum hipoklorit gibi.), iyot ve iyodoforlar, gümüş bileşikler, peroksijenler, fenoller, kuarterner amonyum bileşikler (benzalkonyum klorür gibi) sayılabilir^(37,60).

Antiseptik ve dezenfektan maddelere bakteriyel adaptasyon ve direnç oluşumu, bu maddelerin hastaneler ve pek çok ortamda yaygın kullanımı ve önerilen kullanım konsantrasyonlarının altında ya da üstünde kullanımına bağlı bilinçsiz ve yanlış uygulamaya bağlı olarak görülebilir⁽⁶³⁾.

Dezenfektan ve antiseptik maddelerin ya da genel bir ifade ile biyositlerin antibiyotiklerden farklı olarak bakteri hücresinde spesifik bir

hedef bölgeleri yoktur, çok sayıda hedef bölgeleri bulunmaktadır^(14,60,61,62).

Biyosit ile bakteri etkileşiminde pek çok faktör; temas süresi, biyosit konsantrasyonu, sıcaklık, pH, ortamda bulunan organik madde varlığı, bakterinin türü gibi faktörler antibakteriyel aktiviteyi etkilemektedir^(54,61,62).

Biyosit ile bakteri etkileşiminden sonra bakteri hücresinin yıkımı şu aşamalarla oluşur^(14,37);

- a-) Transmembran proton hareketinde kesilme ile oksidatif fosforilasyondan ayrılma ve membran aktif transportunun inhibe olması,
- b-) Respirasyonun inhibe olması ya da anabolik / katabolik reaksiyonların inhibe olması,
- c-) Hücre duvarı sentezini önleme, lipidleri eritme gibi mekanizmalarla hücre duvarının yapısını ve işlevini bozma,
- d-) Replikasyonun durması,
- e-) Potasyum, inorganik fosfat, pentoz, nükleotitler ve proteinler gibi esansiyel hücre içi elemanların membran dışına sızması bu maddelerin kaybı ile hücre homeostazının bozulması,
- f-) Lizis,
- g-) Hücre içi elemanların koagülasyonu gibi mekanizmalar ile mikroorganizmalara etki etmektedirler.

Bakteriler dezenfektan ve antiseptik maddelere direnç geliştirebilme yeteneğindedir. Bakterilerde biyosit maddelere direnç 1950-1960'lı yıllarda gösterilmiştir, direnç oluşumu ve bu durumun arttığı bilinmektedir^(9,60). Dezenfektan ve antiseptik maddelere direnç bu maddelerin bakteri hücrelerine alınımının azalmasıyla ya da atılımının olmasıyla gerçekleşmektedir. Bakterilerde enzimatik detoksifikasyon ya da modifikasyon ile klorheksidin gibi bazı biyositlere direnç görülebilmektedir. Hedef bölge değişimi ile biyosit direnci antibiyotiklerden farklı olarak biyositlerin bir çok hedef bölgesi olması dolayısıyla nadir görülür^(9,19,37,50,65).

Bakterilerde biyosit direnci antibiyotik maddelerde de olduğu gibi doğal direnç ve kazanılmış direnç olarak iki şekilde oluşmaktadır. Doğal direnç, bakteride doğal olarak vardır ve bakterinin kromozomu tarafından kontrol edilmektedir. Kazanılmış direnç ile bakterinin kromozomlarındaki mutasyon ya da plazmid veya transpozonlar aracılığı ile kazandığı direnç tanımlanmaktadır^(37,50,65).

Doğal direnç :

Dezenfektan ya da antiseptik maddeler hedef bölgelerine ulaşabilmek için bakteri dış tabakalarını geçmek zorundadırlar, bu tabakalar yapıları sebebiyle bazen bazı biyositlere karşı bariyer görevi üstlenebilirler, böylece geçirgenliğin azalmasıyla bu maddelere karşı duyarlılıkta azalır^(37,58,61). Gram negatif bakteriler dış membranları yapısı sebebiyle Gram pozitif

bakterilere göre biyositlere doğal olarak daha dirençlidir^(50,54,56,61). Mikobakteriler ve spor oluşturan bakterilerde hücre duvarı ve spor duvarı yapısı özellikleriyle alınının azalması yoluyla biyositlere doğal olarak dirençlidirler^(54,56).

Gram negatif bakterilerde antibiyotik ve biyosit direnç birlikteliği ile ilgili yapılan çalışmalarda *Proteus mirabilis* ve *Pseudomonas stutzeri*'de klorheksidin direnci ile çeşitli antibiyotiklere direnç birlikteliğine rastlanmıştır. Bu direnç ilişkisi genetik olarak kanıtlanamamış, bakteri hücresi duvarının özelliğine bağlı olarak alınının azalması mekanizmasıyla doğal direnç olarak açıklanmıştır⁽⁵⁵⁾.

Bakteri hücresi dış tabakaları bakterinin türüne göre değişiklik gösterir örneğin; Gram pozitif bakteri hücre duvarı peptidoglikan ve teikoik asitten oluşur. Gram pozitif bakteriler bu yapıları dolayısıyla kuarterner amonyum bileşikleri ve klorheksidin gibi dezenfektanlara duyarlıdırlar, ancak besin kısıtlaması ve bakterinin üreme hızının azaltılması ile peptidoglikan tabaka kalınlığında ve çapraz bağlanmalarındaki değişimle dezenfektan maddelere karşı duyarlılık değişebilmektedir, örneğin; peptidoglikan değişikliği, lipit artışı gibi hücre duvarı değişimine bağlı klorheksidin direnci gibi.⁽³⁷⁾. Gliserol içeren besiyerlerinde tekrar tekrar pasajları yapılan *S. aureus*'larda hücre duvarındaki lipit miktarı artar, bazı antibiyotiklere, bazı fenollere, kuarterner amonyum bileşiklerine ve klorheksidine duyarlılıkları azalır. Bu

azalmış duyarlılık durumu fenotipik uyum ile oluşan doğal direnç bir örnektir^(37,54,61,65).

Biyofilm oluşumu da fenotipik uyum sağlayarak doğal direnç neden olur. Biyofilm içinde yerleşmiş olan bakterilerin biyositlere olan duyarlılıkları azalmıştır. Biyofilm oluşturan bakterilerde genel adı ile biyositlere duyarlılığın azalması şu nedenlerle oluşmaktadır^(19,37,61).

- a-) Biyositin biyofilm içerisindeki bakteriye ulaşması zorlaşır ve bakteri hücrelerine biyosit girişi azalır,
- b-) Biyofilm ile dezenfektan madde arasında kimyasal etkileşim,
- c-) Besin ve oksijen eksikliğine bağlı olarak mikroçevre değişimi,
- d-) Biyofilm içinde düşük biyosit konsantrasyonlarında etkili yıkıcı enzim üretimi,
- e-) Biyofilm içerisinde nötralizan kimyasal maddelerin bulunması,
- f-) Biyofilm içerisindeki bakteriler arasında genetik bilgi aktarımının oluşabilmesidir.

S. aureus'larda biyofilm oluşumuna bağlı ekstrasellüler matriks artışıyla katyonik biyositlere özellikle de kuarterner amonyum bileşiklerine artmış direnç yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Biyofilm oluşturan *S. aureus* ve *P. aeruginosa* türleri kıyaslandığında *S. aureus*'ların kuarterner

amonyum bileşiklerine karşı dirençlerinin daha kuvvetli olduğu belirtilmiştir⁽⁷⁾.

Kazanılmış direnç:

Dezenfektan ve antiseptik maddelere direnç kazanımı, kromozomal mutasyonlar, plazmid veya transpozonlar aracılığı ile genetik özellik kazanılarak oluşmaktadır. Bakterilerde plazmidler aracılığı ile kodlanan dezenfektan direnç mekanizmaları azalmış alım (uptake), dışarı atım (efflux), dış membran proteinleri değişimi ile olmaktadır^(37,62). Biyosit, bakteri hücrelerine alınımının azalması, bakteri hücrelerinden atılımının ise artmasıyla hücre içerisinde etkili konsantrasyonuna ulaşamaz ve azalmış duyarlılık ya da direnç oluşur⁽⁵⁸⁾.

Gentamisin ve metisilin direncini kodlayan pSAJ1 plazmidini taşıyan *S. aureus* suşlarının klorhekzidin, diamidinler, kuarterner amonyum bileşiklerine, etidyum bromid, propamidin izotionat ve akridinlere karşı minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) değeri yüksek bulunmuştur⁽⁷³⁾.

Dezenfektan direncinin plazmidler aracılığıyla aktarıldığını göstermek amacıyla pSK1 plazmidinin 2.3 kb'lık bölümü *Escherichia coli*'de klonlanmış ve kuarterner amonyum bileşiklerine 4-6 kat artmış MİK değerleri tespit edilmiştir⁽⁷²⁾.

Gram pozitif bakterilerde ve *S. aureus*'da plazmid aracılığı ile dezenfektan direnci genellikle *qacA*, *qacB*, *qacC*, ve *qacD* genleri tarafından kodlanmaktadır. *qacA* ve *qacB*; çoklu ilaç direnci, beta-laktamaz ve ağır metal direnci plazmidlerinde, *qacC* <3kb'lık küçük konjugatif olmayan, *qacD* büyük 50kb'lık konjugatif çoklu direnç plazmidlerinde bulunmaktadır. *qacA* geni kuarterner amonyum bileşiklerine, klorhekzidin, diamidinlere, akridinler ve etidyum bromide direnç ile ilgilidir. *qacB* ağır metal direnci ile ilgili plazmidin üzerindedir, kuarterner amonyum bileşikleri, akridinlere ve etidyum bromid direnci ile ilgilidir. *qacC* ve *qacD* bazı kuarterner amonyum bileşiklerine ve etidyum bromide direnci kodlamaktadır. Bu *qac* genlerinin ürünleri tarafından oluşturulan plazmid aracılıklı dışarı atılım pompaları Gram pozitif bakterilerde metaller, kuarterner amonyum bileşikleri, klorhekzidin, diamidinlere ve akridinlere direnç oluşumu için önemlidir (37,56,60).

Gentamisine dirençli görülen MRSA'larda (MGRSA) biyositlere karşı MİK değeri artmış bulunmaktadır. MRSA veya MGRSA türlerinde her zaman artan bir biyosit direnci bulunmasa da doğuştan stabil olmayan GNAB (gentamicin-nucleic acid-binding) plazmidi varlığında klorhekzidin için MİK değeri 2-4 kat artarken, plazmidin olmadığı durumda klorhekzidine karşı artan MİK değeri azalırken, bakterisidal etkide bir değişim olmaz^(12,65).

Gram negatif bakterilerde ise plazmid aracılığı ile katyonik biyositlere direnç genellikle *emrE*, *qacE*, *qacEA1* genleri tarafından kodlanmaktadır⁽¹¹⁾.

Mutasyona bağlı kazanılmış direnç dezenfektan maddenin artan konsantrasyonlarına kademeli olarak maruz kalınmasına bağlıdır. Örneğin, kuarterner amonyum bileşiklerine *Serratia marcescens*'te gözlenen direnç ve klorhekzidine *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *S. marcescens*'te gelişen direnç buna örnektir. Bu direnç genellikle stabil değildir, biyosit içermeyen besiyerlerinde bakterinin kültürünün yapılmasıyla azalabilir ya da kaybolabilir^(45,54). Bakterilerde mutasyona bağlı hedef bölge değişimiyle biyosit direnci, biyositlerin çok sayıda hedef bölgelerinin bulunmasına bağlı olarak nadir görülen bir durumdur^(50,62,65).

Farklı antimikrobiyal maddelerin örneğin antibiyotikler ve biyositlerin bakteri hücreindeki hedef bölgeleri aynı olabilir, bu hedef bölgede meydana gelecek değişim çapraz direnç yoluyla antibiyotiklere dirençli türlerin seçilimine neden olabileceği gibi, bir den çok hedef bölgelerinin bulunmasıyla karakterize biyositlere karşı nadir de olsa çapraz direnç yoluyla direnç oluşumuna neden olabilir⁽¹¹⁾.

Bakterilerde biyositlere karşı görülen direnç oluşum mekanizmalarından bir diğeri de zamanla biyosit kullanımı sonucu ortamda

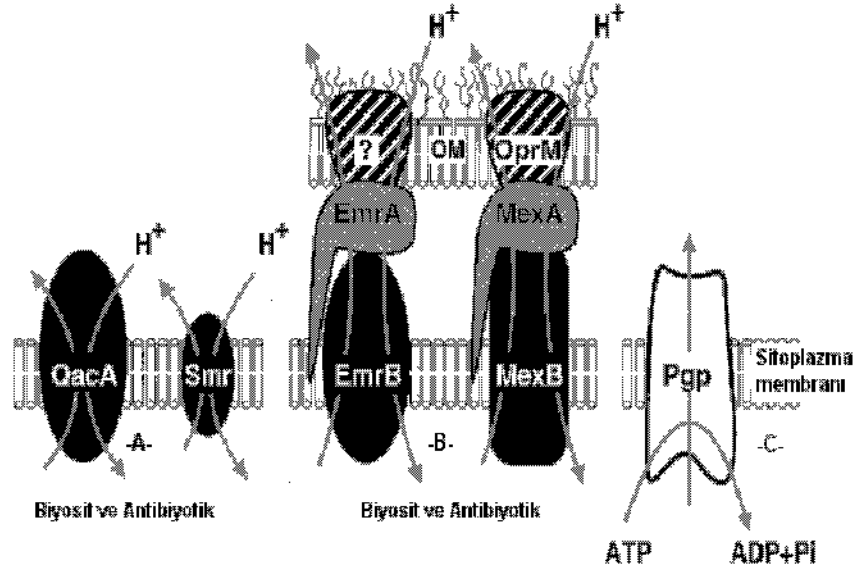
kalan biyosit kalıntılara bağlı düşük düzeyde duyarsızlık ya da direnç gelişimi olabileceği belirtilmektedir⁽⁶²⁾.

Patolojik özellikte olan bakterilerde çoklu ilaç dışarı atılım sistemleri (multidrug efflux systems = MDR) biyosit ve antibiyotik maddelere dirençte oldukça önemlidir. Biyositlerin bakteri hücresinden dışarı atılımı çoklu ilaç dışarı atılım sistemleri (MDR) ile olur. Bu sistem 6 sınıfa ayrılmaktadır^(39,50,51,60,68),

- 1- SMR (small multidrug resistance family) örneğin; *Escherichia coli*'de EmrE, *S. aureus*'da QacC, QacD, Gram negatif bakterilerde QacE gibi.
- 2- DMT (drug/metabolite transporter superfamily),
- 3- MFS (major facilitator superfamily) örneğin; *Bacillus subtilis*'de Bmr, *E. coli*'de EmrB, *S. aureus*'da QacA ve QacB,
- 4- ABC (ATP-binding cassette family),
- 5-RND (resistance-nodulation-division family) örneğin; *Pseudomonas aeruginosa*'da MexB, *Escherichia coli*'de AcrB,
- 6- MATE (multidrug and toxic compound extrusion family) örneğin; *S. aureus*'larda MepA gibi.

Bakterilerdeki MDR ile ilişkili genlerin transkripsiyonu aktivatör ve repressörlerle düzenlenmektedir⁽⁶⁸⁾. Bu çoklu ilaç dışarı atılım sistemlerinden sadece ABC'de (ATP-binding cassette family) gereken enerji ATP

kullanılarak ATP hidrolizi ile elde edilmektedir, diğer sistemlerde ise dışarı atılım proton gradienti ile olmaktadır⁽⁴⁷⁾. **Şekil 1** de çoklu ilaç dışarı atım sistemleri örneklenerek şematize edilmiştir. *S. aureus*'ta biyosit atılımı ile ilgili çoklu ilaç dışarı atılım sistemleri MFS ve SMR protein aileleridir⁽⁶⁰⁾.



Şekil 1 Çoklu ilaç dışarı atılım sistemlerinin örnekleri görülmektedir⁽⁴⁷⁾.

A-Gram pozitif bakteri sitoplazma membranında MFS ve SMR ailesi örnekleri, B- Gram negatif bakteri sitoplazma membranında MFS ve RND ailesi üyeleri C- Ökaryot hücre sitoplazma membranında P-glikoprotein görülmektedir. A ve B'de proton gradientine bağlı olarak biyosit ve antibiyotik atılımı gerçekleşirken, C'de ATP hidrolizi yoluyla atılım gerçekleşmektedir.

1.2.4. Dezenfektan maddelere karşı oluşan direnci belirlemede kullanılan testler

Dezenfektan maddelere karşı oluşan direnci belirlemede kullanılan testler aynı zamanda dezenfektan maddenin etkinliği hakkında da bize bilgi vermektedir. Dezenfektan etkinliğini belirlemede çok çeşitli yöntemlerden yararlanılmaktadır. Bu yöntemlerin ortak özelliği etkinliği belirlenecek dezenfektan maddenin sulandırımının belirli mikroorganizmalarla karşılaştırılması esasına dayanmaktadır. Belirlenen temas süresi sonunda dezenfektan maddenin hangi konsantrasyonunun uygulamasında mikroorganizmaların ne kadarının öldüğü, ne kadarının canlı kaldığı ise testin sonucunu belirlemektedir⁽¹⁾.

Dezenfektan madde etkinliğini belirlemede kullanılan testlerde, kullanılan mikroorganizmanın suşları ve yoğunluğu, dezenfektanın sulandırma sıvıları, temas süresi, sıcaklık, pH, ortamdaki organik maddeler ve kullanılacak nötralizan maddeler uygulanacak yönteme göre değişiklik göstermekte ve dezenfektan maddenin uygulamasındaki başarıyı da etkilemektedir^(1,70). Etkili ve doğru sonuçlar elde edebilmek için uygun yöntemlerin tercih edilmesi ve bu konudaki çalışma protokollerine uyulması gerekmektedir.

Dezenfektan etkinlik testlerinin yanlış uygulanması ya da uygunsuz ortam şartları yanlış sonuçların alınmasına neden olabilir. Etkinliği araştırılacak maddenin yanlış konsantrasyonlarda sulandırımı, sulandırım sıvısının kontamine olması, maddenin uygun koşullarda saklanmaması, uygun sıcaklık ve pH da testin yapılmamış olması, ortamdaki organik maddeler test sonucunu etkilemektedir. Örneğin kuarterner amonyum bileşiklerinin pamukla uygulanması yanlış bir uygulamadır, bu maddeler pamukla inaktive olmaktadır⁽⁶³⁾.

Dezenfektan etkinlik testleri testin uygulanacağı mikroorganizmanın özelliği, testin aktivitesi, testin amacı ve testin yapısına bağlı olarak sınıflandırılmıştır. Dezenfeksiyon etkinlik testlerinin testlerin yapısına göre sınıflandırılması^(1,53,70),

1. İn-vitro testler:

- Süspansiyon testleri; bir çok değişkenin etkisinin incelenebildiği kalitatif ve kantitatif sonuçların alınabildiği testlerdir.
- Kapasite testleri; dezenfektan solüsyonuna kirli bir alet daldırılır, böylece artan yük karşısında dezenfektan maddenin aktivitesini koruyup korumama kapasitesi belirlenir. Alet ve ortam dezenfeksiyonunun in-vitro uygulamasıdır.
- Taşıyıcı testler; aletlerin ve kumaş gibi malzemelerin dezenfeksiyonunun in-vitro uygulamasıdır.

2. Pratik testler: Dezenfeksiyonun uygulandığı yüzeyin, aletlerin, kumaşın, elin, derinin dezenfeksiyonunun yeterliliğini saptama testleridir.
3. Uygulama testleri; konsantrasyon ve uygulama süresi in-vitro testlerle belirlendikten sonra bu testler belirlenen konsantrasyon ve sürede gerçek uygulama alanlarında yapılırlar.

İn-vitro bakterisidal testlerden süspansiyon testleri belli bir zamanda dezenfektan konsantrasyonuna bağlı mikrop sayısındaki azalmayı logaritmik olarak incelemeyi sağlar^(18,27). Süspansiyon testleri diğer in vitro testlerle kıyaslandığında kolay uygulanabilmesi, aynı zamanda bir çok değişkenin (temas süresi, sıcaklık, gibi) incelenebilmesi ve ekonomik olması sebebiyle tercih edilmektedirler⁽¹⁾. Süspansiyon testleri kalitatif ve kantitatif olarak yapılabilir. Kalitatif süspansiyon testi, dezenfektan etkileşiminden sonra alınan pasajda üreme olup olmamasına göre değerlendirilir. Kantitatif süspansiyon testi ise dezenfektan uygulamasından sonra orijinal ekim büyüklüğüne karşı canlı kalan bakteri sayısı belirlenerek değerlendirilir. Uygulama sonrası alınan örnek katı besiyerine ekilir, üreyen koloni sayısı uygulama öncesindeki bakteri sayısı ile karşılaştırılır^(1,18,53).

Bakterisidal etki şöyle hesaplanır^(1,70):

$$\text{Bakterisidal etki (BE)} = \log N_C - \log N_D$$

$\log N_C$; kontrol serisinde dezenfektan yerine su kullanılan ortamdan alınan örnekteki koloni sayısı

$\log N_D$; dezenfektan uygulanan gruptan alınan örnekteki koloni sayısı

Dezenfeksiyon testlerinde bakterisidal aktivite logaritma redüksiyon faktörü (RF) ile ifade edilir, dezenfektan kullanımından önceki mikroorganizma sayısının logaritması ile dezenfeksiyon uygulaması sonrasındaki mikroorganizma sayısının logaritması arasındaki farkı gösterir. 1 dakikalık dezenfektan uygulaması sonucunda 5 logaritmalık bir azalma anlamlı iken biyofilm oluşturan bakterilerde 3 logaritmalık'lık bir azalma da anlamlı kabul edilir⁽¹⁾.

Genel adı ile biyositlere karşı bakteriyel duyarlılığın belirlenmesinde antibiyotiklerdeki gibi minimum inhibisyon konsantrasyonundan (MİK) faydalanılır⁽⁶²⁾. MİK testleri vejetatif bakterilere karşı dezenfektan maddenin etkinliğini gösteren testlerdir. Bir çok araştırmacı dezenfektan ve antiseptik maddelere direnç durumunu MİK değerine dayanarak belirtmektedir. Antibiyotik maddelerde olduğu gibi MİK ölçümü biyosit maddelere direnç durumu hakkında bilgi verse de klinik uygulama farklılık göstermektedir, çünkü biyositler MİK değerlerinin 1000 katı gibi yüksek konsantrasyonlarda kullanılmaktadır^(9,10,11). Sürekli kullanılan bir dezenfektan maddenin direnç oluşturma durumunun takip edilmesinde MİK testinin yapılması anlamlıdır⁽¹⁾. Dezenfektan maddelere direnç ile ilgili yapılan çalışmalarda direnç durumu genellikle MİK değerindeki artma ile ifade edilmektedir^(58,63).

Araştırmacılar MİK değeri belirlemede genellikle agar diffüzyon yöntemini kullanmaktadır, ancak bazı biyositler agar içerisine az diffüze

olmakta bazıları ise agar içerisindeki maddelerle etkileşime girmektedir, bu durumda bulunan MİK değeri sıklıkla lethal etkileşimin gösterdiği değerden az olmaktadır ve testin güvenilirliğini etkilemektedir^(9,58).

Etkinliği araştırılacak maddenin azalan konsantrasyonlarında yapılan MİK testi yarı kantitatif özelliktedir. MİK değeri inkübasyon sıcaklığı, inkübasyon süresi, inoküle edilen organizma sayısı ve türüne bağlı olarak değişebilmektedir, MİK değeri inokulum miktarından etkilendiği için MİK testlerin özellikle inokulum miktarı dikkate alınarak yapılması önerilmektedir^(30,32). Lambert⁽³⁰⁾ inokulum miktarındaki değişimlerin MİK değeri üzerindeki etkisi konusunda yaptığı çalışmada, düşük inokulum miktarı ile biyosit etkinliğini yüksek düzeyde bulurken, yüksek inokulum miktarında biyosit etkinliğini düşük bulmuş ve MİK değerinin inokulum miktarından etkilendiğini belirtmiştir.

Biyositler antibiyotiklerden farklı olarak MİK ya da minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) değerlerinden daha yüksek konsantrasyonlarda kullanılırlar, bu sebeple dışarı atılım sistemleriyle bakteri hücresinden başarı ile atılamazlar⁽⁵⁹⁾. Biyositlerin kullanım konsantrasyonlarının MİK değerinden yüksek olması sebebiyle etkinliklerinin geniş konsantrasyon aralıklarında incelenmesi önerilmektedir.

Dezenfektan maddenin etkinliğinin belirlenmesinde kullanılan testlerden bakterisidal testlerin sonuçları MİK testleri sonuçlarından daha anlamlıdır⁽⁶⁹⁾.

1.2.5. *Staphylococcus aureus*'larda görülen dezenfektan direnç genleri ve özellikleri

Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'larda kuarterner amonyum bileşiklerine (QAC = Quaternary Ammonium Compounds) direnç oluşumundan sorumlu genler tanımlanmıştır. Genler bu bileşiklere dirençten sorumlu oldukları için *qac* adını almışlardır. Plazmidlerce taşınmaktadırlar ve aynı zamanda çok sayıda biyosite karşı azalmış duyarlılık ve dirençten de sorumludurlar⁽¹⁶⁾.

qac genleri üzerinde çok çalışılan bir konu, bir çok farklı tipi (*qacA*, *qacB*, *qacC*, *qacD*, *qacG*, *qacH* ve *qacJ*) bilinmektedir. Bunlar düşük düzeyde katyonik biyosit ve ilişkili antibiyotik direncinden sorumludur^(48,60,62). Ayrıca *qacC* ve *qacD* genleri sırasıyla *ebr* ve *smr* genleri olarakta bilinmektedir⁽³⁵⁾.

qacA geni normal hücresel gelişimden sorumlu öncü genlerle ilişkili olarak gelişir. Katyonik biyositlerin kullanımından önce ökaryot ve prokaryot sistemde yaygın olduğu ve ikisi arasında çok benzer olduğu ileri sürülmektedir. *qacA*'nın *qacB*'den geliştiği, klorheksidinin yaygın

kullanımının *qacA* determininatlarının ortaya çıkmasından sorumlu olduğu, kuarternar amonyum bileşiklerinden benzalkonyum klorürün *qacA* ve *qacB* ekspresyonuna sebep olduğu belirtilmektedir. Ayrıca bu katyonik biyositlerin hastanelerde kullanıma girmesiyle klinik *S. aureus* suşlarında *qacA* ve *qacB* ortaya çıkışının kronolojik olarak gerçekleştiği de belirtilmektedir^(48,60,62).

qacA/B gen ailesi protona bağlı dışarı atılım proteinlerini kodlar, bu proteinler diğer enerji bağımlı transportörler ile örneğin tetrasikline dirençli türlerde bulunan tetrasiklin transportörlerinde olduğu gibi önemli homoloji gösterirler^(37,60). *qac* genlerinin kodladıkları Qac proteinleri transmembran elektrokimyasal proton yüküne bağlı olarak proton aktif güçle dışarı atımdan sorumlulardır. *qac* genleri ile kodlanan dışarı atılım pompaları ATP'den bağımsız olarak çalışır, ATP'ye gereksinim duymaz⁽³⁴⁾.

Biyositlerin bakteri hücresinden dışarı atılımını sağlayan çoklu ilaç dışarı atılım sistemi, *qacA* ve *qacB* genlerini taşıyan stafilokoklarda MFS (major facilitator superfamily) iken *qacC*, *qacD*, *qacG* ve *qacH* genini taşıyanlarda SMR (small multidrug resistance family)'dir⁽⁶⁰⁾. SMR ailesinde QacC, QacD, QacG ve QacH proteinleri, MFS ailesinde QacA, QacB ve NorA proteinleri bulunmaktadır. NorA proteini diğer MFS ailesindeki proteinlerden farklı olarak 12 transmembran segmenti içerir. NorA proteinini kodlayan *norA* geni *S. aureus*'da kromozom üzerinde bulunur.

norA geninin biyosit direnci ile ilgisi açıklanmamıştır, ancak antiseptiklere dirençli MRSA’larda bu gen gösterilmiştir. *qacA*, *qacB*, *qacC* ve *qacD* genleri klinik *S. aureus* türlerinde yaygın olarak bulunur, dezenfektan ve antiseptik maddelere dirençten sorumludur^(41,49,50,60).

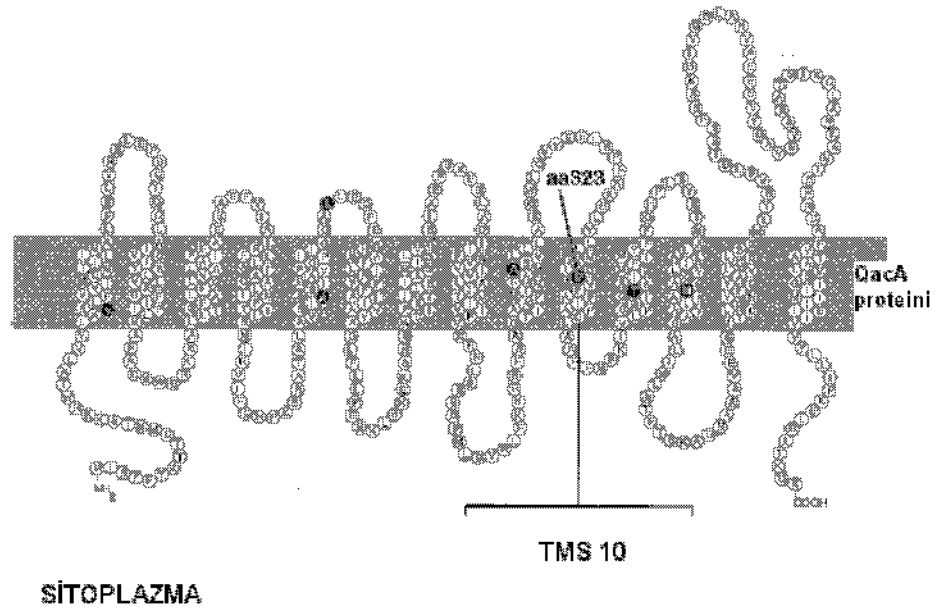
Stafilokok’larda *qacA* ve *qacB* genleri büyük çoklu ilaç direnci plazmidlerinde bulunur. *qacA* geninin kodladığı QacA proteini kuarterner amonyum bileşiklerine, klorheksidine, diamidinlere, akridinlere ve etidyum bromide dirençten sorumludur. *qacB* ağır metal direnci ile ilgili plazmidin üzerindedir, kodladığı QacB proteini kuarterner amonyum bileşikleri, akridinler ve etidyum bromid direncinden sorumludur. *qacC* genleri <3kb’lık küçük konjugatif olmayan, *qacD* genleri büyük 50kb’lık konjugatif çoklu direnç plazmidleri üzerinde bulunur. *qacC* ve *qacD* genlerinin kodladıkları QacC ve QacD proteinleri bazı kuarterner amonyum bileşiklerine ve etidyum bromide dirençten sorumludur. *qacG* ve *qacH* genleri de sırasıyla QacG ve QacH proteinlerini kodlarlar, bu proteinler de kuarterner amonyum bileşikleri, etidyum bromid ve akridinlere dirençten sorumludur^(35,60).

qacA geni pSK1 plazmidi içeren *S. aureus*’larda tanımlanmıştır, *qacB* ise pSK23 plazmidi içeren türlerde tanımlanmıştır, *qacA* hem tek değerli hem de iki değerli organik katyonlara proton hareketine bağlı güçle dışarı atılım mekanizması yoluyla dirençten sorumludur, *qacB* ise tek değerli

organik katyonlara dirençten sorumludur, iki değerli katyonlara düşük düzeyde direnci kodlar ya da iki değerli katyonlara duyarlıdır. pSK1 (*qacA*) ve pSK23 (*qacB*) plazmidleri üzerinde saptanılan gen dizilerinin 1., 26., 152., 167., 291., 323., 380'ci pozisyonlarındaki aminoasitlerinde farklılıklar bulunmaktadır. *qacB* ve *qacA* arasında 7 yada 9 nükleotitik fark bulunmaktadır, start kodonları da farklıdır^(35,41,46,48). Birbirine benzer nükleotit dizisi içeren *qacA* ve *qacB* genleri basit polimeraz zincir (PZR) yöntemi ile ayırt edilemezler^(35,41,42).

qacA geni stafilokoklar da QacA proteinini kodlar, QacA proteini 14 transmembran segmenti içeren bir proteindir, çoklu ilaç dışarı atılım pompası olarak görev yapar, proton hareketine bağlı güçle dışarı atılımını sağlayarak tek ve iki değerli organik katyonlara direnç durumu oluşturur^(22,38,39,46). QacA, MFS transport proteini ailesi üyesidir, 30'dan fazla farklı tek değerli ve çift değerli toksik maddenin, katyonik ve lipofilik ajanın yer aldığı geniş bir substrat spesifikliğı vardır. Substratının hücre membranından uniport (tek başına), symport (taşıyıcı ile) ya da antiport (ortak taşıyıcı ile zıt yönde) taşınmasını sağlar. Patojen *S. aureus* türlerinden izole edilen çoklu ilaç dışarı atılım pompaları QacA ve QacB yakın ilişkilidir, QacB tek değerli katyonlara yüksek düzeyde dirençten sorumludur, farklı olarak iki değerli katyonlara düşük düzeyde dirençten sorumludur ya da duyarlıdır. QacA ve QacB'nin 323'üncü aminoasit pozisyonunda farklılık bulunmaktadır. QacA'da 323'üncü aminoasit pozisyonunda asparagin

aminoasiti QacB’de ise alanin aminoasiti bulunmaktadır. Bu fark QacA proteininin daha geniş direnç fenotipi göstermesini sağlar. QacA’nın 10’cu transmembran segmentinde 323’üncü aminoasit pozisyonundaki negatif yük iki değerli katyonların pozitif yükü ile etkileşime girer, substratını tanır, bağlanır ve QacA ile ilişkili dışarı atılım yoluyla bu maddelerin dışarı atılımı gerçekleşir^(4,38,39,46). **Şekil 2**’de QacA proteinini bakteri hücresi membranındaki yerleşimi şematize edilmiş ve 323’üncü aminoasit pozisyonu belirtilmiştir.



Şekil 2 *Staphylococcus aureus* sitoplazma membranında 14 transmembran segmenti içeren QacA proteini görülmektedir⁽⁴⁷⁾. α helikal yapıda 10’uncu transmembran segmentinde 323’üncü aminoasit pozisyonunda asparagin aminoasiti bulunmaktadır. QacB proteininde ise aynı pozisyonda alanin aminoasiti bulunmaktadır.

QacA'nın direnç özgülüğü tek ve iki değerli katyonlarla sınırlıdır, üç değerli katyonlara ve negatif değerli maddelere direnci gösterilmemiştir⁽³⁸⁾. QacA'nın tek ve iki değerli katyonları tanıma ve bağlanma bölgeleri farklıdır, QacA ve QacB'nin tek değerli katyonları tanıma ve bağlanma bölgeleri ise benzerdir⁽³⁹⁾.

QacA ilaç dışarı atılım pompasının ekspresyonunun düzenlenmesinde QacR repressör protein olarak görev almaktadır. QacR tarafından *qacA* transkripsiyonunun represyonu değişik yapıda QacA substratları ile olmaktadır, invitro ortamda katyonik QacA substratlarının QacR'nin *qacA* geni operatör bölgesine bağlanmasını sağlayarak sonuçta *qacA* ekspresyonu baskılar^(22,68). QacR regülatör proteinler ailesinde bulunur. TetR ile temelde benzer homoloji gösterir, N- terminal ucu multi-helikal DNA bağlayan domen içerir, C-terminal bölgesi ise yüksek çeşitlilikte bileşiklere bağlanabilme özelliğindedir⁽²²⁾. Tetrasiklin direnç genlerinden *tetK* ve bu genin kodladığı TetK proteini de QacA proteini gibi 14 transmembran segmenti içerir, N- terminal bölgeleri benzerlik gösterir ve proton hareketine bağlı güçle antibiyotiğin dışarı atılımını sağlar⁽⁴⁹⁾.

Klinikten izole edilen *S. aureus* türleri farklı plazmidler üzerinde bulunan ve antiseptik ve dezenfektan direncini kodlayan *qac* genlerini taşırlar. *qacA* geni pSK1 plazmidi yanısıra pSK1 plazmidi gibi β -laktamaz ve ağır metal direnç plazmidi pSK57'de de bulunur, *qacB* geni β -laktamaz ve

ağır metal direnç plazmidi pSK23 plazmidi yanısıra aynı özellikteki pSK21, pSK84 ve pSK156'da da bulunur. *qacC* küçük konjugatif olmayan pSK89 ve pW32 plazmidleri, *qacD* büyük konjugatif plazmidler olan pJE1 ve pSK41'de bulunur^(33,34). Klinik *S. aureus* türlerinde bulunan pSK1, pSK156 ve pSK23 plazmidleri yüksek düzeyde %85-100 benzerlik göstermektedirler, pSK156'da 184. kodonda valin aminoasiti yerine pSK23'de alanin aminoasiti bulunmaktadır. pSK23 ve pSK156 plazmidlerinde bulunan *qacB* genlerinin fenotipik olarak benzer oldukları belirtilmektedir⁽⁴⁸⁾. Klinik *S. aureus* türlerinde tespit edilmiş plazmidler, boyutları, taşıdıkları dezenfektan direnç genleri ve fenotipik olarak plazmidin kodladığı antibiyotik ve antimikrobiyal dirençleri **tablo 1** de gösterilmektedir⁽³⁴⁾.

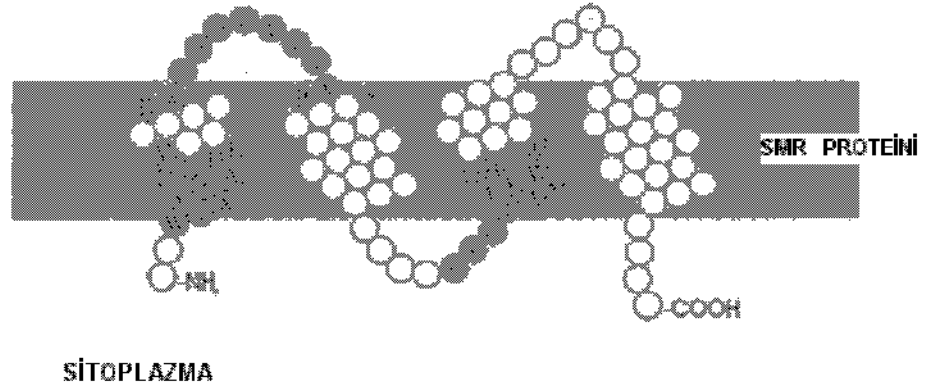
Tablo 1 Klinik *S. aureus* türlerinden izole edilen plazmidler ve direnç özellikleri

Plazmid	Boyutu (kb)	Direnç geni	Fenotipik direnç*
pSK1	28.4	<i>qacA</i>	Gm, Tm, Km, Tp
pSK57	28.8	<i>qacA</i>	Hg, Cd, Pc
pSK21	35.3	<i>qacB</i>	Hg, Cd, Pc
pSK23	38	<i>qacB</i>	Gm, Tm, Km, Hg, Cd
pSK84	32.8	<i>qacB</i>	Cd
pSK156	45.4	<i>qacB</i>	Cd, Pc
pSK89	2.4	<i>qacC</i>	
pSK41	47.8	<i>qacD</i>	Gm, Tm, Km, Nm
pUW3626	54.4	<i>qacD</i>	Gm, Tm, Km, Nm, Pc
pJE1	50	<i>qacD</i>	Gm, Tm, Km, Nm, Tp

* Gm: gentamisin, Tm: tobramisin, Km: kanamisin, Nm: neomisin, Hg: civa, Cd: kadmiyum, Pc: penisilin, Tp: trimethoprim,

qacG geni pST94 plazmidini üzerinde 2-3 kb'lık bir alanda kuarterner amonyum bileşiklerine direnç ile ilgili olarak bulunur, pST94 plazmidini gıda endüstrisinde benzalkonyum klorüre dirençli stafilokoklardan izole edilmiştir. *qacG* geni ürünü olan QacG proteini 107 aminoasitten oluşur, SMR protein ailesi üyesidir, proton hareketine bağlı güçle dışarı atılım yoluyla dirençten sorumludur⁽²⁴⁾. Kuarterner amonyum bileşiklerinin hastaneler ve gıda endüstrisinde yaygın kullanımı dolayısıyla bu maddelere direnç gelişebilmektedir. Kuarterner amonyum bileşiklerine direnç gelişiminde *qacA* ve *qacB* genleri yanı sıra özellikle gıda endüstrisinden izole edilen türlerde *qacG* geninin de etkin olduğu gösterilmiştir⁽²⁴⁾. *qacG* geni bulunan *S. aureus*'lar kuarterner amonyum bileşiklerine duyarlı kontrol grubuyla kıyaslandığında MİK değerinin 5 kat arttığı gösterilmiştir⁽¹¹⁾.

qacH ve *qacJ* genleri, *qacG* geni gibi plazmid aracılığıyla taşınan dezenfektan direnç genleridir, bu genlerin kodladıkları proteinler de SMR protein ailesi üyeleridir, bulundukları stafilokok türleri veterinerlik alanından ve gıda endüstrisinden izole edilmiştir⁽⁴²⁾. SMR protein ailesi tipik olarak 110 aminoasit ve 4 transmembran segmentinden oluşmaktadır^(47,52). **Şekil 3**'de bakteri hücresi sitoplazma membranında yer alan SMR proteini şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3 Bakteri hücresi sitoplazma membranında yer alan 4 transmembran segmenti içeren SMR proteini görülmektedir⁽⁵²⁾.

qac antiseptik ve dezenfektan direnç genlerinin hem koagülaz negatif stafilokoklarda hem de *Staphylococcus aureus*'da antiseptik ve dezenfektanların yaygın olarak kullanımından önce de bulunduğu inanılmaktadır⁽⁵⁶⁾.

Anthonisen ve arkadaşları⁽⁴⁾ insan ve hayvan kaynaklı *Staphylococcus haemolyticus* türleri ile yaptıkları çalışmada bu bakterilerde de dezenfektan direnç geni *qacA* varlığını tespit etmişlerdir. Ayrıca *S. haemolyticus* ve *S. aureus*'dan izole edilen *qacA* genlerinin % 99,9'dan daha fazla nükleotit seviyesinde aynı olduğunu belirtmişlerdir. Bu durum insan ve hayvan gibi farklı konaklarda kolonize olabilen farklı stafilokok türlerinin antibiyotik ve

dezenfektan direnç genlerini çoklu ilaç direnç plazmidleri aracılığıyla değiştirebildiklerini göstermektedir.

qac genlerinin bulunmadığı durumlardaki dezenfektan direncinin sebebi bu genler dışında çoklu ilaç dışarı atım pompalarını kodlayan diğer genler olabilir, örneğin stafilokoklarda *qac* genleri dışında kromozomal genlerden *sepA* ve *mdeA*'da çoklu ilaç dışarı atılım pompası görevi yapan proteinleri kodlamaktadır⁽⁵⁶⁾. MdeA (Multidrug Efflux A) 52 kDa'luk çoklu ilaç dışarı atılım proteinidir, *mdeA* geni tarafından kodlanmaktadır. *mdeA* geni *S. aureus*'larda genomda bulunmaktadır, kuarterner amonyum bileşikleri ve antibiyotik direnciyle ilgilidir. MdeA proteini 14 transmembran segmenti içerir, QacA ve QacB'de olduğu gibi MFS çoklu ilaç dışarı atılım sisteminin genom kaynaklı bir üyesidir⁽²⁵⁾.

Staphylococcus aureus'lar genel adıyla biyositlere direnç geliştirebilme özelliğinde olan bakterilerdir, direnç gelişiminin bir yolu da sahip oldukları direnç genleri vasıtasıyla olmaktadır. Bu genlerin daha sık izole edilmesinin ve antibiyotiklere dirençli stafilokoklarda antibiyotiklere duyarlı olanlara göre daha sık bulunmasının ise klorheksidin ve kuarterner amonyum bileşikleri gibi katyonik biyositlerin klinik uygulamaya girmesinin bir sonucu olduğu ve bu katyonik biyositlerin klinik ve klinik dışı uygulamalarda sıklıkla kullanımının ilaçlara dirençli stafilokokların seçilimine sebep olabileceği belirtilmektedir^(48,55,56,58). Yine klinik ve

endüstriyel alandan izole edilen kuarterner amonyum bileşiklerine duyarlılığı azalmış stafilokoklar bazı antibiyotiklere çok dirençli bulunmuştur, kuarterner amonyum bileşiklerinin özellikle hayvancılıkta yaygın kullanımına bağlı olarak antibiyotiğe dirençli bakterilerin seçiliminin olduğu ileri sürülmektedir⁽⁶²⁾.

Bu sebeple bakterilerin direnç geni taşıyıp taşımadığını ve sahip olunan genlerin fenotipik yansımasının olup olmadığını bilmek bu bakteri kaynaklı hastane infeksiyonlarının önlenmesinde önemlidir.

2. MATERİYAL ve YÖNTEM

2.1. Bakteri izolasyonu

Mayıs 2005- Haziran 2006 tarihleri arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen klinik örneklerin alındığı materyaller ve hastane infeksiyonu etkeni olma durumları göz önüne alınarak 69 adet metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* ve pozitif kontrol amaçlı dört adet *qacA/B* geni pozitif MRSA ^(Kobayashi, Noguchi) toplam 73 bakteri ile çalışıldı.

Hastane infeksiyonu etkeni olduğu tespit edilen ve yatan hastalara ait çeşitli materyallerden izole edilen toplam 69 adet hastane suşunun tespit edildikleri materyallere göre dağılımı; 20 adet yara yeri, 14 adet kan, 12 adet bronkoalveolar lavaj, 6 adet balgam, 3 adet pü, 2 adet doku biyopsisi, 2 adet abse, 2 adet trakeal aspirat, 2 adet eklem sıvısı, 2 adet burun sürüntüsü, 1 adet beyin omurilik sıvısı, 1 adet kateter, 1 adet periton sıvısı, 1 adet plevra sıvısı şeklindedir (**tablo 2**). Toplam 69 adet hastane suşu MRSA'ların hepsi de farklı hastalardan izole edilmiş ve her hastadan sadece bir adet suş çalışmaya dahil edilmiştir.

Tablo 2 Çalışmamızda kullandığımız MRSA suşlarının izole edildikleri materyallere göre dağılımı

Materyal	Sayısı
Yara yeri	20
Kan	14
Bronkoalveolar lavaj	12
Balgam	6
Pü	3
Doku biyopsisi	2
Abse	2
Trakeal aspirat	2
Eklemleri	2
Burun sürüntüsü	2
* Diğer	4
TOPLAM	69

* Diğer; beyin omurilik sıvısı, kateter, periton sıvısı ve plevra sıvısı.

Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* olarak rapor edilen ve çalışma grubunu oluşturan tüm bakteri suşları çalışma öncesi kanlı agar pasajlanarak koloni morfolojisi, mikroskopik görünümü, katalaz ve koagülaz testleri tekrarlanarak *Staphylococcus aureus* oldukları doğrulandı. Oksasilin metisiline göre daha stabil bir madde olması sebebiyle oksasilin (1µg,Oxoid) kullanılarak CLSI (eski NCCLS) M2 – A9 dökümanına⁽⁷⁵⁾ göre uygulanan disk difüzyon yöntemi ile bakterilerin metisiline direnci kontrol edildikten sonra MRSA tanıları doğrulandı ve bakterilerin saf kültürlerinden saklama şişelerine (microbank, Pro-lab, Kanada) pasajlar

alındı ve moleküler, bakteriyostatik ve bakterisidal çalışmalara kadar bakteri suşları – 30 ° C’de saklandı.

2.2. *qacA/B* dezenfektan direnç genlerinin saptanması

Bakterilerden DNA eldesi

Bakterilerden DNA izolasyonu yapılmadan bir gün önce, dondurularak saklanmış olan bakteri suşları Müller Hilton agar (Biolab, Macaristan) içeren plaklara pasajlandı ve 37 ° C’de 24 saat inkübe edilerek canlandırıldı.

TE (1X TrisEDTA) hazırlanışı: 1 M Tris-Cl’den 1000 µl, 0.5 M EDTA’dan 200 µl alındı ve 100 ml distile su ile karıştırılarak hazırlandı (pH 8.0).

1 ml TE (1X TrisEDTA) içerisinde bakteri süspansiyonu hazırlandı, 6.500 devir/dakika hızda 5 dakika santrifüj edildi (Mikro 22R, Hettich, Almanya) ve üst sıvı atıldı. Bu işlem her bir bakteri için 3 kez olmak üzere tekrarlandı ve böylece yıkama işlemi tamamlandı. Yıkama işlemi sonrasında 200 µl TE içerisinde bakteri süspansiyonları hazırlandı ve 98°C’de 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 14.000 devir/dakika hızda 10 dakika santrifüj yapılarak hücresel atıkların çöktürülmesi sağlandı, içerisinde DNA bulunan üst sıvı temiz tüplere aktarılarak bakterilerden DNA izolasyonu tamamlandı ve bu sıvı daha sonra polimeraz zincir reaksiyonu ile bakteri

suşlarımızdaki *qacA/B* genlerinin saptanması deneylerinde kalıp DNA olarak kullanıldı.

***qacA/B* gen bölgelerinin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılması**

qac direnç genleriyle çalışan araştırmacıların kendi çalışmalarında^(35,41,42) da belirttikleri gibi, basit PZR ile *qacA* ve *qacB* dezenfektan direnç genleri birbirinden ayırt edilemeyeceği için bu genlerin varlığı birlikte araştırılmış, *qacA/B* şeklinde belirtilmiştir. PZR işlemi sırasında her reaksiyonda pozitif ve negatif kontroller kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak dört adet *qacA/B* geni pozitif MRSA^(Kobayashi, Noguchi), negatif kontrol olarak ön deneylerde *qacA/B* negatif bulunan MRSA suşları ve H₂O kullanılmıştır.

Primerlerin seçimi: Polimeraz zincirleme reaksiyonunda kullanılan oligonükleotit primerlerin seçiliminde “National Centre for Biotechnology Information” bünyesinde bulunan “Entrez Nucleotide” nükleotid dizileri veritabanında bulunan *qacA/B* dizilerinden yararlanıldı⁽⁷⁴⁾. Primer tasarımında bu veri tabanında yer alan X56628 kodlu dizi kullanıldı. Dizi üzerinde 849 – 2393 bazlar arasında *qacA* kodlayan bölgesi belirlendi. Bu bölge PerlPrimer 1.1.14 (<http://perlprimer.sourceforge.net/>) (Marshall OJ. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. Bioinformatics 2004 20(15):2471-2472) programına aktarıldı. Primer dimer oluşturma olasılığı en az bulunan primer çiftleri

(NH₄)₂SO₄, 67 mM Tris-HCl (pH 8.8), %0.01 Tween-20, 3 mM MgCl₂, 0.2 mM her bir dNTP (dATP, dGTP, dTTP ve dCTP), 0.6 µM oligonükleotid primer qacA-f, 0.6 µM oligonükleotid primer qacA-r, 0.25 U Taq DNA polimeraz (Bioron, Almanya) ve 0.1 – 1 µg bakteri DNA'sı bulunacak şekilde hazırlandı. Tüpler termal döngü cihazına (Applied Biosystems, Amerika Birleşik Devletleri) yerleştirilerek 95 °C'de 3 dakika denatüre edildi. Denatürasyonun ardından 95°C'de 15 saniye denatürasyon, 60°C'de 45 saniye primer birleşmesi ve 72°C'de 1 dakika uzama olacak şekilde PZR döngüsü 40 kez tekrar edildi. Tüpler son uzama için 72 °C'de 7 dakika inkübe edildi.

PZR ürünlerinin elektroforezi ve görüntülenmesi

PZR sonunda ürünler elektroforez aşamasına kadar + 4 °C'de saklanmıştır, % 2'lik agar içeren TBE jelinde, TBE tamponu içerisinde elektroforezleri yapılmıştır.

Tris Borik Asit EDTA (TBE) tamponunun hazırlanışı; 5X stok çözelti, 800 ml distile suda 54g Tris-base, 27.5 g borik asit, 20 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0) çözünerek 1 litreye tamamlanmıştır. Bu stok çözeltiden alınan bir hacim, dört hacim distile su ile karıştırıldı, böylece agaraz jel hazırlanmasında ve elektroforez işleminde gerekli olan 1X TBE tamponu hazırlanmış oldu.

% 2'lik agaroz jelin hazırlanışı: 75 ml 1X TBE içerisinde 1.5 g agar (Sigma, Almanya) süspanse edilmiş, mikrodalga fırında kaynamadan ısıtılarak agaroz tamamen eritilmiştir. 55°C'de agaroz 20x20 cm tabaklara dökülerek donduruldu ve polimerasyonun ardından 1X TBE tomponu ile doldurulmuş elektroforez tankına alındı.

Örneklerin jele yüklenmesi: Yükleme tamponu deiyonize su içinde %30 (hacim/hacim) gliserol, %0.25 (ağırlık/hacim) orange G (Amresco, Amerika Birleşik Devletleri) kullanılarak 6x konsantrasyonunda hazırlandı. Her reaksiyon tüpünden 4.5 µl örnek 2 µl yükleme tamponu ile karıştırılarak agaroz jelin kuyucuklarına yüklendi. Jelin her sıranın başına ve sonuna DNA moleküler ağırlık standardı (SeeGene, Kore) yüklendi. Yükleme işlemi sonrasında 5 V/cm potansiyel farkı ile elektroforez yapıldı. Orange G boyası jel üzerinde sonraki sıraya ait kuyulara 0.5 cm yaklaştığında elektroforez işlemi sonlandırıldı.

Jelin boyanması ve görüntülenmesi: Elektroforez işlemi sonrasında jel 0.5 µg/ml etidyum bromür (Amresco;ABD) içeren 1X TBE çözeltisinde 30 dakika boyandı, 1X TBE ile yıkandı. UV transillüminatör üzerine aktarılan jel 300 nm UV ile görüntülendi. Görüntüler kamera kullanılarak kaydedildi. (Syngene Bio Imaging, Ingenius, İngiltere). Elde edilen sonuçlar DNA moleküler ağırlık standardı ile karşılaştırıldığında 689 baz çifti ağırlığında bant görülen suşlar *qacA/B* pozitif olarak değerlendirildi (**resim 1**).

2.3. Bakteriyostatik etkinin belirlenmesi

Bu amaçla tüm suşlardaki klorheksidin ve kuarterner amonyum bileşiklerine karşı minimal inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değerleri belirlendi. Etkinliği araştırılacak maddenin azalan konsantrasyonlarında yapılan MİK testi yarı kantitatif özelliktedir. Sürekli kullanılan bir dezenfektan maddenin direnç oluşturma durumunun takip edilmesinde MİK testinin yapılması önerilmektedir⁽¹⁾. MİK değeri inkübasyon sıcaklığı, inkübasyon süresi ve inkübe edilen organizma sayısına bağlı olarak değişebilmektedir⁽³²⁾.

Minimal inhibisyon konsantrasyonunun (MİK) belirlenmesi

Çalışmadan bir gün önce, 69 adet hastane suşu metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* test suşu ve *qacA/B* genine sahip pozitif kontroller Microbank' lerden Müller Hilton agar (Biolab) içeren plaklara pasajlandı, 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Toplam 73 adet bakteri suşunda klorheksidin (Sigma, Almanya) ve benzalkonyum klorür'ün (Sigma, Almanya) her biri için MİK değerlerine mikrodilüsyon yöntemiyle bakıldı.

Tüm bakteri suşlarında klorheksidin ve benzalkonyum klorür'ün 128 µg/ml'den itibaren azalan konsantrasyonlarında MİK çalışması yapıldı. Öncelikle dezenfektan maddelerin 128 µg/ml'lik konsantrasyonları

hazırlandı. Mikroplaklarda dezenfektan konsantrasyonu 128 µg/ml'in ½ oranında azalan konsantrasyonda 128 µg/ml ile 0.125 µg/ml arasında olacak şekilde dilüe edilerek ayarlandı. 5×10^5 bakteri/kuyucuk olacak sayıda bakteri inokülasyonundan sonra Typtone soy broth (TSB) (Fluka; Hindistan) içeren mikroplaklar 37 °C'de 24-48 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda bulanıklığın olmadığı son kuyucuk her bakteri için MİK değeri olarak belirlendi ve kaydedildi. Bu çalışma her iki dezenfektan madde için ayrı ayrı olmak üzere her bakteri suşu için iki kere gerçekleştirildi.

2.4. Bakterisidal etkinin belirlenmesi

Bakterisidal testlerden kantitatif süspansiyon testi yapılarak benzalkonyum klorür ve klorhekzidinin önerilen kullanım konsantrasyonlarındaki bakterisidal etkisi tüm suşlar için belirlendi.

Kantitatif süspansiyon testi ile bakterisidal etkinin belirlenmesi

Kantitatif süspansiyon testi kullanılarak, hastane infeksiyonu etkeni MRSA suşlar ve *qacA/B* genine sahip pozitif kontrollerde klorhekzidin solüsyonu (Savlex; %15 setrimid, %1.5 klorhesidin glukonat, boyar madde ve alkol, DrogSan, Türkiye) ve benzalkonyum klorür solüsyonu (Zefiran forte; 100 cc'de 10 g benzalkonyum klorür, koku verici esans, İlSan, Türkiye) kullanım konsantrasyonlarındaki bakterisidal etkinliği araştırıldı.

Dezenfektan maddelerin üretici firmaların önerdikleri %1'lik ve 1/10 kez seyreltilmiş konsantrasyonlarında 30 saniyedeki bakterisidal etkinliği incelendi.

Tüm suşların distile su içerisindeki süspansiyonları 5 McFarland bulanıklıktan daha yoğun bir bulanıklık oluşturacak şekilde ayarlandı. Çalışma klorhekzidin, benzalkonyum klorür solüsyonları ve kontrol grubu olarak 3 grupta gerçekleştirildi. Ayrıca kullanılan nötralizan madde için nötralizan etkinlik testi yapılarak, nötralizanın antibakteriyel etkisinin olup olmadığı ve antiseptik maddelerin etkisini nötralize edip etmediği incelendi.

Nötralizanın hazırlanması; %0.3 lesitin (Nattermann,Almanya), %0.1 L-histidin (Merck, Almanya), %0.5 sodyum tiyosülfat (Merck, Almanya), %3 Tween 80 (Merck, Almanya) kullanılarak hazırlanmıştır^(14,27).

Klorhekzidin solüsyonunun bakterisidal etkinliğinin belirlenmesi:

Her bakterinin distile su içinde 5 McFarland bulanıklığından daha yoğun olmak üzere süspansiyonları hazırlandı. Bu süspansiyonlardaki bakteri sayısının belirlenmesi amacıyla da, içinde 5 ml distile su bulunan iki ayrı deney tüpü hazırlandı. Bakteri süspansiyonundan önce 10 µl örnek alınarak birinci tüpe, buradan da 10 µl alınarak ikinci tüpe pasajlandı. Daha sonra ikinci tüpten 20 µl örnek alınarak triptik soy agar (TSA) (Fluka, BioChemika) içeren plaklara pasajlandı. 37°C'de 24-48 saat inkübe

edildikten sonra koloni sayımı yapıldı ve böylelikle süspansiyondaki bakteri sayısı hesaplandı.

Klorheksidin solüsyonunun bakterisidal etkisini belirlemek amacıyla her bakteri için iki set deney tüpü hazırlandı. Birinci set tüplere klorheksidin solüsyonunun %0.1'lik sulandırımından 900 µl, ikinci set tüplere ise nötralizan maddeden 900 µl eklendi. Bakteri süspansiyonundan 100 µl alınarak önce birinci set tüplere aktarıldı ve burada 30 saniye bekletildi; 30 saniye sonunda buradan alınan 100µl örnek nötralizan maddeyi içeren ikinci set tüpe aktarıldı ve karıştırıldı. Son aşamada nötralizan içeren tüpten alınan 50 µl örnek TSA içeren plaklara pasajlandı. 37 °C'de 24-48 saat inkübe edildikten sonra koloni sayımı yapıldı. Aynı deney klorheksidin solüsyonunun %1'lik konsantrasyonu için de gerçekleştirildi.

Benzalkonyum klorür solüsyonunun bakterisidal etkinliğini belirlenmesi:

Her bakterinin distile su içinde 5 McFarland bulanıklığından daha yoğun olmak üzere süspansiyonları hazırlandı. Bu süspansiyonlardaki bakteri sayısının belirlenmesi amacıyla da, içinde 5 ml distile su bulunan iki ayrı deney tüpü hazırlandı. Bakteri süspansiyonundan 10 µl örnek alınarak birinci tüpe, buradan da 10 µl alınarak ikinci tüpe pasajlandı. Daha sonra ikinci tüpten 20 µl örnek alınarak triptik soy agar (TSA) (Fluka, BioChemika) içeren plaklara pasajlandı. 37°C'de 24-48 saat inkübe

edildikten sonra koloni sayımı yapıldı ve böylelikle süspansiyondaki bakteri sayısı hesaplandı.

Benzalkonyum klorür solüsyonunun bakterisidal etkisini belirlemek amacıyla her bakteri için iki set deney tüpü hazırlandı. Birinci set tüplere benzalkonyum klorür solüsyonunun %0.1'lik sulandırımından 900 µl, ikinci set tüplere ise nötralizan maddeden 900 µl eklendi. Bakteri süspansiyonundan 100 µl alınarak önce birinci set tüplere aktarıldı ve burada 30 saniye bekletildi; 30 saniye sonunda buradan alınan 100µl örnek nötralizan maddeyi içeren ikinci set tüpe aktarıldı ve karıştırıldı. Son aşamada nötralizan içeren tüpten alınan 50 µl örnek TSA içeren plaklara pasajlandı. 37 °C'de 24-48 saat inkübe edildikten sonra koloni sayımı yapıldı. Aynı deney benzalkonyum klorür solüsyonunun %1'lik konsantrasyonu için de gerçekleştirildi.

Klorhekzidin ve benzalkonyum klorür solüsyonlarının %0.1 ve %1'lik konsantrasyonlarındaki bakterisidal etkileri dezenfektan uygulamasından sonra orijinal ekim büyüklüğüne karşı canlı kalan bakteri sayısı belirlenerek değerlendirildi. 24-48 saat inkübasyon sonunda katı besiyerinde üreyen koloni sayısı belirlendi, koloni tek bir canlı hücreden oluştuğu için, koloniler sayılarak canlı bakteri sayısı belirlenmiş oldu. Bakterisidal etki koloni sayıları belirlendikten sonra klorhekzidin ve benzalkonyum klorür solüsyonlarının %0.1 ve %1'lik konsantrasyonları için ayrı ayrı aşağıdaki

formüle göre hesaplandı. Her bir konsantrasyon için 5 logaritmalık azalma bakterisidal etki olarak belirlendi.

Bakterisidal etki şöyle hesaplandı^(1,70):

$$\text{Bakterisidal etki (BE)} = \log N_C - \log N_D$$

$\log N_C$; kontrol serisinde dezenfektan yerine su kullanılan ortamdan alınan örnekteki koloni sayısı

$\log N_D$; dezenfektan uygulanan gruptan alınan örnekteki koloni sayısı

Nötralizan etkinlik testleri: Dezenfektan maddenin %1'lik konsantrasyonunun bakterisidal etkili olduğu üç bakteri rasgele seçildi. Nötralizan maddenin etkinliğini belirlemek amacıyla; önce nötralizan maddenin antibakteriyel etkisinin olmadığı gösterildi (a), daha sonra nötralizanın dezenfektan maddeyi nötralize ettiği gösterildi (b).

a-) Nötralizan maddenin antibakteriyel etkisinin olmadığını gösterilmesi; çalışılacak bakterilerin 5 McFarland bulanıklığından daha yoğun süspansiyonları hazırlandı. Başlangıçtaki bakteri sayısı belirlemek amacıyla içerisinde 5 ml distile su bulunan birinci ve ikinci set tüplere sırasıyla 10'ar µl bakteri süspansiyonundan eklendi ve 10'ar dakika beklenildi. İkinci set tüplerden 20 µl örnek alınarak TSA içeren plağa pasajlandı. Aynı bakteri süspansiyonundan yine 10 µl alınarak bu kez içinde 5 ml nötralizan madde bulunan tüplere aktarıldı ve burada da 10 dakika bekletildikten sonra 20 µl

örnek TSA içeren plağa pasajlandı. Plaklar 37°C’de 48 saat inkübe edildikten sonra koloni sayımı yapıldı. Her iki plakta da koloni sayısının aynı bulunması, nötralizan maddenin antibakteriyel etkisinin olmadığı şeklinde yorumlandı. Bu test üç ayrı bakteri suşu için iki kez tekrarlandı.

b-) Nötralizan maddenin dezenfektan maddeyi nötralize ettiğinin gösterilmesi; ilk adımda klorhekzidin ve benzalkonyum klorür solüsyonlarının %1’lik konsantrasyonları hazırlandı ve dezenfektan maddelerin bakterisidal etkilerini göstermek için her bakteri için 900 µl bir set klorhekzidin solüsyonu bir sette benzalkonyum klorür solüsyonu içeren tüpler ve her biri için ayrıca 900 µl nötralizan içeren tüpler hazırlandı. Bakteri süspansiyonundan 100 µl örnek önce dezenfektan içeren tüplere alındı, karıştırılıp bir dakika beklendikten sonra 100 µl örnek alınıp nötralizan içeren tüplere eklendi ve karıştırıldı. Nötralizan içeren tüplerden alınan 50 µl örnek TSA içeren plaklara pasajlandı. 37°C’de 24-48 saat inkübasyon sonunda üreme olmadığı görüldü ve bu durum dezenfektan maddelerin %1’lik konsantrasyonlarının bakterisidal etkili olduğu şeklinde yorumlandı.

İkinci adımda dezenfektan maddelerin %10’luk konsantrasyonları hazırlandı, dezenfektan maddelerin %10’luk stok sulandırımıları nötralizan madde ile 10 kat daha sulandırılarak dezenfektan maddelerin %1’lik sulandırımıları hazırlandı ve bundan 900 µl alınarak birinci set tüpler

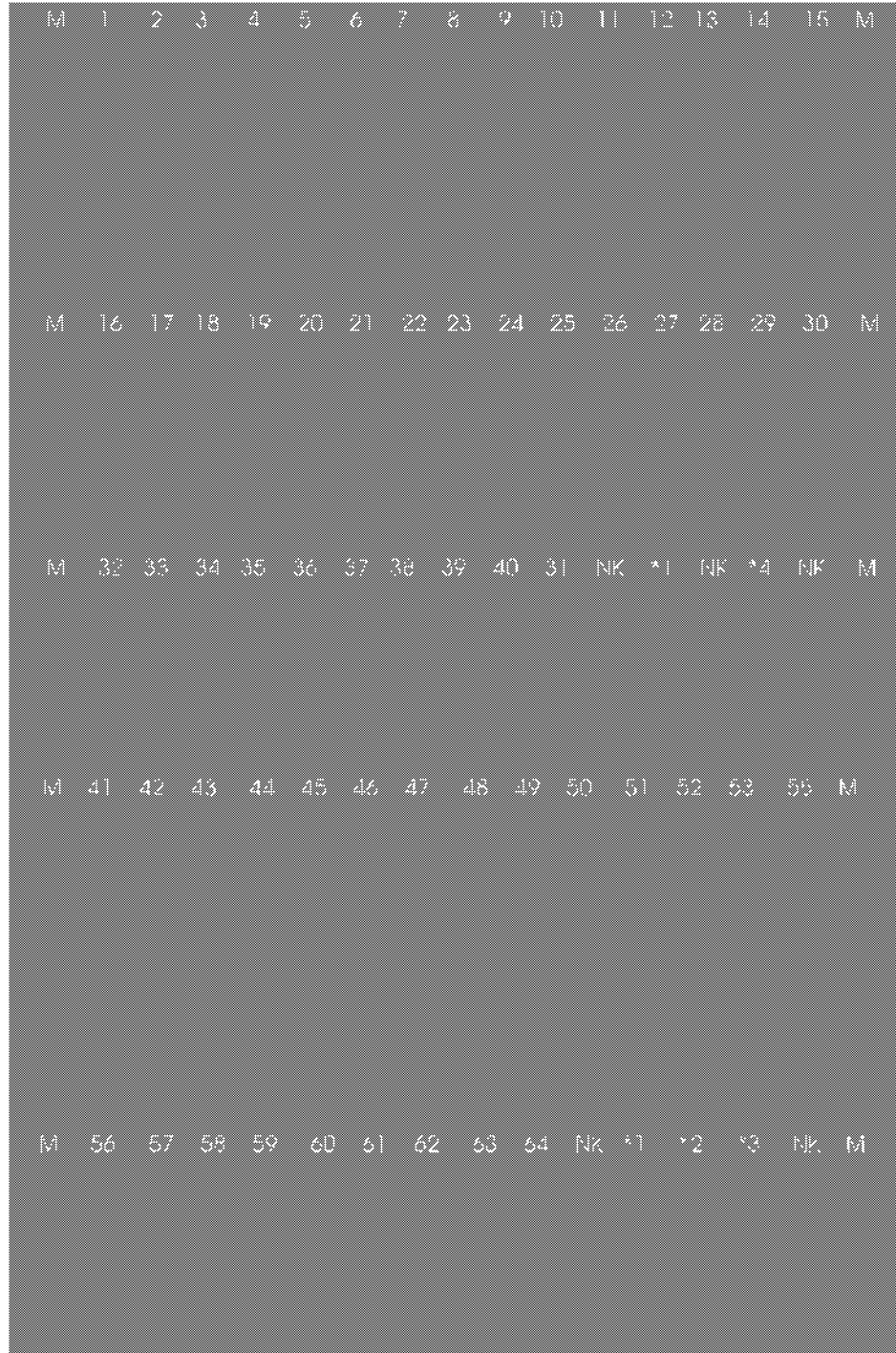
oluşturuldu, ikinci sette tüplerde 900µl nötralizan madde kullanıldı. Bakteri süspansiyonundan 100µl örnek alındı önce nötralizanla sulandırılmış dezenfektan solüsyonuna eklendi, bir dakika sonunda buradan alınan 100 µl örnek nötralizan içeren ikinci set tüpe aktarıldı ve son olarak bu tüplerden alınan 50 µl örnek TSA içeren plakalara pasajlandı. 37°C’de 24-48 saat inkübasyon sonunda plakalarda görülen yoğun üreme daha önce %1’lik konsantrasyonda etkili bulunan dezenfektanların nötralizan madde içinde sulandırıldıklarında nötralize olmaları sebebiyle etkisiz kalmaları ve nötralizan maddenin klorhekzidin ve benzalkonyum klorür solüsyonlarının dezenfektan etkisini nötralize ettiği şeklinde yorumlandı.

3. BULGULAR

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen klinik örneklerden hastane infeksiyonu etkeni olarak izole edilen 69 adet MRSA ve 4 adet *qacA/B* geni pozitif kontrol grubu ile toplam 73 bakteri ile çalışıldı. 69 adet hastane suşunun 8 tanesinde %11.5 oranında *qacA/B* dezenfektan direnç geni tespit edildi. Sonuçlar DNA moleküler ağırlık standardı ile karşılaştırıldığında 689 baz çifti ağırlığında bant görülen suşlar *qacA/B* pozitif olarak değerlendirildi (**resim 1**). 8 adet *qacA/B* geni pozitif bulunan MRSA'ların izole edildikleri materyallere göre dağılımı şu şekildedir. 3 tanesi kan, 2 tanesi yara yeri, 1 tanesi pü, 1 tanesi bronkoalveolar lavaj ve 1 tanesinde burun sürüntüsüdür (**tablo 3**).

Tablo 3 *qacA/B* geni pozitif bulunan MRSA'ların izole edildikleri materyallere göre dağılımı

Materyal	Sayısı
Kan	3
Yara yeri	2
Pü	1
Bronkoalveolar lavaj	1
Burun sürüntüsü	1
TOPLAM	8



Resim 1 Çalışmaya alınan MRSA suşlarının ve kontrol suşlarının PZR işlemi sonrasında jeldeki görüntüsü. NK: negatif kontrol,*1,*2,*3,*4 pozitif kontroller, M: DNA moleküler ağırlık standardı,bantlar yukarıdan aşağıya 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 ve 100 bazçifti olarak görünmektedir. 689 baz çifti hizasında bant veren suşlar *qacA/B* için pozitif kabul edilmiştir.

Bakteriyostatik aktivitenin belirlenmesi amacıyla, hastaneden izole edilen 69 adet MRSA suşunun benzalkonyum klorür ve klorheksidinin her biri için MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri (**tablo 4**) ve MİK değerlerinin dağılımı (**tablo 5**) belirlendi.

Benzalkonyum klorür için MİK değeri 69 adet hastane suşunun 35 tanesinde (%50.72) 2 µg/ml, 27 tanesinde (%39.13) 4 µg/ml, 7 tanesinde (%10.14) 8 µg/ml olarak belirlendi.

qacA/B geni pozitif bulunan 8 hastane suşunun MİK değeri bakterilerin 3 tanesinde (%37.5) 2 µg/ml, 4 tanesinde (%50) 4 µg/ml, 1 tanesinde (%12.5) 8 µg/ml olarak belirlendi (**tablo 6**).

4 adet *qacA/B* geni pozitif kontrolün 1 tanesinde 4 µg/ml, 2 tanesinde 8 µg/ml, 1 tanesinde de 16 µg/ml olarak MİK değeri belirlendi.

Klorheksidin için MİK değeri 69 adet hastane suşunun 41 tanesinde (%59.42) 2 µg/ml, 25 tanesinde (%36.23) 4 µg/ml, 3 tanesinde (%4.34) 8 µg/ml olarak belirlendi.

qacA/B geni pozitif bulunan 8 hastane suşunun MİK değeri bakterilerin 3 tanesinde (%37.5) 2 µg/ml, 4 tanesinde (%50) 4 µg/ml, 1 tanesinde (%12.5) 8 µg/ml olarak belirlendi (**tablo 6**).

4 adet *qacA/B* geni pozitif kontrolün 3 tanesinde 4 µg/ml, 1 tanesinde 8 µg/ml olarak MİK değeri belirlendi.

Tablo 4. Benzalkonyum klorür ve klorheksidinin MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri

	MİK aralığı (µg/ml)	MİK ₅₀	MİK ₉₀
Benzalkonyum klorür	2-8 µg/ml	2 µg/ml	8 µg/ml
Klorheksidin	2-8 µg/ml	2 µg/ml	4 µg/ml

Tablo 5 Hastaneden izole edilen MRSA suşlarında benzalkonyum klorür ve klorheksidin için MİK değerlerinin dağılımı

MİK değeri (µg/ml)	Benzalkonyum klorür (%)	Klorheksidin (%)
2 µg/ml	35 (%50,72)	41 (%59,42)
4 µg/ml	27 (%39,13)	25 (%36,23)
8 µg/ml	7 (%10,14)	3 (% 4,34)
TOPLAM	69	69

Tablo 6 *qacA/B* dezenfektan direnç geni bulunan hastane suşu MRSA’larda benzalkonyum klorür ve klorheksidin için MİK değerlerinin dağılımı

MİK değeri (µg/ml)	Benzalkonyum klorür (%)	Klorheksidin (%)
2 µg/ml	3 (%37,5)	3 (%37,5)
4 µg/ml	4 (%50)	4 (%50)
8 µg/ml	1 (%12,5)	1 (%12,5)
TOPLAM	8	8

Sadece MİK değerleri dikkate alınıp < 2µg/ml ve 2 µg/ml değerler benzalkonyum klorür ve klorheksidin için duyarlı olarak kabul edildiği takdirde, bakterilerin %59.42'i klorheksidine duyarlı, %50.72'si de benzalkonyum klorüre duyarlı bulunmaktadır. Bu sonuçlara göre klorheksidin hastane infeksiyonu etkeni olarak izole ettiğimiz MRSA'lar üzerinde daha etkili görülmektedir. Ancak hastane infeksiyonu etkeni olan MRSA'lar üzerinde %59.42'i klorheksidine duyarlılığı ve %50.72 benzalkonyum klorüre duyarlılığı arasında SPSS 10.0 programında yapılan “ki-kare” testiyle istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. (p>0.05)

Benzalkonyum klorür ve klorheksidin için < 2 µg/ml ve 2 µg/ml değerleri duyarlı kabul edildiğinde ise *qacA/B* geni pozitif bulunan MRSA'larda bakterilerin %37.5'i hem klorheksidine ve hem de benzalkonyum klorüre duyarlı bulunmaktadır. Direnç geni saptanan MRSA'larda klorheksidin ve benzalkonyum klorür duyarlılığı açısından bir fark bulunmamaktadır.

Bakterisidal etkinin belirlenmesi amacıyla Klorheksidin ve benzalkonyum klorür solüsyonlarının %0.1 ve %1'lik konsantrasyonları için kantitatif süspansiyon testi yapıldı.

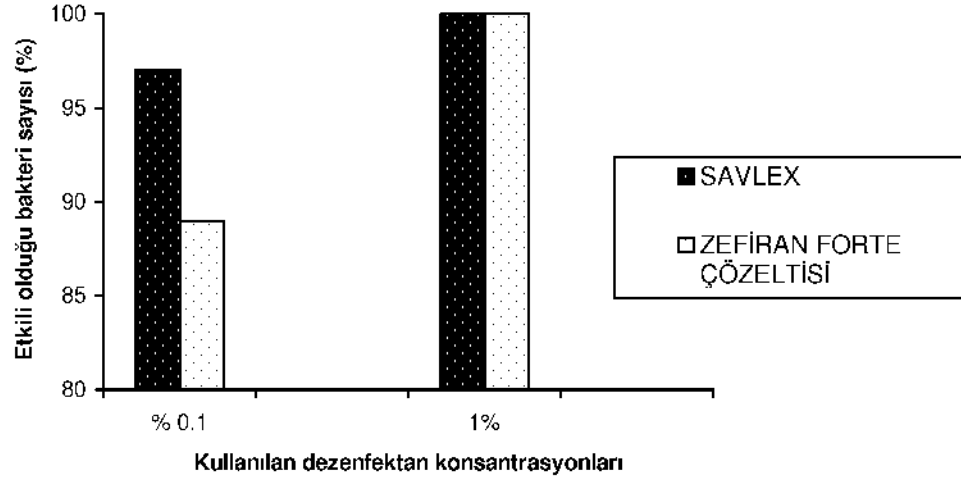
Klorheksidin solüsyonunun %0.1'lik konsantrasyonu 69 adet hastane suşunun 67 tanesinde (%97.10) bakterisidal etkili bulundu, 2 tanesinde

(%2.90) bakterisidal olarak etkisiz bulundu. %0.1'lik konsantrasyonda bakterisidal etkinin bulunmadığı suşlarda %1'lik konsantrasyonda test tekrarlanarak bakterisidal etki araştırıldı ve dezenfektan maddenin %1'lik konsantrasyonu bakterisidal etkili bulundu. Klorheksidin solüsyonunun %0.1'lik konsantrasyonunun bakterisidal olarak etkisiz bulunduğu 2 bakteri suşunda benzalkonyum klorür solüsyonu %0.1'lik konsantrasyonları bakterisidal etkilidir ve klorheksidin MİK değerleri 2 - 4 µg/ml arasında değişmektedir. 4 adet *qacA/B* geni pozitif kontrolün ise 2 tanesinde %0.1'lik konsantrasyon bakterisidal olarak etkisiz bulunurken %1'lik konsantrasyon etkili bulunmuştur. Bu bakterilerde benzalkonyum klorür solüsyonu %0.1'lik konsantrasyonlarında bakterisidal olarak etkisizdir, klorheksidin MİK değerleri ise 4 - 8 µg/ml arasında değişmektedir.

Benzalkonyum klorür solüsyonunun %0.1'lik konsantrasyonu 69 adet hastane suşunun 62 tanesinde (%89.85) bakterisidal olarak etkili bulundu, 7 tanesinde (%10.15) bakterisidal olarak etkisiz bulundu. %0.1'lik konsantrasyonda bakterisidal etkinin bulunmadığı suşlarda %1'lik dezenfektan konsantrasyonunda test tekrarlandı ve benzalkonyum klorür solüsyonu %1'lik konsantrasyonu bakterisidal etkili bulundu. Benzalkonyum klorür solüsyonunun %1'lik konsantrasyonunun bakterisidal etkili bulunduğu bakterilerin hepsinde klorheksidin solüsyonunun %0.1'lik konsantrasyonu bakterisidal etkilidir. Benzalkonyum klorür için MİK değerleri 2 - 8 µg/ml arasında değişmektedir. 4 adet *qacA/B* geni pozitif

kontrolün ise iki tanesinde benzalkonyum klorür solüsyonunun %0.1'lik konsantrasyonu bakterisidal olarak etkisiz bulunurken, %1'lik konsantrasyonu etkili bulunmuştur. Bu bakterilerde klorhekzidin solüsyonunun %0.1'lik konsantrasyonları da etkisiz bulunmuştur, benzalkonyum klorür MİK değerleri ise 4 - 8 µg/ml arasında değişmektedir.

Bakterisidal test sonuçlarına göre hastane infeksiyonu etkeni olarak izole edilen MRSA'larda %0.1'lik kullanım konsantrasyonunda klorhekzidin solüsyonu %97.10, benzalkonyum klorür solüsyonu ise %89.85 bakterisidal etkilidir (şekil 5). Bu orana göre %0.1'lik klorhekzidin solüsyonu MRSA'lar üzerinde bakterisidal olarak daha etkili görünmesine rağmen, %0.1'lik klorhekzidin solüsyonunun etkisiz olduğu bakterilerde %0.1'lik benzalkonyum klorür solüsyonu bakterisidal etkili bulunmuştur. %0.1'lik benzalkonyum klorür solüsyonunun etkisiz olduğu bakteri suşlarında da %0.1'lik klorhekzidin solüsyonu bakterisidal etkili bulunmuştur. Bu sebeple bu dezenfektan maddelerin %0.1'lik konsantrasyonlarının %89.85 – %97.10 oranında bakterisidal etkilidirler denilebilir. İki dezenfektan maddenin %0.1'lik konsantrasyonlarının bakterisidal etkileri arasında SPSS 10.0 programında yapılan “ki-kare” testiyle istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Dezenfektan maddelerin %1'lik konsantrasyonları ise çalışılan tüm bakteri suşlarında bakterisidal etkili bulunduğundan bu sonuçlarla ilgili olarak istatistiksel hesaplama yapılmamıştır.



Şekil 5 Klorhekzidin ve benzalkonyum klorür solüsyonlarının %0.1 ve %1’lik kullanım konsantrasyonlarında 30 saniyedeki bakterisidal etkinlikleri

Klorhekzidin solüsyonunun %0.1’lik konsantrasyonun bakterisidal etkili olduğu 67 hastane suşunun %59.70’inde (40/67) klorhekzidin için MİK değeri 2 µg/ml bulunmuştur. %40.30’unda ise MİK değeri 2 µg/ml’nin üzerinde bulunmasına rağmen bu bakterilerde klorhekzidin solüsyonunun %0.1’lik konsantrasyonu bakterisidal etkili bulunmuştur.

Benzalkonyum klorür solüsyonunun %0.1’lik konsantrasyonunun bakterisidal etkili olduğu 62 hastane suşunun %50’sinde (31/62) benzalkonyum klorür MİK değeri 2 µg/ml bulunmuştur. Diğer %50’de ise MİK değeri 2 µg/ml’nin üzerinde bulunmasına rağmen benzalkonyum klorür solüsyonunun %0.1’lik konsantrasyonu bakterisidal etkili

bulunmuştur. Bu sonuçlar dikkate alındığında artmış MİK değerleri ile bakterisidal etki arasında bir ilişki bulunmamaktadır.

Sonuç olarak çalışmamızda polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile *qacA/B* geni pozitifliği tespit ettiğimiz MRSA suşlarının hepsi için klorhekzidin ve benzalkonyum klorür solüsyonlarının %0.1'lik konsantrasyonları bakterisidal etkili bulunmuştur. Klorhekzidin ve benzalkonyum klorür solüsyonları için üretici firmaların dezenfektan amaçlı kullanım için önerdikleri %1'lik konsantrasyon dikkate alındığında önerilen konsantrasyonun 10 katı sulandırımın direnç geni bulunan bakterilerde dahi bakterisidal etkili bulunuşu sevindiricidir.

4. TARTIŞMA

Günümüzde hastane infeksiyonları önem arzetmektedir ve bu infeksiyonların önlenmesinde hastanemizde dahil olmak üzere yaygın şekilde dezenfektan maddeler kullanılmaktadır. Hastane infeksiyonu etkeni olabilen metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)'ların çok sayıda antibiyotik maddeye olduğu gibi dezenfektan maddelerede dirençli olabildikleri bilinmektedir. Hastane ortamı ve yatan hastalardan izole edilen bakteri suşları dezenfektanlara laboratuvar suşlarından daha az duyarlıdır, bu durumun temelinde seleksiyon ve mutasyonlar önemli rol oynamaktadır.

Dezenfektan ve antiseptik maddeler hastaneler ve hastaneler dışındaki sağlık kuruluşları yanı sıra, veterinerlik alanında, farmakolojide, kozmetik sanayisinde, evlerde ve gıda sektöründe yaygın kullanım alanlarına sahiptir. Bu maddelerin yaygın kullanımlarının bakteri türleri arasında direnç faktörlerinin korunmasına neden olabileceği, ayrıca ortamda bulunan kalıntıların biyosit ve antibiyotik dirençli bakteri türlerinin seçimine yol açabileceği düşünülmektedir^(4,51,57,58). Bu konuyla ilgili olarak destekleyici ve epidemiyolojik çalışmalara gerek vardır, bu da ancak direncin kaynağının ortaya konulabilmesiyle mümkündür.

Biyosit direncinin bakteriler arasında kromozom dışında plazmid gibi hareketli genetik elemanlarla aktarımı ve bu plazmidlerin bir den çok direnç

özelliğini taşıyan genleri de barındırması, biyositlere dirençli bakteri türlerinin aynı zamanda antibiyotik maddelere, antibiyotik maddelere dirençli türlerinde aynı zamanda biyositlere dirençli olabileceği fikrini akla getirmektedir⁽⁶⁷⁾. Bu çapraz direnç durumu gelecekte daha dirençli bakteri türlerinin seçilimin neden olabilir bu sebeple de direncin kaynağının belirlenmesi önemlidir.

Ekolojik ve epidemiolojik verilere göre dirençli stafilokokların hastanelerde yayılmasının sebebi bazı araştırmacılara göre, antiseptik ve antibiyotiklerin her ikisinin de kullanılıyor olmasıdır^(60,62). Kuarterner amonyum bileşikleri gibi katyonik biyositlerin yaygın kullanımının çoklu ilaç dışarı atılım pompasına sahip, *qac* genleri bulunan bakterilerin seçilimine neden olduğu düşünülmektedir⁽⁶⁰⁾. Akimitsu ve ark.⁽²⁾ yaptıkları çalışma da MRSA’larda bazı durumlarda biyosit ve antibiyotik direnci arasında ilişki olduğu yönündedir, biyositlerin klinik uygulamaya girmesinin yanı sıra oluşan bazı mutasyonlar antibiyotiğe dirençli bakterilerin seçilimine yol açabilir. Bu çalışmada MRSA’larda benzalkonyum klorür MİK değerinin > 5µg/ml olarak verilmiş, oksasilin MİK değeri daha yüksek bulunan MRSA’larda ise benzalkonyum klorür MİK değeri 10 µg/ml olarak belirtilmiştir. Oksasiline karşı artmış MİK değeri gösteren *S. aureus*’larda klorhekzidin, benzalkonyum klorür, hekzamin ve akriflavine karşı duyarlılık azalmaktadır. Çoklu ilaç direncini kodlayan genler bu 4 biyosite dirençli

suşların % 70'inde bulunurken, tek bir biyosite dirençli suşların % 45'inde saptanmıştır⁽³⁷⁾.

Ev gibi hastane dışı ortamlarda sıklıkla subletal konsantrasyonlarda kullanılan kuarterner amonyum bileşikleri, bu biyositlere karşı çevrede yaygın olan ve potansiyel patojen olan bakterilerden dirençli olanların seçilimine yol açar⁽³⁶⁾. Bu durumda ev gibi ortamlarda dezenfektan maddelerin subletal konsantrasyonlarda kullanıldıklarında dirençli bakteri türlerin seçiliminde potansiyel olarak riskli olan alanlar oldukları söylenebilir.

Mayer ve arkadaşları⁽³⁵⁾ 1997-1999 yıllarında Avrupa'nın farklı şehirlerinden topladıkları kan ve yara yeri kültürlerinden izole edilmiş, 297 adet MRSA ve 200 adet MSSA toplam 497 *S. aureus* suşunda dezenfektan direnç genlerinin prevalansını ve dağılımını incelemişlerdir. MRSA'ların % 63'ünde (186/297), MSSA'ların ise % 12'sinde (24/200) *qacA/B* direnç genlerini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar tarafından *qacA/B* genlerin prevalansının yüksek bulunuşunu, infeksiyon önleyici ajanların hastanelerde yaygın kullanımının zorunlu seçici etkisi olarak yorumlanmıştır. Ayrıca MRSA'larda *qacA/B* direnç genlerin MSSA'lara göre daha yüksek oranda bulunması, bu genlerin çoklu ilaç direnci taşıyan plazmidlerde yaygın bulunuşunun bir sonucu olarak yorumlamışlardır. Bu çalışmada görüldüğü gibi dezenfektan direnç genleri Avrupa'da lokal değil yaygın bir problemdir.

Noguchi, Suwa ve ark.⁽⁴²⁾ 11 Asya ülkesinden izole ettikleri MRSA suşlarında dezenfektan direnç genlerin bulunması, dağılımı ve çeşitli dezenfektan maddelere direnci ile ilgili yaptıkları çalışmada %41.6 (372/894) oranında *qacA/B* direnç geni tespit etmişlerdir. 11 ülke tek tek ele alındığında genlerin bulunma olasılığı %5 (Çin) ile %72 (Singapur) arasında değişmektedir. MRSA suşlarının benzalkonyum klorür için MİK değerleri 1-16 µg/ml arasında değişirken, klorheksidin için MİK değerleri < 0.5-16 µg/ml arasında değişmektedir. Araştırmacılar çalışmalarının sonucu *qacA/B* direnç geninin Asya'daki MRSA türleri arasında antiseptik direncinde büyük rol oynadığı, spesifik MRSA'lardaki *qacA/B* gen dizisinin korunduğu, *qacA/B* genlerinin Asya'da *smr* genlerinden daha yaygın olduğu yönündedir.

Noguchi, Hase ve ark.⁽⁴⁰⁾ 98 MRSA suşunda antiseptik direnci ile ilgili *qacA/B* ve *smr* genlerinin dağılımını ve antiseptik maddelere duyarlılığını incelemişlerdir. %10.2 (10/98) oranında *qacA/B* geni pozitifliği, %20.4 (20/98) oranında *smr* geni pozitifliği belirlemişlerdir. Antiseptiklere dirençli toplam 71 bakterinin 41 tanesinde bu iki gen grubunun bulunmadığı belirtilmiştir. *qacA/B* geni içeren bakterilerde klorheksidin ve benzalkonyum klorür için MİK değerleri 3.13-12.5 µg/ml olarak aynı verilmiştir. Araştırmacılar direnç geni bulunmayan 41 bakterideki direnç durumu, plazmid konjugasyonu yada transformasyonla transfer edilmiş olabileceği şeklinde açıklamışlardır. Bizim çalışmamızda da yukarıdaki çalışmalara benzer şekilde hastane infeksiyonu etkeni olarak tespit edilen MRSA'larda

öncelikle *qacA/B* dezenfektan direnç genlerinin varlığı araştırılmış ve %11.5 oranında gen pozitifliği tespit edilmiştir. *qacA/B* direnç geni taşıyan bakterilerde benzalkonyum klorür ve klorhekzidin MİK değerleri aynı ve 2 – 8 µg/ml arasında bulunmuştur. 2µg/ml ve altındaki MİK değerleri duyarlı kabul edildiği durumda direnç geni bulunmayan bakteri suşlarında da 4 ve 8 µg/ml değerinde yüksek MİK değerleri bulunmuştur.

Noguchi, Nakaminami ve ark.⁽⁴¹⁾ çalışma gruplarındaki bakterilerden impetigo ve SSSS (Staphylococcal Scalled Skin Syndrome) dışındaki klinik MRSA suşlarında %45.9 (95/207) oranında *qacA/B* geni pozitifliği tespit etmişlerdir. 95 adet *qacA/B* geni pozitif MRSA suşunda klorhekzidin glukonat ve benzalkonyum klorür MİK değerlerini aynı oranlarda 1-8 µg/ml olarak belirtmişlerdir. Impetigo ve SSSS hastalarından izole ettikleri MRSA’larda %1.3 (1/76) oranında *qacA/B* geni pozitifliği bulmuşlar, bu suşlar için klorhekzidin glukonat için MİK değerini 1-4 µg/ml, benzalkonyum klorür için MİK değerini ise 2-4 µg/ml olarak belirtmişlerdir. Ayrıca spesifik MRSA klonları arasında taşınan *qacA/B* genlerinin yaygın olmadığını ama farklı MRSA klonları arasında horizontal olarak transfer edilebildiğini ileri sürmüşlerdir. Yine aynı araştırmacılar MRSA’larda direnç genlerinin bulunma oranının artmasına bağlı olarak benzalkonyum klorür ve klorhekzidin MİK değerinde artış olduğunda belirtmektedir. Bizim çalışmamız sonucunda *qacA/B* direnç geni bulunan ve bulunmayan tüm MRSA suşlarında klorhekzidin ve benzalkonyum klorür için MİK

değerlerinin dağılımı 2 – 8 µg/ml arasında bulunmuştur. *qacA/B* geni pozitif bulunan MRSA suşlarında MİK değerine göre benzalkonyum klorür ve klorheksidin aynı oranda etkili dezenfektanlar olarak belirlenirken tüm MRSA suşları dikkate alındığında klorheksidin daha etkili bir dezenfektan olarak görülmektedir(**tablo 5 ve tablo 6**).

Heir ve ark.⁽²³⁾ kuarterner amonyum bileşiklerine dirençli stafilocokların gıda endüstrisinde yaygın olarak görüldüğünü belirtmektedir. Bu bileşiklere dirençten sorumlu olan genler klinikten izole edilen türlerde olduğu gibi *qacA*, *qacB*, *qacC* ve *qacD* direnç genleridir. Çalışmaya alınan 24 adet stafilocok türünün hepsi kuarterner amonyum bileşiklerine dirençli olarak belirtilmiştir. Bakterilerin %29’unda (7/24) *qacA/B* geni pozitif bulunmuştur. Ayrıca *qacA/B* geni taşıyan bakterilerin %71’inde (5/7) penisilin G ve ampisiline yüksek oranda direnç tespit edilmiştir. Benzalkonyum klorür için MİK değeri 1µg/ml bulunurken, klorheksidin için MİK değeri 0.25 µg/ml bulunmuştur.

Sundheim ve ark.⁽⁷¹⁾ gıda endüstrisinden izole ettikleri stafilocok türlerinde, *qacA/B* ve *qacC/D* dezenfektan direnç genlerini taşıyan türlerinde benzalkonyum klorür için MİK değerlerini araştırmışlardır. < 2 µg/ml MİK değerini duyarlı olarak, 4-11 µg/ml MİK değerlerini ise dirençli olarak kabul ettikleri çalışmalarında *qacA/B* ve *qacC/D* genlerini taşıyan bakteri suşların benzalkonyum klorüre MİK değerlerine göre dirençli bulmuşlardır. *qacA/B*

geni içeren türlerde MİK değeri 5.5-7.1 µg/ml arasında değişmektedir. Araştırmacılar ayrıca kuarternar amonyum bileşiklerinin 30-40°C gibi yüksek sıcaklıklarda uygulandıklarında bakterisidal etkilerinin arttığını da yaptıkları çalışmada belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise benzalkonyum klorür ve klorhekzidin için 2 µg/ml'nin üzerindeki MİK değerlerine sahip MRSA'lar dirençli olarak yorumlandığında, *qacA/B* direnç geni tespit ettiğimiz bakterilerin %62.5'i hem benzalkonyum klorüre hem de klorhekzidine dirençli bulunmuştur(**tablo 6**).

Mitchell ve ark.⁽³⁸⁾ *qacA* geni ile ilişkili olarak QacA proteini bulunan *Staphylococcus aureus* türlerinde klorhekzidin diglukonat ve klorhekzidin dihidroklorit MİK değerleri eşit ve 12 µg/ml, *qacB* geni ile ilişkili olarak QacB proteinin bulunan *S. aureus* türlerinde ise MİK değerleri eşit ve 6 µg/ml olarak belirtilmiştir.

Littlejohn ve ark.⁽³⁴⁾ *qacA* ve *qacB* direnç genlerini taşıyan plazmidleri içeren klinik *S. aureus* suşlarında klorhekzidin için MİK değerini 0.8-2 µg/ml, benzalkonyum klorür için MİK değerini ise 6 µg/ml olarak vermişlerdir. McDonnell ve ark.⁽³⁷⁾ *Staphylococcus aureus* için benzalkonyum klorür ve klorhekzidin için MİK değerlerini sırasıyla 0.5 µg/ml ve 0.5-1 µg/ml olarak belirtilmiştir, ayrıca *qacA/B* ve *qacC/D* gen dizileri taşıyan MRSA'larda katyonik ajanlara karşı MİK değerinin artabileceğinden bahsetmişlerdir. Farklı *qac* dezenfektan direnç genlerini içeren stafilokoklarda benzalkonyum

klorür ve klorheksidine MİK değerleri şöyle verilmiştir. *qacA*, *qacB*, *qacC* ve *qacD* genlerini taşıyan bakterilerin hepsinde benzalkonyum klorür için MİK değeri $> 3\mu\text{g/ml}$ olarak verilmiş, *qacA* geni taşıyan bakterilerde klorheksidin için MİK değeri $2.5\ \mu\text{g/ml}$, *qacB*, *qacC* ve *qacD* taşıyan bakterilerde klorheksidin MİK değeri ise $1\ \mu\text{g/ml}$ olarak belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda *qacA/B* dezenfektan direnç geni tespit ettiğimiz MRSA'ların benzalkonyum klorür ve klorheksidin MİK değerlerinin dağılımı aynı ve bakterilerin %37.5'inde $2\ \mu\text{g/ml}$, %50'sinde $4\ \mu\text{g/ml}$, %12.5'inde $8\ \mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur.(**tablo 6**)

Russell⁽⁶⁰⁾ İngiltere'de MRSA üzerinde yaptığı çalışmada triklorozan ve katyonik biyositlerden klorheksidin ile çalışmış, klorheksidin için MİK değerini $0.25\text{-}4\ \mu\text{g/ml}$ olarak belirtmiştir. Al-Masaudi ve ark.⁽³⁾ MRSA'ların bazı antibiyotik, antiseptik ve dezenfektanlara duyarlılıklarını inceledikleri çalışmalarında klorheksidin için MİK değerini $2\text{-}2.5\ \mu\text{g/ml}$, benzalkonyum klorür için MİK değerini $2.5\text{-}5\ \mu\text{g/ml}$ olarak belirtmişler ve MRSA'ların kuarterner amonyum bileşiklerine klorheksidine göre daha az duyarlı olarak belirtmişlerdir. Çalışmamızda bu araştırmacıların yaptıkları çalışmalarla tutarlı olacak şekilde $< 2\mu\text{g/ml}$ ve $2\ \mu\text{g/ml}$ MİK değerleri duyarlı kabul edildiği takdirde MRSA'larda kuarterner amonyum bileşiği olarak kullandığımız benzalkonyum klorüre duyarlılığın, klorheksidin duyarlılığından daha az olduğu görülmektedir.

Furman ve ark.⁽⁵⁾ farklı kliniklerden izole edilen hastane infeksiyonu etkenleri arasında MRSA ve MSSA'larında bulunduğu farklı bakterilerde klorheksidin duyarlılığı ve yoğun klorheksidin kullanımı arasındaki ilişkiyi araştırmaya yönelik yaptıkları çalışmada, bakterilerin klorheksidin duyarlılıkları MİK ve disk diffüzyon yöntemi ile incelenmiştir. İstatiksel olarak klorheksidin kullanım konsantrasyonu ile bütün mikroorganizmaların duyarlılığı arasında ters ilişki bulmuşlardır. Araştırmacıların çalışmaları sonucunda stafilokoklar diğer bakterilerle kıyaslandığında klorheksidine daha duyarlı bulunmuştur. MSSA'larda klorheksidin MİK değerleri 1-64 µg/ml arasında değişirken MRSA'larda 0.5-8 µg/ml arasında değişmektedir. Ayrıca hastane infeksiyonu etkeni olarak izole edilen mikroorganizmaların klorheksidine duyarlılığı ile klinik servislerde kullanılan klorheksidin yoğunluğu arasında negatif bir ilişki olduğu gösterilmiştir.

Furman ve arkadaşlarının aksine Cookson ve ark.⁽¹²⁾ MRSA suşlarında MSSA'larla karşılaştırıldığında klorheksidin MİK değerinin yüksek olduğunu belirtmişlerdir. MRSA'larda klorheksidin için MİKdeğerini 4.19 µg/ml olarak vermişlerdir. Irizarry ve ark.⁽²⁶⁾ MRSA suşlarında klorheksidin ve kuarterner amonyum bileşiğine MİK değerinin MSSA suşlarına göre 5-10 kat fazla bulmuşlardır. MRSA'larda klorheksidin için MİK değerini 5-10 µg/ml olarak belirtmişlerdir. MİK değerleri göz önüne alındığında MRSA türleri MSSA'lara göre dezenfektan maddelere daha dirençlidir ancak bu

maddeler klinik uygulamada MİK değerlerin yüz yada bin katı konsantrasyonlarda kullanıldıklarından bu ilişki klinikte gösterilememiştir.

Gram pozitif bakteriler için klorhekzidin MİK değeri genel olarak 1 µg/ml belirtilmektedir⁽⁶⁴⁾. Suller ve ark.⁽⁶⁹⁾ MRSA'larda agar diffüzyonu yöntemi ile yaptıkları MİK çalışmasında benzalkonyum klorür için MİK değerini 1.5-4 µg/ml, klorhekzidin MİK değerini ise 1.5-3 µg/ml olarak bulmuşlardır. Lambert⁽³¹⁾ klinik *S. aureus* şuşlarında benzalkonyum klorür için MİK değerini 2 µg/ml, klorhekzidin için MİK değerini 3.1 µg/ml olarak belirtmiştir. Bu araştırmacıların sonuçları ile kıyaslandığında çalışma grubumuzu oluşturan bakterilerin benzalkonyum klorür ve klorhekzidin MİK değerlerinin yüksek bulunduğu görülmektedir.

Klorhekzidin ve triklorazan ile yapılan çalışmalarda⁽³⁷⁾ MİK değerlerinin yükselmesinin bakterisidal etkiyi etkilemediği gösterilmiş ve bu durum biyositlerin antibiyotiklerden farklı olarak çok sayıda hedef bölgeye sahip olmasıyla açıklanmıştır. Çalışmamızda benzer şekilde benzalkonyum klorür ve klorhekzidin MİK değeri yüksek bulunan bakteri şuşlarının bu etken maddeleri içeren benzalkonyum klorür ve klorhekzidin solüsyonlarının önerilen kullanım konsantrasyonlarına ve 10 kat sulandırımına duyarlı oldukları gözlenmiştir.

Rutala ve ark.⁽⁶⁷⁾ antibiyotikler duyarlı standart suşlar ve antibiyotikler dirençli hastane suşlarından oluşan Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerde benzalkonyum klorürün üretici firma tarafından önerilen %3'lük konsantrasyonunda %95 oranında bakterisidal etkili, %1.5'lik konsantrasyonunda ise %91 oranında bakterisidal etkili bulmuşlardır. Ayrıca rutin olarak antibiyotiklere dirençli olan bakterilerde dezenfektan duyarlılığına bakmanın gerekli olmadığını belirtmişlerdir. Çalışmamızda çok sayıda antibiyotiğe dirençli MRSA suşlarında benzalkonyum klorür içerikli dezenfektanın üretici firma tarafından önerilen konsantrasyonunun %100, 10 kat sulandırımının ise %89.95 oranında bakterisidal etkili bulunmasına rağmen dezenfektan duyarlılık testlerinin yapılmasının önemli olduğunu düşünmekteyiz.

Rutala, Barbee ve ark.⁽⁶⁶⁾ Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerde benzalkonyum klorür içerikli ticari bir ev dezenfektanın 30 saniyede ve 5 dakikadaki bakterisidal etkisini kantitatif süspansiyon testi yaparak incelemişler ve dezenfektanın önerilen konsantrasyonlarının bu sürelerde bakterisidal etkili olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışma kuarternar amonyum bileşiklerinin evlerde dahil olmak üzere çok amaçlı yaygın olarak kullanıldığını göstermektedir.

Huang, Oie ve ark.⁽⁴³⁾ MRSA'lar üzerinde dezenfektan maddelerin bakterisidal etkilerini incelemişlerdir, %0.1'lik klorhekzidin glukonat 10

dakikada tüm bakteriler üzerinde bakterisidal etkili bulunmuştur. Aynı testi biyofilm içerisindeki bakterilere yaptıklarında klorhekzidin glukonatın %1, %0.5 ve %0.1'lik konsantrasyonları 60 dakikada bile bakterisidal olarak etkisiz bulunmuştur. Biyofilm içerisinde benzalkonyum klorürün %1'lik konsantrasyonu 10 dakikada bakterisidal etkili bulunurken, %0.5'lik konsantrasyonu ise 30 dakikada bakterisidal olarak etkili bulunmuş, biyofilm içerisindeki MRSA'larda benzalkonyum klorürün klorhekzidine göre bakterisidal etkisinin daha fazla olduğu belirtilmiştir.

Kobayashi ve ark.⁽²⁹⁾ MRSA suşlarında benzalkonyum klorür ve klorhekzidin glukonat için MİK değerini suşların %30'unda yüksek bulmuşlardır. Buna karşılık klorhekzidin glukonatın %0.5, %0.1 ve %0.05'lik konsantrasyonları 30, 60 ve 180. dakikalarda bakterisidal olarak etkisiz bulunmuştur. Benzalkonyum klorürün ise % 0.05'lik konsantrasyonları aynı sürelerde etkisiz bulunurken %0.5 ve %0.1'lik konsantrasyonları bazı suşlarda bakterisidal olarak etkili bulunmuştur. Ayrıca MİK değerinin antiseptik ve dezenfektan madde etkinliğini belirlemede gerekli olmadığı vurgulanmıştır. Araştırmacılar benzalkonyum klorür ve klorhekzidin etanol içerisinde çözündüklerinde MRSA'lar üzerindeki bakterisidal etkilerinin arttığında belirtmektedir. Bizim çalışmamızda benzer şekilde klorhekzidin ve benzalkonyum klorür için MİK değerleri sırasıyla %40.57 - %49.27 oranında yüksek bulunmasına rağmen, benzalkonyum klorür ve klorhekzidin içeren dezenfektan maddelerin

%0.1'lik konsantrasyonları 30 saniyede %89.85 - %97.10 oranında bakterisidal etkili bulunmuştur. Ayrıca MİK değerinin antiseptik ve dezenfektan madde etkinliğini belirlemede gerekli olmadığı fikri de desteklenmektedir.

Güneri ve ark.⁽²¹⁾ bazı dezenfektanlar ile klorhekzidin ve benzalkonyum klorür solüsyonlarının *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* üzerine bakterisidal etkinliğini inceledikleri çalışmada, klorhekzidin solüsyonunun %0.5, %0.25, %0.1, %0.05, %0.02 ve %0.01'lik konsantrasyonları 2.5 dakika içinde *S. aureus*'lar için bakterisidal olarak etkili bulunmuştur. Benzalkonyum klorür solüsyonunun %0.001'lik ve %0.0005'lik konsantrasyonları 60 dakikada bile etkisiz bulunurken %0.25, %0.125, %0.005, %0.0025'lik konsantrasyonları 2.5 dakikada bakterisidal olarak etkili bulunmuştur. Sonuçta kuarterner amonyum bileşiklerinin klorhekzidinden daha az bakterisidal etkili olduğu belirtilmiştir. Benzer şekilde klorhekzidin ve benzalkonyum klorür solüsyonunun %0.1 ve %1'lik konsantrasyonlarının MRSA'lar üzerindeki 30 saniyedeki bakterisidal etkinliğini incelediğimiz çalışmamızda, %1'lik konsantrasyonlar tüm bakteri suşlarında bakterisidal etkili bulunurken, %0.1'lik konsantrasyonlarda bir kuarterner amonyum bileşiği olan benzalkonyum klorür klorhekzidinden daha az bakterisidal etkili bulunmuştur.

Ekizoğlu⁽¹⁷⁾ çalışmasında Gazi Üniversitesi ve Haccetepe Üniversitesi hastanelerinden izole ettiği bakterilerde klorheksidin solüsyonunun bakterisidal etkinliğini incelemiş, hastane suşu *S. aureus*'larda klorheksidin solüsyonunun önerilen %1'lik kullanım konsantrasyonunun 5 dakikada bakterisidal etkili olduğunu belirtmiştir. Çakır⁽¹³⁾ Gazi Üniversitesi hastanesinden izole ettiği bakterilerde klorheksidin solüsyonunun %1'lik ve %10'luk konsantrasyonlarının bakterisidal etkinliğini incelemiş, metisiline duyarlı ve metisiline dirençli *S. aureus* suşlarının hepsinde klorheksidin solüsyonunun 1 dakikada %1 ve %10'luk konsantrasyonlarını bakterisidal olarak etkili bulmuşlardır. Aynı hastaneden hastane infeksiyonu etkeni olarak izole ettiğimiz MRSA'larda klorheksidin solüsyonunun üretici firma tarafından önerilen %1'lik kullanım konsantrasyonu ve 10 kat sulandırımının 30 saniyede bakterisidal etkili olduğu tespit edilmiştir. Daha çok sayıda bakteri suşu üzerinde yapılan çalışmamız hastanemiz dezenfeksiyon politikası açısından oldukça anlamlı bulunmuştur.

Biyosit ve antibiyotik direnci arasında bir bağlantı olduğu üzerinde çok düşünülen ve çalışılan bir konudur. Bakterilerde bu maddelerin hedef bölgeleri farklılık gösterse de direnç gelişim mekanizmaları doğal ve kazanılmış direnç başlıkları altında benzer olduğundan dolayı bu maddelerden birine dirençli olan bakterilerin seçilimi sonucu ortak direnç özelliği taşıyan bir diğerine de direnç probleminin olacağı düşünülmektedir. Bu konuyla ilgili olarak antibiyotiklere dirençli bakterilerin biyositlere

duyarlı bakterilerin seçilimi ile olduğu, biyositlere dirençli olan bakterilerin antibiyotiklere dirençli olabilecekleri, biyositlerin antibiyotiklere dirençli bakterilerin seçimine neden olabileceği, biyositlerin klinik uygulama girmesiyle antibiyotik direncinin gelişebileceği düşünülmektedir. Ancak antibiyotiklere dirençli bakterilerin biyositlerin kullanım konsantrasyonlarına dirençli olmadıkları gösterilmiştir. Bakterilerde biyosit maddelere karşı görülen azalan duyarlılık yada artan direnç durumu antibiyotik maddelere dirence bağlı yada bağımsız olabilir, bu direnç birlikteliğinde ortak mekanizma özgül olmayan bir şekilde dış membran permeabilitesinin azalmasına bağlı alınının azalmasıyla ilişkili olabilir^(56,58,60).

Sonuç olarak değişik fizik ve kimyasal çevre şartlarına uyum sağlayabilen mikroorganizmalar yaygın kullanımları olan dezenfektan maddelere dirençli hale gelebilirler. Dezenfektan maddelere karşı artmış MİK değerlerinin belirleme dezenfektan maddenin bakterisidal etkisinde fazla bir değişiklik meydana getirmediğinden klinik olarak önemli değildir. Dezenfektan ve antibiyotik direnci arasında çapraz reaksiyonlar olabilirliği şüphesi ile bu konu üzerinde durulmaktadır.

MRSA'larda dezenfektan direnci gittikçe artan bir şekilde tanımlanmaktadır. Direnç oluşumundaki olası mekanizmalar dışarı atılım, hedef bölge değişimi ve hücre duvarı değişimine bağlı alınının azalması

şeklinde tanımlanmaktadır. Özellikle dışarı atılım yoluyla direnç gelişimi oldukça önemlidir. *qacA/B* geni MRSA'lar da en önemli antiseptik ve dezenfektan direnç geni olarak da bilinmektedir ve biyosit dışarı atılımıyla görevli proteinleri kodlamaktadır. Bu sebeple bakterilerin direnç geni taşıyıp taşımadığını ve sahip olunan genlerin fenotipik yansımalarının olup olmadığını bilmek bu bakteri kaynaklı hastane infeksiyonlarının önlenmesinde önemlidir. Eğer biyosit direnci giderek artan şekilde yaygınlaşır ve antibiyotik direnci de buna bağlantılı bir şekilde eşlik ederse tedavi edilemeyen infeksiyonların artışı izlenebilir. Biyosit direnci transfer edilebilir özellikle olduğundan, yetersiz dekontaminasyon sonucu çapraz infeksiyonların oluşumuna sebep olabileceğinden dolayı riskli bir durumdur. Ayrıca biyosit direnci antibiyotik direnciyle ilgili olabilir bu sebeple de önemlidir.

5. SONUÇ

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarına Mayıs 2005- Haziran 2006 tarihleri arasında gönderilen klinik örneklerden hastane infeksiyonu etkeni olarak izole edilen 69 adet metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)'lar da *qacA/B* dezenfektan direnç geninin varlığı ve dağılımı araştırıldı. %11.5 oranında *qacA/B* dezenfektan direnç geni pozitifliği tespit edildi.

MİK ve kantitatif süspansiyon testleri yapılarak, benzalkonyum klorür ve klorhekzidinin bakteriyostatik ve bakterisidal etkileri belirlendi, *qacA/B* direnç genlerin fenotipik olarak dezenfektan direncine yol açıp açmadığı veya ne ölçüde yol açtığı da araştırıldı. Klorhekzidin solüsyonunun %0.1'lik konsantrasyonunun etkili olduğu 67 hastane suşunun %59.70'inde klorhekzidin için MİK değeri 2 µg/ml, %40.30'unda ise 2 µg/ml'nin üzerinde bulundu. Benzalkonyum klorür solüsyonunun %0.1'lik konsantrasyonunun etkili olduğu 62 hastane suşunun %50'sinde benzalkonyum klorür MİK değeri 2 µg/ml, %50'de ise 2 µg/ml'nin üzerinde bulundu. Bu sonuçlar dikkate alındığında artmış MİK değerleri ile bakterisidal etki arasında bir ilişki bulunamadı.

Sonuç olarak çalışmamızda polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile *qacA/B* geni pozitifliği tespit ettiğimiz MRSA suşlarının hepsi için

klorhekzidin ve benzalkonyum klorür solüsyonunun %0.1'lik konsantrasyonları bakterisidal etkili bulundu. Klorhekzidin ve benzalkonyum klorür solüsyonlarının üretici firmaların dezenfektan amaçlı kullanım için önerdikleri %1'lik konsantrasyon ve 10 kat sulandırımı *qacA/B* direnç geni bulunan bakteriler ve yüksek MİK değerine sahip olan bakterilerde bakterisidal olarak etkili bulundu. Direnç genlerinin ve artmış MİK değerlerinin direnç fenotipine yansımadıkları sonucuna varıldı.

ÖZET

Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) tüm dünyada hastane infeksiyonları etkenleri arasında önemli bir yere sahiptir. Klinik olarak kanıt bulunmasa da MRSA'ların antiseptik ve dezenfektan maddelere direnç gösterdikleri bilinmektedir. *qacA/B* geni bazı dezenfektanlara dirençli klinik MRSA türlerinde bulunabilmektedir. Bu çalışmada hastane infeksiyonu etkeni olduğu tespit edilmiş MRSA suşlarında *qacA/B* direnç genlerinin varlığı ve bu genlerin fenotipik olarak dezenfektan direncine yol açıp açmadığı araştırılmıştır.

MRSA türleri Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarından Mayıs 2005 – Haziran 2006 tarihleri arasında izole edildi. MRSA suşlarında 8/69 (%11.5) oranında *qacA/B* pozitifliği tespit edildi. MRSA suşlarında benzalkonyum klorür ve klorheksidin için minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) belirlendi. MİK değerleri MRSA suşlarında benzer şekilde 2 – 8 µg/ml arasında bulundu. Kantitatif suspansiyon testi yapılarak klorheksidin ve benzalkonyum klorür antiseptik solüsyonlarının bakterisidal etkileri incelendi. Bu antiseptik maddelerin %1'lik ve %0.1'lik konsantrasyonları bakterisidal etkili bulundu.

Sonuç olarak *qacA/B* direnç genleri bulunan bakteri suşlarında antiseptik solusyonların klinik kullanım konsantrasyonlarına direnç bulunamadı.

TITLE

DETERMINATION OF DISINFECTANT RESISTANT GENES *qacA/B* IN
NOSOCOMIAL METHICILLIN-RESISTANT ISOLATES OF
STAPHYLOCOCCUS AUREUS

SUMMARY

Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) remains an important cause of hospital-acquired infections worldwide. Although there is no adequate evidence in clinical practice so far, it is known that MRSA shows resistance to some antiseptics and disinfectants. The *qacA/B* genes identified in clinical MRSA strains confer resistance to some disinfectants. In this study, we aimed to investigate *qacA/B* resistance genes in nasocomial MRSA isolates and also to determine whether these genes cause disinfectant resistance phenotypically.

The MRSA strains were isolated between May 2005 and June 2006 in the Clinical Microbiology Laboratory in Gazi University of Medical Hospital. The *qacA/B* genes were found in 8/69 *S. aureus* isolates (11.5%). We performed benzalkonium chloride and chlorhexidine minimum inhibitory concentrations (MIC) on MRSA isolates. Benzalkonium chloride and chlorhexidine MIC values for MRSA isolates were found between 2 – 8 µg/ml. Quantitative suspension tests were performed to assess the bactericidal efficacy of the chlorhexidine and benzalkonium chloride antiseptic solutions. The antiseptics were found bactericidal for the isolates at the concentrations of 1% and 0.1%.

Finally, the presence of the *qacA/B* genes did not cause the isolates to be resistant to the antiseptic solutions at the concentrations used in clinical practice.

KAYNAKLAR

1. ABBASOĞLU, U.: Dezenfektan Direncini Belirleyen Testlere Global Bir Bakış. Hangi Testler Hangi Sıra İle yapılmalıdır? En Ucuz ve En Kesin Sonuç Nasıl Elde Edilir?, 4. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi Kitabı, (GÜNAYDIN, M., SANIÇ, A., GÜRLER, B.), 715-726, Bilimsel Tıp, Samsun, (2005)
2. AKIMITSU, N., HAMAMOTO, H., INOUE, R., SHOJI, M., AKAMINE, A., TAKEMORI, K., HAMASAKI, N., SEKIMIZU, K.: Increase in Resistance of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* to β -Lactams Caused by Mutations Conferring Resistance to Benzalkonium Chloride, A Disinfectant Widely Used in Hospital, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(12), 3042-3043. (1999)
3. AL-MASAUDI, S. B., DAY, M. J., RUSSELL, A. D.: Sensitivity of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains to Some Antibiotics, Antiseptics, and Disinfectants, *Journal of Applied Bacteriology*, 65, 329-337. (1988)
4. ANTHONISEN, I. L., SUNDE, M., STEINUM, T. M., SIDHU, M. S., SORUM, H.: Organization of The Antiseptic Resistance Gene *qac A* and *Tn552*-Related β -Lactamase Genes in Multidrug-Resistant *Staphylococcus haemolyticus* Strains of Animal and Human Origins, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46 (11), 3606-3612. (2002)

5. BOCK, C., FURMAN, M.: Association Between Intensity of Chlorhexidine Use and Micro-organisms of Reduced Susceptibility in a Hospital Environment, *Journal of Hospital Infection*, 51, 201-206. (2002)
6. BOYCE, J.M.: MRSA Patient: Proven Methods to Treat Colonization and Infection, *Journal of Hospital Infection*, 48 (Supplement A), 9-14. (2001)
7. CAMPANAC, C., PINEAU, L., PAYARD, A., BAZIARD-MOUYSSET, G., ROQUES, C.: Interactions Between Biocide Cationic Agents and Bacterial Biofilms, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(5), 1469,1474. (2002)
8. CENGİZ, A.T.: Staphylococcus, Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, (USTAÇELEBİ, Ş.), 339-347, Güneş Kitapevi, Ankara, (1999)
9. CHAPMAN, J. S.: Characterizing Bacterial Resistance to Preservatives and Disinfectants, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41, 241-245. (1998)
10. CHAPMAN, J. S.: Biocide Resistance Mechanisms, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51, 133-138. (2003)
11. CHAPMAN, J. S.: Disinfectant Resistance Mechanisms, Cross-Resistance and Co-Resistance, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51, 271-276. (2003)
12. COOKSON, B. D., BOLTON, M. C., PLATT, J. H.: Chlorhexidine Resistance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* or just an Elevated MIC? An In-Vitro and In-Vivo Assessment, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35(10), 1997-2002. (1991)

13. ÇAKIR, F. Ö.: Hastaneden İzole Edilen Dirençli Bakteri Suşlarının Bazı Dezenfektanlara Duyarlılıklarının Araştırılması, Uzmanlık Tezi, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, (2004)
14. DENYER, S.P., STEWART, G.S.A.B.: Mechanisms of Action of Disinfectants, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 41, 261-268. (1998)
15. DÜNDAR, V.: Metisiline Dirençli Stafilokok Enfeksiyonları, *Klinik Dergisi*, 13, 26-27. (2000)
16. FARAISE, A. P.: Susceptibility of Antibiotic-Resistant Cocci to Biocides, *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, 92, 158-162. (2002)
17. EKİZOĞLU, M., Hastaneden İzole Edilen Çeşitli Bakterilerin Bazı Antiseptik / Dezenfektan Maddelere Duyarlılıklarının Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara (2000)
18. GIBSON, H., ELTON, R., PETERS, W., HOLAH, J. T.: Surface and Suspension Testing: Conflit or Complementary, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 375-384. (1995)
19. GILBERT, P., McBAIN, A.: Potential Impact of Increase Use of Biocides in Consumer Products on Prevalence of Antibiotic Resistance, *Clinical Microbiology Reviews*, 16(2), 189-208. (2003)

20. GÜL, M., ÇIRAGİL, P., ARAL, M.: Kahraman Maraş Sütçü İmam Üniversitesi Hastane personelinde Burun ve El *Staphylococcus aureus* Taşıyıcılığı, Aknem Dergisi, 18(1), 36-39. (2004)
21. GÜNERİ, S., KAYALI, F., TAŞLI, H., COŞAR, G.:The In-Vitro Antimicrobial Activities of Certain Antiseptics and Disinfectants, İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection), 11(4), 365-370. (1997)
22. GRKOVIC, S., BROWN, M. H., ROBERTS, N. J., PAULSEN, I. T., SKURRAY R. A.: Qac R Is a Repressor protein That Regulates Expression of The *Staphylococcus aureus* Multidrug Efflux Pump Qac A, The Journal of Biological chemistry, 273 (29), 18665-18667. (1998)
23. HEIR, E., SUNDHEIM, G., HOLCK, A.L.: Identification and Characterzation of Quaternary Ammonium Compound Resistant Staphylococci from The Food Industry, International Journal of Food Microbiology, 48, 211-219. (1999)
24. HEIR, E., SUNDHEIM, G., HOLCK, A. L.: The qac G Gene on Plasmid pST94 Confers Resistance to Quarternary Ammonium Compounds in Staphylococci Izolated from Food Industry, Journal of Applied Microbiology, 86, 378-388. (1999)
25. HUANG, J., O'TOOLE, P. W., SHEN, W., AMRINE-MADSEN, H., JIANG, X., LOBO, N., PALMER, L. M., VOELKER, L., FAN, F., GWYNN, M. N., McDEVITT, D.: Novel Chromosomally Encoded Multidrug Efflux Transporter MdeA in *Staphylococcus aureus*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 48 (3), 909-97. (2004)

26. IRIZARRY, L., MERLIN, T., RUPP, J., GRIFFITH, G.: Reduced Susceptibility of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* to Cetylpyridinium Chloride and Chlorhexidine, *Chemotherapy*, 42, 248-252. (1996)
27. JOHNSTON, M. D., SIMONS, E. A., LAMBERT, R. J. W.: One Explanation for The Variability Of The Bacterial Suspension Test, *Journal of Applied Microbiology*, 88, 237-242. (2000)
28. KALELİ, İ., ÖZEN, N., YALÇIN, A. N., AKŞİT, F.: Hastane Personelinde Burunda *Staphylococcus aureus* Taşıyıcılığının Saptanması, *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection)*, 11(3), 243-245. (1997)
29. KOBAYASHI, H., TSUZUKI, M., HOSOBUCHI, K.: Brief Report: Bactericidal Effects of Antiseptics and Disinfectants Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 10(129), 562-564. (1989)
30. LAMBERT, R.J.W.: Susceptibility Testing: Inoculum Size Dependency of Inhibition Using The Colworth MIC Technique, *Journal of Applied Microbiology*, 89, 275-279. (2000)
31. LAMBERT, R. J. W., Comparative Analysis of Antibiotic and Antimicrobial Biocide Susceptibility Data in Clinical Isolates of Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus*, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* Between 1989 and 2000, *Journal of Applied Microbiology*, 97, 699-711. (2004)

32. LAMBERT, R. J. M., PEARSON, J.: Susceptibility Testing: Accurate and Reproducible Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Non-Inhibitory Concentration (NIC) values, *Journal of Applied Microbiology*, 88, 784-790. (2000)
33. LITTLEJOHN, T. G., DIBERARDINO, D., MESSEROTTI, L. J., SPIERS, S. J., SKURRAY, R. A.: Structure and Evolution of a Family of Genes Encoding Antiseptic and Disinfectant Resistance in *Staphylococcus aureus*, *Gene*, 101, 59-66. (1990)
34. LITTLEJOHN, T. G., PAULSEN, I. T., GILESPIE, M. T., TENNET, J. M., MIDGLEY, M., JONES, I. G., PUREWAL, A. S., SKURRAY, R. A.: Substrate specificity and Energetics of Antiseptic and Disinfectant Resistance in *Staphylococcus aureus*, *FEMS Microbiology Letters*, 95, 259-266. (1992)
35. MAYER, S., BOOS, M., BEYER, A., FLUIT, A. C., SCHMITZ, F. J.: Distribution of The Antiseptic Resistance Genes *qac A*, *qac B*, and *qac C* in 497 Methicillin-Resistance and -Susceptible European Isolates of *Staphylococcus aureus*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47, 896-897. (2001)
36. McBAIN, A. J., LEDDER, R. G., MOORE, L. E., CATRENICH C. E., GILBERT P.: Effects of Quarternary-Ammonium-Based Formulations on Bacterial Community Dynamics and Antimicrobial Susceptibility, *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (6), 3449-3456. (2004)

37. McDONNELL, G., RUSSELL, A.D.: Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance, *Clinical Microbiology Reviews*, 12 (1),147-179. (1999)
38. MITCHELL, B. A., BROWN, M. H., SKURRAY R. A.: Qac A Multidrug Efflux Pump from *Staphylococcus aureus*: Comparative Analysis of resistance to Diamidins, Biguanidines, and Guanyldihydrazones, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42 (2), 475-477. (1998)
39. MITCHELL, B. A., PAULSEN, I. T., BROWN, M. H. SKURRAY, R. A.: Bioenergetics of the Staphylococcal Multidrug Export Protein Qac A, *The Journal of Biological Chemistry*, 274(6), 3541-3548. (1999)
40. NOGUCHI, N., HASE, M., KITTA, M., SASATSU, M., DEGUCHI, K., KONO, M.: Antiseptic Susceptibility and Distribution of Antiseptic-Resistance Genes in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, *FEMS Microbiology Letters*, 247-253. (1999)
41. NOGUCHI, N., NAKAMINAMI, H., NISHIJIMA, S., KUROKAWA, I., SO, H., SASATSU, M.: Antimicrobial Agent of Susceptibilities and Antiseptic Resistance Gene Distribution Among Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates From Patients With Impetigo and Staphylococcal Scalded Skin Syndrome, *Journal of Clinical Microbiology*, 44(6), 2119-2125. (2006)
42. NOGUCHI, N., SUWA, J., NARUI, K., SASATSU, M., ITO, T., HIRAMATSU, K., SONG, J.H.: Susceptibilities to Antiseptic Agents and Distribution of Antiseptic-Resistance Genes *qacA/B* and *smr* of Methicillin-

- Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated in Asia During 1998-1999, Journal of Medical Microbiology, 54, 557-565. (2005)
43. OIE, S., HUANG, Y., KAMIYA, A., KONISHI, H., NAKAZAWA, T.: Efficacy of Disinfectants Against Biofilm Cells of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, Microbios, 85, 223-230. (1996)
44. ÖNCÜL, O, ERDEMOĞLU, A, ÖZSOY, M. F., ALTUNAY, H., ERTEM, Z., ÇAVUŞOĞLU, Ş.: Hastane Personelinde Nazal *Staphylococcus aureus* Taşıyıcılığı, Klimik Dergisi, 15(3), 74-77. (2002)
45. ÖZYURT, M.: Dezenfeksiyon ve Sterilizasyon Yöntemleri, Klimik Dergisi, 13, 41-48. (2000)
46. PAULSEN, I. T., BROWN M, H., LITTLEJOHN, T. G., MITCHELL, B. A., SKURRAY, R. A.: Multidrug Resistance Proteins Qac A and Qac B from *Staphylococcus aureus*: Membrane Topology and Identification of Residues Involved in Substrate Specificity, Proc. Natl. Acad. Sci.USA, 93, 3630-3635. (1996)
47. PAULSEN, I. T., BROWN, M. H., SKURRAY, R. A.: Proton-Dependent Multidrug Efflux, Microbiological Reviews, 60(4), 575-608. (1996)
48. PAULSEN, I. T., BROWN, M. H., SKURRAY, R. A.: Characterization of The Earliest Known *Staphylococcus aureus* Plasmid Encoding A Multidrug Efflux System, Journal of Bacteriology, 180(13), 3477-3479. (1998)
49. PAULSEN, I. T., SKURRAY, R. A.: Topology, Structure and Evolution of Two Families of Proteins Involved in Antibiotic and anticeptic Resistance in Eukaryotes and Prokaryotes-An Analysis, Gene, 124, 1-11. (1993)

50. POOLE, K.: Mechanisms of Bacterial Biocide and Antibiotic Resistance, *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, 92, 56-64. (2002)
51. POOLE, K.: Efflux-Mediated Antimicrobial Resistance, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56, 20-51. (2005)
52. PUTMAN, M., VEEN, H. W., KONINGS, W.: Molecular Properties of Bacterial Multidrug Transporters, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), 672-693. (2000)
53. REYBROUCK, G.: The Testing of Disinfectants, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41, 269-272. (1998)
54. RUSSELL, A. D.: Mechanism of Bacterial Resistance to Biocides, *International Biodeterioration*, 26, 101-110. (1990)
55. RUSSELL, A. D.: Possible Link Between Bacterial Resistance and Use of Antibiotic and Biocides, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(8), 2151. (1998)
56. RUSSELL, A.D.: Do Biocides Select for Antibiotic Resistance?, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 52, 227-233. (2000)
57. RUSSELL, A.D.: Biocides and Pharmacologically Active Drugs as Residues and in The Enviroment: Is There A Correlation with Antibiotic Resistance?, *Am. J. Infect. Control*, 30, 495-498. (2002)
58. RUSSELL, A.D.: Antibiotic and Biocide Resistance in Bacteria: Comment and Conclusions, *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, 92, 171S-173S. (2002)

59. RUSSELL, A.D.: Mechanisms of Antimicrobial Action of Antiseptics and Disinfectants: an Increasingly Important Area of Investigation, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49, 597-599. (2002)
60. RUSSELL, A.D.: Introduction of Biocides into Clinical Practice and The Impact on Antibiotic-resistance Bacteria, *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, 92, 121-135. (2002)
61. RUSSELL, A.D.: Similarities and Differences in The Responses of Microorganismis to Biocides, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52, 750-763. (2003)
62. RUSSELL, A.D.: Biocide Use and Antibiotic Resistance: The Relevance of Laboratory Findings to Clinical and Enviromental Situations, *The Lancet Infectious Diseases*, 3, 794-803. (2003)
63. RUSSELL, A.D.: Bacterial Adaptation and Resistance to Antiseptics, Disinfectants and Preservatives is Not A New Phenomenon, *Journal of Hospital Infection*, 57, 97-104. (2004)
64. RUSSELL, A. D., DAY, M. J.: Antibacterial Activity of Chlorhexidine, *Journal of Hospital Infection*, 25, 229-238. (1993)
65. RUSSELL, A. D., DAY, M.J.: Antibiotics and Biocide Resistance in Bacteria, *Microbios*, 85, 45-65. (1996)
66. RUTALA, W.A., BARBEE, S. L., AGILAR, N. C., SOBSEY, M. D., WEBER, D. J.:Antimicrobial Activity of Home Disinfectants and Natural Products Against Potential Human Pathogens, *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 21(1), 33-38. (2000)

67. RUTALA, W. A., STIEGEL, M. M., SARUBBI, F. A., WEBER, D. J.: Susceptibility of Antibiotic-Susceptible and Antibiotic-Resistant Hospital Bacteria to Disinfectants, *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 18(6), 417-421. (1997)
68. SCHUMACHER, M. A., BRENNAN, R. G.: Structural Mechanisms of Multidrug Recognition and Regulation by Bacterial Multidrug Transcription Factors, *Molecular Microbiology*, 45(4), 885-893. (2002)
69. SULLER, M. T. E., RUSSELL, A. D.: Antibiotic and Biocide Resistance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Vancomycin-Resistant Enterococcus, *Journal of hospital Infection*, 43, 281-291. (1999)
70. SULTAN, N.: Dezenfektanların Mikroorganizma Üzerine Etkinliğinin Ölçümü ve Pratiksel Önemi, Sterilizasyon ve Dezenfeksiyon Hastane Enfeksiyonları 2002 Kitabı, (GÜNAYDIN, M., SANIÇ, A., GÜRLER, B., LEBLEBİCİOĞLU, H.), Samsun Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Derneği Simad Yayını, No:1. (2002)
71. SUNDHEIM, G., LANGSRUD, S., HEIR, E., HOLK, A. L.: Bacterial Resistance to Disinfectants Containing Quaternary Ammonium Compound, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41, 235-239. (1998)
72. TENNET, J. M., LYON, B. R., GILLESPIE, M. T., MAY, J. W., SKURRAY, R. A.: Cloning and Expression of *Staphylococcus aureus* Plasmid-Mediated Quaternary Ammonium Resistance in *Escherichia coli*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 27(1), 79-83. (1985)

73. YAMAMOTO, T., TAMURA, Y., YOKOTA, T.: Anticectic and Antibiotic Resistance Plasmid in *Staphylococcus aureus* That Possesses aġabeylity to Confer Chlorhexidine and Acrinol Resistance, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32(6), 932-935. (1988)
74. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide&itool=olbar>
75. Performance Standards for Antimicrobial Disk SusceptibilityTests; Approved Standard-Ninth Edition, Clinical and Laboratory Standards Institute, M2 – A9, 26(1), (2006)

ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Ankara’da doğdum. 1984 – 1991 yılları arasında ilk öğrenimimi İğsaş ilkokulu ve İzmit Merkez ortaokulunda tamamladım. 1991 – 1994 yılında İzmit lisesinde lise eğitimimi tamamladım. 1995 yılında İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümünde lisans eğitimine başladım. 1999 yılında “*Romatoid Artrit Hastalığının İmmünogenetiği*” konulu tez çalışmasını yaparak lisans eğitimimi tamamladım ve Tıbbi Biyolog ünvanını aldım. 1999 yılında Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsüne bağlı olarak Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans programına başladım. 2001 yılında “*Gaita Örneklerindeki Protozoon Kistlerinin Trichrome Boyası Kullanılarak Değerlendirilmesi*” konulu tez çalışmasını yaparak yüksek lisans eğitimimi tamamladım ve Bilim Uzmanlığı ünvanını aldım. 2001 yılında Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsüne bağlı olarak Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Doktora programına başladım. 2006 yılında “*Hastane İnfeksiyonu Etkeni Olarak İzole Edilen Metisiline Dirençli Staphylococcus aureus Suşlarında qacA/B Dezenfektan Direnç Genlerinin Araştırılması*” konulu tez çalışmasını tamamladım. 2005 yılından beri İzmit Kızılay Tıp Merkezi Laboratuvarında çalışmaktayım.